



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Marques de Carvalho

**Estudo dos mecanismos de modulação da resposta imune celular
patógeno-específica em indivíduos infectados pelo
Mycobacterium leprae.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Rio de Janeiro

2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Marques de Carvalho

**Estudo dos mecanismos de modulação da resposta imune celular
patógeno-específica em indivíduos infectados pelo
Mycobacterium leprae.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
doutora em Ciências na área de Imunologia e
Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Rio de Janeiro

2017

Carvalho, Fernanda Marques de.

Estudo dos mecanismos de modulação da resposta imune celular patógeno-específica em indivíduos infectados pelo *Mycobacterium leprae*. / Fernanda Marques de Carvalho. - Rio de Janeiro, 2017.

112 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Maria Cristina Vidal Pessolani.

Bibliografia: f. 78-95

1. Proteção contra hanseníase. 2. Vacinação com BCG. 3. Peptídeos específicos . 4. *Mycobacterium leprae*. 5. Resposta imune específica. I. Título.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Marques de Carvalho

**Estudo dos mecanismos de modulação da resposta imune celular
patógeno-específica em indivíduos infectados pelo
Mycobacterium leprae.**

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 13/11/2017.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira - Instituto Oswaldo Cruz -Presidente

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Francisco Carlos Félix Lana - Universidade Federal de Minas Gerais

SUPLENTE:

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro - Instituto Oswaldo Cruz / Revisora

Prof. Dra. Wania Ferraz Pereira Manfro - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 13 de novembro de 2017.

Que darei eu ao Senhor por todos os benefícios que me tem feito? sl 116:12 Louvar-te-
ei, Senhor, de todo meu coração; contarei todas as tuas maravilhas! sl 9:1.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor e consumidor da minha fé.

À Dra. Maria Cristina Pessolani e ao Dr. Geraldo Pereira por todos esses anos de orientações que foram conduzidos com maestria. Com certeza os conselhos e correções foram fundamentais na minha caminhada. Agradeço também pelas oportunidades, por sempre me incentivarem e pela paciência. Com toda minha admiração e respeito: Muito Obrigada!

À Dra. Luciana Rodrigues e à Dra. Iris Alvim que participaram da primeira etapa desse trabalho e foram fundamentais a sua realização. Obrigada por todas as correções e ajuda com análise e aquisição das amostras.

À Dra. Euzenir Nunes Sarno por me ajudar cuidadosamente a selecionar cada paciente, por seus conselhos, paciência e por sua amizade.

Ao Dr. José Augusto Nery por sua paciência em conduzir o retorno dos contatos mesmo quando sua agenda estava cheia, por sua ajuda no recrutamento e seleção dos pacientes.

À Dra. Roberta Olmo por toda a sua paciência durante a primeira etapa do trabalho, principalmente quanto ao recrutamento dos contatos, por dividir comigo as amostras dos contatos e por ser a revisora deste trabalho.

À Dra. Nádia Duppre pelo auxílio no recrutamento dos contatos e correções da primeira etapa do trabalho.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves pela realização dos testes estatísticos

Ao Dr. Flávio Alves Lara por sua imensa ajuda com as imagens de microscopia de fluorescência.

Aos doutores Francisco Lana, Herbert Guedes e Wânia Manfro por gentilmente aceitarem o convite para participar da banca e a Dra Verônica Shimitz que além de ter aceitado participar da banca, tem conduzido o recrutamento dos pacientes para a segunda etapa do trabalho.

Aos meus amigos de laboratório do Lamicel-sala 16: Vilma e Otto que são sempre um ombro amigo e estão dispostos a ajudar em todas as situações, a Dra. Mariana Gandini por sua ajuda nas análises de citometria da segunda etapa do trabalho e em especial à Natasha Cabral pela ajuda na execução e análise das amostras da segunda etapa desse trabalho.

Aos meus queridos amigos do Pavilhão de hanseníase: Márcia Berredo, Letícia Lery, Sabrina, Leonardo, João, Karina, Arthur, Katherine, Camila, Harrison, Thiago, Rhana, Leonardo Araújo, Eliane. E em especial à Lívia, André, Natasha Linhares, Débora, Chyntia, Robertha, Thabatta, Fabrício, Cristiana Macedo, Augusto e ao Sr. Sales.

A toda equipe do ambulatório Souza Araújo e em especial à Dra. Nádia, Dra. Ana Sales, Alex, Wellington, Cíntia, Ana e Cristiane.

Ao meu esposo, Roberto, pelo carinho, amizade, paciência, dedicação, por entender os momentos em que precisei ficar ausente e estar ao meu lado em todas as situações, principalmente as mais difíceis ao longo dessa caminhada. Por passar noites acordado comigo esperando terminar os experimentos, e por saber que posso contar com você em todos os momentos. Você foi e é o meu porto seguro. Não poderia esquecer de agradecer a nossa pipoquinha que passou tantas madrugadas acordada comigo!

À minha querida mãezinha Alice por sempre ter acreditado em mim, por todos os momentos difíceis que passamos juntas, pelo seu amor, conselhos, orações e apoio que foram essenciais ao longo dessa caminhada. Por também ser meu porto seguro e minha maior incentivadora. Ao meu pai Aristides por seu amor e preocupação.

Aos meus irmãos Fernando e Amélia por sempre terem acreditado em mim, pelo apoio, conselhos, orações, incentivo, amizade e paciência por entenderem os momentos que precisei ficar ausente. Aos meus sobrinhos Alexandre Jr, Anne e agora a Melissa por me retribuírem com tanto amor e admiração e por tornarem os meus dias mais felizes.

Às minhas primas Aline, Fabiane, Camila e Ângela e aos amigos Raquel, Laís, Carol, Aline, Rodrigo e Roberto por me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos pacientes de hanseníase e seus contatos. Toda a minha dedicação e esforço foi para vocês. Muito obrigada!!!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas e siglas.....	ix
	Lista de figuras.....	xi
	Lista de tabelas.....	xiii
	Resumo.....	xiv
	Abstract.....	xv
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A hanseníase e o estigma social.....	1
1.2	Distribuição geográfica e prevalência da hanseníase.....	4
1.3	<i>Mycobacterium leprae</i>	5
1.4	Transmissão.....	7
1.5	Formas clínicas na hanseníase.....	9
1.6	Diagnóstico e tratamento.....	12
1.7	A resposta imune na hanseníase.....	13
1.8	As células T reguladoras.....	17
1.9	Por que as pessoas têm hanseníase.....	22
1.10	Os contatos de pacientes com hanseníase multibacilar, o risco de adoecimento e a vacinação com BCG.....	24
1.11	A vacina com BCG e a indução da imunidade treinada.....	28
1.12	A modulação da resposta imune frente `a constante exposição ao <i>M. leprae</i> e a alta carga bacilar	31
2	HIPÓTESE	33
3	OBJETIVO.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	Seleção de indivíduos e Permissão ética.....	35
4.2	Desenho experimental.....	36
4.3	Estímulos.....	37
4.4	Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS).....	38
4.5	Ensaio de estimulação de CMS <i>in vitro</i> em cultura de 6 horas para análise fenotípica e 5 dias para dosagem de mediadores inflamatórios no sobrenadante.....	38

4.6	Ensaio de estimulação de CMS <i>in vitro</i> em cultura de 18 horas para análise fenotípica.....	39
4.7	Obtenção de linfócitos provenientes de fragmentos de pele obtidos por biópsia...	39
4.8	Análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo das CMS provenientes das culturas de 6 horas	40
4.9	Análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo das CMS provenientes das culturas de 18 horas.....	41
4.10	Imunofluorescência.....	42
4.11	Dosagem de mediadores por sistema multiplex.....	42
4.12	Análise dos dados.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	Desenho do estudo.....	44
5.2	Dados epidemiológicos dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares incluídos no estudo.....	45
5.3	Análise da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de memória central e efetora em resposta ao <i>M. leprae</i> em CMS de contatos domiciliares de pacientes multibacilares antes e após o tratamento do caso índice.....	46
5.3.1	Sequência de análises utilizadas para identificação das subpopulações de linfócitos CD4 ⁺ CD69 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ de memória central e de memória efetora.....	46
5.3.2	Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ de memória central e de memória efetora respondedores ao <i>M. leprae</i> em T0 e T1.....	49
5.3.3	Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ de memória central e memória efetora em resposta a peptídeos <i>M. leprae</i> específicos em T0 e T1.....	51
5.4	Análise de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes das culturas de CMS dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares estimuladas com <i>M. leprae</i> e peptídeos específicos do <i>M. leprae</i>	52
5.5	Avaliação de células T <i>M. leprae</i> específicas por citometria de fluxo em sangue periférico de pacientes com hanseníase.....	57

5.6	Avaliação de células T reguladoras por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência em lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	63
5.6.1	Frequência de células T reguladoras em lesões de pele de paciente multibacilares	63
5. 6.2	Células T reguladoras em lesões de pele de pacientes.....	64
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	77
8	REFERÊNCIAS	78
9	ANEXO	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.

AIMV	Meio Imunoterápico Adaptativo V
APC	Célula apresentadora de antígeno
APC	Alofococianina
APCCY-7	Alofococianina-cianina 7
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BB	Borderline borderline
BSA	Albumina de soro bovino
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BL	Borderline lepromatoso
BT	Borderline tuberculóide
CD	Grupo de diferenciação
CLA	Antígeno leucocitário humano
CMS	Células mononucleares sanguíneas
D.O	Densidade óptica
EC _{low}	Do inglês “endemic controls medium burden”
EC _{high}	Do inglês “endemic controls high burden”
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Foxp3	Forkhead Box P3
g	Força-G
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
HCMB	Do inglês “household contacts of multibacillary patients”
HCPB	Do inglês “household contacts of paucibacillary patients”
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
IB	Índice baciloscópio
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucinas

LL	Lepromatoso Lepromatoso
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago-1beta
NEC _{Brazil}	Do inglês “non-endemic controls, Brazil”
ND-O-BSA	natural dissacarídeo-octil-BSA
NIH/NIAID	Instituto Nacional de Saúde/Instituto nacional de alergia e doenças infecciosas
OMS	Organização Mundial de Saúde
P38-92	Peptídeos 38-92
PARK	Gene que codifica a proteína parkina
PACRG	Gene corregulado com parkina
PB	Paucibacilar
PDIM	Dimicocerosato ftiocerol
-PE	Ficoeritrina
PE/Cy7	Ficoeritrina Cianina 7
PGLs	Glicolipídeos fenólicos
PGL-1	Glicolipídeo fenólico 1
PQT	Poliquimioterapia
SEB	Enterotoxina B de <i>Stafilococcus aureus</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	Linfócito T helper 1
Th2	Linfócito T helper 2
TMB	Tetrametilbenzidina
TMM	Monomicolato trealose
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T reguladoras
T0	Início do tratamento do caso índice
T1	Durante o tratamento do caso índice

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1.1. Deformidades físicas causadas pela hanseníase.....	1
Figura 1.2. Hanseníase uma doença com forte estigma social.....	2
Figura 1.3. Distribuição geográfica de novos casos detectados em 2016 por 10 mil habitantes.....	4
Figura 1.4. Número de casos novos no Brasil em 2015.....	5
Figura 1.5. Infecção pelo <i>M. leprae</i> em três hospedeiros diferentes.....	8
Figura 1.6. Disseminação da hanseníase pelo mundo.....	9
Figura 1.7. Análise histopatológica de fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com hanseníase	10
Figura 1.8. Formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966).....	11
Figura 1.9. Representação esquemática dos possíveis fenótipos de células T envolvidos na patogênese da hanseníase.....	16
Figura 1.10. Mecanismos de supressão das células T reguladoras.....	20
Figura 1.11. Ciclo de transmissão do <i>M. leprae</i>	27
Figura 1.12. Diferença na ativação da memória imunológica clássica e a imunidade treinada.....	29
Figura 1.13. Modificações epigenéticas durante a imunidade treinada.....	30
Figura 1.14. Modelo da modulação negativa da produção de IFN- γ pelo <i>M. leprae</i> durante infecção assintomática e doença ativa.....	32
Figura 5.1. Desenho do estudo.....	44
Figura 5.2. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	47
Figura 5.3. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de memória central e de memória efetora positivas para CD69.....	48
Figura 5.4. Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ de memória central e de memória efetora respondedores ao <i>M. leprae</i> em T0 e T1.....	50
Figura 5.5. Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ de memória central e memória efetora respondedores a peptídeos <i>M. leprae</i> específicos em T0 e T1.....	51

Figura 5.6. Aumento da produção de mediadores inflamatórios em resposta ao <i>M. lepra</i> , e após o tratamento do caso índice e vacinação com BCG, em contatos de pacientes multibacilares.....	53
Figura 5.7. Produção individual de mediadores inflamatórios em resposta ao <i>M. leprae</i> em T0 e T1.....	54
Figura 5.8. Análise de componente principal.....	55
Figura 5.9. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	58
Figura 5.10. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos T reguladores <i>M. leprae</i> específicos e T convencionais de memória.....	59
Figura 5.11. Frequência de células T reguladoras <i>M. leprae</i> específicas e convencionais de memória em sangue periférico de pacientes com hanseníase.....	60
Figura 5.12. Frequência de células T reguladoras <i>M. leprae</i> específicas e convencionais de memória em sangue periférico de pacientes com hanseníase sem a interferência dos coestímulos.....	61
Figura 5.13. Razão das células T reguladoras <i>M. leprae específicas</i> e convencionais em sangue periférico de pacientes com hanseníase.....	62
Figura 5.14. Frequência de células T reguladoras em lesões de pele de pacientes multibacilares.....	63
Figura 5.15. Detecção de células T reguladoras e efetoras em lesões de pele de pacientes multibacilares por imunofluorescência.....	64
Figura 6.1. Padrão da resposta imune dos contatos de pacientes multibacilares antes e após a vacinação com BCG e o tratamento do caso índice.....	73

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 5.1. Dados epidemiológicos dos contatos de pacientes multibacilares.....	45
Tabela 5.2. Análise de componentes principais.....	56
Tabela 5.3. Dados epidemiológicos dos pacientes com hanseníase.....	57

RESUMO

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e permanece até os dias atuais como um problema de saúde pública. Os indivíduos com hanseníase multibacilar são considerados as principais fontes de disseminação do bacilo. Dessa forma, os contatos domiciliares de pacientes multibacilares constituem o grupo de indivíduos com maior risco de desenvolver a doença devido à superexposição ao *M. leprae*. O exame clínico dos contatos e à vacinação com o bacilo de Calmette-Guerin (BCG) constituem estratégias importantes para o controle da doença. O presente estudo teve como objetivo geral compreender os mecanismos de modulação negativa da resposta imune celular *M. leprae*-específica em indivíduos sadios com alta exposição ao bacilo e em pacientes com hanseníase. Este estudo foi realizado em duas etapas: 1) Análise do impacto do tratamento do caso índice e da vacinação com BCG no perfil fenotípico de subpopulações leucocitárias sanguíneas, e no padrão de citocinas produzidas em contatos de pacientes com a forma multibacilar; e 2) Avaliação das características de células T reguladoras (Tregs) presentes no sangue periférico e em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Também investigamos a expressão de fatores de transcrição relacionados ao perfil funcional de linfócitos T reguladores e convencionais nas lesões de pele. Observamos um aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central e efetora em resposta ao *M. leprae*, assim como um aumento significativo dos mediadores pró inflamatórios IL-1 β , IL-6, MIP-1 β , MCP-1, IL-17, TNF e IFN- γ após o tratamento do caso índice e a vacinação com BCG de contatos domiciliares de pacientes multibacilares. A partir dos dados obtidos, demonstramos que o tratamento do caso índice e consequente eliminação da fonte de *M. leprae* vivo no ambiente, juntamente com a vacinação com BCG, contribuíram para o aumento de resposta imune celular *M. leprae*-específica dos contatos de pacientes multibacilares avaliados. Reforçando a importância dessas duas medidas na proteção contra a hanseníase. Na segunda etapa do nosso trabalho, nossos dados preliminares mostraram a presença de células T regs em sangue periférico e em lesões de pele de pacientes multibacilares por citometria de fluxo. Também através de imunofluorescência detectamos a presença de células com fenótipo regulador em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Uma análise detalhada do fenótipo funcional das células presentes na lesão lepromatosa poderá contribuir na definição das populações celulares envolvidas na modulação negativa da resposta imune protetora contra o *M. leprae*.

ABSTRACT

Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) and remains as a public health problem. Individuals with multibacillary leprosy are considered the main sources of dissemination and transmission of the bacillus. Thus, the household contacts of patients with multibacillary leprosy are the group of individuals at higher risk of developing the disease due to overexposure to *M. leprae*. The clinical examination of the contacts combined with the Calmette-Guerin bacillus (BCG) vaccination are important strategies for the control of the disease. The present study aimed to understand the mechanisms of negative modulation of *M. leprae*-specific cellular immune response in healthy individuals with high exposure to bacillus and in patients with leprosy. This study was carried out in two stages: 1) Analysis of the impact of the treatment of the index case and BCG vaccination on the phenotypic profile of blood leukocyte subpopulations and the pattern of cytokines produced in household contacts of multibacillary leprosy patients; and 2) Evaluation of the characteristics of regulatory T cells (Tregs) present in peripheral blood and skin lesions in patients with leprosy. We also investigated the expression of transcription factors related to the functional profile of regulatory and conventional T lymphocytes in skin lesions. We observed an increase in central and effector memory CD4⁺ CD69⁺ T lymphocytes in response to *M. leprae*, as well as a significant increase in IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , MCP-1, IL-17, TNF and IFN- γ after treatment of the index case and BCG vaccination of household contacts of multibacillary leprosy patients. From the obtained data, it was possible to conclude that the treatment of the index case and consequent elimination of the source of live *M. leprae* in the environment, together with the vaccination with BCG, contributed for the increase of *M. leprae*-specific cellular immune response of the contacts of multibacillary patients evaluated. In the second stage of our study, our preliminary data showed the presence of regulatory T cells in peripheral blood and skin lesions of multibacillary patients by flow cytometry. Also through immunofluorescence we detected the presence of cells with regulatory phenotype in skin lesions of patients with leprosy. A detailed analysis of the functional phenotype of the cells present in the lepromatous lesion may contribute to the definition of the cellular populations involved in the negative modulation of the protective immune response against *M. leprae*.

1. Introdução

1.1- A hanseníase e o estigma social

A hanseníase é uma doença crônica causada por *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório, de crescimento lento que infecta preferencialmente macrófagos e células de Schwann (Kaufmann SH, Golecki JR, Kazda J, Steinhoff U. T 1989). O dano aos nervos periféricos resulta em deficiência sensorial e motora com deformidades características causando grande estigma social. O termo estigma foi criado pelos gregos para evidenciar algo de extraordinário ou negativo sobre seu *status* moral e assim possibilitavam que aquilo fosse facilmente identificado e evitado; uma marca imposta pela sociedade a um dos seus membros. O indivíduo que revelasse um comportamento diferente do grupo seria excluído, pois não se enquadraria nas características esperadas pela comunidade (Goffman E, 1980). O estigma na hanseníase é real e permanece até os dias atuais. A **figura 1.1** mostra as deformidades físicas deixadas pela doença, no entanto, a hanseníase possui tratamento e este iniciado rapidamente diminui os riscos de danos físicos aos pacientes.



Figura 1.1. Deformidades físicas causadas pela hanseníase. A) Residente de antigo leprosário na cerimônia pelos sete anos da lei que concede pensão especial às pessoas atingidas pela segregação (Fonte: [http://www.simers.org.br/2016/01/qualidade-de-vida-reduz-casos-mas-brasil-ainda-esta-longe-de-erradicar-hanseniose/acessado dia 30/09/2017](http://www.simers.org.br/2016/01/qualidade-de-vida-reduz-casos-mas-brasil-ainda-esta-longe-de-erradicar-hanseniose/acessado%20dia%2030/09/2017)). B-C) Deformidades nas mãos. Fontes: B - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leprosy_deformities_hands.jpg acessado dia 30/09/2017 / C- Semioblog Estudos de semiologia médica e história da medicina. Fonte: <http://semiologiamedica.blogspot.com.br/2013/01/a-mao-na-hanseniose.html> acessado dia 30/09/2017). D) Deformidades físicas em membros inferiores. (Fonte: <http://www.medicinenet.com/leprosy/article.htm> acessado em 30/09/2017).

Na idade média doentes não podiam frequentar igrejas, precisavam usar luvas e roupas especiais e carregavam sinos que anunciavam sua presença (**Figura 1.2A**). Devido à ausência de medicamentos eficazes, ao medo do contágio e às deformidades físicas evidentes, os indivíduos diagnosticados com a lepra eram encaminhados para instituições, longe das cidades, conhecidas como “leprosários” (**Figura 1.2B**) (Rocha Pinto, 1995). A sustentação científica para isolamento como forma de cuidado é do século XIX. Em 1897, na Primeira Conferência Internacional de Leprologia, realizada em Berlim, o médico Gerhard Armauer Hansen, propôs o isolamento como medida fundamental (Borenstein MS, 2008).



Figura 1.2. Hanseníase, uma doença com forte estigma social. A) Pacientes na idade média eram obrigados a portarem um sino para anunciar a sua presença (Fundação Oswaldo Cruz [www.ioc.fiocruz.br]. Hanseníase na história [acesso em 20/09/2017]. Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1182&sid=7>). B) Pessoas com hanseníase recém-chegadas em vagões fechados ao hospital-colônia Aimorés na década de 1930 – Acervo do departamento de profilaxia da lepra. Fonte <http://revistapesquisa.fapesp.br/2015/10/14/violencia-medo-e-preconceito/> acessado em 30/09/2017.

Uma vez no leprosário, esses indivíduos eram abandonados pela sociedade, família e amigos, e condenados a viver em um ambiente de privação de suas necessidades básicas e afetivas (Cunha AZS, 2002). A hanseníase é acompanhada por um forte estigma desde os mais remotos tempos, o que deixou marcas sociais e culturais que persistem. Os primeiros documentos que relatam a existência da hanseníase no Brasil são de 1696. O governador Artur de Sá e Menezes prestava assistência no Rio de Janeiro aos “miseros leprosos” já então em número apreciável e que sofriam com o grande estigma da doença. O estado de São Paulo, no início da década de 30, adotou o modelo de isolamento compulsório dos hansenianos. Em 1954 a Organização Mundial da Saúde (OMS) enviou uma comissão ao Brasil, que recomendou o fim do isolamento compulsório, a exemplo de outros países (Ferreira J. 1983). O Departamento de Dermatologia Sanitária, que tinha o objetivo de auxiliar no processo de redução do estigma em relação à doença, acreditava que o imenso resíduo de estigmatização da “lepra” estava ligado ao nome da doença (Opromolla D, 2000). Estas concepções ocasionaram um movimento no Brasil de substituição da nomenclatura da doença. Em 1976, com a aprovação do decreto nº 165, de 14 de maio de 1976, que muda o nome de “lepra” para hanseníase, o novo termo foi adotado no Brasil, sendo amplamente empregado em documentos técnicos-científicos. Porém, com a Lei Federal 1.010, de 1995, proibindo, terminantemente, a utilização do termo “lepra” e seus derivados foi que o termo hanseníase se tornou oficial.

1.2- Distribuição geográfica e prevalência da hanseníase

Dados da Organização Mundial da Saúde mostraram uma redução do número de casos diagnosticados de 2006 a 2015 (WHO, 2017). Porém a hanseníase ainda persiste como um problema de saúde pública em diversos países, como pode ser observado na **figura 1.3**. Em 2016 foram registrados 214.783 mil novos casos da doença no mundo refletindo o grau de transmissão contínua da infecção.

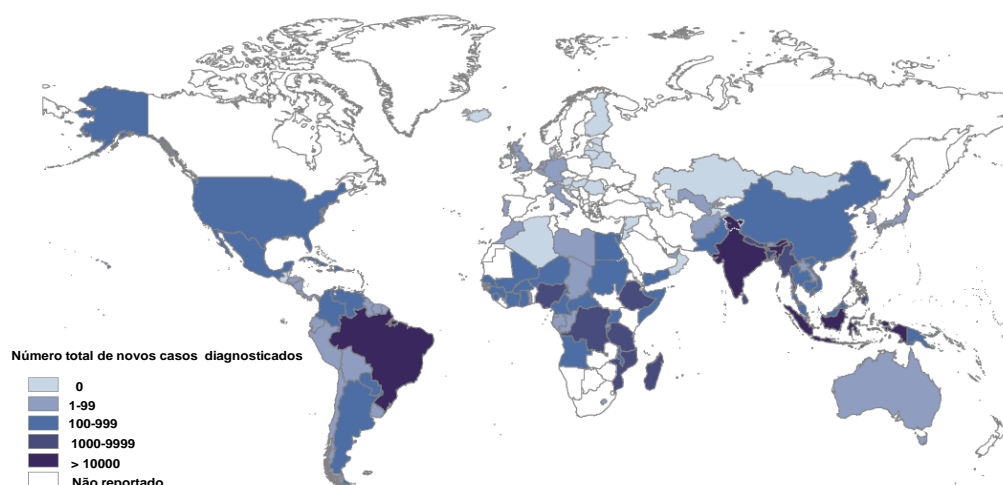


Figura 1.3 Distribuição geográfica de casos novos detectados em 2016 por 10 mil habitantes. World Health Organization/ National leprosy programmes WHO, 2017.

Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase no Brasil, algumas regiões demandam intensificação das ações para eliminação da doença, pois apresentam um alto padrão de endemicidade. O Brasil é o segundo país com maior número de casos contribuindo para 90% dos casos nas américas. No ano de 2015 foram detectados 28.761 novos casos no Brasil (**Figura 1.4**). 1880 pacientes já apresentavam incapacidades físicas decorrentes da doença no momento do diagnóstico (Sinan/SVS-MS). Neste mesmo ano, no estado do Rio de Janeiro, local onde desenvolvemos este trabalho apresentou uma taxa de detecção de 6,39 por 100.000 habitantes.

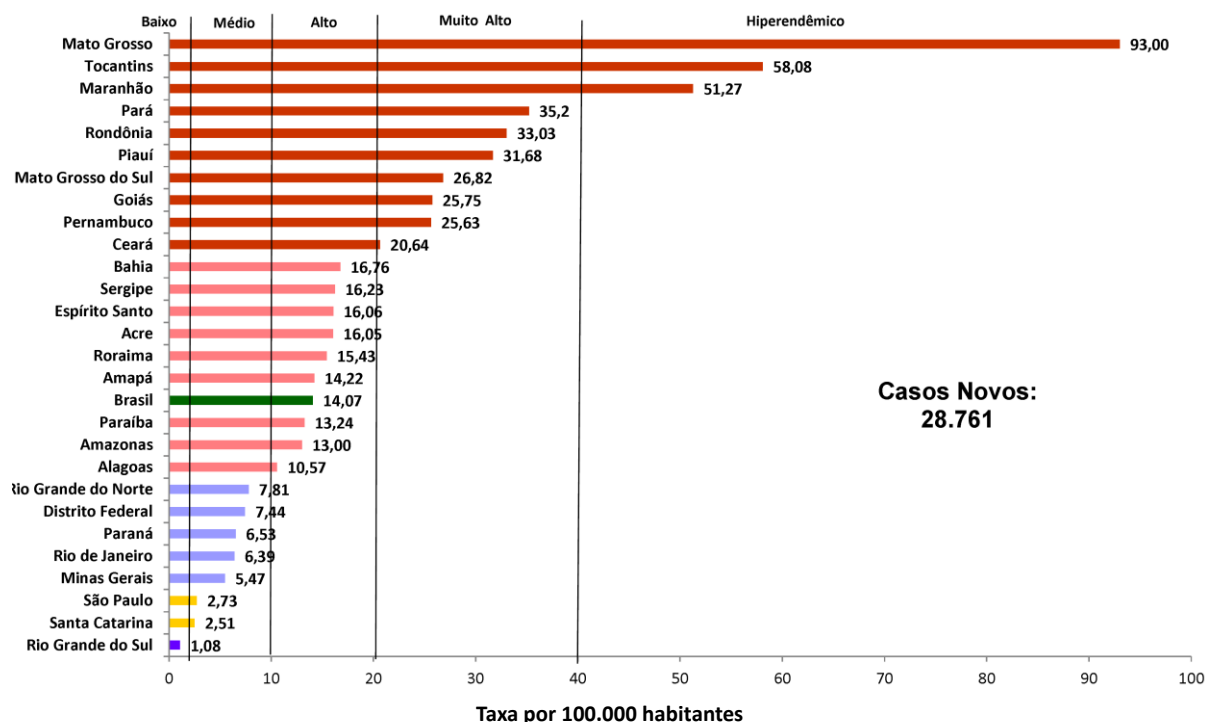


Figura 1.4. Número de casos novos no Brasil em 2015. Os estados foram classificados de acordo com a taxa de detecção. Baixa endemicidade representado pela cor lilás, média endemicidade representada pelas cores amarelo e azul, alta endemicidade representada pela cor rosa e regiões hiperendêmicas estão em vermelho. Fonte Ministério da Saúde, 2016.

1.3- *Mycobacterium leprae*

M. leprae foi descoberto em 1873 por Gerhard Henrick Armauer Hansen na Noruega. Este bacilo multiplica-se lentamente *in vivo*, por divisão binária, não sendo possível cultivá-lo *in vitro* até os dias atuais (Levy L, Ji B, 2006). Devido à ausência de modelos experimentais que mimetizem a doença e por não ser possível o cultivo de *M. leprae* em meios artificiais, a infecção em animais tem sido utilizada para obter o bacilo viável. O tatu de nove bandas, *Dasyus novencintus* é um hospedeiro suscetível à infecção e uma fonte de *M. leprae*, possibilitando o isolamento de grandes quantidades de bacilo para estudos bioquímicos e fisiológicos. Em 2001, Truman e Krahenbuhl demonstraram que embora seja possível obter um grande número de *M. leprae* de tatus infectados, uma melhor viabilidade de *M. leprae* é obtida quando este é recuperado da pata do camundongo (Truman RW, Krahenbuhl JL. 2001). Dessa forma, camundongos

atímicos representam um hospedeiro adequado, naturalmente sensível à infecção por *M. leprae* (Colston MJ, Hilson GR, 1976).

Quando comparado ao *M. tuberculosis*, o genoma de *M. leprae* apresenta uma redução evolutiva. Somente 49,5% do genoma de *M. leprae* correspondem a genes funcionais. A deleção de genes em *M. leprae* eliminou importantes atividades metabólicas incluindo produção de sideróforo, parte da cadeia respiratória anaeróbica e microaerófila e diversos sistemas catabólicos (Cole ST, et al. 2001). A perda massiva de genes e a presença de mutação em diversas áreas metabólicas pode explicar a dificuldade de se cultivar *M. leprae in vitro* até os dias atuais (Vissa VD, Brennan PJ, 2001). A parede celular de *M. leprae* é considerada um componente chave na interação do bacilo com o ser humano, seu principal hospedeiro natural. Apresenta uma rica variedade de ácidos micólicos e ácidos micoserósicos assim como glicolipídeos fenólicos (PGLS). O glicolipídeo fenólico I (PGL-I) é um glicolipídeo antigênico muito abundante e encontrado unicamente em *M. leprae* (Brennan PJ, Barrow WW, 1980; Hunter SW, Brennan PJ, 1981). PGL-I em si ou como parte de neoglicoproteínas semi-sintéticas contendo o dissacarídeo terminal sintético ou o trissacarídeo inteiro conjugado a albumina de soro bovino ou humano, tem sido de grande utilidade no diagnóstico sorológico, confirmando a forma multibacilar da doença. O PGL-I também está envolvido no tropismo de *M. leprae* pelas células de Schwann através de ligação à laminina. O PGL-I tem também um importante papel na regulação negativa da resposta imune e inflamatória, inibindo a maturação e ativação de células dendríticas e facilitando a persistência de *M. leprae* no hospedeiro (Spencer JS, Brennan PJ, 2011). O monitoramento dos níveis séricos de PGL-I é uma ferramenta importante no manejo dos contatos de pacientes com hanseníase (Duppre et al, 2012).

1.4- Transmissão

A hanseníase possui um longo período de incubação, com uma média de três anos e meio para a forma paucibacilar e até 10 anos para a forma multibacilar (Fine, 1982; Meima A, et al. 2004). A detecção da hanseníase em crianças e em indivíduos 20 anos após a permanência em uma área endêmica demonstra a grande variação no período de incubação do bacilo (Noordeen, 1994). Acredita-se que a transmissão ocorra principalmente através do contato de indivíduo para indivíduo e que *M. leprae* se dissemine através da inalação de aerossóis, ou pelo contato com secreções nasais e superfícies expostas da pele de pacientes multibacilares não tratados (Job CK et al. 2008). Silva e colaboradores observaram que *M. leprae* é capaz de infectar o epitélio alveolar e nasal de humanos, demonstrando que as vias aéreas constituem uma importante rota de entrada para *M. leprae* no corpo humano (Silva CAM, et al. 2013). Entretanto, diversos estudos têm demonstrado a possibilidade da hanseníase como uma zoonose (Joshua EL, et al. 2006; Domozych RE, et al. 2016; Sharma R, et al. 2013). Em 2011, Truman e colaboradores demonstraram por comparações genômicas que amostras de *M. leprae* isoladas de pacientes com hanseníase no Estado da Louisiana, nos Estados Unidos e de tatus desta região possuem sequências genômicas idênticas, pertencendo a uma única cepa responsável pela infecção nos dois hospedeiros. Recentemente foi descrita infecção por *M. leprae* em esquilos vermelhos residentes nas ilhas Britânicas. Neste trabalho também foi demonstrado que duas cepas de *M. leprae* envolvidas na infecção dos esquilos na Inglaterra são semelhantes à cepa encontrada no esqueleto de pacientes com hanseníase da Europa medieval. A presença de *M. leprae* nas Ilhas Britânicas, onde a doença foi eliminada há centenas de anos, demonstra que o patógeno pode persistir no meio ambiente, muito tempo após a eliminação do reservatório humano (Avanzi C, et al. 2016). Esses trabalhos demonstram que *M. leprae* é capaz de infectar pelo menos três diferentes hospedeiros: seres humanos, tatus e esquilos vermelhos (**Figura 1.5**).



Figura 1.5. Infecção pelo *M. leprae* em três hospedeiros diferentes. A) Similaridade entre as lesões de pele em patas de tatu e em pés humanos (Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB et al, 2013). (B) Características macroscópicas de esquilos infectados pelo *M. leprae* (Avanzi C, et al. 2016).

Lavania e colaboradores através de métodos moleculares, demonstraram a presença de *M. leprae* viável no solo de regiões hiperendêmicas para a hanseníase, no qual, poderia ajudar a explicar a dinâmica de infecção pelo bacilo (Lavania M, et al. 2008). Uma revisão sistemática da literatura reforça as evidências de transmissão zoonótica, contato pele a pele e aerossóis e gotículas contendo *M. leprae* no ambiente e subsequente infecção, através de poeira ou pequenas feridas, como opções possíveis de transmissão. Além disso, um estudo de infecção experimental realizado por pesquisadores do nosso laboratório demonstrou que barbeiros (*Rhodnius prolixus*) também podem contribuir para a transmissão da hanseníase em áreas endêmicas, uma vez que *M. leprae* se mantém viável no intestino do barbeiro vinte dias após a infecção oral. Posteriormente os autores obtiveram sucesso na infecção ao inocular fezes do barbeiro em patas de camundongos nude que são susceptíveis à infecção por *M. leprae* (Neumann A da S, et al. 2016).

Em 2009 Monot e colaboradores demonstraram através de análise genômica e filogeográfica de *M. leprae* que os padrões de migração dos primeiros seres humanos e as rotas comerciais, com a Estrada da Seda ligando a Europa à China contribuíram para a propagação da doença (Monot et al, 2009). A **figura 1.6** demonstra o padrão de disseminação da doença de acordo com a migração humana.

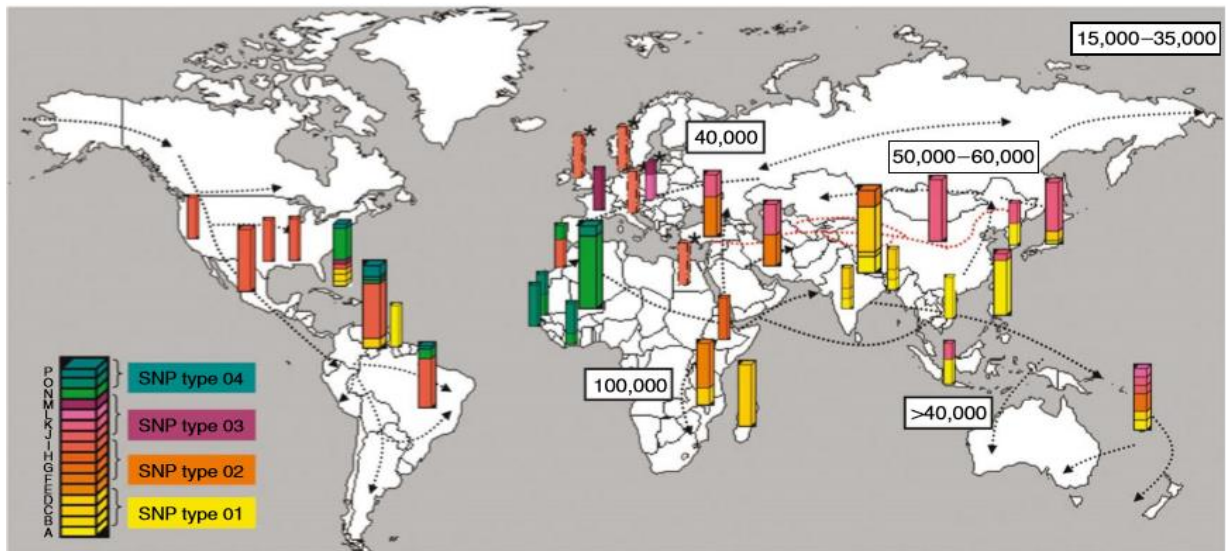


Figura 1.6. Disseminação da hanseníase pelo mundo. As barras estão localizadas no país de origem das amostras de *M. leprae* e codificadas por cores de acordo com as cepas identificadas. A espessura da barra corresponde ao número de amostras analisadas (1-5 fina, 6-29 intermediária, >30 larga). As setas indicam as rotas de migração dos humanos com a estimativa de tempo em anos (Monot et al, 2009).

1.5- Formas clínicas da hanseníase

A grande maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não adoece. Entretanto, aqueles que adoecem podem manifestar a doença através de um amplo espectro de formas clínicas, determinado pela intensidade da resposta imune celular do paciente a *M. leprae*. A hanseníase dificilmente leva à morte, mas constitui a principal causa de neuropatia periférica e a lesão neural é observada em todas as formas clínicas da doença.

Em 1966 Ridley e Jopling, a partir de critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos descreveram 5 formas clínicas na hanseníase. A análise histológica de fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com níveis mais altos de imunidade mediada por células, com lesões de pele bem delimitadas, apresentando hipopigmentação central e pouca sensibilidade local, revelou uma inflamação granulomatosa bem desenvolvida com raros bacilos no tecido caracterizando a forma tuberculóide polar (TT). Já lesões de pacientes com a forma polar lepromatosa (LL) revelaram a presença de macrófagos espumosos na derme contendo grande número de bacilos. A maioria dos pacientes, entretanto, apresentou características entre as duas formas polares e foram subdivididos em borderline lepromatoso (BL), borderline-borderline (BB) e borderline tuberculóide (BT) (Ridley DS, Jopling WH, 1966). Além

dessas formas clínicas, de um modo geral, os indivíduos que se infectam, inicialmente apresentam a forma indeterminada (I) da hanseníase. A hanseníase indeterminada é um estágio inicial e transitório da doença, que pode ser encontrado em indivíduos de resposta imune não definida diante do bacilo, usualmente, crianças (Jopling WH, McDougall AC, 1988).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu aos países endêmicos que adotassem uma simplificação do critério diagnóstico de acordo com o índice bacilar (IB) feito a partir de esfregaços de linfa e o número de lesões. De um modo geral, pacientes tuberculóides (TT, BT) e com a forma I são classificados como paucibacilares (PB), com IB=0 e apresentam até 5 lesões de pele e, pacientes lepromatosos (BB, BL e LL) são classificados como multibacilares (MB), com IB>0 apresentando mais de 5 lesões de pele

A **Figura 1.7** ilustra os perfis inflamatórios encontrados em lesões de pele de um paciente tuberculóide e de um paciente lepromatoso. Na **Figura 1.7. A** observamos um infiltrado inflamatório bem organizado, característico das lesões de pacientes do pólo tuberculóide, epiderme com aspecto característico, com células epitelióides ao redor dos vasos sanguíneos e dos feixes nervosos e a presença de células gigantes dentro do granuloma. Na **Figura 1.7. B** podemos observar um infiltrado inflamatório difuso, epiderme achatada, faixa de Unna e macrófagos indiferenciados com aspectos característicos de uma lesão de paciente do polo lepromatoso.

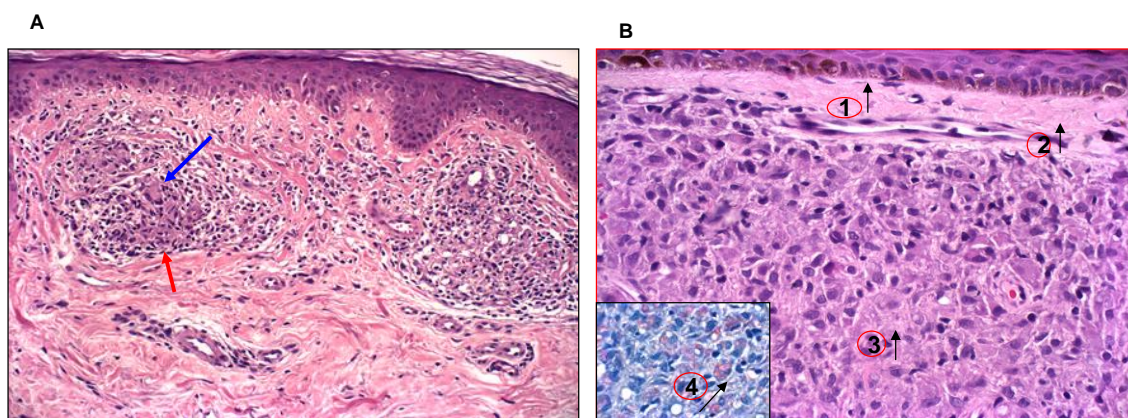


Figura 1.7. Análise histopatológica de fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com hanseníase. A) lesão de pele de um paciente tuberculóide (coloração por hematoxilina e eosina 200x). A seta azul indica a presença de células epitelióides ao redor dos vasos sanguíneos e dos feixes nervosos, a seta vermelha indica a presença de células gigantes dentro do granuloma. **B)** lesão de pele de um paciente lepromatoso (coloração por hematoxilina e eosina 200x). Em detalhe (coloração por Wade 1000x). 1- epiderme achatada, 2- faixa de Unna, 3- macrófagos indiferenciados, 4- macrófagos altamente infectados. Imagens gentilmente cedidas pela Dra. Alice Miranda do Laboratório de Hanseníase-IOC-Fiocruz.

No pólo TT estão os doentes que desenvolvem resposta parcialmente protetora ao bacilo, pois possuem uma imunidade mediada por células controlando a disseminação da doença e por isso apresentam um baixo índice bacilar. Já o polo LL é representado por aqueles indivíduos que apresentam um alto índice bacilar devido à ineficiente resposta celular contra a bactéria resultando na doença lepromatosa disseminada, e que apresentam uma alta carga bacilar. Nas formas clínicas intermediárias BT, BB e BL, a resposta imune celular é maior ou menor de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide ou lepromatoso, respectivamente (Ridley DS, Jopling WH, 1966) (**Figura 1.8**).

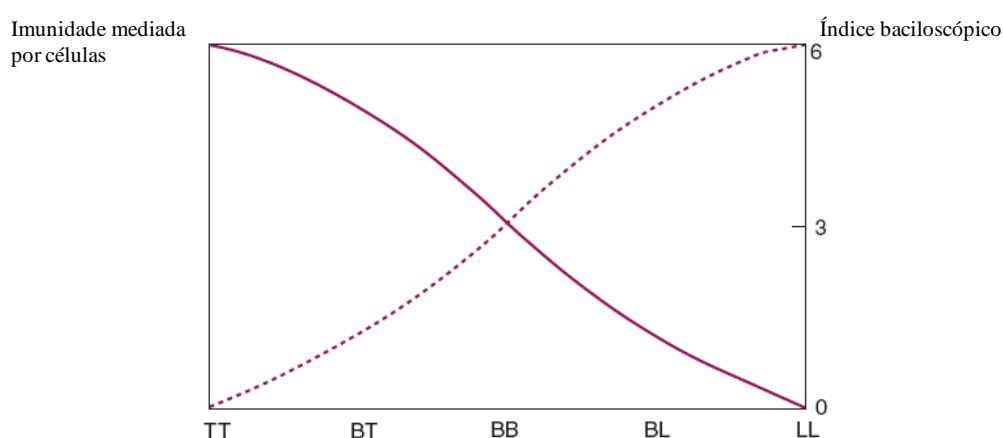


Figura 1.8. Formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966). A linha tracejada indica o índice bacilar que como pode ser observado, é bem elevado em pacientes do polo LL e zero nos pacientes do polo tuberculóide. Já a linha preenchida indica a imunidade mediada por células que é elevada no polo TT e muito baixa no polo LL. Classificações: TT (Tuberculóide polar), BT (Borderline-Tuberculóide), BB (Borderline-Borderline), BL (Borderline Lepromatoso), LL (Lepromatoso polar). Adaptado de Walker SL, Lockwood DNJ, 2006.

Durante o curso da doença, cerca de 50% dos pacientes apresentam episódios reacionais devido à reativação da resposta imune celular ligada à produção de mediadores inflamatórios e associada ao dano tecidual. As reações podem ocorrer a qualquer momento durante a evolução crônica da doença, sobretudo após o início do tratamento específico, que leva à morte bacilar e liberação maciça de antígenos micobacterianos (Britton WJ, Lockwood DNJ.2004). Os episódios reacionais podem levar a piora do quadro clínico dos pacientes, aumentando o dano neural e contribuindo para o surgimento de incapacidades físicas

1.6- Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico. Os profissionais de saúde realizam a anamnese para obtenção da história clínica e epidemiológica do indivíduo, identificam lesões de pele com alteração de sensibilidade. Nas unidades de referência realizam avaliação neurológica identificando neurites, incapacidades e deformidades, além disso, identificam se o indivíduo já apresenta características do estado reacional da doença. São também realizados exame para detecção do índice bacilar em esfregaços de linfa e exame histopatológico (Ministério da Saúde, 2002). Apesar da redução de sensibilidade ser característica predominante das lesões de hanseníase, cerca de 30% das lesões não são anestésicas, o que pode dificultar o diagnóstico da doença (Walker SL, Lockwood DNJ, 2006) .

A poliquimioterapia (PQT) com três drogas para pacientes multibacilares foi introduzida em 1981 pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A PQT desenvolvida pela OMS é constituída por rifampicina, dapsona e clofazimina, essa combinação de três drogas possui o objetivo de reduzir o tempo de tratamento e o aparecimento de formas resistentes do bacilo a uma única droga. Os pacientes Paucibacilares são tratados por seis meses com rifampicina e dapsona e os Multibacilares são tratados por 12 meses com rifampicina, dapsona e clofazimina (Ministério da Saúde, 2002). A hanseníase tem cura e o tratamento é eficaz e gratuito. No entanto a detecção precoce de casos novos é imprescindível para interromper a cadeia de transmissão e evitar incapacidades físicas (Sales AM, et al. 2011).

1.7- A resposta imune na hanseníase

A captura de *M. leprae* pelas células dendríticas e a produção local de citocinas e quimiocinas pode regular a inflamação e manipular o curso da imunidade celular. Além disso, *M. leprae* induz a liberação de citocinas por monócitos através de sinais reguladores positivos e negativos envolvendo PI3K, NF-kappaB, e caspase-1 (Sinsimer D, et al. 2010).

Fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com hanseníase revelaram que monócitos e células dendríticas em lesões de pacientes tuberculóides expressam receptores do tipo Toll 1 e 2 em maior quantidade do que em lesões de pacientes lepromatosos (Krutzik SR, et al. 2003). Diversos trabalhos demonstram que *M. leprae* é capaz de regular a resposta imune através dos macrófagos, além de induzir o acúmulo de colesterol em macrófagos infectados para garantir a sua sobrevivência (Mattos, KA, et al. 2014). *M. leprae* também é capaz de induzir o fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-1) atenuando mecanismos antimicrobicidas e promovendo sua sobrevivência no interior dos macrófagos (Batista-Silva LR, et al. 2016).

A indução de CD163 pelo bacilo favorece sua sobrevivência e persistência através da ativação de vias anti-inflamatórias e por aumentar os estoques intracelulares de ferro (Moura DD, et al. 2012). Outro mecanismo utilizado por *M. leprae* é a indução da enzima Indoleamine 2, 3-Dioxygenase (IDO). Sales e colaboradores (2011) demonstraram que a infecção por *M. leprae* aumenta a expressão e atividade de IDO em monócitos de indivíduos saudáveis e pacientes lepromatosos. Os autores propuseram que a infecção crônica por *M. leprae* induz a ativação de IDO, que por sua vez, contribui para a imunossupressão específica observada na hanseníase LL (de Souza Sales J, et al. 2011). Corroborando com esses dados, um estudo recente demonstrou que IDO e ferro são necessários para a sobrevivência do bacilo. Os autores demonstraram que o ferro pode regular a expressão de IDO por um mecanismo que envolve IL-10, no qual pode contribuir para a predominância de macrófagos com fenótipo M2 em lesões de pacientes lepromatosos favorecendo a fagocitose e manutenção de *M. leprae* na célula do hospedeiro (de Mattos Barbosa MG, et al. 2017). Interessantemente, macrófagos infectados com *M. leprae* apresentam perfil semelhante a macrófagos com fenótipo M2 com aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias e diminuição das citocinas

pró-inflamatória (Montoya D, et al. 2009; Mège J-L, Mehraj V, Capo C. 2011). Estes macrófagos, quando cultivados com células virgens, induzem preferencialmente linfócitos T reguladores com elevada expressão de FOXP3 e IL-10, regulando negativamente a resposta Th1 e citotóxica (Yang D et al. 2016). Além disso, *M. leprae* é capaz de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos, facilitando a sua sobrevivência no interior dessas células (Holzer, T.1986).

A diferenciação de células T virgens em células efetoras e de memória representa uma etapa fundamental da resposta imune mediada por células. Descrições iniciais retratam os linfócitos T efetores como células encontradas em ambientes de estimulação antigênica ativa capazes de eliminar microorganismos por diferentes mecanismos efetores. Em contraste, linfócitos T de memória são células que permanecem presentes na ausência de estimulação antigênica e têm a capacidade de se expandir rapidamente após uma segunda exposição ao antígeno (Zimmerman C, et al. 1996). O IFN- γ possui um importante papel na proteção contra patógenos intracelulares e pode ser produzido por células do sistema imune inato e adaptativo (Pernis A, et al. 2007). As células T CD4 produtoras de IFN- γ possuem um papel fundamental no controle da infecção por *M. leprae* e *M. tuberculosis* (Raupach B, Kaufmann SHE. 2001). IFN- γ possui amplas funções biológicas. É o principal produto das células com fenótipo Th1, promove atividade citotóxica diretamente, junto com a IL-12 e participa na diferenciação de células T CD4⁺ virgens para o fenótipo Th1 (Schoenborn JR, Wilson CB. 2007). O IFN- γ também regula a expressão de MHC de classe I e de classe II e a apresentação de antígenos, influencia no ciclo celular, crescimento e apoptose, no tráfego de leucócitos e interação dos leucócitos com as células epiteliais, aumentando a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão, influencia na troca de isotipo dos anticorpos produzidos pelas células B e também possui papel regulador, inibindo o desenvolvimento de células CD4⁺ do tipo Th2 (von Boehmer H. 2005; Schoenborn JR, Wilson CB. 2007). Sieling e colaboradores demonstraram que a expressão do antígeno leucocitário humano (CLA) é regulada durante o curso da infecção por *M. leprae* sugerindo que a resposta das células T aos antígenos micobacterianos direciona as células T antígeno-específicas para o sítio da infecção (Sieling PA, et al. 2007).

As células T possuem um importante papel na resistência a *M. leprae*, como evidenciado pela abundante multiplicação do bacilo em patas de camundongos timentomizados (Rees RJ, et al. 1967) e congenitamente atímicos (Colston MJ, Hilson

GR, 1976). Pacientes LL não são imunocomprometidos e não são propensos a câncer ou a infecções oportunistas que afetam pessoas com imunodeficiência. A anergia imunológica associada aos pacientes LL é específica aos antígenos de *M. leprae* (Modlin R, T H Rea. 1994).

Diversos tipos celulares podem estar envolvidos no curso da resposta imune a *M. leprae* e na ausência de resposta imune ao bacilo observada nos pacientes lepromatosos. Como pode ser observado na **Figura 1.9**, os pacientes com a forma tuberculoide apresentam maior frequência de linfócitos com fenótipo Th1 que expressam o fator de transcrição linhagem específica T bet e produzem IFN- γ , assim como apresentam células com fenótipo Th17 produtoras de IL-17 que junto com as células Th1 são capazes de evitar a disseminação do bacilo e manter a doença localizada. Outra possibilidade é a presença de células Th1/Th17 contribuindo para o controle de *M. leprae*. Essas células expressam simultaneamente Tbet e RORc produzindo IFN- γ e IL-17. Tanto células com fenótipo Th1 ou Th2 são capazes de inibir a ação das células T reguladoras. Saini e colaboradores demonstraram a presença de células CD4⁺Th17 em pacientes tuberculóides com uma alta expressão e liberação da IL17A por células mononucleares sanguíneas estimuladas com antígenos de *M. leprae* e em lesões de pele (Saini C, et al. 2013).

Os pacientes lepromatosos apresentam menor frequência de células com fenótipo Th1 e maior frequência de células T regs resultando na doença disseminada, com alta carga bacilar não sendo capaz de conter a multiplicação do bacilo. As diferenças entre o polo lepromatoso e polo tuberculóide na resposta a *M. leprae* também podem ser observadas através dos padrões de citocinas produzidas por esses pacientes. Clones isolados de lesão de pacientes TT secretam preferencialmente IFN- γ , enquanto clones de linfócitos T CD4 isolados de lesão de pacientes LL produzem predominantemente IL-4 (Sieling PA, Modlin RL, 1994). Apesar dos pacientes lepromatosos possuírem elevados níveis de anticorpos anti-PGL-1 e contra proteínas de *M. leprae*, a resposta humoral não confere proteção por tratar-se de um patógeno intracelular (Scollard DM, et al. 2006).

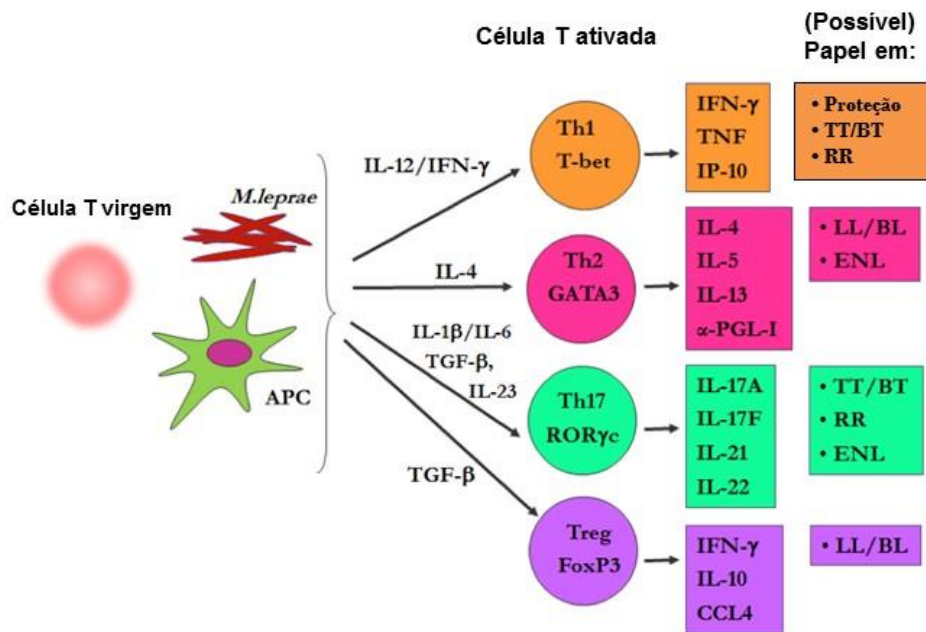


Figura 1.9. Representação esquemática dos possíveis fenótipos de células T envolvidas na hanseníase. As diferentes formas clínicas da hanseníase são provavelmente causados por mecanismos de defesa do hospedeiro, que são orquestrados pelas respostas imunes inatas e adaptativas. Após o reconhecimento de *M. leprae* por receptores Toll-like (TLRs), NF- κ B é ativado, resultando na regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias (GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IP-10, IL-12) e quimiocinas induzindo a migração e ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos. Posteriormente, as APCs migram para os órgãos linfóides para apresentarem antígenos micobacterianos às células T virgens. Dependendo de diferentes moléculas co-estimuladoras ou inibitórias e citocinas, diferentes subpopulações de células T serão desenvolvidas e podem variar de células CD4⁺ Th1 ou Th2, CTL ou Th17. Além das células T reguladoras (Treg), que desempenham um papel na diminuição da resposta imune *M. leprae* específica observada nos pacientes (LL Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van. 2014) (Adaptado de van Hooij A, Geluk A. 2016)

Células Tregs (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺) circulantes variam nas diferentes formas clínicas da hanseníase e pacientes multibacilares apresentam uma maior frequência de células T regs quando comparados aos paucibacilares (Attia EAS, et al. 2010; Palermo et al. 2012). Foi demonstrado que células T regs CD25⁺ poderiam influenciar na modulação negativa da resposta imune *M. leprae*-específica observada nos pacientes multibacilares (Bobosha K, et al. 2014), sugerindo o envolvimento dessas células na determinação da forma da doença. Ensaios de supressão usando Tregs CD4⁺CD25⁺ de pacientes multibacilares indicam que essas células podem estar envolvidas na supressão da resposta imune mediada por células de maneira independente de contato em pacientes lepromatosos. Em outro estudo os autores demonstraram que as Tregs de pacientes BL/LL possuem uma estabilidade da expressão de *FOXP3* (*forkhead box protein 3*) por apresentarem acetilação de *FOXP3* nos resíduos de lisina (Kumar S, et al 2013).

1.8- As células T reguladoras

As Tregs possuem um importante papel na supressão da resposta imune, mantendo a auto-tolerância e a homeostasia. Estudos sobre o papel supressor dessas células se originaram da observação de que camundongos timectomizados até três dias após o nascimento desenvolviam autoimunidade, e que esse processo era revertido após a transferência singênica de células T do baço ou do timo (Nishizuka Y, Sakakura T, 1969). Sakaguchi e colaboradores demonstraram que o tipo celular responsável por prevenir a autoimunidade nesse modelo apresentava o fenótipo CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi S, et al. 1995), e posteriormente essas células foram classificadas como FOXP3⁺ (Fontenot JD, et al. 2003). As Tregs expressam constitutivamente o fator de transcrição linhagem-específico, *FOXP3* e altos níveis da cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25). Este fator de transcrição é essencial para a diferenciação, manutenção e capacidade supressora das Tregs, assim como para a inibição da expressão de genes associados a linfócitos *T helper* (Josefowicz SZ, et al. 2012). A expressão de *FOXP3* é essencial para prevenir auto-imunidade em seres humanos (Fred Ramsdell, Steven F. Ziegler, 2014). O gene *FOXP3* possui uma região reguladora chamada região desmetilada Treg-específica (*TSDR* – do inglês, *Treg-specific demethylated region*), que é passível de alterações epigenéticas, devido ao seu rico conteúdo CpG. Citosinas metiladas estão associadas à inibição da transcrição gênica, enquanto citosinas desmetiladas possibilitam a ativação da expressão gênica. A desmetilação da região *TSDR* nas Tregs parece ser essencial para a expressão estável de *FOXP3* e, conseqüentemente, estabilização da função reguladora (Povoleri GA, et al. 2007). A análise de genes alvos do *FOXP3* em Tregs demonstrou que os diferentes programas de transcrição estabelecem a linhagem das Tregs durante a diferenciação e proliferação na periferia. Esse estudo também mostrou que *FOXP3* pode regular aproximadamente 700 genes podendo atuar como ativador ou repressor, além disso, FOXP3 provavelmente configura uma rede de fatores de transcrição que controlam o programa funcional das Tregs como sobrevivência, proliferação e função supressora (Ye Zheng, et al. 2007). Essas células podem ser derivadas do timo ou induzidas na periferia em condições inflamatórias ou em resposta a um patógeno.

A principal função das Tregs tímicas é migrar para o sítio de inflamação e suprimir os linfócitos efetores, principalmente as subpopulações de células T auxiliares (Th): Th1, Th2, Th17 e Th follicular (Chaudhry A, et al. 2009; Chung Y, et al. 2011; Koch MA, et al. 2009; Linterman MA, et al. 2011). Em seres humanos, após o seu desenvolvimento no timo, as Tregs saem em direção a periferia onde representam cerca de 2 a 4% das células T (Baecher-Allan C, et al. 2004). Já as Tregs induzidas se desenvolvem fora do timo em condições variadas que incluem não somente a resposta a antígenos em condições inflamatórias agudas, mas também em inflamações crônicas e infecção (Bilate AM, Lafaille JJ 2012). A ativação do receptor de linfócito T (TCR) parecer ter um papel importante na indução da atividade supressora das Tregs. Andrew G Levine e colaboradores (2014) demonstraram que a ativação do TCR foi necessária para manter a expressão de um subconjunto de genes que compreende 25% da assinatura transcricional das Treg ativadas (Andrew G Levine, et al. 2014) e a homeostasia das Tregs, expressão gênica linhagem-específica e capacidade supressora dependem da ativação contínua de seu TCR (J. Christoph Vahl, et al. 2014). Além disso, foi demonstrado que a força de supressão das Treg CD25 high depende da intensidade da estimulação do TCR em um ambiente antígeno-específico e que, quanto mais forte for a ativação do TCR, mais rapidamente as células respondedoras se tornam supressoras (Baecher-Allan C, et al. 2002).

As Tregs apresentam um importante papel no controle da resposta imune contra patógenos (Belkaid Y, et al. 2001). Dados da literatura demonstram que as Tregs, através da produção de IL-10, favorecem a persistência de *Leishmania major* (Suffia IJ, et al. 2006), e que Tregs específicas para *L. major*, encontradas no sítio de infecção, suprimem as células T de maneira dependente ou não de IL-10 (Belkaid Y, et al. 2001). Estudos posteriores mostraram que em seres humanos as Tregs são capazes de suprimir a ativação de células T no sítio de infecção na Leishmaniose visceral (Ambak K. Rai, et al. 2012). Além disso, as Tregs podem se expandir e acumular no sítio de infecção (Campanelli AP et al, 2006; Xu D, et al. 2006). Em resposta a antígenos virais em seres humanos, células T de memória e Tregs FOXP3⁺ específicas para *Varicella zoster* se acumulam simultaneamente no sítio de desafio intradérmico com o antígeno, sugerindo que as Tregs podem ser derivadas de células T de memória durante a resposta imune *in vivo* em um local específico, e que pode haver uma ligação entre a expansão das células

T CD4⁺ de memória e Tregs antígeno-específicas que controlam a resposta durante a ativação antígeno-específica nos tecidos (Vukmanovic-Stejić M, et al. 2013).

As Tregs podem ser encontradas na circulação, em tecidos linfóides secundários e em tecidos não linfóides até mesmo em condições não inflamatórias (Sather BD, et al. 2007). Em 2014 foi demonstrado que células Tregs de memória residem estavelmente na pele humana e que em condições inflamatórias essas células se expandem, são altamente proliferativas, e produzem baixos níveis de IL-17 em lesões de psoríase (Sanchez Rodriguez R, et al. 2014). As células Tregs possuem um importante papel na tolerância imunológica e homeostasia através de diversos mecanismos, suprimindo diversas células do sistema imune como células T CD4 e CD8, células dendríticas, células B, natural killers, macrófagos e mastócitos (von Boehmer H, 2005; Misra N, et al. 2004; Lim HW, et al. 2005; La Cava A, et al. 2006; Taams LS, et al, 2005). As células Tregs suprimem células T efetoras, bloqueando a ativação e função destes linfócitos de diversas maneiras como evidenciado na **Figura 1.10**. Essas células, através de CD39 e CD73, são capazes de inibir a ativação e proliferação celular via conversão de ATP/ADP (Borsellino G, et al. 2007; Kober JJ, et al. 2006). São capazes de inibir a apresentação de antígeno pelas células dendríticas através da expressão do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), e gene 3 de ativação linfocitária (LAG-3, *Lymphocyte-activation gene 3*). (Josefowicz SZ, et al. 2012). Um outro mecanismo de supressão observado nas Tregs é a capacidade de transferir exossomas contendo micro RNA (miRNA) para várias células do sistema imune, incluindo células T helper 1, nas quais suprimem a proliferação e produção de citocinas (Isobel S. Okoye, et al. 2014).

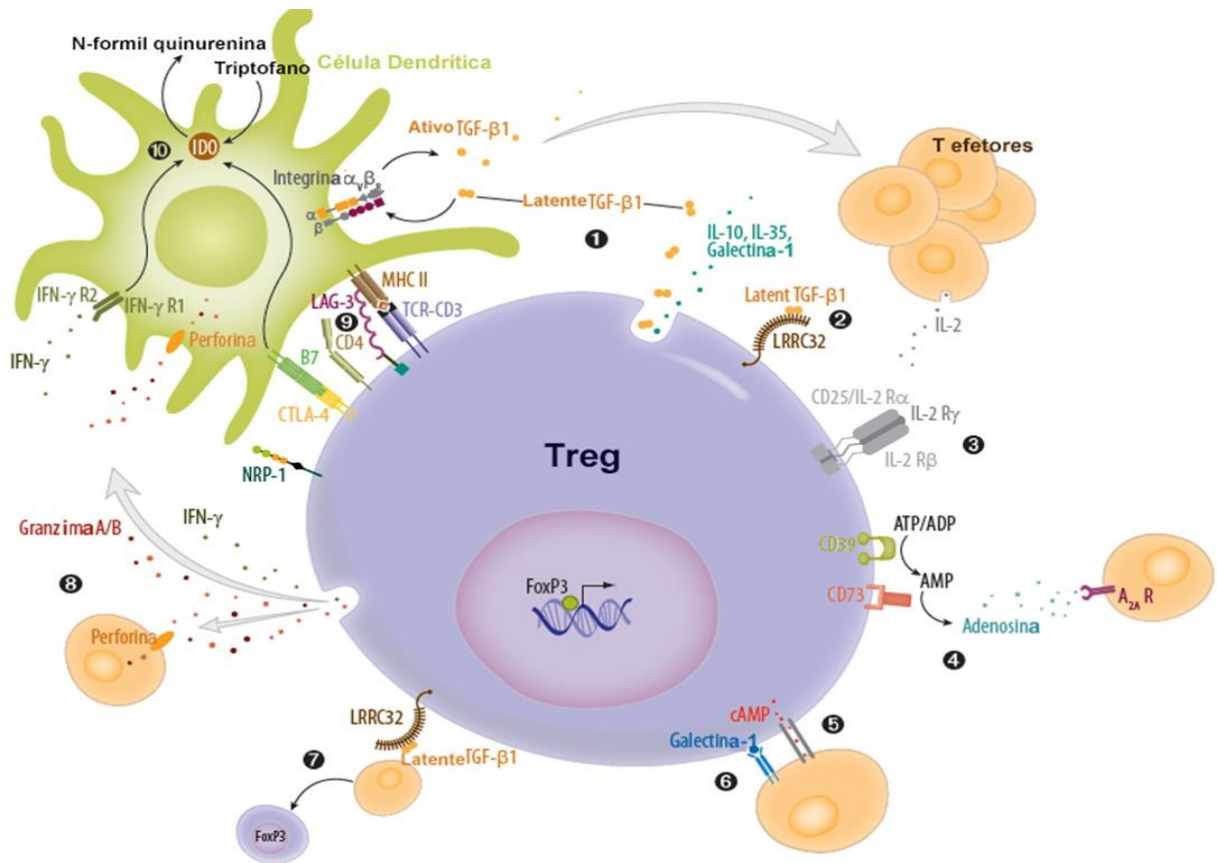


Figura 1.10. Mecanismos de supressão das células T reguladoras. 1-Secreção de TGF-β1, IL-10, IL-35 e Galectina 1. 2- TGF-β1 latente associado a membrana. 3- Elevada expressão de VF25/IL2Ra 4- Geração de adenosina extracelular pela expressão das moléculas de superfície CD39/CD73.5- Transferência da molécula inibidora AMPc através de junções GAP. 6- Galectina-1 associada a membrana. 7- Indução de tolerância. 8- Secreção de granzima A e B. 9-Ligação de LAG-3 ao MHC-II. 10- Supressão dependente de CTLA-4. Adaptado de R&D Systems Tools for Cell Biology Research™ (acesso em: 12/07/2017 disponível em https://resources.rndsystems.com/images/site/MA104_Treg_NOV6870.pdf).

A hanseníase multibacilar está associada à uma resposta reduzida das células T específicas para *M. leprae* cujos mecanismos ainda não foram esclarecidos. Um estudo realizado por Kumar e colaboradores (2011) demonstrou um aumento significativo de TGF-β em pacientes com hanseníase. Os autores sugerem que a super expressão de TGF-β poderia possibilitar a conversão de células T virgens e de memória em células T regs pela indução de FOXP3 nessas células e simultaneamente favorecer a geração de Tregs (Kumar S, et al. 2011b). Corroborando esses dados, em 2014, Saini e colaboradores demonstraram um aumento de células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ produtoras de TGF-β em pacientes lepromatosos tanto em lesões de pele quanto *in vitro*, indicando que essas células podem regular negativamente a resposta imune mediada por células T

refletindo a anergia antígeno específica associada aos lepromatosos e a severidade da doença (Saini C, Ramesh V, Nath I2014). TGF- β inibe a proliferação de células efetoras Th1 e Th2 em pacientes lepromatosos (Kumar S, et al. 2011a) e a função efetora de Th1 e Th17 através do contato direto, ou indiretamente através da produção de IL-10 e TGF- β , que atuam como mediadores de supressão (Kumar S, et al. 2013c).

Os dados anteriores demonstraram que TGF- β em pacientes lepromatosos é proveniente de macrófagos infectados por *M. leprae*, que liberam grandes quantidades dessa citocina (Kumar S, et al. 2011b), mostrando um possível mecanismo para que a infecção por *M. leprae* induza um ambiente propício ao desenvolvimento de Tregs e supressão da resposta imune patógeno-específica observada nos pacientes lepromatosos. Um estudo recente demonstrou que IL-12 e IL-23 podem modular a plasticidade das Tregs na hanseníase. Os autores demonstraram que o uso de IL-12 e IL-23 recombinantes podem converter as Tregs em células Th1 ou Th17 modificando a resposta imune do hospedeiro, e que um balanço entre essas subpopulações poderia controlar o crescimento do bacilo (Tarique M, et al. 2017). De fato, as Tregs induzidas na ausência ou presença de condições inflamatórias podem apresentar funções biológicas distintas, e isso alterar a regulação da resposta imune do hospedeiro (Angelina MB, Juan JL, 2012).

1.9- Por que as pessoas têm hanseníase?

Diversos fatores podem estar associados ao desenvolvimento da hanseníase. Historicamente a doença tem sido associada à pobreza. Existem dados mostrando uma relação entre a alta prevalência da hanseníase e a desigualdade social. Um maior risco de adoecimento também foi associado a menor grau de escolaridade, habitação pobre e baixa renda (Ponnighaus JM, et al. 2011). Corroborando com esses dados, Silva e colaboradores (2017) demonstraram que a distribuição da hanseníase e o risco de adoecimento está diretamente relacionado às condições de moradia da população.

Fatores imunológicos e o estado nutricional também parecem ser fatores de risco importantes para o adoecimento (Alfonso JL, 2005; Moet, 2006). A predisposição genética também é um fator importante. Um estudo epidemiológico realizado por Bakker e colaboradores (2004) demonstrou que 50% da susceptibilidade à hanseníase é hereditário. Polimorfismos na região promotora para o gene da Linfotóxina-alfa (LTA) foram descritos como um fator genético de risco para o adoecimento (Alcaïs A, et al. 2007). Mira e colaboradores (2004) identificaram polimorfismos em uma região promotora compartilhada por dois genes: *PARK2* e *PACRG*. Estes polimorfismos estão associados a uma maior susceptibilidade à doença. Polimorfismos em outros genes como o do receptor da vitamina D, TNF, L-10, IFN- γ , componentes do complexo HLA e receptores do tipo Toll-1 (TLR-1) também foram descritos como fatores de risco para o desenvolvimento da hanseníase (Mira MT, et al. 2004; Santos AR, et al. 2002; Cardoso CC, et al. 2011; Suryadevara NC, et al. 2013; Pinto P, et al. 2012; Marques C de S, et al. 2013).

A hanseníase pode afetar indivíduos em todas as faixas etárias e em ambos os sexos. A distribuição da doença entre homens e mulheres varia amplamente entre as diferentes populações. No entanto, em relação à idade, um estudo com 48.000 casos de hanseníase observados entre 1962 e 1970 demonstrou um pico de prevalência e incidência da hanseníase na faixa etária de 35-44 anos, onde, a distribuição por idade da hanseníase tuberculóide mostra uma curva bimodal, com picos entre 10-14 e 35-44 anos. O primeiro pico aparece relacionado à ocorrência de lesões precoces e auto curáveis em escolares e o segundo pico relacionando os tipos de hanseníase em famílias de casos únicos e múltiplos (de Vries JL, Perry BH, 1985). Corroborando esses dados, o trabalho de Moet e colaboradores (2006) mostra uma distribuição bimodal da doença de

acordo com a idade: um maior risco de adoecimento foi observado em indivíduos de 10 a 19 anos e naqueles com idade de 30 anos com um aumento crescente com o envelhecimento, sendo essa observação mais evidente nas mulheres. Diversos estudos têm demonstrado uma maior incidência da hanseníase multibacilar em homens (Britton WJ, et al. 2012).

Um recente estudo realizado com dados do Ambulatório Souza Araújo (ASA), Centro de Referência em Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz, mostrou que o índice bacilar (IB) é maior no sexo masculino mesmo quando se considera apenas pacientes sem deformidades físicas no diagnóstico. Este estudo encontrou IB significativamente maior em homens de 20 a 59 anos de idade. Uma possível explicação para essa descoberta é que o aumento de testosterona nesse grupo pode estar envolvido na criação de um ambiente que poderia facilitar o crescimento de *M. leprae* favorecendo uma carga bacilar mais elevada em homens (Nobre ML, et al. 2017). Interessantemente, estudos experimentais em infecção por patógenos intracelulares têm demonstrado que enquanto o estrogênio estimula a resposta imune celular, aumentando a frequência de células T CD4 antígeno específica e a produção de IFN- γ , a testosterona estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias associadas com a resposta Th2 como IL-10 e IL-4, sendo a produção desse hormônio uma possível explicação para a maior incidência da hanseníase em homens (Snider H, et al. 2009; Pinzan CF, et al. 2010; Yamamoto Y, et al. 1991; Bini EI, et al. 2014).

1.10- Os contatos de pacientes com hanseníase multibacilar, o risco de adoecimento e a vacinação com BCG

Estudar a hanseníase e não investigar os contatos domiciliares seria negligenciar a doença como um problema de saúde pública, pois a eliminação da hanseníase não pode ser alcançada somente com a PQT. A identificação de indivíduos com risco de desenvolver a hanseníase e seu diagnóstico precoce é crucial para o controle efetivo da doença. Os contatos de pacientes multibacilares constituem a população com maior risco de adoecer. O risco de adoecimento dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares é de 8 a 10 vezes, enquanto para os contatos domiciliares de pacientes paucibacilares é de 2 a 4 vezes maior quando comparados a indivíduos sadios de área endêmica sem história de exposição a *M. leprae* (Noordeen SK, 1994).

As principais características que facilitam o surgimento da doença entre os indivíduos saudáveis são a consanguinidade e proximidade com um paciente de hanseníase, e a carga bacilar deste paciente, pois a exposição frequente e prolongada a *M. leprae* é o maior determinante para o adoecimento (Sales AM, et al, 2011). Em 1991, Sampaio e colaboradores demonstraram que a redução de resposta imune a *M. leprae* entre pessoas expostas pode ser indicadora de susceptibilidade. Embora *M. leprae* seja considerado um patógeno de baixa patogenicidade, o bacilo apresenta uma alta infectividade. Já foi demonstrado que em locais de alta prevalência para hanseníase, quase a metade da população é considerada um contato (Bakker MI, et al. 2004). Corroborando essa informação, Martins e colaboradores (2012) demonstraram que em locais de alta endemicidade para hanseníase, a resposta a *M. leprae* é independente de um contato prévio com um paciente de hanseníase. Para Moet e colaboradores (2006), se os vizinhos tiverem um contato intenso com um paciente, esses indivíduos também apresentarão um maior risco de adoecimento.

Embora o maior risco de adoecimento ocorra entre os contatos intradomiciliares, em áreas endêmicas os contatos considerados sociais, que são aquelas pessoas que residem no mesmo bairro e participam da mesma vida social, também apresentam um risco de adoecimento associado. As medidas de controle para a hanseníase não devem ser limitadas somente à família dos pacientes, mas devem ser estendidas a grupos de risco de um mesmo bairro (Feenstra SG, et al. 2013).

Em adição ao tratamento com a PQT, o programa de controle da hanseníase no Brasil recomenda o exame clínico e, a partir de 1992, a vacinação intradérmica com Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) nos contatos de pacientes que são considerados o grupo com maior risco de desenvolver a doença (Ministério da Saúde, 2002). Embora tenha sido desenvolvida inicialmente para tuberculose, já é bem estabelecido que a vacina BCG também confere proteção contra a hanseníase (Abel L, et al. 1990; Fine PE, et al. 1997; Zodpey SP, et al. 2005, Düppre NC, et al. 2008). A aplicação da vacina BCG depende da história vacinal de cada indivíduo. Se no momento do exame clínico o contato não apresentar cicatriz de BCG recomenda-se tomar uma dose da vacina; se o contato apresentar uma única cicatriz de BCG, é recomendado que este seja vacinado com mais uma dose, e se o contato apresentar duas cicatrizes de BCG, nenhuma dose é prescrita (Ministério da Saúde, 2007).

Em 2004, Cunha e colaboradores observaram que a vacinação com BCG conferiu cerca de 70% de proteção contra a hanseníase na vacinação neonatal, principalmente para a forma MB. Já em grupos de risco (contatos), a vacinação com BCG conferiu cerca de 50% de proteção, sendo esta proteção aumentada em 25% com a repetição da vacina. Sarno e colaboradores (2012) também demonstraram que a vacinação e a revacinação com BCG possuem um papel protetor para os contatos intradomiciliares. Estudos têm demonstrado que o tratamento do caso índice e a vacinação com BCG (a primeira ou a segunda dose) diminuem o risco de se contrair a hanseníase (Düppre NC, et al. 2008).

A vigilância epidemiológica dos contatos é um componente altamente eficiente no controle da hanseníase. A busca ativa de novos casos é fundamental para a detecção precoce e ao mesmo tempo interrompe a cadeia de transmissão ajudando a prevenir as incapacidades decorrentes de doença não tratada (Ministério da Saúde, 2006). Hacker e colaboradores (2012) demonstraram que casos diagnosticados por vigilância de contatos foram detectados no início da progressão da doença, resultando em apresentações clínicas menos graves, níveis mais baixos de incapacidades físicas, índices baciloscópicos iniciais e finais menores e uma menor prevalência de episódios reacionais. A este respeito, a vigilância de contatos provou ser uma estratégia eficaz de prevenção terciária, indicando que a vigilância ativa é especialmente importante em áreas de alta endemicidade como o Brasil. Através de um estudo multinível de dados que permitiu a observação dos efeitos das variáveis no grupo dos pacientes e dos

contatos simultaneamente, Sales e colaboradores (2011) identificaram os principais fatores de risco para o adoecimento. Os autores observaram que o principal fator de risco entre os casos de contatos incidentes foi a proximidade com o caso índice e entre as características do caso índice, a carga bacilar do caso índice foi o principal fator de risco associado ao desenvolvimento da hanseníase entre os contatos.

O maior risco de adoecimento entre os indivíduos que possuem uma relação muito próxima com o caso índice também foi relatado por outros autores (Dos Santos, et al. 2013). Sales e colaboradores (2011) também relataram que a cicatriz de BCG e a aplicação da vacina após o diagnóstico do caso índice contribuiu para a proteção. Além disso, os autores observaram que a vacina aplicada na infância se mostrou protetora contra a hanseníase em 72% de todos os casos coprevalentes e em 55% dos casos incidentes. Durante o estudo, a taxa de proteção conferida para a vacina aplicada após o diagnóstico do caso índice foi de 56%. Um estudo realizado em Bangladesh demonstrou que a vacina BCG pode contribuir para a identificação de contatos com infecção subclínica. Os autores observaram que 28 (23%) dos 122 contatos diagnosticados com hanseníase, desenvolveram os sintomas 2-10 meses após a vacinação, sendo a forma paucibacilar identificada nas primeiras 12 semanas e a forma multibacilar sendo identificada mais tardiamente, reforçando a teoria de que a BCG ativa a resposta imune, revelando indivíduos onde a doença já se encontra em progressão em contatos com infecção subclínica. Dessa forma, a vacinação com BCG ajudaria a identificar esse grupo de alto risco, que receberá o tratamento adequado em estágio inicial diminuindo a incidência de lesões neurais e deformidades físicas (Richardus RA, et al. 2015).

O exame de contatos combinado com a sorologia para PGL-I e a vacinação com BCG permanecem como importantes estratégias para o controle da hanseníase. Duppre e colaboradores avaliaram o impacto da soropositividade ao PGL-I no efeito protetor da vacinação com BCG entre os contatos de pacientes com hanseníase. A constatação de que os índices de casos de hanseníase foram maiores entre os contatos soropositivos justifica as estratégias de acompanhamento voltadas para este grupo específico. Além disso, recomenda-se que os contatos com sorologia positiva para PGL-I e os contatos com um familiar com elevado índice baciloscópico, independentemente da resposta sorológica, devem ser monitorados (Düppre NC, et al. 2008). Como pode ser observado na **Figura 1.11**, a principal fonte de transmissão são os pacientes multibacilares, entretanto indivíduos superexpostos ao bacilo, principalmente os que já apresentam

sorologia positiva para o PGL-I e que possuem um maior risco de adoecer (Buhrer-Sekula S, et al. 2000), mas que são assintomáticos, poderiam estar contribuindo para a disseminação do bacilo no ambiente.

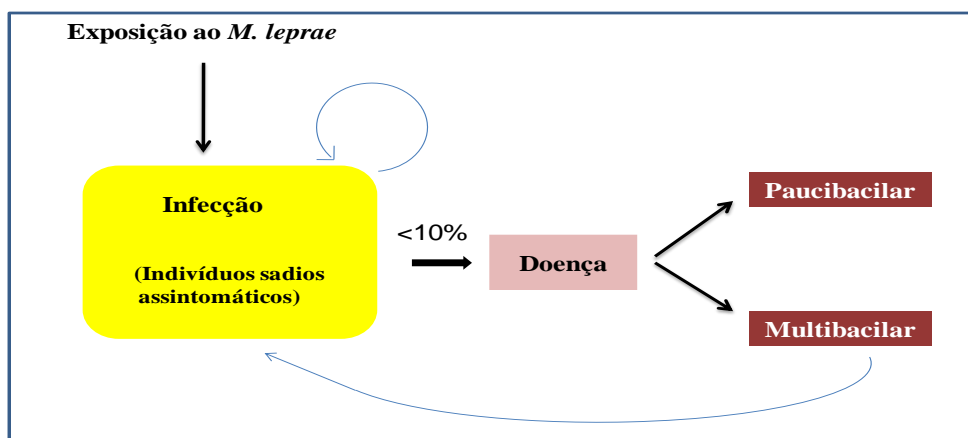


Figura 1.11. Ciclo de transmissão do *M. leprae*. Os pacientes multibacilares são considerados a principal fonte de eliminação de bacilo viável no ambiente. Após a exposição a *M. leprae* menos de 10% dos indivíduos irão desenvolver a doença, no entanto os indivíduos assintomáticos, mas que já apresentam uma carga bacilar devido à superexposição a *M. leprae* podem estar contribuindo para a disseminação do bacilo, participando da cadeia de transmissão (Adaptado de Visschedijk J, et al. 2000).

A identificação e tratamento de indivíduos ainda num estágio inicial da doença são de grande importância para uma eficiente interrupção da cadeia de transmissão de *M. leprae*. A quimioprofilaxia em contatos usando uma dose única de rifampicina mostrou um efeito protetor de aproximadamente 60% nos primeiros 2 anos e, nos casos em que esse contato já havia recebido a vacina BCG, o efeito protetor aditivo foi de 80%. Além disso, foi demonstrado que o efeito protetor da vacinação BCG é maior entre os contatos de pacientes com hanseníase do que entre a população geral, 68% contra 53% (Richardus JH, Oskam L. 2015).

1.11- A vacina BCG e a indução de imunidade treinada

A imunização com BCG é bem conhecida por induzir uma forte resposta adaptativa do tipo Th1 com o aumento da produção de IFN- γ (Flynn JL, et al. 1993). Recentemente foi descrito que a vacinação com BCG também leva à indução de células do tipo Th17 produtoras de IL-17 (Kleinnijenhuis et al, 2014). A vacinação com BCG induziu um aumento na produção de mediadores inflamatórios, principalmente IFN- γ , em crianças no Reino Unido (Lalor MK, et al, 2010), assim como induziu uma resposta imune específica contra *Mycobacterium tuberculosis* mediado pelo aumento de células B e produção de anticorpos específicos (Ismail Sebina, et al. 2012). De forma interessante, até a cicatriz vacinal materna está associada com um aumento de uma resposta pró-inflamatória nas crianças (Mawa PA, et al. 2017).

Um elemento para explicar a ação da vacina BCG na proteção contra hanseníase, é o fato de que *M. leprae* e *M. bovis* compartilham muitos antígenos com alto grau de homologia (Cole ST, et al. 2001). Contudo, a vacina BCG tem reconhecidamente efeitos que aumentam a resposta imune de forma inespecífica (Kleinnijenhuis J, et al. 2014). O mecanismo imunológico para os efeitos não específicos da vacina BCG foi descrito recentemente. Voluntários saudáveis vacinados com BCG apresentaram uma reprogramação epigenética de seus monócitos via receptor NOD2, resultando num aumento da expressão de receptores celulares, acompanhado por uma maior produção de citocinas em resposta a patógenos não relacionados ao BCG. Este fenômeno foi chamado de "imunidade treinada" ou "memória imune inata" (Kleinnijenhuis J, et al. 2012; Netea MG, et al. 2016).

A imunidade treinada é orquestrada por reprogramação epigenética que modifica a expressão gênica e a fisiologia celular de maneira diferente de modificações genéticas permanentes como mutação e recombinação, que são essenciais para a imunidade adaptativa (Netea MG, et al. 2011). Participam da imunidade treinada células mielóides, Natural Killer (NK), células linfóides inatas, receptores de reconhecimento padrão e citocinas. Além disso, diferentemente da imunidade adaptativa, o aumento da resposta a um segundo estímulo não é específico para um patógeno, mas é mediado por sinais que interferem diretamente com fatores de transcrição via reprogramação epigenética. A **Figura 1.12** mostra a diferença na ativação da memória imunológica clássica e a imunidade treinada.

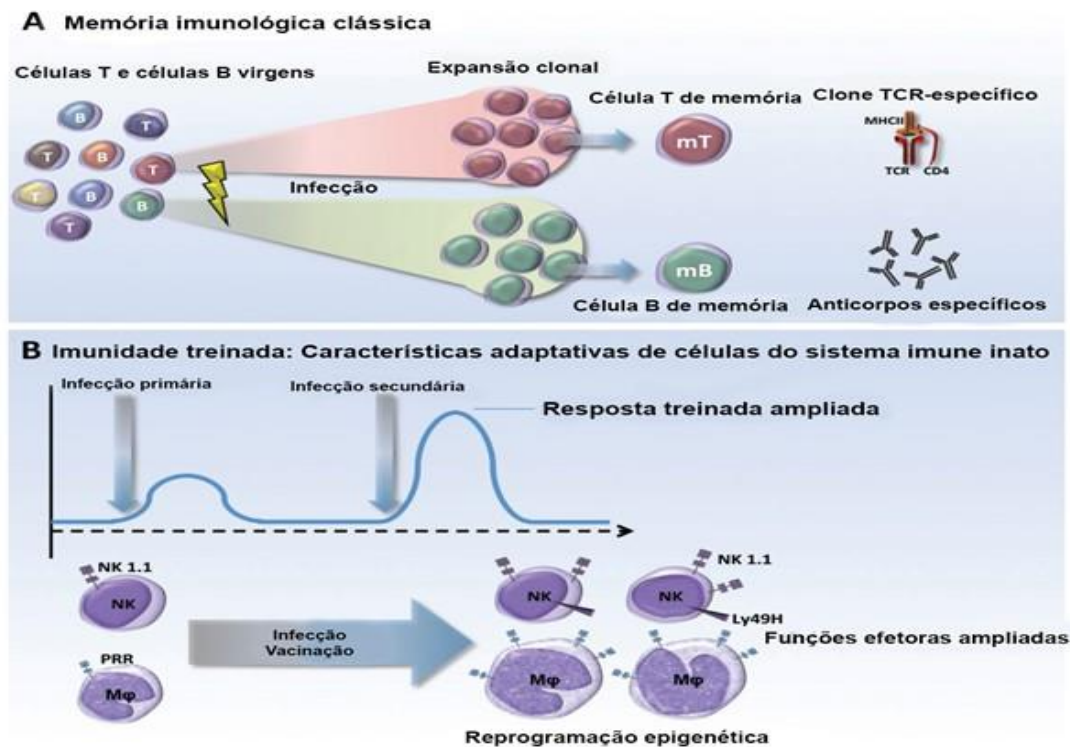


Figura 1.12. Diferença na ativação da memória imunológica clássica e a imunidade treinada. **A)** Memória imunológica adaptativa envolve recombinação genica em linfócitos B e T o qual confere alta especificidade por muitos anos. **B)** Imunidade treinada definida como memória imunológica inata que induz aumento de propriedades inflamatórias e antimicrobianas nas células inatas, responsável por um aumento não específico da resposta a infecções posteriores melhorando a sobrevivência do hospedeiro (Adaptado de Netea MG, et al. 2016).

A imunidade treinada depende de um estado funcional alterado das células imunes inatas que persistem durante semanas a meses, após a eliminação do estímulo inicial (Netea MG, et al. 2017; Kleinnijenhuis J, et al. 2014). Dados da literatura sugerem que a resposta imune inata pode ser “treinada” e exercer um novo tipo de memória imunológica após re-infecção (Netea MG, et al. 2017). Elementos reguladores que são epigeneticamente não metilados ou metilados em baixo nível em células não estimuladas, ganham modificações nas histonas somente em resposta a um antígeno específico. Como pode ser observado na **Figura 1.13**, após remoção do estímulo *in vitro*, uma fração latente dos elementos reguladores retém histonas modificadas e podem sofrer uma forte ativação em resposta a uma re-estimulação.

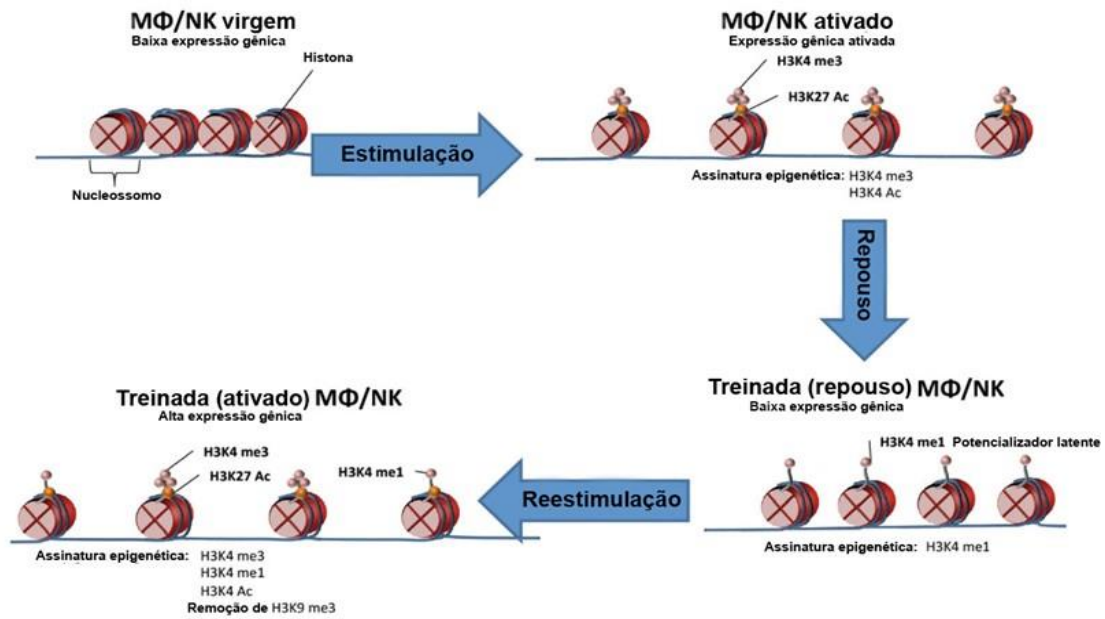


Figura 1.13. Modificações epigenéticas durante a imunidade treinada. A ativação inicial da transcrição gênica é acompanhada pela metilação específica da cromatina, que é apenas parcialmente perdida após a eliminação do estímulo. As modificações epigenéticas das células imunes inatas, ilustrado pela persistência de histonas metiladas, como H3K4me1, que caracterizam os "potencializadores latentes", resultam em uma resposta mais forte frente a uma re-infecção. (Netea MG, et al. 2016).

Recentemente Polycarpou (2016) demonstrou que *M. leprae* ativa TLR-4, porém a prévia vacinação com BCG pode impactar diretamente no seu nível de ativação, sugerindo um possível mecanismo pelo qual a vacinação com BCG estimula a proteção “não-específica” do sistema imune. Os autores demonstraram um aumento da expressão de TLR-4 em macrófagos provenientes de indivíduos não vacinados com BCG após incubação com *M. leprae*. Interessantemente, a expressão de TLR-4 em macrófagos de indivíduos saudáveis vacinados com BCG foi modulada negativamente. Além disso, os autores demonstraram que o pré-tratamento com BCG reverteu a ativação de TLR-4 induzida por *M. leprae* em macrófagos de indivíduos não vacinados (Polycarpou A et al. 2016).

1.12- A modulação da resposta imune frente à constante exposição a *M. leprae* e a alta carga bacilar

Os pacientes multibacilares são considerados a principal fonte de transmissão de *M. leprae*, uma vez que eles possuem uma alta carga bacteriana, podendo liberar cerca de 10^7 bacilos viáveis por dia através das vias aéreas (Davey, Rees, 1974). Em 1973 um estudo demonstrou que indivíduos superexpostos ao bacilo apresentavam uma resposta linfoproliferativa *in vitro* baixa, no entanto, quando o paciente era tratado havia uma elevação dessa resposta (Godal T; Negassi K, 1973). Posteriormente, em 1991, Sampaio e colaboradores demonstraram que a perda de resposta imune a *M. leprae* entre pessoas expostas pode ser indicador de susceptibilidade (Sampaio EP, et al. 1991). Diversos estudos em diferentes países têm relacionado a super exposição a *M. leprae* com o maior risco de adoecimento (Bakker MI, et al. 2004; Fine PE, et al. 1997; Van Beers SM, et al. 1999). Um estudo multicêntrico realizado pelo nosso grupo em indivíduos com diferentes graus de exposição a *M. leprae* demonstrou que os indivíduos com maior exposição ao bacilo apresentam uma diminuição da produção de IFN- γ em resposta ao patógeno. Como pode ser observado na **Figura 1.14**, a produção de IFN- γ foi medida em células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com diferentes históricos de exposição a *M. leprae* estimuladas com o bacilo sonicado e com peptídeos *M. leprae*-específicos. Uma correlação entre os grupos de indivíduos saudáveis em relação à produção de IFN- γ reflete o nível de exposição a *M. leprae*, pois, enquanto os níveis de IFN- γ foram zero ou próximos a zero em indivíduos residentes em áreas com baixa/média prevalência para a hanseníase, em indivíduos sadios residentes em área de alta prevalência de Fortaleza os níveis foram comparáveis aos observados nos contatos de pacientes com hanseníase. Um pico na produção de IFN- γ em resposta aos peptídeos *M. leprae*-específicos foi observado no grupo de contatos de pacientes paucibacilares. Estes níveis caem em contatos de pacientes multibacilares que apresentam maior exposição a *M. leprae*, e diminuem mais ainda nos pacientes com hanseníase. Esses dados sugerem que a evolução da infecção latente para doença ativa está relacionada com a progressiva redução na produção de IFN- γ patógeno-específico e em paralelo com um aumento da carga bacilar nesses indivíduos (Martins MVSB, et al. 2012).

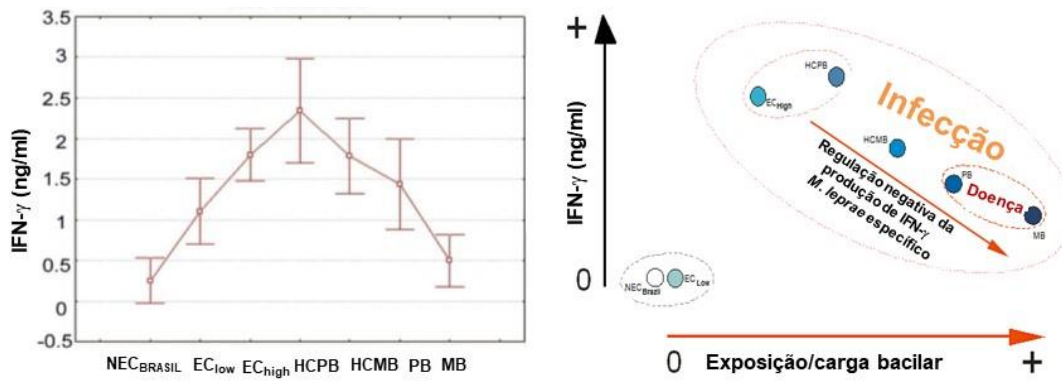


Figura 1.14. Modelo da modulação negativa da produção de IFN- γ pelo *M. leprae* durante infecção assintomática e doença ativa. NEC_{BRAZIL}= Do inglês “non-endemic controls, Brazil”
 EC_{LOW} = do inglês “endemic control médium burden”, EC_{high} = “endemic control high burden”, HCPB = Household Contacts of Paucibacillary Patients”, HCMB = do inglês “Household Contacts of Multibacillary Patients, PB= Paucibacillary patients, MB = Multibacillary patients (Adaptado de Martins MVSB, et al. 2012).

2- Hipótese

Os contatos de pacientes multibacilares, devido à sua maior exposição a *M. leprae* e maior risco de adoecimento, representam um grupo com grande importância para o estudo dos mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune celular antígeno-específica na infecção pelo *M. leprae*. Especificamente neste trabalho investigamos como a interrupção da exposição a *M. leprae* via tratamento do caso índice, assim como a vacinação com BCG, impactam na resposta imune específica ao bacilo nos contatos de pacientes multibacilares. A nossa hipótese inicial é a da existência de um componente inespecífico no mecanismo de proteção da BCG contra a hanseníase e, para validar essa hipótese, avaliamos o perfil de resposta imune celular a peptídeos específicos de *M. leprae* que não são compartilhados com BCG.

Na segunda parte deste estudo investigamos se as Tregs *M. leprae*-específicas nos pacientes com hanseníase contribuem para a modulação negativa da resposta a *M. leprae* que é observada com o aumento da carga bacilar. Nossa hipótese é que as células Treg poderiam estar envolvidas na supressão da resposta Th1 *M. leprae*-específica. Consideramos que a interação de *M. leprae* com fagócitos mononucleares gera um microambiente favorável ao surgimento de células Tregs que suprimem a resposta imune patógeno-específica na hanseníase. Para investigar essa hipótese, nos propusemos a avaliar fenotípica e funcionalmente células Tregs presentes em lesão de pele e sangue periférico de pacientes com as formas lepromatosa e tuberculóide da hanseníase. Diferente dos trabalhos anteriormente citados que descrevem a participação das células Tregs na hanseníase, o nosso trabalho tem como objetivo avaliar a razão das células Tregs e T efectoras *M. leprae* específicas, avaliar a capacidade supressora das Tregs e a estabilidade do fenótipo regulador, bem como investigar fatores de transcrição linhagem específicos de células T efectoras e reguladoras em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Entender os mecanismos envolvidos na modulação da resposta a *M. leprae* durante a infecção tem relevância potencial para o desenvolvimento de um teste diagnóstico precoce ou vacina para a hanseníase.

3- Objetivos

Objetivo Geral:

Identificar mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune celular patógeno-específica em indivíduos infectados por *M. leprae*.

Objetivos específicos:

- ◆ Avaliar o impacto do tratamento do caso índice e/ou vacinação com BCG no perfil fenotípico e funcional de subpopulações linfocitárias *M. leprae*-específicas presentes em sangue periférico de contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares;

- ◆ Investigar o impacto do tratamento do caso índice e/ou vacinação com BCG nos níveis de citocinas e quimiocinas presentes em sobrenadantes de culturas leucocitárias de contatos de pacientes multibacilares submetidos a estímulos patógeno-específicos;

- ◆ Avaliar o perfil fenotípico e funcional de subpopulações linfocitárias *M. leprae* específicas presentes em sangue periférico e lesão de pacientes com as diferentes formas clínicas da hanseníase;

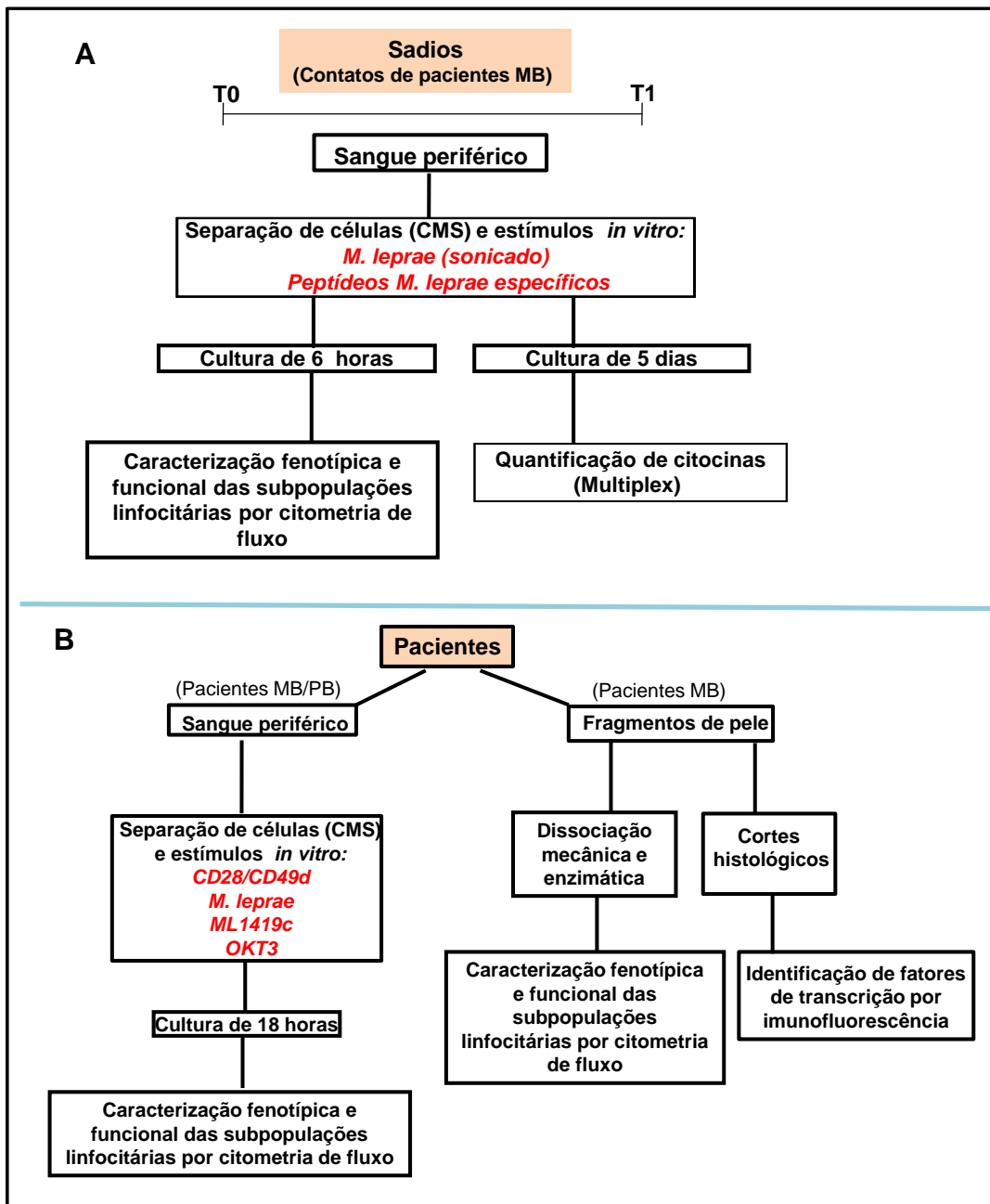
- ◆ Investigar a presença de fatores de transcrição FOXP3 e T-BET em lesões de pele de pacientes por imunofluorescência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos indivíduos e Permissão ética

Os contatos domiciliares de pacientes multibacilares foram recrutados no Ambulatório Souza Araújo – FIOCRUZ-RJ próximo ao diagnóstico (até 3 meses) e ao final do tratamento do caso-índice, tendo sido colhido 35 mL de sangue nestas duas ocasiões. Todos os contatos passaram pelos exames de rotina (dermatológico, neurológico e/ou avaliação fisioterápica) e fizeram sorologia para PGL-1 (ML Dipstick). Os contatos com sorologia anti-PGL-1 negativa foram submetidos ainda a eletroneuromiografia (quando houver mancha suspeita), coleta de linfa cutânea dos dois lóbulos e, coleta de raspado de mucosa nasal para fins diagnósticos. Nos contatos com sorologia anti-PGL-1 positiva, além dos testes descritos acima, foram realizados o teste de Mitsuda e o Laser Doppler, independente da suspeição da hanseníase. Todos os contatos receberam a vacina BCG-ID, conforme recomendação do Ministério da Saúde. Amostras de sangue (35 mL) e/ou fragmento de pele por biópsia de punch (6 mm) foram coletados de pacientes com hanseníase não tratados no Ambulatório Souza Araújo – FIOCRUZ-RJ. Cada paciente foi avaliado através de exame clínico e dermatológico, do índice bacteriológico (IB), índice logaritmo de biópsia (ILB) e foram categorizados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1963), e receberam a poliquimioterapia recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) após a coleta da amostra. Indivíduos menores de 18 anos ou acima de 65 anos, indivíduos sabidamente HIV⁺ e portadores de doenças crônicas ou agudas não relacionadas à hanseníase foram excluídos do trabalho. Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram examinados quanto aos sintomas clínicos da hanseníase e a presença de cicatriz vacinal com BCG. Todos os indivíduos recrutados foram esclarecidos e aqueles que livremente aceitaram participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ (protocolo n° 633/11 e Parecer n° 951.494). Para a proteção e bem-estar dos indivíduos incluídos neste estudo, não foi divulgado o nome de nenhum dos participantes.

4.2. Desenho Experimental



Desenho experimental. A) Desenho experimental da primeira parte do trabalho onde apenas os contatos serão recrutados e em dois momentos diferentes: (T0) antes do tratamento do caso índice e antes da vacinação com BCG e em (T1) a partir de 6 meses do início do tratamento do caso índice e após a vacinação com BCG. Sangue periférico foi coletado em T0 e T1, CMS foram isoladas e estimuladas com *M. leprae* e peptídeos *M. leprae* específicos durante 6 horas para caracterização fenotípica e funcional das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo e em paralelo foram mantidas culturas de 5 dias para quantificação de citocinas. B) Desenho experimental da segunda parte do trabalho: Pacientes com a forma multibacilar (MB) e paucibacilar (PB) da doença foram recrutados e o sangue periférico foi colhido, as CMS foram isoladas e mantidas em cultura com os estímulos mostrados no desenho acima durante 18 hs para caracterização fenotípica e funcional das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. Em paralelo, fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes MB foram coletados, para posterior a dissociação mecânica e enzimática, serem caracterizadas fenotípica e funcionalmente das subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. Em paralelo, cortes histológicos de pacientes MB foram utilizados para identificação de fatores de transcrição por imunofluorescência. CMS: Células mononucleares sanguíneas.

4.3 Estímulos

Os seguintes estímulos foram utilizados neste trabalho:

- ◆ Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) – Sigma, EUA, Cat: S4881, 1 mg/mL.
- ◆ Sonicado total de *M. leprae* irradiado isolado de tatu de nove bandas (*Dasyus novemcintus*) Este material foi fornecido pelo NIH/NIAID “Leprosy Research Support” Contrato N01 AI-25469 da Universidade do Colorado (estes reagentes estão agora disponíveis através do convênio Biodefesa e fontes repositórias de infecções emergentes listado em:
(<http://www.beiresources.org/TBVTRMResearchMaterials/tabid/1431/Default.aspx>).
- ◆ Peptídeos sintetizados a partir de sequências específicas de *M. leprae* de 9 ou 15 aminoácidos, cedidos pelo Dr. Patrick Brennan, da Universidade do Colorado, EUA – 1mg/mL. A análise do genoma *in silico* permitiu a identificação de genes e proteínas específicas de *M. leprae*. Algoritmos foram, então, aplicados para a identificação de regiões ligantes de HLA para essas sequências proteicas específicas. As regiões ou epítomos escolhidos foram selecionados por se ligarem a MHC de classe I ou de classe II gerando peptídeos sintéticos de 9 e 15 aminoácidos, respectivamente. Dezesete peptídeos foram selecionados para esse estudo do painel original de 58 peptídeos específicos de *M. leprae*. Esses peptídeos foram previamente testados quanto à indução de IFN- γ em CMS de pacientes com hanseníase e seus contatos e controles de áreas endêmicas e não endêmicas para a hanseníase (Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MAM, Williams DL, Martins MVSB, et al. 2005).
- ◆ Proteína recombinante ML1419c de *M. leprae* a 1 μ g/mL (NIH/NIAID “Leprosy Research Support” Contract N01 AI-25469 da Colorado State University, CO, EUA). A ML1419c já foi descrita como altamente antigênica gerando fortes respostas antígeno-específicas (Rotcheewaphan S, Belisle JT, Webb KJ, Kim HJ, Spencer JS, Borlee BR, 2016).
- ◆ Orthoclone OKT3 – anticorpo monoclonal anti-CD3 ϵ a 0,1 μ g/mL (Cilag, EUA)

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

Após prévio consentimento, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos heparinizados e então processadas, separadamente, para obtenção das CMS. A cada experimento, o sangue coletado foi diluído numa proporção 1:1 em solução salina balanceada PBS (Gibco® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) e centrifugado a 900 *xg* sobre gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Bio-Sciences) por 30 minutos a temperatura ambiente. O anel contendo as CMS, que se encontra na interface Ficoll-Paque/plasma, foi cuidadosamente coletado com auxílio de pipeta e lavado com PBS a 300 *xg* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 10 mL de PBS gelado às células havendo, então, uma nova centrifugação a 500 *xg* durante 10 minutos a 4 °C. Esse processo foi repetido e as células foram ressuspensas em 5 mL de meio AIMV estéril (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). A determinação de células viáveis foi realizada pelo método de exclusão por meio de coloração pelo azul Tripán (corante vital) e avaliada em câmara de Neubauer para estimativa da concentração de células viáveis. A manipulação do sangue dos indivíduos incluídos neste estudo foi realizada em câmara de fluxo laminar respeitando as normas de precauções para manipulação de material biológico.

4.5. Ensaios de estimulação de CMS *in vitro* em cultura de 6 horas para análise fenotípica e 5 dias para dosagem de mediadores inflamatórios no sobrenadante

As CMS foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 por poço em placa de 96 poços fundo U estéril (BD-Bioscience, San José, CA). Foram adicionados em cada poço a ser estimulado 1 $\mu\text{g/mL}$ CD28 e CD49d (BD Pharmingen, USA). Em seguida, as células foram estimuladas com enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* (SEB) a 1 $\mu\text{g/mL}$ ou *M. leprae* sonicado proveniente de tatu (20 $\mu\text{g/mL}$) ou com um conjunto de peptídeos específicos de *M. leprae* (10 $\mu\text{g/mL}$) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 6 horas, sendo a última hora de cultura na presença de brefeldina A (Protein transport inhibitor, BD GolgiPlug™, USA). Após o término da cultura, as placas foram mantidas na geladeira a 4°C para marcação com anticorpos no dia seguinte. Paralelamente células na concentração de 2×10^5 por poço em duplicata, estimuladas com SEB, *M. leprae* e peptídeos na mesma concentração utilizada para a cultura de seis horas foram mantidas também a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante cinco dias

para dosagem de citocinas nos sobrenadantes. Após os cinco dias de cultura, os sobrenadantes foram coletados e estocados em freezer a -20°C até o momento da dosagem das citocinas.

4.6. Ensaios de estimulação de CMS *in vitro* em cultura de 18 horas para análise fenotípica

As CMS foram ajustadas para a concentração de 1×10^6 /mL, foram incubadas em placas de cultura de 96 poços com fundo em U (BD-Biosciences, San Jose, CA, EUA) e estimuladas com Orthoclone OKT3 – anticorpo monoclonal anti-CD3ε a 0,1 µg/mL (Cilag, EUA), 2), sonificado de *M. leprae* irradiado a 20 µg/mL (BEI Resources, University Boulevard Manassas, VA, EUA) e proteína recombinante de *M. leprae* ML1419c de a 1 µg/mL (NIH/NIAID “Leprosy Research Support” Contract N01 AI-25469 da Colorado State University, CO, EUA). Os co-estímulos anti-CD28 e anti-CD49d a 1µg/mL (BD Pharmingen, EUA) também foram utilizados para otimizar as condições de estimulação. As culturas foram mantidas por 18 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Após a cultura, foi feita a fenotipagem das células por citometria de fluxo.

4.7. Obtenção de linfócitos provenientes de fragmentos de pele obtidos por biópsia:

Após o diagnóstico do paciente, um fragmento de pele foi coletado através de biópsia. Em seguida, esse fragmento de pele foi colocado em meio RPMI (Gibco® - Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), em gelo úmido. Após um breve período, a derme e a epiderme foram separadas mecanicamente, com o auxílio de um bisturi, e a derme fragmentada em porções menores para facilitar a ação das enzimas na presença de uma solução contendo 0,8 mg/mL de colagenase do tipo 4 (Worthington, Lakewood, NJ, EUA), 0,02 mg/mL DNase I (Sigma-Aldroch, St. Luis, MO, EUA), 10% de soro fetal bovino (SFB – Gibco, Grand Island, NY, EUA), 1% de HEPES/penicilina (SigmaAldrich, St. Luis, MO, EUA) em meio RPMI (Sanchez et al, 2010). O tecido fragmentado e 3 mL de solução enzimática foram adicionados em uma placa de 6 poços (Corning Costar, NY, EUA) e incubados a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 18 horas. Após término da incubação, as células e fragmentos de tecido não digeridos foram transferidos para tubo de 50 mL (Corning Costar, NY, EUA) e ressuspensos em solução de lavagem contendo RPMI com 2% de SFB, 1% HEPES e 1% de Penicilina. O tubo contendo a amostra foi centrifugado (4°C, 10min, 500xg), o

sobrenadante descartado e adicionado novamente tampão de lavagem às células. O tecido digerido foi então passado por filtro com poros de 40 µm (BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), e o filtrado foi centrifugado novamente e ressuspensão em meio RPMI. A contagem e a viabilidade das células foram avaliadas em suspensão de células coradas em Azul de Tripán a 0,4% em câmara de Neubauer. Em seguida foi realizada a análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo (descrito no item 3.7) nas células obtidas.

4.8. Análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo das CMS provenientes das culturas de 6 horas

A placa com a cultura de 6 horas das CMS com os diferentes estímulos como descrito no item 3.4 foi centrifugada durante 5 minutos, a 4° C, 600xg e freio baixo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os poços foram ressuspensos com 150 µL de PBS gelado. A placa foi centrifugada novamente durante 5 minutos, a 4° C, 600xg, freio baixo e o sobrenadante mais uma vez foi descartado. Os poços foram ressuspensos com 150 µL de PBS contendo 0,02% de EDTA e o sobrenadante foi misturado cuidadosamente no vortex por um minuto e a placa então foi mantida a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esse período, a placa foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado por duas vezes e então, as células foram coradas com *Live/Dead fixable dead cells stain Violet* (Molecular probes – Invitrogen, Eugene, OR, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e foram incubadas durante 30 minutos a 4° C protegida da luz. Após o período de incubação, a placa foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado por duas vezes. As células foram então marcadas com os anticorpos de superfície CD3-v500 (Biolegend), CD4-PercP (Biolegend), CD8-Alexa 700 (Biolegend), CD69-APCCy-7 (Biolegend), CD45RO-PE/Cy-7 (Biolegend), CD62-L-FITC (Biolegend) e seus respectivos controles de isotipo. Após 30 minutos de incubação a 4°C, os poços foram lavados com 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 1% SFB. Em seguida os poços foram ressuspensos com 1% de paraformaldeído e incubadas por 30 minutos. Após esse período de incubação os poços foram lavados duas vezes com 150µL de PBS com 0,1% de azida, e as células foram transferidas para tubos de citometria em um volume final de 200µL de PBS com 0,1% de azida para posterior leitura em citômetro de fluxo FACSAria (BD Biosciences). As porcentagens das células com os fenótipos virgens, de memória

central, de memória efetora, CD69⁺ foram calculadas utilizando o número de células de cada fenótipo em relação ao número total de células CD4⁺ e CD8⁺. As porcentagens obtidas em cada estímulo utilizado foram descontadas do controle não estimulado.

4.9. Análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo das CMS provenientes das culturas de 18 horas

As CMS estimuladas ou células derivadas de biópsia foram adicionadas em tubos de citometria de 1,1 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA). As amostras foram então centrifugado a 450xg por 10 minutos a 4°C e as células lavadas em PBS. As células foram marcadas com *Live/Dead fixable dead cells stain Violet* (Molecular probes – Invitrogen, Eugene, OR, EUA), ressuspensas em 1mL de PBS e incubadas por 30 minutos a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas novamente em PBS, e depois em solução de lavagem (1 mM de EDTA (Ambion, EUA), 1% de albumina sérica bovina (BSA – Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, EUA) em PBS). As células foram ressuspensas em solução de bloqueio (5% soro AB humano inativado, 1% BSA em PBS), e incubadas por 30 min a 4°C. Após bloqueio, as células foram lavadas e marcadas com anticorpos monoclonais e incubadas por 30 min a 4°C. Os anticorpos utilizados foram: anti-CD4-Alexa Fluor 700 (Biolegend, San Diego, CA, EUA), anti-CD25-PE (Biolegend, San Diego, CA, EUA), CD45RA-BV510 (Biolegend, San Diego, CA, EUA), anti-CD137-APC (Biolegend, San Diego, CA, EUA), CD45RO-PECY7 (Biolegend, San Diego, CA, EUA), CCR7-BV650 (Biolegend, San Diego, CA, EUA). Ao fim do período de incubação, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído a 2% e incubadas por 20 minutos a 4°C. Após essa etapa, as células foram armazenadas em solução de lavagem para continuação da marcação intracelular no dia seguinte. Para marcação intracelular as células foram permeabilizadas com FOXP3 Perm (Biolegend, San Diego, CA, EUA) e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células marcadas com o anticorpo anti-FOX3-Alexa Fluor 488 (Ebioscience, San Diego, CA, EUA) incubadas por 30 minutos, protegidas da luz à temperatura ambiente. Finalmente, as celulares foram lavadas e ressuspensas em solução de lavagem para análise em citômetro de fluxo FACS Aria IIu (BD-Biosciences, EUA).

4.10. Imunofluorescência

A biópsia de pele foi realizada sobre lesão típica (escolhida no exame clínico). Após a escolha da lâmina com auxílio de um patologista em microscópio ótico onde cortes seriados, cortados em micrótomo, com 5µm de espessura foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina, para avaliação geral das camadas de pele para diagnóstico. Novos cortes, agora para imunofluorescência foram solicitados ao Laboratório de Hanseníase, onde o fragmento de pele congelado foi processado em micrótomo criostato para obtenção de cortes histológicos com 5 µM de espessura aderidos a lâminas. A primeira etapa consiste em lavar o tecido 3 vezes, por 5 minutos, com PBS. A lavagem nesta metodologia significa que a solução foi depositada sobre o corte histológico durante 5 minutos e depois removida. Em seguida, foi depositado sobre o corte solução de permeabilização (10% de SFB, 0,01% de triton em PBS) durante 30 minutos. Estes cortes histológicos foram então incubados com anticorpos primários em câmara úmida, por 18 horas para identificação de subpopulações de células. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-CD4 Mouse IgG1 (Abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-CD8 Rabbit IgG1 (Abcam, Cambridge, MA, EUA), anticorpo primário anti-FOXP3 Rat IgG2a (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Após o fim da incubação, os tecidos foram lavados por 5 vezes, durante 5 minutos, com solução de permeabilização e marcados com os anticorpos secundários Rat IgG2a Alexa Fluor 657 (Abcam, Cambridge, MA, EUA), Mouse IgG1 Alexa Fluor 555 (Molecular Probes, Invitrogen, EUA), Rabbit IgG1 Alexa Fluor 488 (Abcam, Cambridge, MA, EUA) e DAPI (Molecular Probes, Invitrogen, EUA), em incubação de 2 horas protegida da luz. Após marcação, o tecido foi novamente lavado por 5 vezes por 5 minutos e então a lamínula foi colocada sob a lâmina na presença do reagente Antifade (Molecular Probes, Invitrogen, EUA). Enfim, o corte histológico foi analisado por microscopia de fluorescência no equipamento ZEISS Colibri Observer Z1.

4.11. Dosagem de mediadores por sistema multiplex

Os sobrenadantes das culturas dos ensaios de estimulação *in vitro* foram aliquotados e estocados a -20°C até o momento da análise. Quatorze citocinas (IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, IFN-γ, TNF, G-CSF, GM-CSF,) e três quimiocinas (MCP-1, IL-8, MIP-1β) foram avaliadas usando o kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay, Bio-Rad, EUA) que contem microesferas

fluorescentes conjugadas a anticorpos monoclonais específicos para cada citocina ou quimiocina alvo. As placas de 96-poços com filtro (componentes do kit) foram pré-umedecidas com 150 μL do “tampão de amostra”, sendo a solução em seguida aspirada utilizando o sistema de sucção a vácuo (Millipore Corporation, Billerica, EUA). Concluída a etapa inicial, 50 μL das microesferas revestidas com anticorpos monoclonais contra os 17 alvos analisados foram adicionados aos poços e em seguida a placa foi lavada com “tampão de lavagem”, aspirada a vácuo, e então, 50 μL das amostras das curvas padrões de cada citocina e quimiocina avaliadas para elaboração das respectivas curvas e dos sobrenadantes de cultura foram adicionados aos poços correspondentes da placa, que foi então incubada protegida da luz, sob leve agitação por duas horas. Após nova lavagem com o sistema de sucção a vácuo foram adicionados 25 μL de anticorpo de detecção em cada poço, diluídos conforme orientação do fabricante e a placa foi incubada protegida da luz sob leve agitação. Por fim, a placa foi incubada sob leve agitação com 50 μL por poço de Streptoavidina conjugada a ficoeritrina (PE), por 10 minutos protegida da luz. Após nova lavagem e aspiração foram adicionados 125 μL do “tampão de amostra” em cada poço, para análise em leitor de Luminex (Bio-Plex Workstation from Bio-Rad Laboratories, Inc). As concentrações de cada parâmetro analisado nas amostras foram estimadas a partir da curva padrão, utilizando o Bio-Plex Manager software (Bio-Rad Laboratories). Os níveis das citocinas foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL).

4.12. Análise dos dados

Os dados de citometria de fluxo foram avaliados com o software FlowJo v10 (Tree Star, Inc, EUA), os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e o teste de Wilcoxon pareado não paramétrico foi utilizado para realizar as análises estatísticas. Os valores de p menores do 0,05 foram considerados significativos. Na análise dos mediadores inflamatórios nos sobrenadantes de cultura as medianas foram comparadas usando teste de Wilcoxon. Para análise de associação coeficiente de correlação Spearman's Rank com correção de Bonferroni para taxa de erro foi utilizado. Análise de componente principal (PCA) foi realizado no software R versão 3.1.2 (Mardia KV, et al. 1981).

5- Resultados

Parte I: Interrupção da exposição persistente ao *M. leprae* combinada ou não com a vacinação recente com BCG aumenta a resposta à antígenos *M. leprae* específicos.

(Os resultados desse trabalho foram publicados na revista PLOS Neglected Tropical Disease e anexados a esta tese).

5.1- Desenho do estudo

Os contatos domiciliares de pacientes multibacilares (HCMB) foram recrutados com uma média de $1,6 \pm 0,7$ meses do início do tratamento do caso índice (tempo designado de T0). Numa etapa posterior do estudo, após um período médio de $13 \pm 7,5$ meses do início do tratamento poliquimioterápico do caso índice, estes mesmos indivíduos foram convidados a ceder nova amostra de sangue periférico (tempo designado de T1). O padrão da resposta imune antígeno-específica destes indivíduos foi analisado nestes dois diferentes momentos (T0 e T1) (**Figura 5.1**).

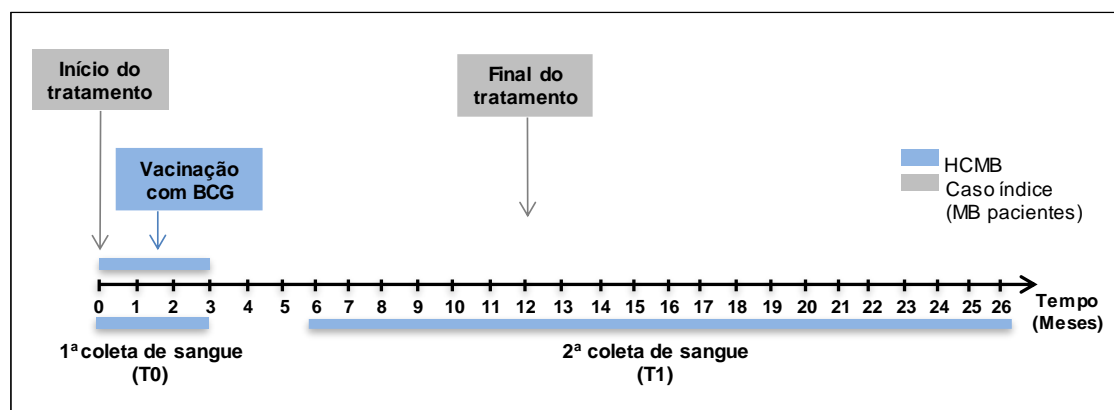


Figura 5.1. Desenho do estudo. Os HCMB foram recrutados durante um período de 0 a 3 meses após o início do tratamento do caso índice. A primeira coleta de sangue foi realizada antes da vacinação BCG de acordo com a presença / ausência de cicatriz BCG (T0). Após um intervalo de 6 a 26 meses a partir do início da quimioterapia do caso índice, os mesmos indivíduos foram recrutados novamente para fornecer novas amostras de sangue periférico (T1).

5.2 - Dados epidemiológicos dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares incluídos no estudo.

Ao longo do estudo recrutamos um grupo de dezesseis contatos compostos por 11 mulheres e 5 homens com idades entre 19 e 63 anos. Na **Tabela 5.2.** é possível observar o histórico de vacinação com BCG e dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo, bem como algumas informações sobre o diagnóstico do caso índice. Dos 16 contatos avaliados, 5 receberam a primeira dose da vacina em T0, 8 receberam a segunda dose da vacina, 2 contatos já apresentavam a cicatriz vacinal em T0 mas não receberam a segunda dose e apenas 1 contato não apresentava cicatriz vacinal e não foi vacinado em nenhum momento do estudo pois estava sob investigação para hanseníase. Posteriormente a possibilidade de doença foi descartada e este contato foi incluído no estudo. Nenhum dos contatos adoeceu durante o desenvolvimento do estudo.

Tabela 5.1. Dados epidemiológicos dos contatos de pacientes multibacilares.

Identificação do contato	Idade (anos) em T0	Vacinação com BCG Neonatal	Vacinação com BCG em T0	Anticorpos IgM contra PGL-I	Forma clínica do caso índice /ILB	Tempo de intervalo entre a primeira e segunda avaliação (meses)
1	52	não	sim	negativo	BL / 4.8	22 meses
2	36	não	sim	negativo	BL / 3.6	6 meses
3	41	não	sim	positivo	BL / 3.6	6 meses
4	52	não	sim	negativo	LL / 5.9	6 meses
5	29	não	sim	negativo	LL / 5.9	12 meses
6	41	sim	sim	negativo	LL / 5.9	26 meses
7	25	sim	sim	negativo	LL / 3.8	26 meses
8	46	sim	sim	positivo	LL / 4.8	12 meses
9	63	sim	sim	negativo	BL / 3.8	12 meses
10	19	sim	sim	positivo	LL / 5.9	20 meses
11	48	sim	sim	positivo	LL / 5.9	10 meses
12	26	sim	sim	negativo	LL / 4.8	17 meses
13	38	sim	sim	positivo	BL / 2.0	6 meses
14	43	não	não	positivo	BL / 4.8	21 meses
15	19	sim	não	negativo	BL / 3.6	6 meses
16	20	sim	não	negativo	LL / 5.9	6 meses

Abreviações: LL, Lepromatoso Lepromatoso; BL, Borderline Lepromatoso; ILB, índice bacilar logarítmico da lesão de pele; T0 indica o início do tratamento do caso índice e a data da vacinação com BCG; BCG = Bacilo Calmette–Guérin, PGL-I= Glicolipídeo fenólico I.

5.3-Análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e efetora em resposta ao *M. leprae* em CMS de contatos domiciliares de pacientes multibacilares antes e após o tratamento do caso índice

5.3.1. Sequência de análises utilizadas para identificação das subpopulações de linfócitos CD4⁺CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ de memória central e de memória efetora.

Utilizamos a citometria de fluxo para avaliar o impacto do tratamento do caso índice e a vacinação com BCG nas frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e de memória efetora, CD69⁺ (marcador de ativação recente) no sangue periférico destes indivíduos em T0 e T1. Para identificar as subpopulações de interesse, uma sequência de análises foi realizada. Inicialmente, células mortas foram excluídas utilizando um kit comercial que permite a distinção de células mortas fixadas. Posteriormente, os aglomerados de células foram excluídos utilizando os parâmetros de tamanho FSCA (“Foward Scatter” área) x FSCH (“Foward Scatter” altura). (**Figura 5.2. A**). Em seguida, os parâmetros de complexidade e granulosidade celular (SSC-A) e tamanho (FSCA) foram utilizados para selecionar a região de análise de linfócitos T (**Figura 5.2. B**). A região de linfócitos T CD4⁺ foi determinada utilizando o anticorpo específico para linfócitos T CD4⁺ juntamente com o parâmetro SSC (**Figura 5.2. C**). Já a região de linfócitos T CD8⁺ foi determinada utilizando anticorpos específicos anti-CD8 e anti-CD3 (**Figura 5.2. D**).

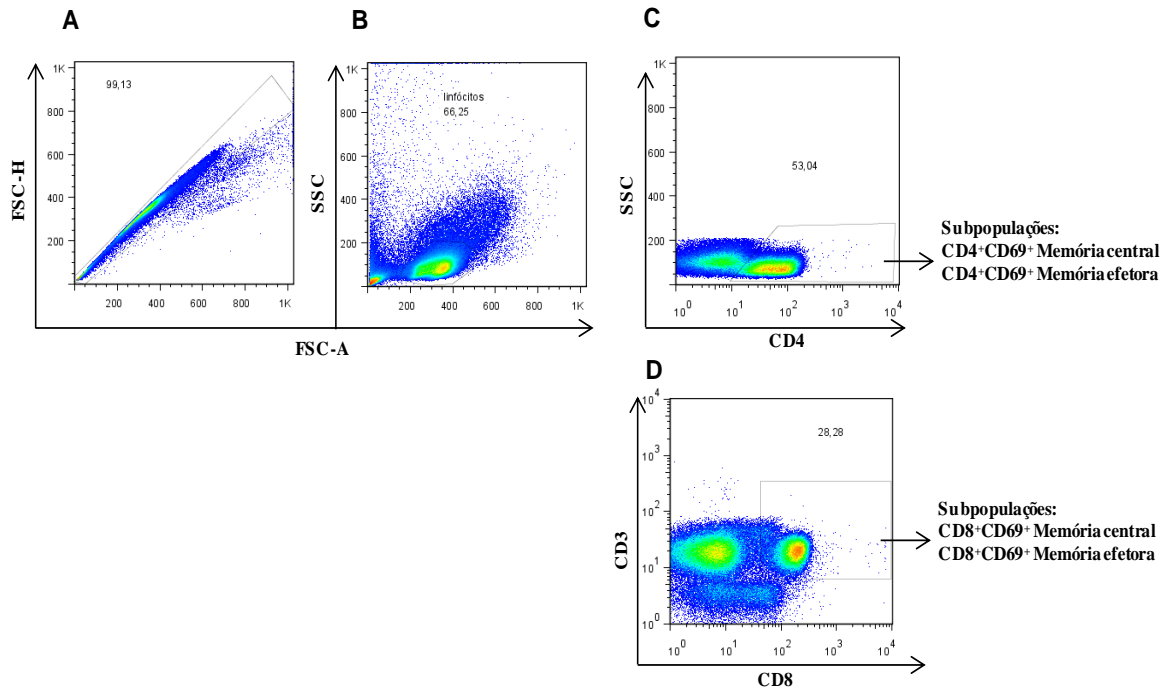


Figura 5.2. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. **B)** Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **C)** Identificação de linfócitos T CD4⁺. **D)** Identificação de linfócitos T CD8⁺.

A partir da determinação da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, utilizamos a marcação com anticorpos anti-CD45RO e anti-CD62L para identificar as subpopulações com os fenótipos de memória central (CD45RO⁺ CD62L⁺) e memória efetora (CD45RO⁺ CD62L⁻). A partir dessas subpopulações, identificamos os linfócitos recém-ativados (CD69⁺) como pode ser observado na figura 5.3.

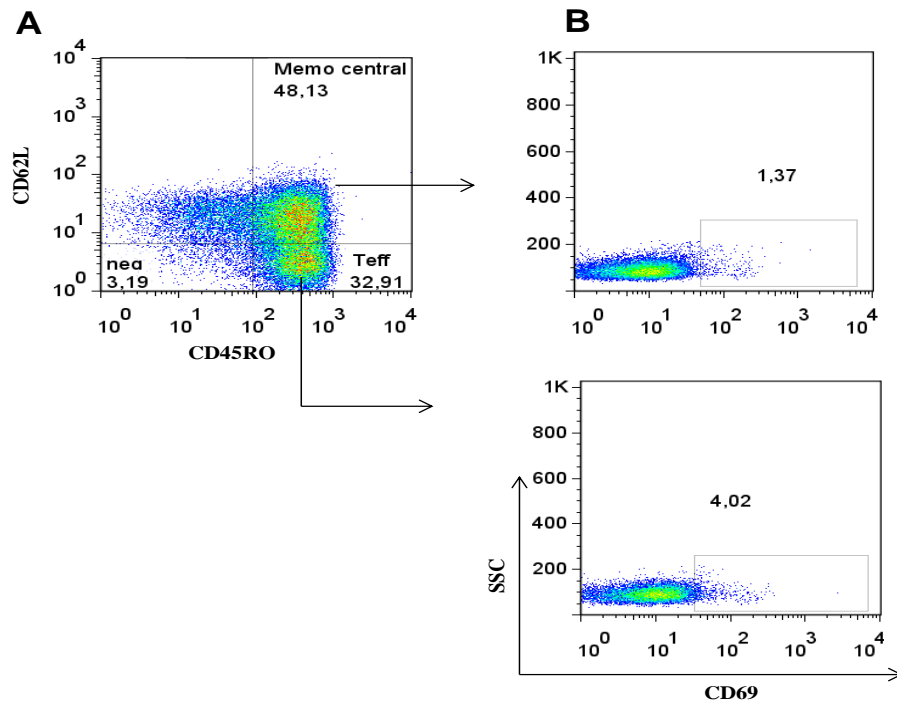


Figura 5. 3. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e de memória efetora. A) Identificação da população de memória central (CD45RO⁺ CD62L⁺) e memória efetora (CD45RO⁺ CD62L⁻). B) Imagem superior demonstra a população de memória central positivas para CD69 e a imagem inferior demonstra a população de memória efetora positivas para CD69.

5.3.2. Frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ de memória central e de memória efetora respondedores a *M. leprae* em T0 e T1.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram uma redução nos níveis de IFN- γ de contatos de pacientes multibacilares quando comparados com o grupo de contatos de pacientes paucibacilares, sugerindo que a superexposição a *M. leprae* poderia levar a uma diminuição da resposta *M. leprae* específica (Martins MVBS e et al, 2012).

Fomos então avaliar o percentual de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ em resposta a *M. leprae* nos fenótipos de memória central e memória efetora. Na **Figura 5.3.A** é possível observar um aumento significativo das frequências de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central em resposta a *M. leprae* após o tratamento do caso índice e após a vacinação com BCG. Embora não tenha sido significativo é possível observar pela mediana um aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora em T1. Na **Figura 5.3B** é possível observar as frequências de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central individuais dos contatos. Para identificarmos quais dos contatos apresentaram aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central em resposta a *M. leprae* em T1, subtraímos o valor percentual das populações em T1 pelo percentual encontrado no T0 (T1-T0). Dos 12 contatos avaliados, em apenas dois não observamos um aumento da frequência de células T1 (contatos 2 e 4). A **Figura 5.3.C** mostra, embora com uma porcentagem menor, também um aumento significativo da frequência de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ de memória central em T1 em resposta a *M. leprae*, assim como para os CD4⁺CD69⁺. Não observamos um aumento significativo dos linfócitos T CD8⁺CD69⁺ de memória efetora em T1, embora a mediana mostre também uma tendência de aumento. A frequência individual de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ de memória central dos contatos avaliados é mostrada na **Figura 5.3D**.

Dados da literatura demonstram o efeito positivo da vacina BCG sobre a resposta imune pró-inflamatória (Lalor MK, et al. 2010; Lalor MK, et al. 2011; Smith SG, et al. 2010), no entanto, é interessante observar que o contato 14 apresentou um aumento tanto da frequência de linfócitos T CD4 quanto de CD8 em resposta a *M. leprae* em T1. Este contato não havia sido vacinado quando foi recrutado em T0 e também não tomou nenhuma das doses da vacina. Dessa forma, é possível observar

mesmo que em apenas um indivíduo, o efeito positivo do tratamento do caso índice sobre essa subpopulação de células.

M. leprae

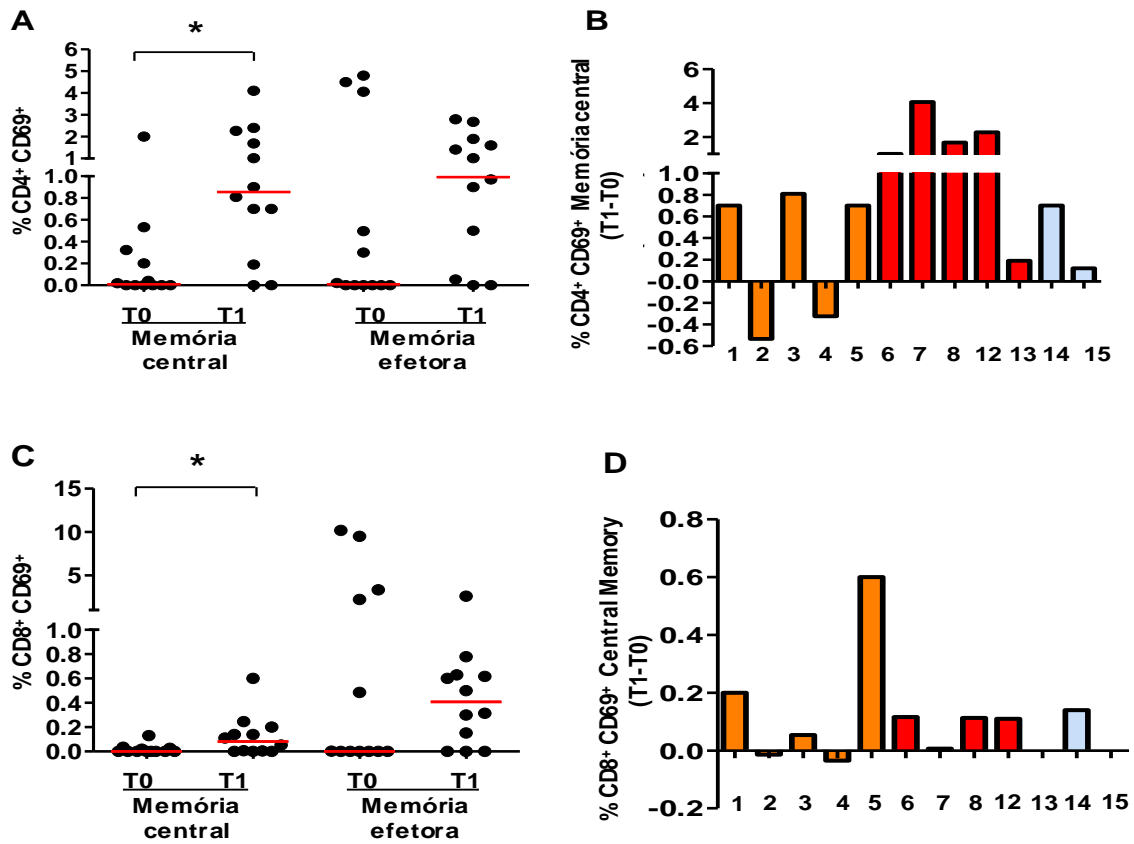


Fig 5.3. Frequências de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ e CD8⁺CD69⁺ de memória central e de memória efetora respondedores ao *M. leprae* em T0 e T1. Frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ (A) e CD8⁺CD69⁺ (C) de memória central e efetora em resposta ao *M. leprae* em T0 e T1. Cada círculo representa um contato em T0 e em T1. A linha vermelha representa a mediana. **B)** Frequência individual de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central. **D)** Frequência individual de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ de memória central após a vacinação com BCG e tratamento do caso índice. Cada barra representa um contato identificado por seu respectivo número. As barras laranjas representam os contatos que receberam a primeira dose de BCG em T0, as barras vermelhas representam os contatos que receberam a segunda dose de BCG em T0 e as barras azuis representam os contatos que não foram vacinados em T0. n = 12. * p<0.05.

5.3.3. Frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central e memória efetora em resposta a peptídeos *M. leprae* específicos em T0 e T1.

Nós também investigamos se o tratamento do caso índice e vacinação com BCG poderiam afetar na resposta específica a *M. leprae*. Para alcançarmos esse objetivo, avaliarmos a frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ em resposta a peptídeos específicos de *M. leprae* e restritos por MHC de classe II. Como pode ser observado na **Figura 5.4 A**, houve um aumento significativo da frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central e de memória efetora (**Figura 5.4 B**) em T1. Até os contatos que não foram vacinados em T0 também aumentaram suas frequências em T1. Esses peptídeos não são compartilhados com BCG, sendo o aumento observado específico para *M. leprae*. A vacina BCG pode aumentar a capacidade de resposta a um antígeno não relacionado através de modificações epigenéticas em leucócitos, conhecido como imunidade treinada (Kleinnijenhuis, J et al, 2012). Essas alterações já foram observadas contra fungos, protozoários e bactérias (Kleinnijenhuis J, et al. 2012; Parra, et al. 2013; Tribouley J, et al. 1978). Nossos dados sugerem que a vacinação com BCG, bem como a eliminação da fonte exógena de bacilo com o tratamento do caso índice aumentam a capacidade do sistema imunológico de responder a *M. leprae*.

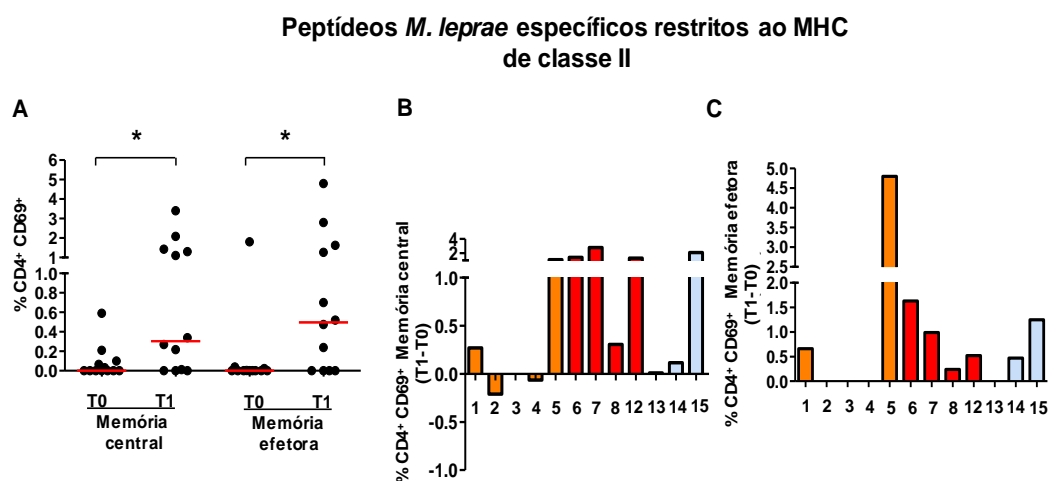


Fig 5.4. Frequências de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central e memória efetora respondedores a peptídeos *M. leprae* específicos em T0 e T1. (A) Frequências de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central e efetora em resposta a peptídeos *M. leprae* específicos em T0 e T1. Cada círculo representa um contato em T0 e em T1. A linha vermelha representa a mediana. (B) Frequências individuais de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória central. (C) Frequências individuais de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ de memória efetora após a vacinação com BCG e tratamento do caso índice. Cada barra representa um contato identificado por seu respectivo número. As barras laranjas representam os contatos que receberam a primeira dose de BCG em T0, as barras vermelhas representam os contatos que receberam a segunda dose de BCG em T0 e as barras azuis representam os contatos que não foram vacinados em T0. n = 12. * p<0.05.

5.4. Análise de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes das culturas de CMS dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares estimuladas com *M. leprae* e peptídeos específicos de *M. leprae*.

Além da análise por citometria de fluxo, nós avaliamos também a produção de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos sobrenadantes das culturas de CMS de todos os contatos domiciliares estimuladas com *M. leprae* e peptídeos específicos de *M. leprae* nos dois diferentes tempos de exposição ao bacilo. Foram medidos os níveis de 17 mediadores inflamatórios nos sobrenadantes destas culturas, utilizando um sistema multiplex (IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL10, IL-12, IL-13, IL-17, assim como as quimiocinas IL-8, MIP-1 β , MCP-1 e os fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF). Um aumento significativo foi observado na produção de IL-1 β , IL-6, MIP-1 β e MCP-1 após o tratamento do caso índice e a vacinação com BCG. Da mesma forma, uma tendência de aumento foi observada para os níveis de TNF ($p = 0,073$), IL-17 ($p = 0,083$) e IFN- γ ($P = 0,093$) como pode ser observado na **Figura 5.5.A**. Esse resultado era esperado já que *M. leprae* e BCG compartilham muitos antígenos e a vacinação com BCG induz em adultos uma resposta tipicamente com perfil Th1 (Ravn P, et al. 1997).

Entre os mediadores inflamatórios, IL-17 e IL-1 β mostraram uma correlação positiva ($R = 0,7$ e $p = 0,001$) nos níveis de produção em resposta a *M. leprae* em T0 e T1. Os níveis de IL-8 estavam acima do limite de detecção em todos os contatos. Em culturas estimuladas com os peptídeos de *M. leprae* apenas os níveis de MCP-1 apresentaram uma tendência de aumento em T0 ($p=0,083$) (**Fig. 5.5B**).

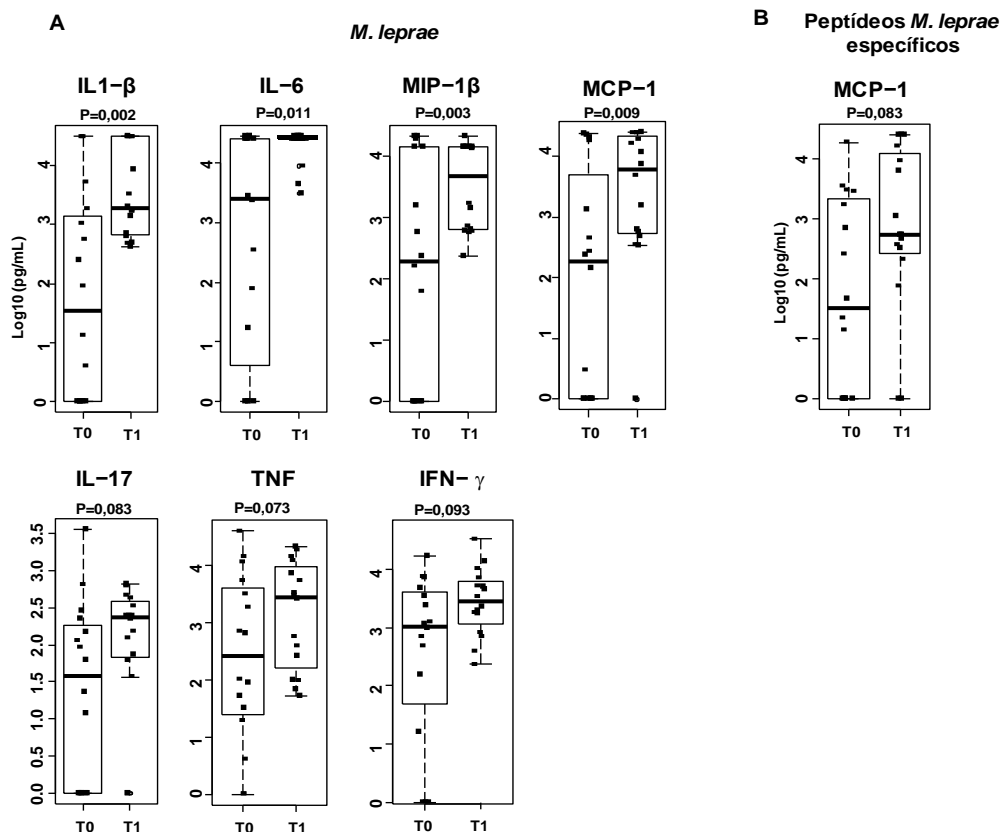


Fig 5.5. Aumento da produção de mediadores inflamatórios em resposta ao *M. leprae* após o tratamento do caso índice e vacinação com BCG, em contatos de pacientes multibacilares. Níveis de mediadores inflamatórios em sobrenadantes após 5 dias de cultura em resposta ao *M. leprae* (A) ou a peptídeos *M. leprae* específicos restritos por MHC de classe II (B) dosados em ensaio multiplex antes (T0) e depois (T1) do tratamento do caso índice e vacinação com BCG. Box plots mostram a mediana, os níveis mínimos e máximos das amostras. Os círculos representam os contatos. n = 16. * p<0.05.

O comportamento individual de cada contato referente à produção desses mediadores inflamatórios é mostrado na **Figura 5.6**. Independente do *status* de vacinação, ou seja, se o indivíduo foi vacinado ou não em T0 diversos contatos apresentaram níveis aumentados de mediadores inflamatórios em resposta a *M. leprae* em T1. Interessantemente, o aumento nos níveis desses mediadores inflamatórios foi observado mesmo nos contatos em que o intervalo entre a primeira e a segunda avaliação foi de 20-26 meses (Contatos n° 1, 6, 7, 10, 14), e também naqueles que não foram vacinados em T0 (Contatos n° 14, 15 e 16). É provável que um aumento mais consistente junto com níveis mais altos de produção de mediadores tenha ocorrido entre os contatos que receberam uma segunda dose de BCG em T0. No entanto, as diferenças não atingiram o nível de significância estatística. Não observamos diferenças na resposta entre os indivíduos positivos ou negativos para PGL-I.

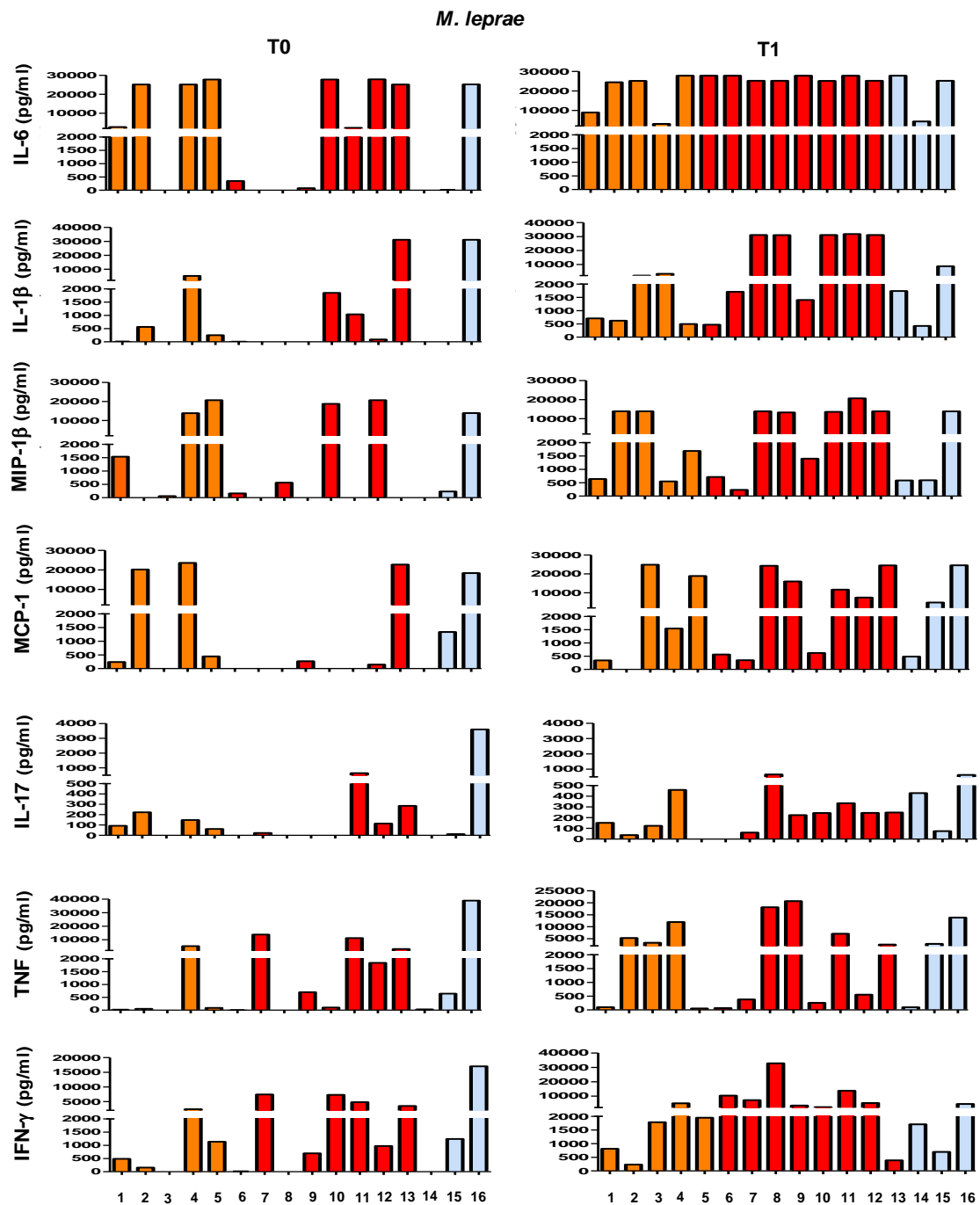


Figura 5.6. Produção individual de mediadores inflamatórios em resposta ao *M. leprae* em T0 e T1. Os sobrenadantes de cultura de cinco dias de CMS estimuladas com *M. leprae* foram analisados por sistema multiplex em T0 e T1. T0 indica início do tratamento do caso índice e antes da vacinação com BCG e T1 indica o final do tratamento do caso índice e após a BCG. Cada barra representa um contato. As barras laranjas correspondem aos contatos que receberam a primeira dose da vacina em T0, as barras vermelhas correspondem a segunda dose da vacina em T0, e as barras azuis representam os contatos que não foram vacinados em T0. n=16.

Posteriormente, nós avaliamos se as citocinas que aumentaram significativamente ou próximo da significância estatística em T1 seriam capazes de diferenciar T0 de T1 quando analisadas simultaneamente. A partir da análise de componente principal, 76,9% do total de variação na resposta das 7 citocinas (MCP-1, IL-1 β , IL-17, IL -6, IFN- γ , MIP-1 β e TNF) foram representados pelos 2 componentes. O primeiro componente foi responsável por 62% da variação total, correspondendo à média da resposta padronizada em log para a IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL17, MCP-1, TNF e MIP-1b. O segundo componente é independente do primeiro e descreve 14% da variação restante, correspondendo à média da resposta para a MIP-1 β e IL-6 (**Tabela 5.2**). Todas essas citocinas juntas, não foram capazes de diferenciar completamente T0 de T1. No entanto, uma produção mais homogênea desses mediadores foi observada em T1 (**Figura 5.7**), sugerindo uma tendência de separação desses dois diferentes momentos.

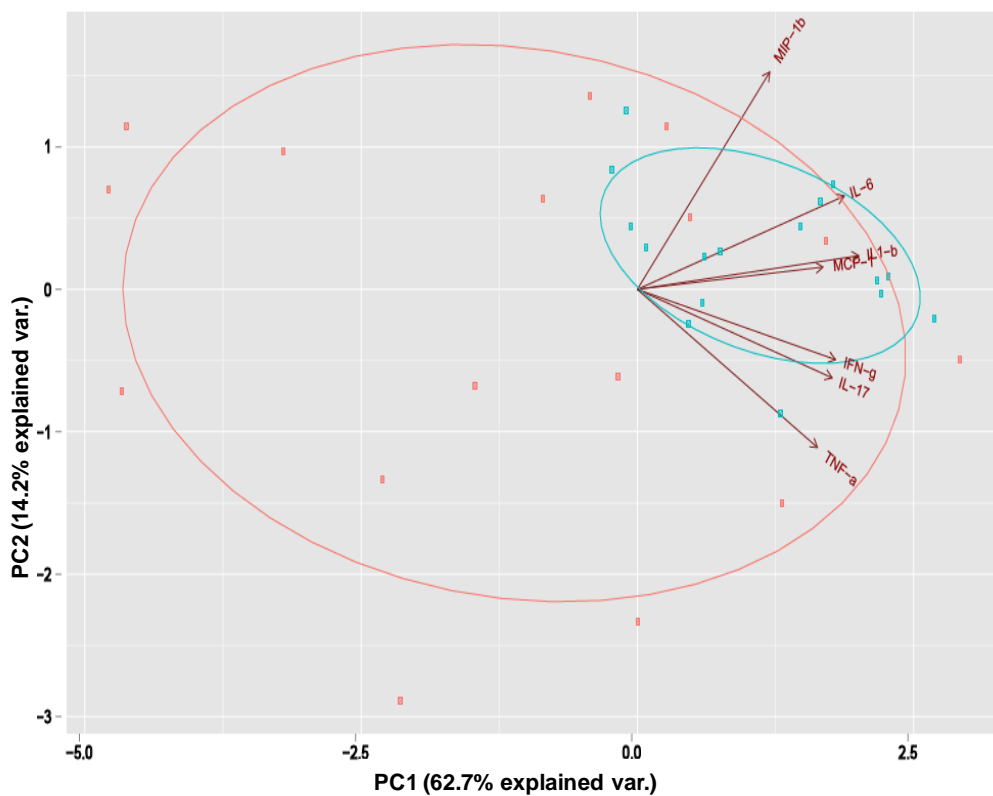


Figura 5.7. Análise de componente principal. Componente principal 1(PC1) abrange 62,7% das amostras e componente principal 2 (PC2) abrange 14,2% da variabilidade das amostras. Vetores em marrom indicam as citocinas. Amostras de T0 em salmão (n = 16) e amostras de T1 em azul (n = 16)

Tabela 5.2. Análise de componentes principais. Análise de componentes principais de 7 citocinas a partir de sobrenadantes estimulados com *M. leprae* em T0 e T1.

Component	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
Component 1	4.25	3.29	62.73	62.73
Component 2	0.96	0.44	14.18	76.91
Component 3	0.52	0.10	7.73	84.64
Component 4	0.43	0.07	6.27	90.91
Component 5	0.36	0.19	5.27	96.18
Component 6	0.17	0.08	2.48	98.66
Component 7	0.09	NA	1.34	100.00
Variable	Component 1	Component 2		
IFN- γ	0.39	-0.23		
IL-17	0.39	-0.29		
IL-1 β	0.44	0.11		
IL-6	0.41	0.30		
MCP-1	0.37	0.07		
MIP-1 β	0.26	0.70		
TNF	0.36	-0.51		

PARTE II- Avaliação do perfil fenotípico e funcional de subpopulações linfocitárias *M. leprae* específicas presentes em sangue periférico e lesão de pele de pacientes com hanseníase

5.5. Avaliação de células T *M. leprae* específicas por citometria de fluxo em sangue periférico de pacientes com hanseníase.

Na segunda etapa do nosso trabalho, nos concentramos em analisar pacientes com hanseníase. Esta investigação permanece em andamento, no entanto, dados preliminares dessa etapa foram incluídos no Grant NIH_NOA_1R01AI129835-01, recém aprovado e com vigência prevista de 2017 a 2022.

Até o momento recrutamos oito pacientes com hanseníase, sendo quatro com a forma multibacilar e quatro com a forma paucibacilar (**Tabela 5.3**).

Tabela 5.3. Dados epidemiológicos dos pacientes com hanseníase

Pacientes	Idade (anos)	Sexo	Forma clínica/ILB	IB	Tempo de tratamento
PB 01	39	F	BT / 0	0	2 meses
PB 02	43	M	BT / 0	0	virgem
PB 03	45	F	TT / 0	0	virgem
PB 04	50	F	BT / 0	0	virgem
MB 01	23	M	BL / 4,3	2,2	1 mês
MB 02	60	F	LL / 4,8	5+	1 mês
MB 03	25	F	LL / 3,8	5+	virgem
MB 04	50	F	LL / 4,9	5+	virgem

Abreviações: LL, Lepromatoso Lepromatoso; BL, Borderline Lepromatoso; BT, Borderline Tuberculóide. ILB, índice bacilar logarítmico da lesão de pele; IB, Índice bacilar.

A **Figura 5.8** mostra a estratégia de *gates* utilizados para identificação das populações de interesse por citometria de fluxo. Primeiramente, os grumos de células foram excluídos através dos parâmetros de dispersão frontal medidos pela área (FSC-A - *Foward Scatter Area*) e altura (FSC-H, *Foward Scatter height*) (**Figura 5.8-A**). Em seguida, os parâmetros de complexidade e granulosidade celular (SSC-A) e tamanho (FSC-A) foram utilizados para selecionar a região de análise de linfócitos T (**Figura 5.8-B**), posteriormente as células mortas foram excluídas utilizando um kit comercial que permite a distinção de células mortas fixadas (**Figura 5.8-C**) e para seleção de linfócitos T CD4 e CD8, anticorpos específicos foram utilizados (**Figura 5.8-D**).

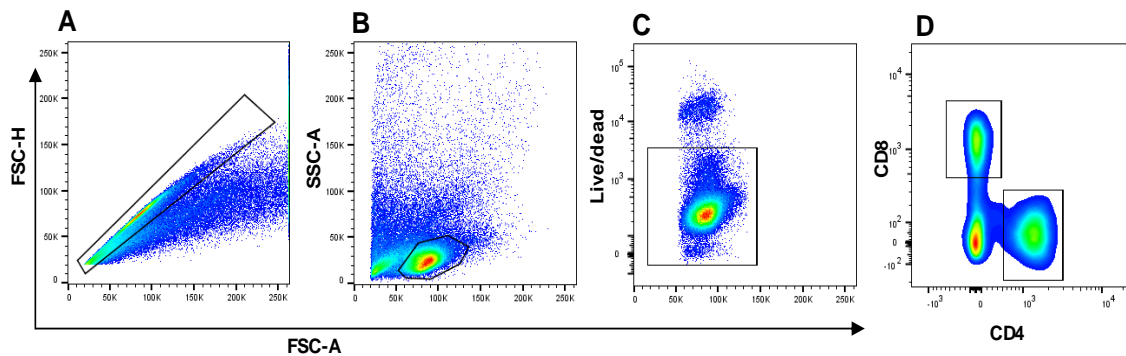


Figura 5.8. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. A) Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. B) Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. C) Exclusão de células mortas. D) Identificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Para caracterizarmos as células Tregs *M. leprae* específicas de memória, utilizamos os anticorpos anti-CD25 (cadeia α do receptor de IL-2), anti-FOXP3 (fator de transcrição linhagem-específico), anti-CD137 e anti-CD45RA (**Figura 5.9-A**), uma vez que as células Tregs *M. leprae* específicas de memória são $CD25^{high}FOXP3^{+}CD137^{+}CD45RA^{-}$. As células T convencionais de memória foram caracterizadas como $CD25^{+}FOXP3^{-}CD45RA^{-}$ (**Figura 5.9-B**).

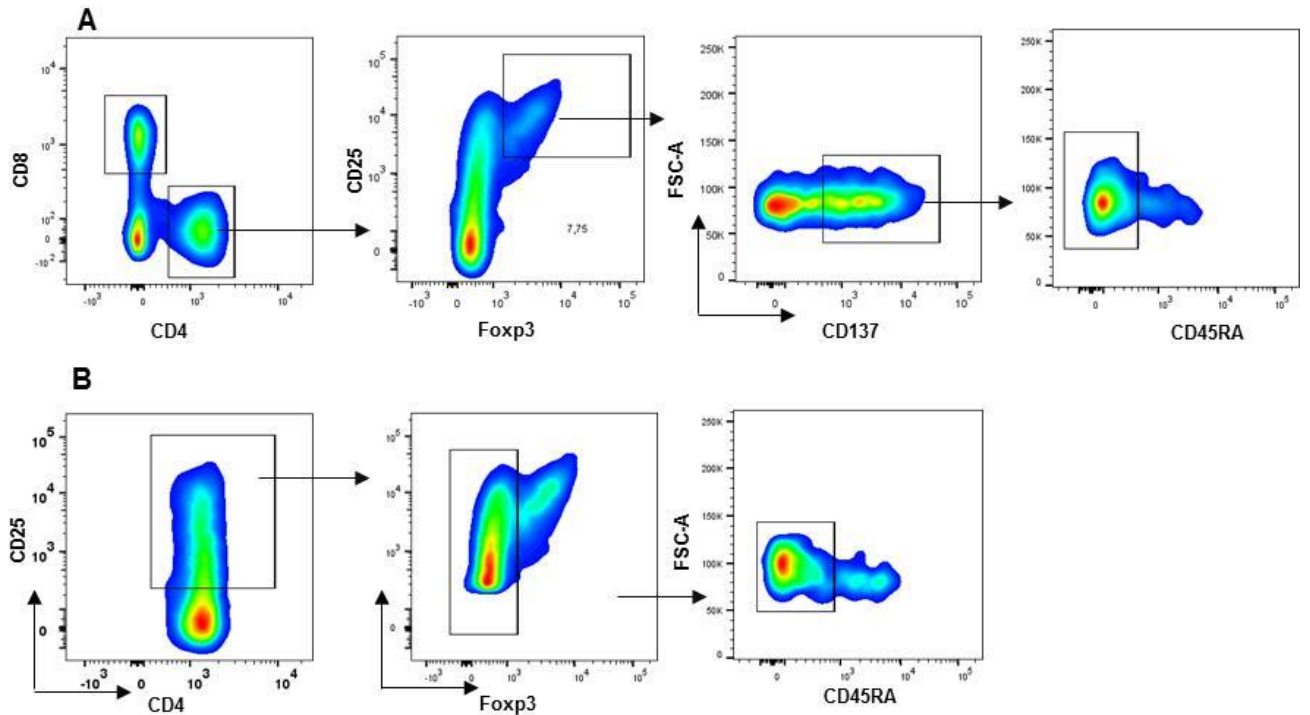


Figura 5.9. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos T reguladores *M. leprae* específicos e T convencionais de memória. **A)** Dentro da região $CD4^{+}$ as células Tregs foram detectadas a partir da expressão simultânea de $CD25^{high}$ e FOXP3 ($CD4^{+}CD25^{high}FOXP3^{+}$), posteriormente as células $CD137^{+}$ foram avaliadas. **B)** Células T convencionais de memória foram identificadas a partir da expressão simultânea de CD4 e CD25, pela ausência da expressão de Foxp3 e CD45RA ($CD4^{+}CD25^{+}FOXP3^{-}CD45RA^{-}$).

Quando estimuladas *in vitro*, as células T de memória apresentam um baixo limiar de ativação e intensa proliferação (Sallusto F, et al. 2004). O receptor CD137 da superfamília TNF foi reconhecido como um dos genes-alvo do fator de transcrição FOXP3, e é expresso em Tregs logo após ativação (Schoenbrunn A, et al. 2012), dessa forma, utilizamos esse marcador para identificar células Tregs *M. leprae* - específicas. Após cultura de 18hs, nós detectamos a presença de células Tregs *M. leprae* específicas de memória ($CD4^+CD25^+FOXP3^+CD137^+CD45RA^-$) e T convencionais (Tconv) de memória ($CD4^+CD25^+FOXP3^-CD45RA^-$) no sangue periférico dos pacientes em resposta aos co-estímulos CD28 e CD49d, ao estímulo policlonal OKT3, *M. leprae* e à proteína ML1419c do *M. leprae* como pode ser observado na **Figura 5.10** em **A** e **B** respectivamente.

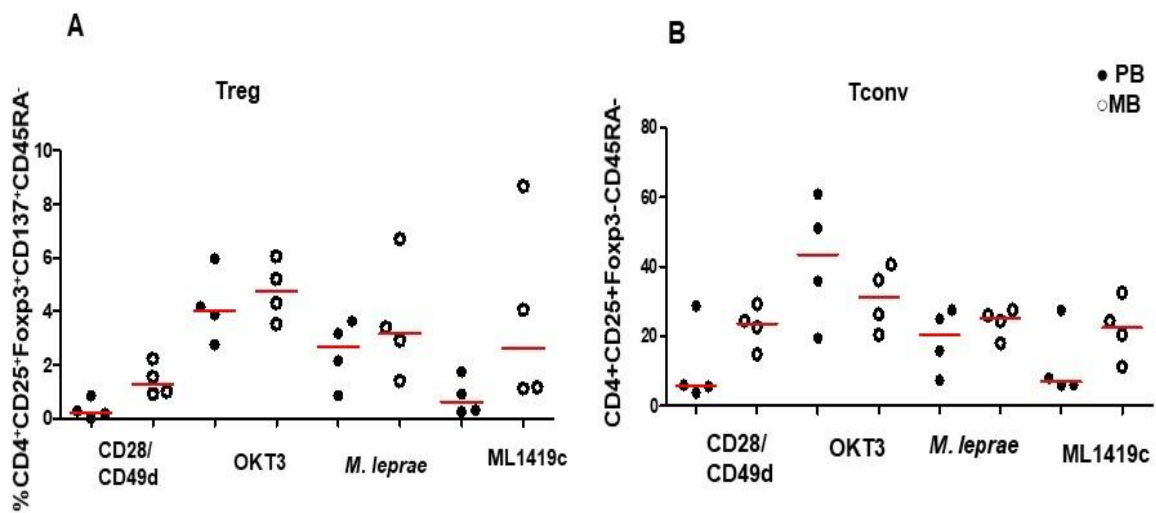
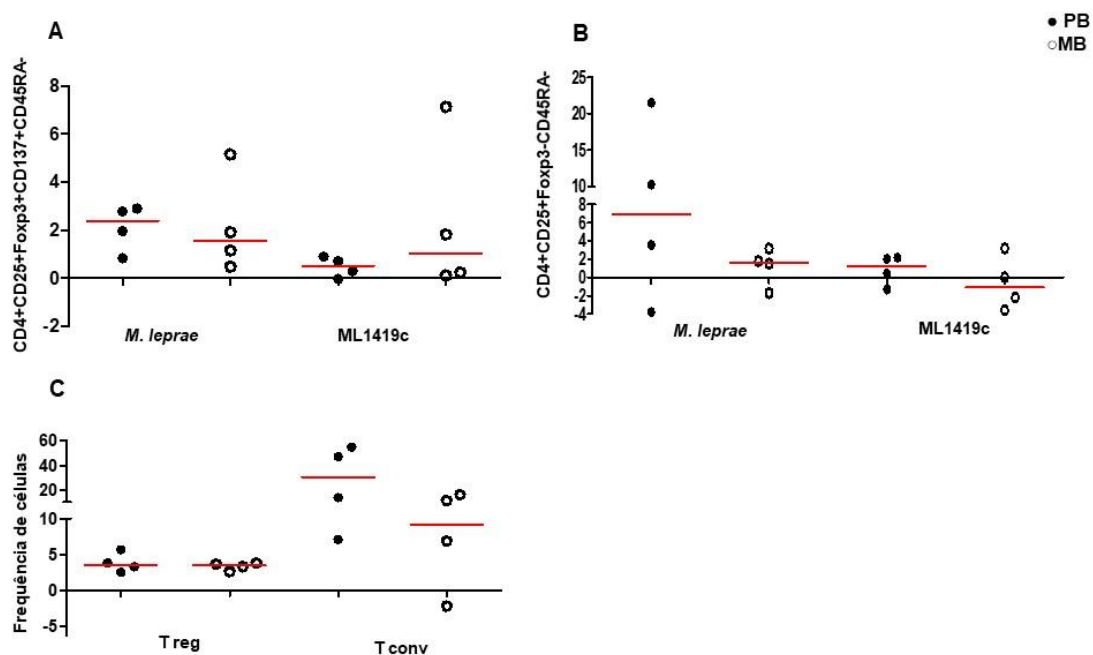
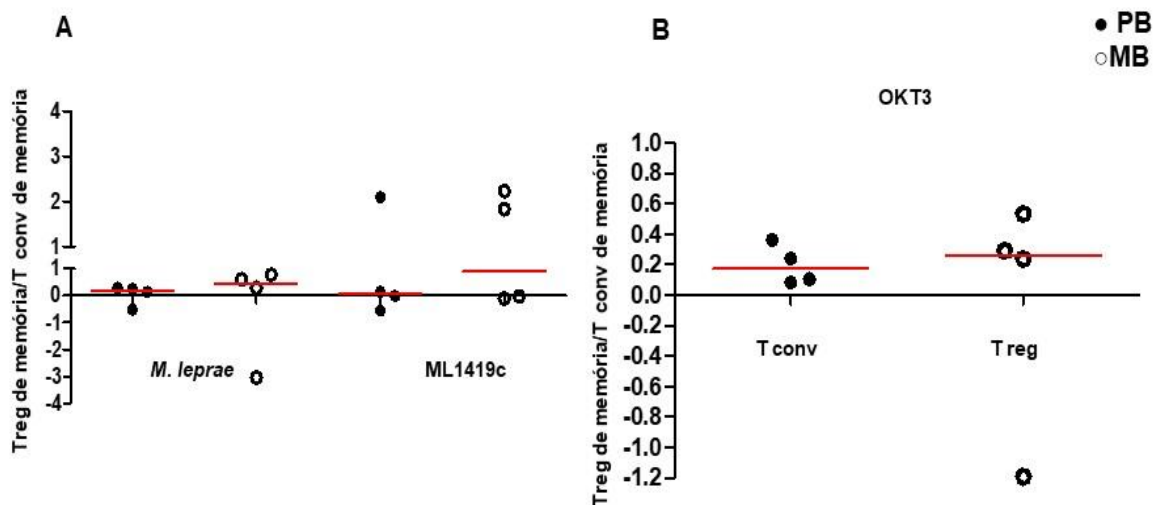


Figura 5.10. Frequência de células T reguladoras *M. leprae* específicas e convencionais de memória em sangue periférico de pacientes com hanseníase. **A)** frequência de células Tregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+137^+$). **B)** frequência de células T convencionais de memória ($CD4^+CD25^+FOXP3^-CD45RA^-$) em sangue periférico de pacientes após 18 horas de cultura. Cada círculo representa um paciente. PB, Paciente Paucibacilar; MB, multibacilar. n=4 por grupo.

As células estimuladas com OKT3, *M. leprae* e proteína também receberam os co-estímulos CD28 e CD49d para otimizar as condições de estimulação. A **Figura 5.11** mostra a frequência de células Tregs (**Figura 5.11-A**) e (**Figura 5.11-B**) convencionais de memória em resposta ao *M. leprae* e a proteína ML1419c respectivamente após a subtração da frequência observada apenas na presença do co-estímulo. Embora o tamanho da amostra por grupo seja pequeno é possível observar que os pacientes multibacilares apresentam menor frequência de células T convencionais de memória em resposta ao *M. leprae* e à proteína quando comparados aos pacientes paucibacilares. A frequência de células Tregs de memória se mostrou heterogênea entre os pacientes em resposta ao *M. leprae*, mas ao estímulo antígeno-específico foi possível observar que pelo menos metade do grupo apresenta uma maior frequência do que os pacientes paucibacilares. A **Figura 5.11-C** mostra a frequência das células Tregs e convencionais de memória em resposta ao estímulo policlonal OKT3. Embora não tenha ocorrido diferença entre as medianas dos grupos, o estímulo policlonal evidenciou a menor frequência de células T convencionais já observada na **Figura 5.11-B** nos pacientes multibacilares.



A expansão simultânea de células Tregs e convencionais durante a resposta a um patógeno pode limitar a imunopatologia, porém, uma maior inibição da resposta efetora pode permitir a persistência do patógeno (Bacher P, et al. 2016). Nós avaliamos a razão entre as células Tregs e convencionais de memória em resposta ao *M. leprae* e à proteína ML1419c (Figura 5.12-A). É possível observar medianas mais elevadas nas razões Tregs/Tconv em resposta ao *M. leprae* e à proteína ML1419c nos pacientes multibacilares em comparação com os paucibacilares. A frequência de Tregs e convencionais de memória em resposta ao estímulo policlonal pode ser observada na Figura 5.12-B.



5.6. Avaliação de células T reguladoras por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência em lesões de pele de pacientes com hanseníase.

5.6.1. Frequência de células Tregs em lesões de pele de pacientes multibacilares

Além da avaliação de células Tregs em sangue periférico, outra importante etapa do nosso trabalho consiste em analisar a frequência dessas células diretamente em lesões de pele dos pacientes com hanseníase. Após digestão mecânica e enzimática do fragmento de pele obtido por biópsia, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Os mesmos parâmetros utilizados em células de sangue periférico para excluir grumos celulares e células mortas também foram utilizados para as células de tecido. Dentro da população de células viáveis, as células $CD4^+$ foram identificadas e as Tregs foram selecionadas ($CD25^{high}FOXP3^+$). Além disso, avaliamos o fenótipo de memória dessas células através dos marcadores CD45RO e CCR7. Células de memória central são $CD45RO^+CCR7^+$ e células de memória efetora são $CD45RO^+CCR7^-$. Como pode ser observado na Figura 5.13, uma maior frequência de células Tregs foi observada na lesão de pele quando comparamos com a frequência encontrada no sangue periférico, 7,58% versus 3,42%, respectivamente. Além disso, todas as Tregs de lesão eram de memória efetora, enquanto as Treg de sangue periférico eram 74,7% de memória efetora e 21,5% de memória central.

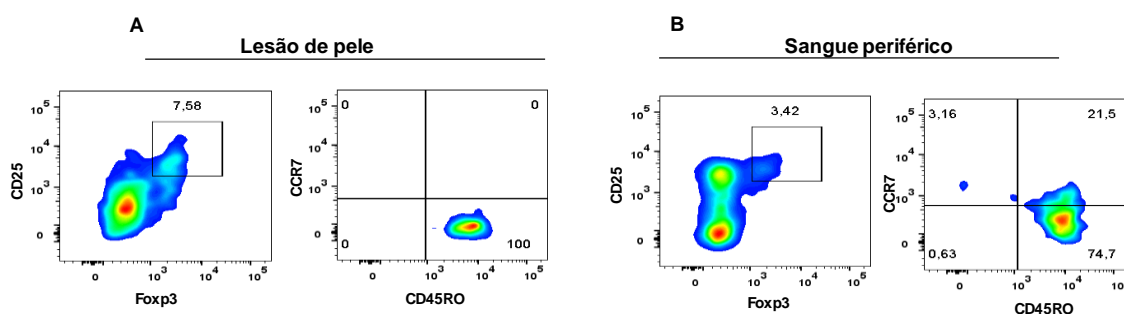


Figura 5.13. Frequência de células T reguladoras em lesões de pele de pacientes multibacilares. A) Células provenientes de fragmento de pele obtido por biópsia foram submetidas à dissociação mecânica e por 18hs foram digeridas enzimaticamente. B) Em paralelo, células mononucleares de sangue periférico do mesmo paciente também foram submetidas ao processo de digestão enzimática. Após incubação, as células foram marcadas extracelularmente com anticorpos monoclonais específicos para detecção do fenótipo regulador e de memória.

5.6.2. Células T reguladoras em lesões de pele de pacientes multibacilares

Com o objetivo de avaliar a presença das células Treg e T efectoras na lesão de pele de pacientes multibacilares, realizamos imunofluorescência e avaliamos a expressão dos seguintes marcadores: CD4, CD8, FOXP3, T-bet. A **Figura 5.14 A** mostra a presença de células e T CD4 positivas para FOXP3 e T CD8 no ambiente de lesão. Além das células T reguladoras, conseguimos detectar também a presença de células T expressando o fator de transcrição T-bet (**Figura 5.14-B**). Esses dados sugerem que as células Tregs no microambiente de lesão poderiam estar modulando negativamente a resposta efectora mediada pelas células Th1(Tbet⁺), favorecendo o crescimento do bacilo.

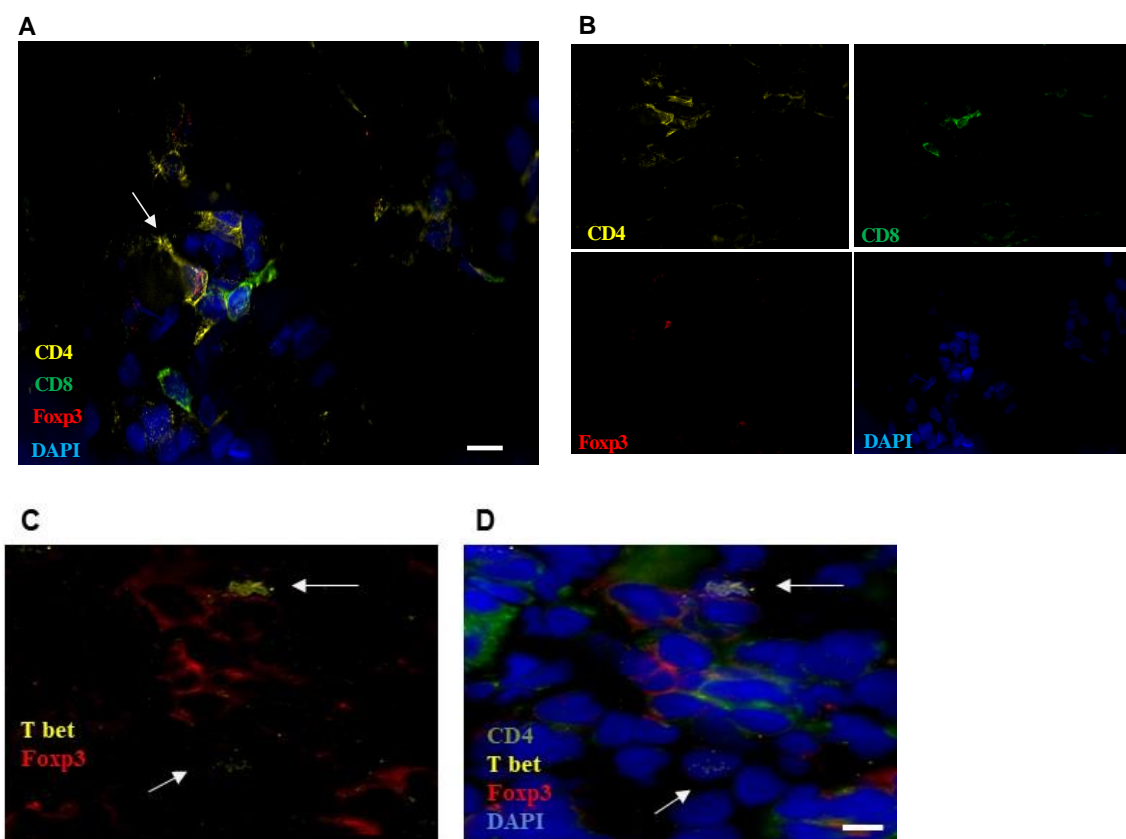


Figura 5.14. Detecção de células T reguladoras e efectoras em lesões de pele de pacientes multibacilares por imunofluorescência. A) Presença de células CD4⁺ expressando FOXP3 e células T CD8⁺. A seta branca indica uma célula CD4⁺FOXP3⁺. B) Marcação individual para CD4, CD8, FOXP3 e DAPI. C) Detecção de células positivas para Tbet. D) Células marcadas para CD4, Tbet, FOXP3 e DAPI. A seta branca indica a presença de Tbet no núcleo. A barra representa 10µm.

6. Discussão

O presente estudo teve como objetivo investigar os mecanismos de modulação da resposta imune celular patógeno-específica em indivíduos infectados por *M. leprae*. A hanseníase é um interessante modelo de estudo para o entendimento da resposta imune, pois a doença pode apresentar várias formas clínicas, cada uma com características imunológicas distintas determinadas pela intensidade de resposta do hospedeiro ao bacilo, sendo a polarização da resposta imune específica a *M. leprae* um elemento importante na patogênese da hanseníase e na determinação das manifestações clínicas. Além disso, outras manifestações imunológicas podem ser observadas durante o curso da hanseníase. Dois tipos de processos inflamatórios agudos podem ocorrer e são conhecidos como episódios reacionais da hanseníase, que acometem de 30-50% dos pacientes devido à reativação da resposta imune celular ligada à produção de mediadores inflamatórios (Britton WJ, Lockwood DNJ, 2004). A reação do tipo 1 é a reação reversa com curso natural que pode durar várias semanas. Ocorre em pacientes com as formas intermediárias da hanseníase (BL, BB e BT) e caracteriza-se por induração e eritema nas lesões existentes, frequentemente com edemas e neurite progressiva, causando neuropatia sensorial e motora. Em casos severos, as lesões podem se tornar ulcerantes. A reação do tipo 2 conhecida como eritema nodoso hansênico (ENH), apresenta um curso natural de uma a duas semanas, porém muitos pacientes apresentam recorrências múltiplas ao longo de vários meses. Este tipo de reação ocorre em pacientes multibacilares (LL e BL) e estes indivíduos em estado reacional apresentam nódulos eritematosos que podem surgir na face, extremidades, ou tronco, sem predileção por lesões existentes. Sistemicamente, estes pacientes muitas vezes também apresentam febre, mal-estar, e algum grau de neurite sensorial e motora (Scollard DM, et al. 2006).

A elucidação das bases imunológicas na hanseníase, a diversidade de resposta entre os polos e a conhecida anergia imunológica dos pacientes lepromatosos têm sido alvo de intensos estudos ao longo desses anos. Para alcançarmos nosso objetivo de avaliar os mecanismos de modulação da resposta imune celular patógeno-específica em indivíduos infectados por *M. leprae*, avaliamos os contatos de pacientes multibacilares em uma primeira etapa do trabalho e posteriormente os pacientes de hanseníase.

Os contatos de pacientes multibacilares são o grupo de indivíduos com maior exposição ao bacilo e devido a essa alta exposição apresentam um maior risco de

adoecimento. Uma possível explicação para o alto risco desses contatos evoluírem da infecção latente para a doença ativa é a modulação negativa da resposta imune efetora a *M. leprae*, em consequência do estímulo contínuo e prolongado do sistema imune pelo patógeno eliminado pelo caso-índice (Fine PE, et al. 1997; De Matos HJ, et al. 1999). Entender os mecanismos envolvidos na modulação negativa da resposta imune sofrida por estes indivíduos superexpostos a *M. leprae* foi o que nos levou a dar início a esta pesquisa. Dois fatores são conhecidos por diminuir o risco de doença entre os contatos de pacientes multibacilares: i) o tratamento do caso índice (paciente) diminuindo a exposição a *M. leprae* vivo (Vijayakumaran P, et al. 1996); e ii) vacinação com BCG (Düppre NC, et al. 2008). Na primeira etapa do estudo recrutamos contatos de pacientes multibacilares e o impacto desses dois fatores na resposta imune desses indivíduos a *M. leprae* foi investigado. Dessa forma, os contatos foram recrutados em dois momentos diferentes: 1º) Antes ou nos três primeiros meses do tratamento do caso índice e antes da vacinação com BCG (T0) e 2º) um intervalo mínimo de 6 meses depois (T1). As frequências das células T de memória de sangue periférico respondedoras a *M. leprae* e os níveis de mediadores inflamatórios produzidos em culturas de células estimuladas com *M. leprae* foram avaliados nestes dois momentos.

Nosso estudo foi originalmente projetado para monitorar os contatos seis meses após sua primeira avaliação. Este intervalo foi escolhido com base em um trabalho anterior que indica uma recuperação da resposta imune aos antígenos de *M. leprae* nos contatos domiciliares 6 meses após o início do tratamento do caso do índice (Godal T e Negassi K. 1973). No entanto, a maioria deles não conseguiu retornar à clínica para a segunda avaliação no intervalo de seis meses e, uma segunda coleta de sangue foi obtida de alguns deles em intervalos maiores como uma tentativa de incluí-los no estudo. Na verdade, essa variável permitiu-nos ver o aumento da resposta imune a *M. leprae*, mesmo 20 a 26 meses após a primeira avaliação, indicando que este é um efeito duradouro. Isso está de acordo com dados anteriores que mostram uma diminuição da detecção de casos entre os contatos de hanseníase ao longo do tempo após o início do tratamento do caso índice (De Matos HJ, et al. 1999). Além disso, vários estudos indicam um efeito a longo prazo da vacinação BCG sobre imunidade inata e adaptativa.

Nossos resultados indicam mudanças na resposta imune dos contatos de pacientes multibacilares aos antígenos micobacterianos após o tratamento do caso índice e vacinação com BCG e essas mudanças podem contribuir positivamente para

resistência ao desenvolvimento da hanseníase. As mudanças observadas foram: i) aumento nas frequências de linfócitos T CD4 e CD8 de memória respondedores a *M. leprae*; ii) Aumento das frequências de linfócitos T CD4⁺ que reconhecem peptídeos específicos de *M. leprae*; e iii) Aumento dos níveis dos mediadores inflamatórios IL1- β , IL-6, IL-17, TNF, IFN- γ , MIP1- β e MCP-1 produzidos por CMS em resposta a *M. leprae*. O aumento da resposta a *M. leprae* nos contatos de pacientes multibacilares em T1 parece ser um efeito duradouro, já que foi observado mesmo após dois anos do primeiro recrutamento (T0). Além disso, um aumento desses parâmetros foi observado mesmo entre os contatos que não receberam a vacina BCG em T0, sugerindo que a exposição reduzida a *M. leprae* vivo em consequência do tratamento do caso índice constitui um elemento importante na melhora da resposta imune observada nesses indivíduos.

Interessantemente, observamos um aumento nas frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas para *M. leprae* nos contatos de pacientes multibacilares em T1. As células T CD4 e CD8 foram implicadas na resposta imune protetora contra micobactérias (Stenger S. 2001) e, portanto, seu aumento nos contatos pode, pelo menos parcialmente, explicar o menor risco de adoecimento dos mesmos após o tratamento do caso índice. Além disso, o aumento dos níveis de IFN- γ e IL-17 em resposta a *M. leprae* observado em T1 aponta para a ativação de subpopulações de células T Th1 e Th17, anteriormente demonstrada como induzidas pela vacinação com BCG (Kleinnijenhuis J, et al. 2014) e envolvida na proteção contra micobactérias (Gopal R, et al. 2012).

Uma observação importante no presente estudo foi o aumento das células T CD4⁺ específicas para peptídeos específicos de *M. leprae* não compartilhados com BCG. Este resultado está de acordo com um estudo anterior que observou níveis aumentados de IFN- γ em resposta a MMPI, um antígeno de *M. leprae* não compartilhado com BCG, após a vacinação dos contatos (Lima MC, et al. 2000). Este resultado poderia ser explicado pelo conhecido efeito "adjuvante" não específico da vacina BCG sobre a resposta imune, mediado por modificações epigenéticas em células imunes inatas, referido como "imunidade treinada" (Kleinnijenhuis J, et al. 2012.) De fato, o aumento de TNF, IL-1 β , IL-6, MCP-1 e MIP-1 β , mediadores classicamente produzidos por monócitos, dá suporte à ideia do envolvimento da "imunidade treinada" induzida por BCG como um mecanismo de ativação heteróloga de linfócitos Th1 / Th17 *M. leprae* específicos favorecendo a proteção dos contatos contra a hanseníase. Outros

estudos mostraram que a maioria desses mediadores é induzida pela vacinação com BCG (Lalor MK, et al. 2010; Smith SG, et al. 2010; Lalor MK, et al. 2011). As modificações fenotípicas de células imunes inatas induzidas pela vacina BCG duram pelo menos um ano após a vacinação (Kleinnijenhuis J, et al. 2014) um intervalo compatível com o recrutamento de 6-26 meses (T0 e T1) adotado no presente estudo. Isso também está de acordo com o efeito de longa duração de proteção induzida pela vacina BCG contra hanseníase descrita anteriormente (Rodrigues LC, et al. 2007).

A imunidade treinada tem como característica ser induzida após uma infecção primária ou vacinação, e confere proteção contra uma infecção secundária através de mecanismos independentes da resposta adaptativa mediada por linfócitos B e T, aumentando a resistência do hospedeiro à reinfeção. Porém, é menos específica que a imunidade adaptativa e, portanto, pode fornecer proteção cruzada para outras infecções (Netea MG, et al. 2011). O efeito inespecífico da BCG é descrito desde 1927 quando a vacina foi introduzida na Suécia para proteger crianças contra tuberculose. As crianças que receberam a vacina BCG no nascimento apresentaram um nível de mortalidade três vezes menor do que as crianças não vacinadas onde o índice de mortalidade ultrapassava 10% (Aaby P, et al. 2011). Na década de 50 um estudo realizado nos Estados Unidos com crianças e adolescentes demonstrou que a vacinação com BCG reduziu a mortalidade não acidental em 25% (Shan F. 2010). Um estudo de caso-controle realizado aqui no Brasil demonstrou que a vacina BCG reduziu 50% o risco de morte por pneumonia (Niobey FM, et al. 1992). Interessantemente, na África, a vacinação com BCG reduziu em 40% a mortalidade neonatal principalmente por prevenir sepse neonatal e infecções respiratórias (Aaby P, et al. 2011; Biering-Sørensen S, et al. 2012). Além disso, diversos estudos em seres humanos e modelos animais têm demonstrado que a vacinação com BCG protege de infecções secundárias contra *Plasmodium*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Schistosoma mansoni*, *Babesia microti*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* (Parra M, et al. 2013; Blanden RV, et al. 1969; Tribouley J, et al. 1978; Kleinnijenhuis J, et al. 2012; van 't Wout, et al. 1992; Clark IA, et al. 1976; Smrkovski LL, Strickland G. 1978). Um estudo de meta-análise com 23 artigos demonstrou a associação da vacinação com BCG na infância e a proteção contra asma (El-Zein M, et al. 2010). Recente foi demonstrado que até a cicatriz de BCG materna está associada ao aumento da resposta imune pró-inflamatória infantil (Mawa PA, et al.

2017). O efeito imuno-estimulatório da vacina BCG também tem sido aplicado ao tratamento de câncer de bexiga em estágios iniciais (Skegg DCG. 1975; Montoya D, et al. 2017; Xie J, et al. 2016). Em 1986, um estudo realizado em Chicago foi o primeiro a descrever que a vacinação neonatal com BCG reduziu a incidência de leucemia e outras doenças malignas na infância (Rosenthal SR. 1986). Outro estudo realizado em sete países da Europa e em Israel demonstrou que indivíduos que receberam a vacinação com BCG ou para varíola, ou ambas, apresentaram metade do risco de desenvolver melanoma quando comparados aos controles não vacinados, independente do gênero, idade ou origem étnica (Pfahlberg A, et al. 2002). Alguns estudos têm sugerido que a indução da maturação imune pela vacinação com BCG em neonatos confere proteção contra leucemia e melanoma (Rosenthal SR, 1986; Grange JM, Stanford JL, 1990; Grange JM, et al. 2003). Por outro lado, como a proteção da vacinação BCG foi proposta inicialmente para tuberculose e sua incidência diminuiu consideravelmente nos países europeus, estes optaram por remover a BCG do calendário de vacinação ou restringir seu uso. Estudos posteriores têm demonstrado que a não vacinação com BCG pode ter aumentado a incidência de uma grande variedade de doenças como dermatite atópica, melanoma maligno e linfoma (Steenhuis TJ, et al. 2008; Grange JM, et al. 2003; Villumsen M, et al. 2009).

Embora a vacinação com BCG às vezes não consiga induzir uma cicatriz, registros de BCG neonatal são bastante raros, e a presença da cicatriz tem sido o método adotado por muitos estudos para verificar o histórico individual de vacinação com BCG. De qualquer forma, as diferenças nas histórias de vacinação com BCG entre os contatos avaliados no presente estudo não afetaram de forma significativa o aumento da resposta imune aos antígenos de *M. leprae* observados em T1

A provável ativação das populações de células T Th1 / Th17 em conjunto com o aumento simultâneo das citocinas inflamatórias / quimiocinas (TNF, IL-1 β , IL-6, MCP-1 e MIP-1 β) em resposta ao BCG poderia explicar o aparecimento de hanseníase paucibacilar (PB) em uma pequena porcentagem de contatos de hanseníase após a vacinação (Lima MC, et al. 2000; Düppre NC, et al. 2008; Bagshawe A, et al. 1989; Richardus RA, et al. 2015). Uma explicação semelhante poderia ser aplicada à incidência de número relativamente alto de pacientes com reações de Tipo 1 entre os contatos previamente assintomáticos que desenvolveram hanseníase logo após o BCG (Richardus RA, et al. 2015). De acordo com Bagshawe e colaboradores (1989) a

manifestação da hanseníase PB após a vacinação BCG reflete o potencial desta vacina para acelerar a evolução da doença clínica em indivíduos infectados antes ou imediatamente após a vacinação. Corroborando com esta hipótese, Duppre e colaboradores (2008) descreveram que, os contatos que contraíram hanseníase tinham em sua maior parte como caso índice pacientes multibacilares, sugerindo que a infecção subclínica pode se tornar explícita devido à ativação da resposta imune induzida pela vacinação. Além disso, Duppre e colaboradores relataram que a incidência de hanseníase paucibacilar foi maior durante o primeiro ano de acompanhamento dos contatos vacinados com sorologia positiva para PGL-I, parâmetro de infecção subclínica, em comparação com os PGL-I negativos (Düppre NC, et al 2012). No presente estudo, no entanto, nenhum contato desenvolveu hanseníase após a vacinação durante o acompanhamento de 3 anos. Do mesmo modo, não houve correlação entre a presença de anticorpos PGL-I e os níveis de resposta imune específicos observados em T1. Em um estudo futuro, pretendemos aumentar o tamanho da amostra para avaliar mais detalhadamente o impacto da sorologia positiva na resposta imune a *M. leprae* entre os contatos dos pacientes com hanseníase multibacilar.

Um aumento da resposta imune celular aos peptídeos específicos de *M. leprae* também foi detectado nos 3 contatos que não receberam BCG em T0. Esta observação é consistente com um estudo anterior indicando um aumento na resposta proliferativa de CMS ao *M. leprae* entre os contatos de pacientes multibacilares 6 meses após o início do tratamento do caso de índice (Godal T, Negassi K. 1973). Em um outro estudo realizado por nosso grupo, a análise da resposta imune aos antígenos específicos de *M. leprae* de indivíduos saudáveis sem história de contato familiar com pacientes com hanseníase, mas vivendo em uma área hiperendêmica de hanseníase no Brasil, encontrou alta produção de IFN- γ em resposta a *M. leprae* em todos os indivíduos avaliados deste grupo. Na mesma investigação, observamos uma redução progressiva nos níveis de IFN- γ com aumento da exposição persistente a *M. leprae* em indivíduos infectados assintomáticos e pacientes com hanseníase (Martins MVSB, et al. 2012). Em conjunto, essas descobertas sustentam a hipótese de que a exposição contínua a *M. leprae* vivo induz uma regulação negativa da resposta imune efetora celular contra o patógeno, e que este efeito é revertido após o tratamento do caso índice. Esta hipótese também é sustentada por dados que indicam que a incidência de hanseníase diminui significativamente entre os contatos domiciliares após três anos de tratamento do caso

índice (Bagshawe A, et al. 1989). Também é demonstrado que, mesmo entre os contatos domiciliares, apenas uma pequena proporção de indivíduos expostos eventualmente desenvolve doença ativa (Sales AM, et al. 2011). A soma dessas observações sugere que, após a infecção inicial, há outras etapas ainda desconhecidas envolvidas na patogênese da hanseníase.

Os dados acumulados a partir das investigações anteriores em conjunto com os nossos resultados indicam a melhora da imunidade celular *ex vivo* contra *M. leprae* entre os contatos de pacientes multibacilares após o tratamento do caso de índice, dão suporte à hipótese de que a exposição persistente pode facilitar a evolução da infecção latente para doença ativa inibindo a resposta efetora nos contatos.

Sem dúvida uma crítica importante do nosso estudo com os contatos foi o pequeno número de indivíduos analisados. A variação individual do sistema imunológico e da resposta imune em seres humanos é bem conhecida e foi destacada em uma revisão recente (Brodin P, Davis MM. 2017). A avaliação da resposta imune em seres humanos frequentemente requer a inclusão de um grande número de indivíduos, a fim de permitir a observação de mudanças significativas nos parâmetros em avaliação. No entanto, apesar do pequeno número de contatos domiciliares incluídos em nosso estudo e sua heterogeneidade, como gênero, idade, histórico da vacinação com BCG e o intervalo de tempo entre a primeira e a segunda avaliação, observamos mudanças relevantes e significativas em suas respostas imunes aos antígenos de *M. leprae* em T1. Na verdade, todos os esforços foram feitos para recrutar um número maior de contatos, mas, infelizmente, uma boa proporção deles não retornou para sua segunda avaliação. Isso é explicado pelo menos parcialmente pelo fato de serem indivíduos saudáveis e conseqüentemente não encontrarem motivação para retornar à clínica. Apenas 30% dos estudos que acompanham os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase realizados na Fiocruz foram concluídos.

As células Tregs específicas para *M. leprae* são uma causa potencial para esta regulação negativa da resposta imune efetora vista nos contatos de pacientes multibacilares. A observação da inibição *in vitro* da resposta imune a *M. leprae* na hanseníase multibacilar por células com características fenotípicas de Treg reforça esta hipótese (Palermo ML, et al. 2012). A exposição contínua do sistema imunológico das vias aéreas aos aerossóis de *M. leprae* vivos expelidos pelos pacientes com hanseníase MB pode criar condições favoráveis à diferenciação de Tregs *M. leprae* específicas nos

contatos destes pacientes, talvez compartilhando alguns dos mecanismos que inibem a geração de células T efetoras em resposta a antígenos ambientais e microbiota normal (Bobosha K, et al. 2014).

Tregs foram implicadas na patogênese do câncer, doenças auto-imunes e infecciosas, bem como alergias. A intervenção terapêutica na função dos Treg foi bem sucedida em algumas situações e poderia, juntamente com o tratamento do caso índice, ser alvo no desenvolvimento de estratégias de vacinação novas e melhoradas para a prevenção da hanseníase em populações expostas à hanseníase. Uma compreensão mais profunda dos mecanismos envolvidos na modulação negativa da resposta imune apresentada por indivíduos persistentemente expostos a *M. leprae* pode contribuir para projetar ferramentas que identifiquem de forma mais confiável aqueles infectados com maior risco de doença antes que a hanseníase se manifeste, o que seria uma contribuição importante para a interrupção da cadeia de transmissão.

Este é o primeiro estudo a demonstrar que o tratamento do caso índice e / ou a vacinação com BCG dos contatos de paciente multibacilares induzem ativação de clones de células T que reconhecem epítomos específicos de *M. leprae*, não compartilhados com o BCG. Esta ativação pode, pelo menos, explicar parcialmente o conhecido efeito protetor dessas medidas contra a progressão da doença nos contatos de pacientes multibacilares. O possível papel das Tregs na anergia dos contatos de pacientes multibacilares é uma hipótese muito atraente, e isso fará parte da segunda etapa do nosso trabalho. A **Figura 6.1** ilustra os resultados que observamos neste estudo e a possível participação das células Tregs (fase que ainda está em investigação) na mudança da resposta imune dos contatos de pacientes multibacilares após a vacinação com BCG e o tratamento do caso índice. A **Figura 6.1-A** ilustra o momento em que o contato está altamente exposto a *M. leprae* pelo fato do caso índice não ter iniciado o tratamento com a PQT e antes da vacinação com BCG. Neste momento os macrófagos estão infectados por *M. leprae* e a resposta efetora contra *M. leprae* não está efetivamente ativada devido à presença de uma maior frequência das células T reguladoras, uma vez que macrófagos infectados por *M. leprae* induzem preferencialmente células Tregs (Degang Yang, et al. 2016). Por outro lado, após o início do tratamento do caso índice há uma diminuição considerável da exposição a *M. leprae*. A vacinação com BCG induz uma imunidade treinada com macrófagos e monócitos produzindo mediadores pró-inflamatórios que inibem a atuação das células

Tregs contribuindo para o surgimento e expansão clonal das células *M. leprae* específicas e consequentemente maior proteção contra o desenvolvimento da doença ativa.

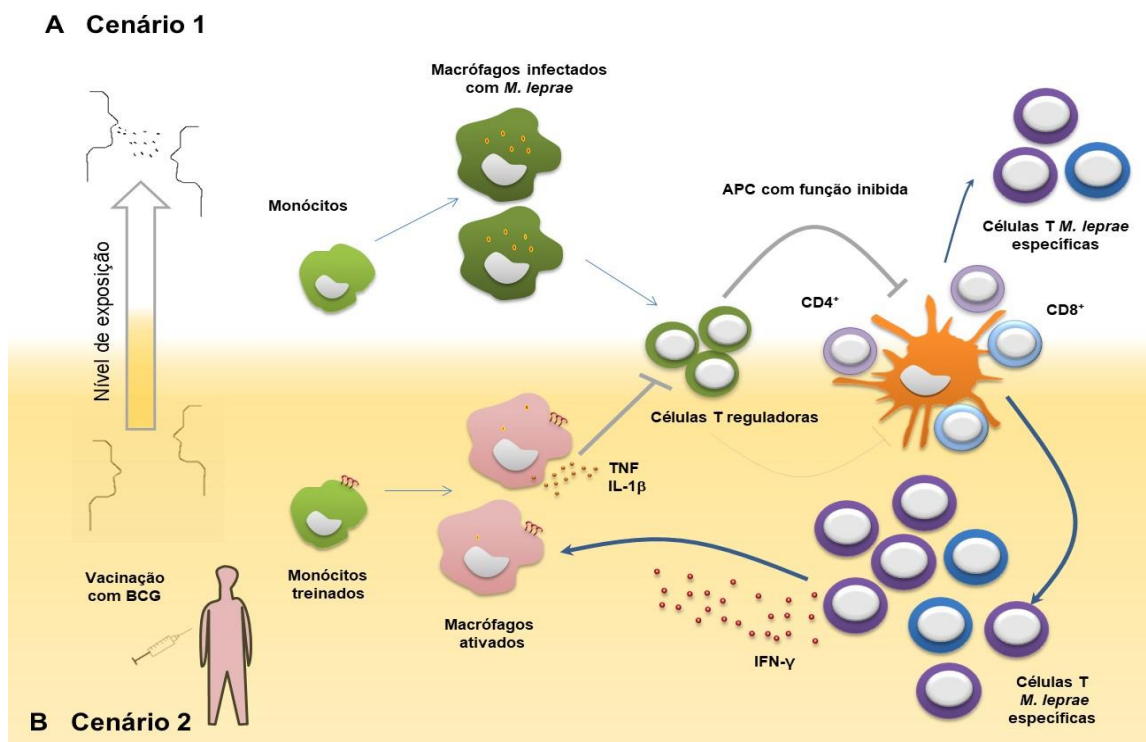


Figura 6.1. Padrão da resposta imune dos contatos de pacientes multibacilares antes e após a vacinação com BCG e o tratamento do caso índice. A) O cenário 1 ilustra T0 que é o momento em que o contato está altamente exposto ao *M. leprae* pelo fato do caso-índice não ter iniciado o tratamento com a PQT e antes da vacinação com BCG. Neste momento os macrófagos infectados pelo *M. leprae* induzem preferencialmente a diferenciação de células T reguladoras que inibem a função das células apresentadoras de antígenos (APC) e estas não conseguem apresentar eficientemente *M. leprae* aos linfócitos T *M. leprae* específicos tornando a resposta imune ao bacilo insuficiente. B) O cenário 2 reflete T1 que é o momento em que houve considerável diminuição da exposição ao bacilo devido ao tratamento do caso índice e após a vacinação com BCG. Neste segundo momento, os monócitos treinados devido a vacinação com BCG produzem mediadores inflamatórios que inibem as Tregs, dessa forma, as APCs passam a apresentar *M. leprae* eficientemente e a induzir a expansão clonal de células T *M. leprae* específicas que produzem mediadores inflamatórios como IFN- γ que ativa os macrófagos estimulando-os a matar o bacilo. IFN- γ -Interferon gama; TNF- fator de necrose tumoral.

Apesar de os contatos da hanseníase constituírem um grupo com alto risco para desenvolver a hanseníase, apenas cerca de 7% deles irão progredir para a doença ativa (Düppre NC, et al. 2008; Sales AM, et al. 2012)". De acordo com o Sistema Brasileiro de Notificação de Doenças (SINAN), nenhum dos 16 contatos incluídos no nosso estudo desenvolveu hanseníase até fevereiro de 2017. A possibilidade de que outros casos de hanseníase no convívio familiar contribuam para a não resposta observada em

alguns indivíduos incluídos no estudo pode ser descartada, uma vez que todos os contatos familiares de cada caso índice foram acompanhados até agora sem sinal de doença. Outro ponto importante é que a situação ideal seria incluir um grupo não vacinado com BCG para que pudéssemos analisar separadamente os efeitos da vacinação BCG versus tratamento de caso de índice na recuperação da resposta imune dos contatos aos antígenos de *M. leprae*. No entanto, indivíduos não vacinados estão se tornando raros por várias razões. O Brasil adota a vacinação com BCG à recém-nascidos e possui uma ampla cobertura. Além disso, desde 1991, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda a vacinação de todos os contatos de pacientes com hanseníase. Isso implica no fato dos contatos serem vacinados com BCG após o diagnóstico do caso do índice, a menos que eles já tenham duas cicatrizes da vacina ou estejam com suspeita da doença. Entre os três contatos que não foram vacinados no início do nosso estudo, dois já haviam sido vacinados duas vezes e um apresentava suspeita de ter hanseníase. O efeito estimulante da vacinação com BCG foi mais claro ao comparar a frequência de células T de CD4 e CD8 em resposta a *M. leprae* (Figura 5.3 B e D), bem como os níveis de produção de mediadores pró-inflamatórios dos contatos que receberam a segunda dose da vacina durante o estudo quando comparados com os contatos que receberam a primeira dose ou não foram vacinados (Figura 5.6). No entanto, para aqueles que não receberam uma dose recente de BCG, a influência de uma vacinação prévia não pode ser descartada.

Devido ao importante papel das células Tregs na modulação negativa da resposta imune efetora, e sua conhecida contribuição na patogênese da hanseníase, na segunda etapa do trabalho recrutamos apenas pacientes com hanseníase e avaliamos o perfil fenotípico das células Tregs em sangue periférico e lesão de pele desses indivíduos. Até o momento recrutamos 8 voluntários, sendo 4 com a forma multibacilar da hanseníase e 4 com a forma paucibacilar. Nós detectamos em sangue periférico e lesão de pele dos pacientes com hanseníase a presença de células Tregs e efetoras. Como trabalhos anteriores não esclareceram se os Treg observados na hanseníase são patógeno-específicos, nós estamos investigando células Tregs de memória *M. leprae* específicas no sangue periférico em resposta a *M. leprae* e à proteína específica de *M. leprae* ML1419c. A dinâmica da diferenciação das células Tregs em seres humanos *in vitro*, *in vivo*, e *ex vivo* foi avaliada. Neste estudo foi demonstrado que células Tregs CD4⁺ FOXP3⁺ podem ser separadas em três subpopulações fenotipicamente e funcionalmente

com base na expressão de FOXP3, padrão de expressão de moléculas de superfície, grau de metilação do gene *FOXP3*, nível de proliferação em condições fisiológicas, capacidade de secretar citocinas, repertório de TCR e atividade supressora *in vitro*. As subpopulações foram divididas em: 1) CD45RA⁺ FOXP3^{low} “resting Treg cells”, 2) CD45RA⁻ Foxp3^{high} “activated Treg cells” e 3) “cytokine-secreting” CD45RA⁻ Foxp3^{low} non-Treg cells (Makoto Miyara et al, 2009).

Nossos resultados preliminares demonstram a presença de células Tregs de memória específicas para *M. leprae* (CD4⁺CD25^{“high”} FOXP3⁺CD137⁺CD45RA⁻) e células efectoras de memória (CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁻CD45RA⁻) no sangue periférico dos pacientes com hanseníase. Embora seja necessário aumentar o número de pacientes, avaliando a proporção de células Tregs de memória específicas para *M. leprae* e T efectoras, uma tendência de aumento é observada na frequência de células Tregs nos pacientes multibacilares (MB). Um estudo recente em seres humanos identificou células Tregs específicas para aeroantígenos como pólen, por exemplo, que são completamente funcionais em indivíduos alérgicos, sugerindo que a proporção de células efectoras Th2 e em relação às Tregs poderia ser a causa da alergia. Este trabalho mostra evidências de que a alteração na proporção de células Tregs antígeno-específicas para T de memória efectora está envolvida na patologia de doenças inflamatórias crônicas em seres humanos (Bacher P, et al. 2016). Na hanseníase multibacilar a presença das células Tregs *M. leprae*-específicas pode induzir a modulação negativa da resposta efectora contribuindo para a disseminação do bacilo. A quantificação e a caracterização simultânea das células Tregs antígeno-específicas e das células T convencionais possibilita o estudo das características destas duas subpopulações e do impacto da proporção entre Tregs e células T efectoras na resposta imune a *M. leprae*. Outra importante etapa do nosso trabalho foi a investigação das células Tregs no ambiente da lesão de pele de pacientes multibacilares. Fizemos a identificação dessas células através de citometria de fluxo, o que nos permitiu avaliar diversos parâmetros simultaneamente em células de lesão de pele. Detectamos uma frequência de células Tregs de memória maior no tecido do que no sangue periférico (Figura 5.12).

Nós também investigamos o perfil fenotípico das células Tregs na lesão por imunofluorescência. Embora a citometria de fluxo nos possibilite avaliar diversos parâmetros simultaneamente, a imunofluorescência demonstra a presença e fornece a localização das células no ambiente da lesão. Nossos dados preliminares demonstram a

presença de células Tregs através da expressão do fator de transcrição *FOXP3* e células T efetoras através da expressão de *Tbet* na lesão (Figura 5.13). A principal função das Tregs naturais é migrar para o sítio de inflamação e suprimir células efetoras, como as células T “helper” (Th) Th1, Th2, Th17 e células Th foliculares (Chaudhry A, et al. 2009; Chung Y, et al. 2011; Koch MA, et al. 2009; Linterman MA, et al. 2011). Além dos pacientes multibacilares pretendemos avaliar também por imunofluorescência as lesões de pele de pacientes paucibacilares para um estudo aprofundado da interação das células T efetoras e reguladoras no ambiente de lesão e a contribuição individual dessas células para a patologia da hanseníase. Identificar as subpopulações celulares moduladas por *M. leprae* na infecção ativa e ampliar essa investigação também para contatos que são superexpostos a *M. leprae* poderá viabilizar o desenvolvimento de estratégias que atuem diretamente na recuperação da resposta imune efetora contra *M. leprae*, dos contatos, atuando na resolução da infecção latente, evitando a doença ativa e contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão do bacilo, e nos pacientes evitando episódios reacionais e recidiva da doença.

7- Conclusões

♦ A partir dos dados obtidos na primeira etapa do nosso estudo reforçamos a importância da rotina de vacinação com BCG nos contatos de pacientes com hanseníase e o tratamento do caso índice como medidas importantes de controle da hanseníase. Observamos que a combinação dessas duas medidas melhorara a resposta imune dos contatos domiciliares dos pacientes multibacilares por aumentarem as frequências de células efetoras em resposta a antígenos específicos de *M. leprae*. Outra observação importante foi o aumento da capacidade de células mononucleares sanguíneas de produzir mediadores inflamatórios quando estimuladas *in vitro* com *M. leprae*. Esta observação pode ser consequência da indução de imunidade treinada pelo BCG. A recuperação na resposta imune dos contatos de pacientes multibacilares apresentou um efeito duradouro, pois foi observado mais de 2 anos após as intervenções estudadas. Os mecanismos pelos quais a vacinação com BCG e o tratamento do caso índice melhoram a resposta imune desses contatos serão avaliados em uma próxima etapa do estudo. Células Tregs induzidas durante o período de super-exposição a *M. leprae* sofrida por esses indivíduos antes do tratamento do caso índice podem estar envolvidas na modulação negativa da resposta imune dos contatos contribuindo para o desenvolvimento da doença ativa.

♦ Na segunda etapa de nosso trabalho demonstramos a presença de linfócitos T com fenótipo de Tregs de memória específicos para antígenos de *M. leprae* em pacientes com hanseníase tuberculóide e lepromatosa. Detectamos também a presença de células expressando fatores linhagem-específicos de Th1 (T-bet) Treg (FOXP3) em lesões de pele de paciente com a forma BL de hanseníase. Existem evidências de que a inibição específica da resposta Th1 é feita de forma mais eficiente por Tregs que expressam simultaneamente FOXP3 e T-bet. A existência de um linfócito T regulador com este fenótipo na hanseníase poderá ser avaliada na continuação deste trabalho. Foi possível obter por dissociação enzimática, e analisar por citometria de fluxo Tregs e outras células de lesão viáveis. As células assim obtidas de lesão poderão ser avaliadas para expressão gênica e eventualmente expandidas *in vitro* para outros estudos, desde que seus fenótipos sejam estáveis.

8- Referencias

- Abel L, Cua VV, Oberti J, Lap VD, Due LK, Grosset J, Lagrange PH. Leprosy and BCG in southern Vietnam. *Lancet*. 1990 Jun 23;335(8704):1536. PMID:1972473
- Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet*. 2008 Apr;123(3):227–35.
- Ambak K. Rai, Chandreshwar P. Thakur, Amar Singh, Tulika Seth, Sandeep K. Srivastava, Pushpendra Singh, Dipendra K. Mitra, Campanelli AP, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006;193: 1313–22.
- Andrew G Levine, Aaron Arvey, Wei Jin, and Alexander Y Rudensky Howard. Continuous requirement for the T cell receptor for regulatory T cell function. *Nat Immunol*. 2014 Nov;15(11):1070-8.
- Angelina M. Bilate and Juan J. Lafaille. Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells in Immune Tolerance. *Annu. Rev. Immunol*. 2012. 30:733–58
- Attia EAS, Marwa Abdallah, Abeer A. Saad, Ashraf Afifi, Alaa El Tabbakh, Dina El-Shennawy and Hala B. Ali. Circulating CD4+ CD25highFoxP3+ T cells vary in different clinical forms of leprosy. *International Journal of Dermatology* 2010, 49, 1152–1158
- Bacher P, Heinrich F, Stervbo U, Nienen M, Vahldieck M, Iwert C, Vogt K, Kollet J, Babel N, Sawitzki B, Schwarz C, Bereswill S, Heimesaat MM, Heine G, Gadermaier G, Asam C, Assenmacher M, Kniemeyer O, Brakhage AA, Ferreira F, Wallner M, Worm M, Scheffold A *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):1067-1078.e16.
- Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2004;16:89–98.
- Bagshawe A, Scott GC, Russell DA, Wigley SC, Merianos A, Berry G. BCG vaccination in leprosy: final results of the trial in Karimui, Papua New Guinea, 1963-79. *Bull World Heal Organ*. 1989;67: 389–99.
- Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Faber WR, van Beers SM, Klatser PR, Oskam L. Population survey to determine risk factors for Mycobacterium leprae transmission and infection. *Int J Epidemiol*. 2004 Dec;33(6):1329-36. Epub 2004 Jul 15.
- Batista-Silva, L. R. ; Rodrigues, Luciana Silva ; Vivarini, Aislan de Carvalho ; Costa, Fabrício da Mota Ramalho ; Mattos, Katherine Antunes de ; Costa, Maria Renata Sales Nogueira ; Rosa, Patricia Sammarco ; Toledo-Pinto, T. G. ; Dias, André Alves ; Moura, Danielle Fonseca; Sarno, Euzenir Nunes ; Lopes, Ulisses Gazos ; Pessolani, Maria Cristina Vidal. Mycobacterium leprae-induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages. *Scientific Reports*, v. 6, p. 27632, 2016.

Belkaid Y, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Biol Med*. 2001;194:1497–506.

Biering-Sørensen S, Aaby P, Napirna BM, Roth A, Ravn H, Rodrigues A, Whittle H, Benn CS. Small randomized trial among low-birth-weight children receiving bacillus Calmette-Guérin vaccination at first health center contact. *Pediatr Infect Dis J*. (2012) 31(3):306–308.

Bini EI, Mata Espinosa D, Marquina Castillo B, Barrios Paya'n J, Colucci D, Cruz AF et al. The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *PLoS One*. 2014; 9(4)

Blanden RV, Lefford MJ, Mackaness GB: The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice. *J Exp Med* 1969, 129:1079-1107.

Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van Schip JJ, Abebe M, Hussein J, Khadge S Neupane KD, Hagge DA, Jordanova ES, Aseffa A, Ottenhoff TH GA. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8: 2773.

Borenstein MS; Padilha MI; Costa E; Gregório VRP; Koerich AME; Ribas DL. Hanseníase: estigma e preconceito vivenciados por pacientes institucionalizados em Santa Catarina (1940-1960). *Rev. bras. enferm.* vol.61 no.spe Brasília Nov. 2008

Borsellino G, Kleiweietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 2007;110(4):1225-32.

Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1980 Dec;48(4):382–7.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 2004 Apr 10;363(9416):1209–19.

Buhrer-Sekula S, Sarno EN, Oskam L, Koop S, Wichers I, Nery JA, et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 2000 Dec;68(4):456–63.

Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis*. 2011 Oct 15;204(8):1256–63.

Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol*. 2002;20: 581–620.

Charlotte Avanzi, Jorge del-Pozo, Andrej Benjak, Karen Stevenson, Victor R. Simpson, Philippe Busso, Joyce McLuckie, Chloé Loiseau, Colin Lawton, Janne Schoening, Darren J. Shaw, Jérémie Piton, Lucio Vera-Cabrera, Jesús S. Velarde-Felix, Fergal McDermott, Stephen V. Gordon, Stewart T. Cole, Anna L. Meredith. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science*. 2016 Nov 11;354(6313):744-747.

Chaudhry A, Rudra D, Treuting P, Samstein RM, Liang Y, Kas A, Rudensky AY. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*. 2009 Nov 13;326(5955):986-91.

Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, Wang YH, Lim H, Reynolds JM, Zhou XH, Fan HM, Liu ZM, Neelapu SS, Dong C. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011 Jul 24;17(8):983-8.

Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R.I., Martinez, G.J., Rawal, S., Wang, Clare Baecher-Allan, Vissia Viglietta, and David A. Hafler. Inhibition of Human CD4CD25high Regulatory T Cell Function. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6210-7.

Clark IA, Allison AC, Cox FE. Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG. *Nature*. 1976 Jan 29;259(5541):309-11

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhil J, James KD, Thomson NR, Wheeler P R, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;401: 1007–11.

Colston MJ, Hilson GR. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. 1976 Jul 29;262(5567):399–401

Comstock GW. Leukaemia and BCG, a controlled trial. *Lancet* 1971; ii: 1062-3

Cunha AZS. Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle. *Ciência & Saúde Coletiva* 2002;7(2):235-42.

Cunha SS, Rodrigues LC, Pedrosa V, Dourado IM, Barreto ML, Pereira SM. Neonatal BCG protection against leprosy: a study in Manaus, Brazilian Amazon. *Lepr Rev*. 2004 Dec;75(4):357–66.

Davey T, Rees R. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr Rev*. 1974;45: 121–134. PMID:4608620

De Matos HJ, Duppre N, Alvim MF, MachadoVieira LM, Sarno EN, Struchiner CJ. Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987-1991). *Cad Saúde Pública*. 1999 Sep;15(3):533–42.

de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paixão de Oliveira JA, Assis TQ, de Toledo-Pinto TG, de Lima Bezerra OC, da Costa Nery JA, Rosa PS, Bozza MT, Lara FA, Moraes MO, Schmitz V, Sarno

EN, Pinheiro RO. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes Infect.* 2017 Jul 3. pii: S1286-4579(17)30095-3.

Degang Yang ,Tiejun Shui ,Jake W. Miranda,Danny J. Gilson,Zhengyu Song,Jia Chen,Chao Shi,Jianyu Zhu,Jun Yang ,Zhichun Jing . *Mycobacterium leprae*-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jan 11;10(1)

de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, Pinheiro RO, Sarno EN. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol.* 2011 Aug;165(2):251-63.

de Vries JL, Perry BH. Leprosy case detection rates by age, sex, and polar type under leprosy control conditions. *Am J Epidemiol.* 1985 Mar;121(3):403-13.

Dos Santos DS, Duppre NC, Sales AM, Nery JA da C, Sarno EN, Hacker MA. Kinship and Leprosy in the Contacts of Leprosy Patients: Cohort at the Souza Araújo Outpatient Clinic, Rio de Janeiro, RJ, 1987-2010. *J Trop Med.* 2013;2013:596316.

Douglas JT, Cellona R V, Fajardo TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 2004. pp. 897–900. doi:10.1128/CDLI.11.5.897-900.2004. PMID:15358649.

Duistermaat, J.J., 2005. Genetic, household and spatial clustering of leprosy on an island in Indonesia: a population-based study. *BMC Med. Genet.* 6, 40.

Düppre NC, Camacho LAB, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JAC, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Jul;102(7):631–8.

Düppre NC, Camacho LAB, Sales AM, Illarramendi X, Nery JAC, Sampaio EP, et al. Impact of pgl-i seropositivity on the protective effect of bcg vaccination among leprosy contacts: A cohort study. *PLoS Diseases.* 2012. *Neglected Tropical*

El-Zeins M, VParent ME, Rousseau MC. Does BCG vaccination protect against the development of children asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Inte. J Epidemiol.* 2010. 39(2)469-486

Feenstra SG, Nahar Q, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. Social contact patterns and leprosy disease: a case-control study in Bangladesh. *Epidemiol Infect.* 2013 Mar;141(3):573-81.

Ferreira J, Bernardi C, Gerbase A. Control of Hansen's disease in an integrated health care system. *Boletín Of Sanit Panam Pan Am Sanit Bur.* 1983 Dec;95(6):507–15.

- Fine PE, Sterne JA, Pönnighaus JM, Bliss L, Sauti J, Chihana A, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol*. 1997 Jul 1;146(1):91–102.
- Fine PE. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiol Rev*. 1982;4:161-88.
- Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol*. 2007; 5(2): e38.
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2249-54.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. *Foxp3* programs the development and function of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4: 330–6.
- FOXP3(+) T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients, *PLoS*
- Godal T, Negassi K. Subclinical infection in leprosy. *Br Med J*. 1973;3: 557–559. PMID: 4580217
- Goffman E. *Estigma: notas sobre a manipulação da identidade deteriorada*. 3a ed. Rio de Janeiro: Zahar; 1980.
- Gopal R, Lin Y, Obermajer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, et al. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Eur J Immunol*. 2012;42: 364–373. doi:10.1002/eji.201141569 PMID: 22101830
- Grange JM, Stanford JL, Stanford CA, Kölmel KF Vaccination strategies to reduce the risk of leukaemia and melanoma. *J R Soc Med*. (2003). 96(8):389–392.
- Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2013. pp. 270–277.
- Gri G, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*. 2008; 29:771–81.
- Groenen G, Pattyn SR, Ghys P, Tshilumba K, Kuykens L, Colston MJ. A longitudinal study of the incidence of leprosy in a hyperendemic area in Zaire, with special reference to PGL-antibody results. The Yalisombo Study Group. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1990 Dec;58(4):641-50. PMID: 2280114.
- Guia para o controle da hanseníase-Ministério da saúde. Brasília; 2002 caderno da atenção básica- nº 21. Ministério da saúde. 2007.

Gurpreet Bansal, Pawan Sachan, Shailendra Sachan, V.S. Yadav , Rupendra Jadhav. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: Insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol.* 2008 Sep;8(5):627-31.

Hacker M de A, Duppre NC, Nery JAC, Sales AM, Sarno EN. Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010. *Memórias Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Dec;107 Suppl 1:49–54.

Hanseníase: estigma e preconceito vivenciados por pacientes institucionalizados em Santa Catarina (1940-1960).

Holzer TJ, Nelson KE, Crispen RG, Andersen BR. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. *Infect Immun* 1986 Apr; 52 (1):348.

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* 1981 Sep;147(3):728–35.

Ismail Sebina, Jacqueline M. Cliff, Steven G. Smith, Sarah Nogaro, Emily L. Webb, Eleanor M. Riley, Hazel M. Dockrell, Alison M. Elliott, Julius C. R. Hafalla, Stephen Cose. Long-Lived Memory B-Cell Responses following BCG Vaccination. *PLoS One.* 2012;7(12):e51381

Isobel S. Okoye, Stephanie M. Coomes, Victoria S. Pelly, Stephanie Czieso, Venizelos Papayannopoulos, Tanya Tolmachova, Miguel C. Seabra, and Mark S. Wilson. MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity.* 2014 Sep 18;41(3):503.

J. Christoph Vahl, Christoph Drees, Klaus Heger, Sylvia Heink, Julius C. Fischer, Jelena Nedjic, Naganari Ohkura, Hiromasa Morikawa, Hendrik Poeck, Sonja Schallenberg, David Rieß, Marco Y. Hein, Thorsten Buch, Bojan Polic, Anne Schönle, Robert Zeiser, Annette Schmitt-Graff, Karsten Kretschmer, Ludger Klein, Thomas Korn, Shimon Sakaguchi, and Marc Schmidt-Supprian. Continuous T Cell Receptor Signals Maintain a Functional Regulatory T Cell Pool. *Immunity.* 2014 Nov 20;41(5):722-36.

Jan Hendrik Richardus, Linda Oskam. Protecting people against leprosy: Chemoprophylaxis and immunoprophylaxis *Clinics in Dermatology* (2015) 33, 19–25

Jérôme Thomas, Keith Harshman, Pushpendra Singh, Philippe Busso, Alexandre Gattiker, Jacques Rougemont, Patrick J Brennan & Stewart T Cole. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Infect Genet Evol.* 2008 Sep;8(5):627-31.

Jia Chen, Chao Shi, Jianyu Zhu, Jun Yang, Zhichun Jing. *M. leprae*-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Mar;78(3):518–21

Jopling W, McDougall A. AC. *Handbook of leprosy.* 2. ed. 1988

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:531-64.

Joshua E. Lane, Douglas S. Walsh, Wayne M. Meyers, MD, Mary K. Klassen-Fischer, David E. Kent, and David J. Cohen. Borderline tuberculoid leprosy in a woman from the state of Georgia with armadillo exposure. *J AM Acad Dermatol* October 2006

K. Schroder, P.J. Hertzog, T. Ravasi, D.A. Hume, Interferon-gamma: an overview
Kaplan G, Mathur NK, Job CK, Nath I, Cohn ZA. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(20):8073–7.

Kaufmann SH, Golecki JR, Kazda J, Steinhoff U. T lymphocytes, mononuclear phagocytes, Schwann cells and *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol.* 1989;7 Suppl 1:141–8.

Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LAB, Ifrim DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012. pp. 17537–42.

Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, van Loenhout J, Xavier RJ, Aaby P, van der Meer JW, van Crevel R, Netea MG. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J Innate Immun.* 2014;6(2):152-8.

Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol.* 2006;177(10):6780-6.

Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med.* 2003 May;9(5):525–32.

Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol.* 2009 Jun;10(6):595-602.

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 Dec;56(4):513-20.

Kumar S, Naqvi RA, Bhat AA, Rani R, Ali R, Agnihotri A, Khanna N, Rao D N. 2013c. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. *Immunobiology* 218, 1488–1496.

Kumar S, Naqvi RA, Khanna N, Pathak P, Rao DN, 2011b. Th3 immune responses in the progression of leprosy via molecular cross-talks of TGF- β -CTLA-4 and Cbl-b. *Clinical Immunology* 141, 133–142.

Kumar S, Naqvi RA, Khanna N, Rao DN. 2011a. Disruption of HLA-DR raft, deregulations of Lck-ZAP-70-Cbl-b cross-talk and miR181a towards T cell hyporesponsiveness in leprosy. *Molecular Immunology* 48, 1178–1190.

La Cava A, Van Kaer L, Fu Dong S. CD4⁺CD25⁺ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol.* 2006; 27:322–7.

Lalor MK, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, Weir RE, Smith SG, et al. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi. *Journal of Infectious Diseases.* 2011. pp. 1075±1085.

Lalor MK, Sian Floyd, Patricia Gorak-Stolinska, Anne Ben-Smith, Rosemary E. Weir, Steven G. Smith, Melanie J. Newport, Rose Blitz, Hazzie Mvula, Keith Branson, Nuala McGrath, Amelia C. Crampin, Paul E. Fine, and Hazel M. Dockrell. BCG Vaccination Induces Different Cytokine Profiles Following Infant BCG Vaccination in the UK and Malawi. *J Infect Dis.* 2011 Oct 1;204(7):1075-85

Lalor MK, Steven G. Smith, Sian Floyd, Patricia Gorak-Stolinska, Rosemary E. Weir, Rose Blitz, Keith Branson, Paul E. Fine, Hazel M. Dockrell. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine* 28 (2010) 1635–1641

Larrea MR, Carreño MC, Fine PE. Patterns and trends of leprosy in Mexico: 1989-2009. *Lepr Rev.* 2012 Jun;83(2):184-94

Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, Gandhi R, Chauhan V, Bansal G, Sachan P, Sachan S, Yadav VS, Jadhav R. *Infect Genet Evol.* 2008 Sep;8(5):627-31

Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.* 2006 Mar;77(1):5–24.

Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;175:4180–3.

Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol.* 2000 Apr;51(4):419–28.

Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ, Fagarasan S, Liston A, Smith KG, Vinuesa CG. Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response Nat Med. 2011 Jul 24;17(8):975-82.

Makoto Miyara, Yumiko Yoshioka, Akihiko Kitoh, Tomoko Shima, Kajsia Wing, Akira Niwa, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4⁺ T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor Immunity 30, 899–911, June 19, 2009

Mallika Lavania, Kiran Katoch, Vishwa Mohan Katoch, Anuj Kumar Gupta, Mardia KV, Kent J T, Bibby JM. Multivariate Analysis. J Appl Math Mech. 1981; 61: 206.

Marques C de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. J Infect Dis. 2013 Jul;208(1):120–9.

Martins MVSB, Guimarães MM da S, Spencer JS, Hacker MAVB, Costa LS, Carvalho FM, et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012.

Mattos KA, Oliveira VCG, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM. et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected-macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. Cellular Microbiology, v. 16, 2014

Mawa PA, Emily L. Webb, Abdelali Filali-Mouhim, Gyaviira Nkurunungi, Rafick-Pierre Sekaly, Swaib Abubaker Lule, et al. Maternal BCG scar is associated with increased infant proinflammatory immune responses. Vaccine. 2017 Jan 5;35(2):273-282.

Mège J-L, Mehraj V, Capo C. Macrophage polarization and bacterial infections. Curr Opin Infect Dis. 2011; 24: 230–234.

Meima A, Smith WC, van Oortmarsen GJ, Richardus JH, Habbema JD. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. World Health Organ. 2004 May;82(5):373-80
Mihai G. Netea, Jessica Quintin, and Jos W.M. van der Meer. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. Cell Host & Microbe 9, May 19, 2011

Mihai G. Netea, Jos W.M. van der Meer. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease Cell Host & Microbe 21, March 8, 2017 ^a

Mihai G. Netea, Leo A.B. Joosten, Eicke Latz, Kingston H.G. Mills, Gioacchino Natoli, Hendrik G. Stunnenberg, Luke A.J. O'Neill, and Ramnik J. Xavier. Trained immunity:

a program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016 April 22; 352(6284)

Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde <http://bvsmms.saude.gov>.

Ministério da Saúde. Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2015. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniaze/11298-situacao-epidemiologica-dados> (acessado em Fevereiro 2017)

Ministério da Saúde. Manual de Normas de Vacinação.. 2001. p. 72

Ministério da Saúde. Portaria nº 1.401, de 14 de Agosto de 1991. Diário Oficial da

União, Brasília, 16 Agosto 1991. 1991. p. 16707

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 Feb 12;427(6975):636–40.

Miriam Süssking Borenstein, Maria Itayra Padilha, Eliani Costa, Vitória Regina Petters Gregório, Ana Maria Espíndola Koerich, Dorotéa Lões Ribas. *Rev Bras Enferm*, Brasília 2008; 61(esp): 708-1

Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*. 2004; 172:4676–80.

Modlin R, T H Rea. Immunopathology of leprosy. In R. C. Hastings and D.V. A. Opromolla (ed.), *Leprosy*. Churchill Livingstone, New York, N.Y.; 1994. p. 225–34.

Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis*. 2006 Feb 1;193(3):346-53.

Tarique M, Chaman Saini, Raza Ali Naqvi, Neena Khanna, Alpana Sharma D.N. Rao. IL-12 and IL-23 modulate plasticity of FoxP3+regulatory T cells in human Leprosy, *Molecular Immunology* 83 (2017) 72–81

Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, Matsuoka M, Taylor GM, Donoghue HD, Bouwman A, Mays S, Watson C, Lockwood D, Khamesipour A, Dowlati Y, Jianping S, Rea TH, Vera-Cabrera L, Stefani MM, Banu S, Macdonald M, Sapkota BR, Spencer JS, Thomas J, Harshman K, Singh P, Busso P, Gattiker A, Rougemont J, Brennan PJ, Cole ST. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1282-

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, Chun R, Schenk M, Zhang X, Ferguson BG, Burdick AE, Sarno EN, Rea TH, Hewison M, Adams JS, Cheng G, Modlin RL. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009 Oct 22;6(4):343-53. doi: 10.1016/j.chom.2009.09.002.

Morales A. BCG: A throwback from the stone age of vaccines opened the path for bladder cancer immunotherapy. *Can J Urol*. 2017 Jun;24(3):8788-8793.

Moura, Danielle D. ; de Mattos, Katherine A. ; Amadeu, Thaís P. ; Andrade, Priscila R; Sales, Jorgenilce S. ; Schmitz, Verônica ; Nery, José Augusto C. ; Pinheiro, Roberta O. ; Sarno, Euzenir N. CD163 favors mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *European Journal of Immunology*. v. 42, p. 2925-2936, 2012.

Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense *Cell Host Microbe*. 2011 May 19;9(5):355-61.

Neumann Ada S, Dias Fde A, Ferreira Jda S, Fontes AN, Rosa PS, Macedo RE, Oliveira JH, Teixeira RL, Pessolani MC, Moraes MO, Suffys PN, Oliveira PL, Sorgine MH, Lara FA. Experimental Infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. *PLoS One*. 2016 May 20;11(5)

Niobey FM, Duchiate MP, Vasconcelos AG, de Carvalho ML, Leal Mdo C, Valente JG. [Risk factors for death caused by pneumonia in children younger than 1 year old in a metropolitan region of southeastern Brazil. A casecontrol study]. *Rev Saude Publica*. 1992. 26:229–238.

Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science (New York, NY)*. 1969; 166:753–5

Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker MA, Nery JA, Jerônimo SM, Sarno EN. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Feb 13;11(2)

Noordeen SK. Elimination of leprosy as a public health problem. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1994 Jun;62(2):278–83.

Opromolla D. *Noções de Hansenologia*. Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato. Bauru, SP.; 2000.

Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, Yamashitafuji TM, Duarte S, Cacere CR, et al. Increased Expression of Regulatory T Cells and Down-Regulatory Molecules in Lepromatous Leprosy. 2012;86: 878–883.

Parra M, Liu X, Derrick SC, Yang A, Tian J, Kolibab K, Kumar S, Morris SL. Molecular analysis of non-specific protection against murine malaria induced by BCG vaccination. PLoS One. 2013 Jul 4;8(7): e66115.

Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. Science. 1995 Jul 14;269(5221):245-7.

Pernis A, Gupta S, Gollob KJ, Garfein E, Coffman RL, Schindler C, Rothman P, Pfahlberg A, Kölmel KF, Grange JM, et al. Inverse association between melanoma and previous vaccinations against tuberculosis and smallpox: results of the FEBIM study. J Invest Dermatol 2002; 119:570–5

Pinto P, Salgado CG, Santos N, Alencar DO, Santos S, Hutz MH, et al. Polymorphisms in the CYP2E1 and GSTM1 genes as possible protection factors for leprosy patients. PLoS One. 2012;7(10): e47498.

Pinzan CF, Ruas LP, Casabona-Fortunato AS, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. PLoS One. 2010; 5: e10757. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan 11;10(1)

Polycarpou A, Holland MJ, Karageorgiou I, Eddaoudi A, Walker SL, Wilcocks S, Lockwood DNJ. Mycobacterium leprae activates Toll-Like receptor-4 Signaling and Expression on Macrophages Depending on Previous Bacillus Calmette-Guerin Vaccination. Frontier in Cellular and Infection Microbiology. 2016.6

Ponnighaus JM, Fine PE, Sterne JA, Malema SS, Bliss L, Wilson RJ. Extended schooling and good housing conditions are associated with reduced risk of leprosy in rural Malawi. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1994 Sep;62(3):345-52.

Povoleri GA, Scottà C, Nova-Lamperti EA, John S, Lombardi G, Afzali B. Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators? Front Immunol. 2013;4:169.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.; 2016. 3-900051-07-0

Rahul Sharma, Ramanuj Lahiri, David M. Scollard, Maria Pena, Diana L. Williams, Linda B. Adams, John Figarola and Richard W. Truman. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases s 6, 19-24 (2013)

Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. Curr Opin Immunol. 2001 Aug;13(4):417-28. Review.

Ravn P, Bolsen H, Pedersen B, Andersen P. Human t cell responses induced by vaccination with mycobacterium bovis bacillus calmette guerin .1997. *Journal Immunology*. 1997;1949–55.

Rees RJ, Waters MF, Weddell AG, Palmer E. Experimental lepromatous leprosy. *Nature*. 1967 Aug 5;215(5101):599–602.

Renee Domozych, BA, Esther Kim, BA, Sarah Hart, BA, and Jeffrey Greenwald, MD, JD Orlando and Longwood. Florida - Increasing incidence of leprosy and transmission
Richardus RA, Butlin CR, Alam K, Kundu K, Geluk A, Richardus JH. Clinical manifestations of leprosy after BCG vaccination: An observational study in Bangladesh. *Vaccine*. 2015. pp. 1562–1567.

Richardus RA, Butlin CR, Alam K, Kundu K, Geluk A, Richardus JH. Clinical manifestations of leprosy after BCG vaccination: an observational study in Bangladesh. *Vaccine*. 2015 Mar 24;33(13):1562-7.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966. Jul-Sep;34(3):255-73.

Rocha Pinto, PGH. O estigma do pecado: A lepra durante a idade média. *Physis-Revista de saúde coletiva*. Vol. 5, Número 1, 1995.

Rodrigues LC, Kerr-Pontes LRS, Frietas MVC, Barreto ML. Long lasting BCG protection against leprosy. *Vaccine*. 2007. pp. 6842–6844.

Rosenthal SR. Cancer precursors and their control by BCG. *Dev Biol Stand* 1986: 58 (Pt A): 401–16.

Rotcheewaphan S, Belisle JT, Webb KJ, Kim HJ, Spencer JS, Borlee BR. Diguanilate cyclase activity of the Mycobacterium leprae T cell antigen ML1419c. *Microbiology*. 2016;162(9):1651-61.

Saini C, Ramesh V, Nath I, Increase in TGF- β secreting CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jan 16;8(1):e2639.

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 Jul 25;7(7):e2338.

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. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013

Sales AM, Ponce de Leon A, Duppre NC, Hacker MA, Nery JAC, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):1013.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. 2004; 22:745–63.

Sampaio EP, Moreira AL, Kaplan G, Alvim MF, Duppre NC, Miranda CF, et al. *Mycobacterium leprae*-induced interferon-gamma production by household contacts of leprosy patients: association with the development of active disease. *J Infect Dis*. 1991 Nov;164(5):990–3.

Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1;186(11):1687–91.

Santos DO, Santos SL, Esquenazi D, Nery JA, Defruyt M, Lorré K, et al. Evaluation of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulatory molecules and dendritic cells on the immune response in leprosy. *Nihon Hansen Gakkai Zasshi Jpn J Lepr Off Organ Jpn Lepr Assoc*. 2001 Feb;70(1):15–24.

Sarah T. Arron, Hobart W. Harris, Sara Hsin-Yi Yang, Bryan A. Anthony, Francis M. Sverdrup, Elisabeth Krow-Lucal, Tippi C. MacKenzie, David S. Johnson, Everett H. Meyer, Andrea Löhr, Andro Hsu, John Koo, Wilson Liao, Rishu Gupta, Maya G. Debbaneh, Daniel Butler, Monica Huynh, Ethan C. Levin, Argentina Leon, William Y. Hoffman, Mary H. McGrath, Michael D. Alvarado, Connor H. Ludwig, Hong-An Truong, Megan M. Maurano, Iris K. Gratz, Abul K. Abbas, and Michael D. Rosenblum. Memory regulatory T cells reside in human skin. *The Journal of Clinical Investigation*. 124 Number 3 March 2014.

Sarno EN, Duppre NC, Sales AM, Hacker MA, Nery JA, de Matos HJ. Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec;107(8):1054–9.

Sather, B. D. *et al*. Altering the distribution of Foxp3+ regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J. Exp. Med*. 204, 1335–1347 (2007).

Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101. Review.

Schoenbrunn A, Frensch M, Kohler S, Keye J, Doms H, Moewes B, et al. A converse 4-1BB and CD40 ligand expression pattern delineates activated regulatory T cells (Treg) and conventional T cells enabling direct isolation of alloantigen-reactive natural Foxp3+ Treg. *J Immunol*. 2012;189(12):5985-94

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):338–81.

Shann F. The non-specific effects of vaccines. 2010. Arch Dis Child 95(9):662–667.

Sharma A. against Trypanosoma cruzi infection in mice by nonspecific immunization T helper cells in leprosy: An update Immunology Letters 184 (2017) 61–66

Sher NA, Chaparas SD, Greenberg LE, Bernard S: Effects of BCG, Corynebacterium parvum, and methanol-extraction residue in the reduction of mortality from Staphylococcus aureus and Candida albicans infections in immunosuppressed mice. Infect Immun 1975, 12:1325-1330.

Sieling PA, Legaspi A, Ochoa MT, Rea TH, Modlin RL. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. Immunology. 2007 Apr; 120 (4):518-25.

Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. Immunobiology. 1994 Oct;191(4-5):378–87.

Silva, C. A. M. ; Danelishvili, L. ; Mcnamara, M. ; Moreira, M. B. P. ; Bildfell, R. ; Biet, F ; Rodrigues, L. S. ; Oliveira, A. V. ; Bermudez, L. e. ; Pessolani, M. C. V.. Interaction of Mycobacterium leprae with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. Infection and Immunity, v. 81, p. 000, 2013.

Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. Infect Immun. 2010 Jan;78(1):293–300.

Skegg DCG. BCG vaccination and the incidence of lymphomas and leukaemia. Int J Cancer 1975;21: 18-21

Smith SG, Lalor MK, Gorak-Stolinska P, Blitz R, Beveridge NER, Worth A, et al. Mycobacterium tuberculosis PPD-induced immune biomarkers measurable *in vitro* following BCG vaccination of UK adolescents by multiplex bead array and intracellular cytokine staining. BMC immunology. 2010. p. 35

Snider H, Lezama-Davila C, Alexander J, Satoskar AR. Sex hormones and modulation of immunity against leishmaniasis. Neuroimmunomodulation. 2009; 16:106–13. Epub 2009 Feb 11.

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 Dec;82(4):344–57.

Spencer JS, Dockrell HM, Kim HJ, Marques MAM, Williams DL, Martins MVSB, et al. Identification of specific proteins and peptides in Mycobacterium leprae suitable for the selective diagnosis of leprosy. J Immunol Baltim Md 1950. 2005 Dec 15;175(12):7930–8.

Steenhuis TJ, van Aalderen WM, Bloksma N, Nijkamp FP, van der Laag J, van Loveren H, Rijkers GT, Kuis W, Hoekstra MO. Bacille-Calmette-Guerin vaccination and the development of allergic disease in children: A randomized, prospective, single-blind study. *Clin Exp Allergy*. 2008. 38(1):79–85.

Stenger S. Cytolytic T cells in the immune response to mycobacterium tuberculosis. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(7):483–7. Aaby P, Roth A, Ravn H, Napirna BM, Rodrigues A, Lisse IM, Stensballe L, Diness BR, Lausch KR, Lund N, Biering-Sørensen S, Whittle H, Benn CS. X Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: Beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J Infect Dis*. 2011. 204(2):245–252

Suffia IJ, Reckling SK, Piccirillo CA, Goldszmid RS, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3⁺ Natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Biol Med*. 2006; 203:777–88.

Suryadevara NC, Neela VSK, Devalraju KP, Jain S, Sivasai KSR, Valluri VL, et al. Influence of Intron II microsatellite polymorphism in human toll-like receptor 2 gene in leprosy. *Hum Immunol*. 2013 Aug;74(8):1034–40.

T.F., Srivastava, M., Divekar, D.P., Beaton, L., Hogan, J.J., et al. (2011). Taams LS, et al. Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Hum Immunol*. 2005; 66:222–30.

Tribouley J, Tribouley-Duret J, Appriou M. Effect of Bacillus Callmette Guerin (BCG) on the receptivity of nude mice to *Schistosoma mansoni*. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1978;172(5):902-4. French.

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 2001 Mar;69(1):1–12

van 't Wout JW, Poell R, van Furth R: The role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice. *Scand J Immunol* 1992, 36:713-719.

Van Beers SM, Hatta M, Klatser PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1999 Jun;67(2):119–28.

Vijayakumaran P, Jesudasan K, Manimozhi N. Fixed-duration therapy (FDT) in multibacillary leprosy; efficacy and complications. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1996; 64: 123±127.

Villumsen M, Sørup S, Jess T, Ravn H, Relander T, Baker JL, Benn CS, Sørensen TI, Aaby P, Roth A. Risk of lymphoma and leukaemia after bacille Calmette-Guérin and smallpox vaccination: A Danish case-cohort study. *Vaccine*. 2009. 27 (49):6950–6958. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8): Reviews 1023.

Visschedijk J, van de Broek J, Eggens H, Lever P, van Beers S, Klatser P. Mycobacterium leprae--millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. *Trop Med Int Heal TM IH*. 2000 Jun;5(6):388–99.

von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005;6:338–44.

van Hooij A, Geluk A. Immunodiagnostics for Leprosy. International textbook for leprosy. 2016.

Vukmanovic-Stejic M, Sandhu D, Sobande TO, Agius E, Lacy KE, Riddell N, Montez S, Dintwe OB, Scriba TJ, Breuer J, Nikolich-Zugich J, Ogg G, Rustin MH, Akbar AN. Varicella zoster-specific CD4+Foxp3+ T cells accumulate after cutaneous antigen challenge in humans. *J Immunol*. 2013 Feb 1;190(3):977-86.

Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull*. 2006;77-78:103–21.

WHO. Weekly epidemiological record. 2017. N35, 92, 501-520.

WHO. Global Leprosy Update, 2015: Time for Action, Accountability and Inclusion. *Weekly Epidemiological Record*. 2016. pp. 405–420. doi:10.1371/jour

Xie J, Codd C, Mo K, He Y. Differential Adverse Event Profiles Associated with BCG as a Preventive Tuberculosis Vaccine or Therapeutic Bladder Cancer Vaccine Identified by Comparative Ontology-Based VAERS and Literature Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016 Oct 17;11(10): e0164792.

Xu D, et al. Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol*. 2006;177: 739–47.

Yamamoto Y, Saito H, Setogawa T, Tomioka H. Sex differences in host resistance to Mycobacterium marinum infection in mice. *Infect Immun*. 1991; 59:4089–4096.

Yamamoto Y, Tomioka H, Sato K, Saito H, Yamada Y, Setogawa T. Sex differences in the susceptibility of mice to infection induced by Mycobacterium intracellulare. *Am Rev Respir Dis*. 1990; 142:430–433.

Yang D, Shui T, Miranda JW, Gilson DJ, Song Z, Chen J, Shi C, Zhu J, Yang J, Jing Z, Ye Zheng, Steven Z. Josefowicz, Arnold Kas, Tin-Tin Chu, Marc A. Gavin & Alexander Y. Rudensky. Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. Vol 445|22 February 2007|

Zimmerman C, Brduscha-Riem K, Blaser C, Zinkernagel RM, Pircher H. Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1367–75.

Zodpey SP, Ambadekar NN, Thakur A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guerin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case–control study in Yavatmal District, India. *J R Inst Public Heal*. 2005;119: 209–216.

RESEARCH ARTICLE

Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to *Mycobacterium leprae* specific antigens


Fernanda Marques de Carvalho¹, Luciana Silva Rodrigues^{1*}, Nádia Cristina Duppre², Iris Maria Pelxoto Alvim¹, Marcelo Ribeiro-Alves³, Roberta Olmo Pinheiro², Euzenir Nunes Samo², Maria Cristina Vidal Pessolani^{1‡}, Geraldo Moura Batista Pereira^{1‡*}

1 Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratory of Clinical Research in DST-AIDS, Institute of Clinical Research Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* Current address: Laboratory of Immunopathology, Rio de Janeiro State University (UERJ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

‡ These senior authors contributed equally to this work.

* cpessola@ioc.fiocruz.br (MCVP); geraldo@ioc.fiocruz.br (GMBP)


 OPEN ACCESS

Citation: de Carvalho FM, Rodrigues LS, Duppre NC, Alvim IMP, Ribeiro-Alves M, Pinheiro RO, et al. (2017) Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to *Mycobacterium leprae* specific antigens. *PLoS Negl Trop Dis* 11(5): e0055560. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0055560>

Editor: Andrew S Azman, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, UNITED STATES

Received: November 30, 2016

Accepted: April 7, 2017

Published: May 3, 2017

Copyright: © 2017 de Carvalho et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data from this work are included in the manuscript.

Funding: The authors wish to thank the Carlos Chagas Filho Foundation for the Support to Research of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) for funding this investigation, and the Technological Development Program in Materials for Health (PDTS/FIOCRUZ)-RPTOBA for the use

Abstract

Household contacts of multibacillary leprosy patients (HCMB) constitute the group of individuals at the highest risk of developing leprosy. Early diagnosis and treatment of their index cases combined with Bacille Calmette-Guérin (BCG) immunization remain important strategies adopted in Brazil to prevent HCMB from evolving into active disease. In the present study, we assessed the impact of these measures on the immune response to *Mycobacterium leprae* in HCMB. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HCMB ($n = 16$) were obtained at the beginning of leprosy index case treatment (T0). At this time point, contacts were vaccinated ($n = 13$) or not ($n = 3$) in accordance with their infancy history of BCG vaccination and PBMCs were recollected at least 6 months later (T1). As expected, a significant increase in memory CD4 and CD8 T cell frequencies responsive to *M. leprae* whole-cell sonicate was observed in most contacts. Of note, higher frequencies of CD4⁺ T cells that recognize *M. leprae* specific epitopes were also detected. Moreover, increased production of the inflammatory mediators IL-1- β , IL-6, IL-17, TNF, IFN- γ , MIP1- β , and MCP-1 was found at T1. Interestingly, the increment in these parameters was observed even in those contacts that were not BCG vaccinated at T0. This result reinforces the hypothesis that the continuous exposure of HCMB to live *M. leprae* down regulates the specific cellular immune response against the pathogen. Moreover, our data suggest that BCG vaccination of HCMB induces activation of T cell clones, likely through "trained immunity", that recognize *M. leprae* specific antigens not shared with BCG as an additional protective mechanism besides the expected boost in cell-mediated immunity by BCG homologues of *M. leprae* antigens.

of the flow cytometry core facility. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Author summary

Leprosy remains a global public health issue with an annual new case detection of approximately 200,000–250,000 patients. The current study targets leprosy patient contacts, who constitute the group of individuals at highest risk of developing the disease. Treatment of the index case (patient) and BCG vaccination of his/her contacts are among the measures known to decrease the risk of household leprosy contacts contracting the disease. In the present work, the impact of these two measures on the immune response of contacts to mycobacterial antigens was investigated, showing improvement in the cellular immune response to both specific and shared *M. leprae* antigens and an increase in secretion of proinflammatory mediators, which likely explains the protective effect of these measures against leprosy.

Introduction

Leprosy is a global disease with no efficient means for early diagnosis or prevention. While disease prevalence has dropped significantly over the past three decades, it has not been completely eliminated (averaging between 200,000–250,000 new cases each year) [1]. Leprosy constitutes a public health threat particularly in Brazil in that about 30,000 new cases are reported per annum [2]. Thus, understanding the human immune response to this pathogen remains an important challenge in the development of novel tools for leprosy control.

Mycobacterium leprae, the causative agent of leprosy, is a highly infectious obligate intracellular bacterium. Although the vast majority of those exposed to *M. leprae* becomes infected, only a small proportion evolves into active disease. Previous work in leprosy and tuberculosis has revealed the major role played by interferon- γ (IFN- γ), an effector cytokine produced by pathogen-specific memory CD4 T cells, in the control of the infection by these intracellular pathogens [3][4].

Leprosy is manifested across a broad spectrum of clinical forms that are determined by the intensity of an individual's cellular immune response to *M. leprae*. The paucibacillary (PB) [polar tuberculoid] (TT), and borderline tuberculoid (BT) forms of leprosy manifest a contained, self-limited infection with few lesions in which scarce bacilli are detected in consequence of the cellular immune response against *M. leprae*. In contrast, the reduced specific cellular immunity in patients with the multibacillary (MB) forms of the disease [lepromatous (LL) and borderline lepromatous (BL)] results in an uncontrolled proliferation of the leprosy bacillus accompanied by many lesions and extensive infiltration in the skin and nerves. MB patients are considered the main source of *M. leprae* transmission since they carry a high bacterial load in their skin and are able to shed large numbers of bacteria from their nasal passages at a daily average of 10^7 viable *M. leprae* [5]. Thus, household contacts of MB leprosy patients (HCMB) are at the highest risk of developing leprosy due to their proximity with their index cases and consequent overexposure to *M. leprae*. In fact, the risk of illness among HCMB is 8–10 times higher than that of healthy individuals residing in endemic areas but with no domiciliary exposure to MB leprosy [6]. Some studies have shown this risk to be even more elevated among contacts carrying specific antibodies against the phenolic glycolipid-I (PGL-I) antigen [7][8][9], a unique molecule located in the *M. leprae* cell wall. Despite the fact that leprosy contacts constitute a group at a high risk to develop leprosy, only about 7% of them will progress to active disease [10][11].

Evidence indicates that persistent exposure to *M. leprae* leads to a reduced lymphoproliferation to *M. leprae* antigen, which improves as a result of index case treatment [12]. Recent data

have confirmed and added to this previous finding, linking persistent exposure to *M. leprae* and/or bacillary load in leprosy patients with hyporesponsiveness to *M. leprae*-specific antigens. A high level of the *ex vivo* IFN- γ response to *M. leprae*-specific peptides was observed in nearly all the exposed healthy individuals. However, there was a progressive reduction in these levels that correlated with the exposure level to *M. leprae* infection. The IFN- γ levels were lowest among HCMB when compared to PB household contacts and individuals residing in an hyperendemic leprosy area but with no history of contact with the disease [13].

It is well established that BCG confers protection against leprosy [14][15][16]. Since 1991, the Brazilian Ministry of Health (BMH) has officially recommended that household contacts (HC) of leprosy patients must be revaccinated with BCG to boost the efficacy of the first dose given to newborns as a tuberculosis prophylactic vaccine. The rationale for the use of BCG as a vaccine against leprosy relies on the knowledge that *M. leprae* and *M. bovis* BCG share many antigens with a high degree of homology [17]. In leprosy HC, the vaccine is administered irrespective of tuberculosis or leprosy skin test results. HC with no BCG scar at all or with only one are vaccinated with BCG. Healthy HC with two BCG scars are not vaccinated [18]. In Brazil, the impact of this policy, assessed in a cohort study of 3536 contacts of 1161 leprosy patients, revealed that the protection conferred by a booster BCG vaccine was 56%. The strain used in Brazil is known as BCG Moreau whose complete genome sequence has recently been deciphered [19].

Although both the BCG vaccination and index case treatment decrease the risk of household contacts contracting leprosy [9], the changes in the immune response induced by these two measures that could possibly explain the resulting protective effect have yet to be investigated in detail. In the present work, a prospective study was conducted to assess the impact of BCG vaccination and index case treatment on the *ex vivo* frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T cells responsive to *M. leprae* specific and shared mycobacterial antigens. The patterns of the cytokine/chemokine responses of the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated *in vitro* with the same antigens were also studied. A better understanding of the mechanisms responsible for the BCG-conferred protection against leprosy and the down modulation of the *M. leprae*-specific immune response by the overexposure to live bacteria among leprosy contacts could contribute to defining the biomarkers of protective immunity against mycobacteria and lead to the development of better and more effective vaccines.

Methods

Ethics statement

Ethical approval of this study was obtained from the Oswaldo Cruz Foundation Committee for Ethics in Research. Participants were informed about the study objectives together with the required amount and kind of samples. Written and informed consent was obtained from study participants before enrollment.

Recruitment of household contacts

A total of 16 household contacts of multibacillary leprosy patients (HCMB) with an average age of 37 ± 13 years, consisting of 11 females and 5 males under surveillance at the Souza Araújo (Fiocruz) Outpatient Clinic (Reference Center for Leprosy Diagnosis and Treatment, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), in Rio de Janeiro, RJ, Brazil), were enrolled in the study. All participants resided in the State of Rio de Janeiro, which, in 2013, had a new leprosy case detection rate of 7.36/100 000 individuals. HCMB were assessed for the presence of a BCG scar and the absence of clinical signs and symptoms of leprosy via routine examinations (dermatological, neurological, and/or physiotherapeutic assessments). Serology was carried out via ML Flow or ELISA for detection of anti-PGL-I IgM. HCMB received 0.1 ml of BCG (Ataulpho

de Paiva Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) intra-dermally in the deltoid region of the arm at about one-third down the upper arm over the insertion of the deltoid muscle [20].

***M. leprae* whole-cell sonicate and synthetic peptides**

Irradiated armadillo-derived *M. leprae* whole cells were probe sonicated with a Sanyo sonicator to 95% breakage. This material was provided by the NIH/NIAID "Leprosy Research Support" Contract N01 AI-25469 from Colorado State University (USA) (These reagents are now available through the Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository listed at <https://www.beiresources.org/Catalog/antigen/NR-19329.aspx>)

Synthetic peptides of 15 amino acids corresponding to class II *M. leprae*-specific epitopes were produced by Peptide 2.0 Inc. (Chantilly, VA, USA). For the present study, 13 HLA class II-restricted, *M. leprae*-specific peptides [p38, p51, p56, p59, p65, p67, p70, p71, p88, p91, and p92 (10 µg/ml each)] of 15 amino acids were combined and used as a pool for culture stimulation. These peptides correspond to *M. leprae* epitopes that share any or low similarity with BCG and are referred to as *M. leprae* specific in this study. They were previously tested for the induction of IFN-γ in the PBMC of leprosy patients and their contacts, and of healthy controls in both endemic and non-endemic areas for leprosy. Only responses in leprosy patients and in healthy individuals exposed to *M. leprae* were observed, indicating that they specifically detect individuals infected with *M. leprae* [21].

PBMC isolation and stimulation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from heparinized blood were isolated using Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences Pittsburgh, PA, USA) and resuspended in AIM V medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). PBMC from each individual were seeded at 2×10^6 cells per well and stimulated with anti-CD28 [1 µg/ml] and anti-CD49d monoclonal antibodies [1 µg/ml] (BioLegend, San Diego, CA, USA) plus armadillo-derived *M. leprae* cell sonicate (20 µg/ml), *M. leprae*-specific peptides [10 µg/ml each], or staphylococcal enterotoxin B (SEB, 1 µg/ml; Sigma) for a period of 6 hrs before the flow cytometry analysis. Protein transport inhibitor (Breifeldin A—BD, San Jose, CA, USA) was added during the last hour of incubation. In parallel, 2×10^5 cells were seeded in 96-well plates and stimulated with the *M. leprae* cell sonicate (20 µg/ml), *M. leprae*-specific peptides (10 µg/ml each), or SEB (1 µg/ml) for 5 days. Supernatants were collected and immediately stored at -20°C until use.

Flow cytometry

After a 6-hr culture, the cell populations were stained with a live/dead fixable violet dead cell stain kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for distinction of dead cells according to the manufacturer's instructions, and the following monoclonal antibodies were used: anti-hCD3-V500, anti-hCD4-PerCP, anti-hCD8-Alexa 700, anti-hCD69-APCCy-7, anti-hCD45RO-PECY7, or CD45RA-PECY7 / anti-hCD62L (BioLegend, San Diego, CA and BD biosciences San Jose, CA, EUA). Flow cytometric analysis was performed using a FACSAria IIu flow cytometer (BD Biosciences) and the FlowJo software version 7.5 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

Measurement of inflammatory mediators

A multiplex biometric immunoassay containing fluorescent-dyed microspheres conjugated with a monoclonal-specific antibody for a target protein was used for measurement of

inflammatory mediators according to the manufacturer's instructions (Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay; Bio-Rad Inc., Hercules, CA, USA). The mediators measured were: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ , and TNF mediator levels were determined by a multiplex assay reader from the Luminex Instrumentation System (Bio-Plex Workstation from Bio-Rad Laboratories, Inc.). Analyte concentration was estimated according to the standard curve using the Bio-Plex Manager software provided by the manufacturer. Values of unstimulated cultures were discounted from all stimuli.

Statistical analysis

Graphs were created using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), and the paired nonparametric Wilcoxon test was utilized to perform statistical analyses. A *p* value of 5% or less was considered significant. Medians were compared by either the Wilcoxon Signed Rank Test (for paired groups) or the Mann-Whitney Test (for unpaired groups). For association analyses, Spearman's Rank Correlations Coefficient with the Bonferroni correction of the family-wise error rate was adopted. Multivariate principal component analysis (PCA) was performed for dimension reduction and visualization using the R version software 3.1.2 [22][23].

Results

Epidemiological data and study design

A prospective study was conducted in HCMB to evaluate the impact of BCG vaccination and interruption of persistent exposure to live *M. leprae* by treating their index case on the *ex vivo* immune response to the pathogen. Blood was collected from the HCMB for comparative evaluation at the outset of the MB leprosy index case treatment prior to BCG contact vaccination (T0) and at least 6 months after the beginning of treatment (T1; Fig 1). The BCG vaccine was administered to contacts according to their vaccination history. As shown in Table 1, 13 out of the 16 HCMB were vaccinated at T0, 5 of whom received their first BCG dose and 8, a second dose due to their BCG scar. Three did not receive the vaccine at T0; 2 had previously received two doses (presence of 2 BCG scars), and the third, with no BCG scar, was suspected of leprosy and not vaccinated. However, this particular HCMB did not become ill during follow up. Ten HCMB were found to be seropositive to anti-PGL-1. However, no correlation between seropositivity to PGL1 and index case BI was observed (Table 1).

Index case treatment and BCG vaccination increase *ex vivo* frequencies of CD4⁺ cells specific for *M. leprae*-specific antigens

Exposure to pathogens is followed by the generation and persistence of memory T cells, which can provide long-lasting protection against these same pathogens (25). The impact on index case treatment and BCG vaccination in *M. leprae*-responsive T cell frequencies in peripheral blood was evaluated by detecting the T cells expressing the early activation antigen CD69 (CD69⁺) in response to short-term *in vitro* stimulation with *M. leprae*-specific antigens. To analyze the frequency of central memory CD4⁺ T cells (TCM) and effector memory CD4⁺ T cells (TEM) responsive to *M. leprae*, the gate strategy shown in S1 Fig was applied. This analysis was performed in 12 HCMB. PBMC from this group were stimulated with two antigen preparations: i) a *M. leprae* cell sonicate, which is a complex antigen mixture that is mostly shared with BCG; and ii) a pool of synthetic *M. leprae*-specific peptides corresponding to HLA class II-restricted epitopes. Regardless of their BCG vaccination status, almost all HCMB

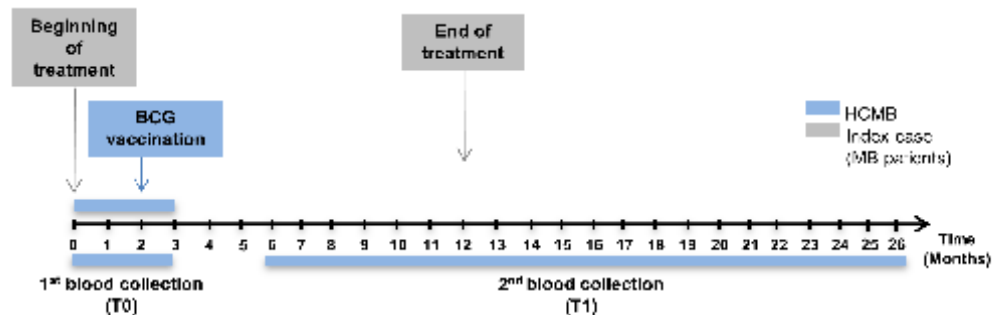


Fig 1. Study design. HCMB were enrolled during a period of 0–3 months after the beginning of their index case treatment. The first blood collection was performed prior to BCG vaccination according to the presence/absence of a BCG scar (T0). After an interval of 6 to 26 months from chemotherapy onset of the index case, the same individuals were asked to provide new peripheral blood samples (T1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005560.g001>

showed an increased frequency of CD4⁺ TCM responsive to the *M. leprae* cell sonicate at T1 (10 out of the 12 contacts) (Fig 2A and 2B). In addition, effector memory CD4⁺ TEM responsive to *M. leprae* frequencies increased in 8 out of 12 HCMB at T1 (SI Fig). Moreover, when analyzing CD8 T cell frequencies, a significant increase was detected in the CD8⁺ TCM responsive to *M. leprae* at T1 (7 out of the 12 contacts) (Fig 2C and 2D). Interestingly, the increase in CD4 and CD8 TCM frequencies was observed even in those HCMB in which the

Table 1. Epidemiological data of MB leprosy patient household contacts.

Contact Identification	Age (years) at first examination	Neonatal BCG vaccination	BCG vaccination at T0	IgM antibodies against PGL-I	Clinical form of the index case / LBI	Time interval between first and second evaluation (months)
1	52	no	yes	negative	BL / 4.8	22 months
2	36	no	yes	negative	BL / 3.6	6 months
3	41	no	yes	positive	BL / 3.6	6 months
4	52	no	yes	negative	LL / 5.9	6 months
5	29	no	yes	negative	LL / 5.9	12 months
6	41	yes	yes	negative	LL / 5.9	26 months
7	25	yes	yes	negative	LL / 3.8	26 months
8	46	yes	yes	positive	LL / 4.8	12 months
9	63	yes	yes	negative	BL / 3.8	12 months
10	19	yes	yes	positive	LL / 5.9	20 months
11	48	yes	yes	positive	LL / 5.9	10 months
12	26	yes	yes	negative	LL / 4.8	17 months
13	38	yes	yes	positive	BL / 2.0	6 months
14	43	no	no	positive	BL / 4.8	21 months
15	19	yes	no	negative	BL / 3.6	6 months
16	20	yes	no	negative	LL / 5.9	6 months

Abbreviations: LL, Lepromatous Lepromatous; BL, Borderline Lepromatous; LBI, logarithmic bacillary index of skin lesion; T0 indicates the beginning of index case treatment and prior to BCG vaccination; and T1 indicates the end of index case treatment and after BCG vaccination.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005560.t001>

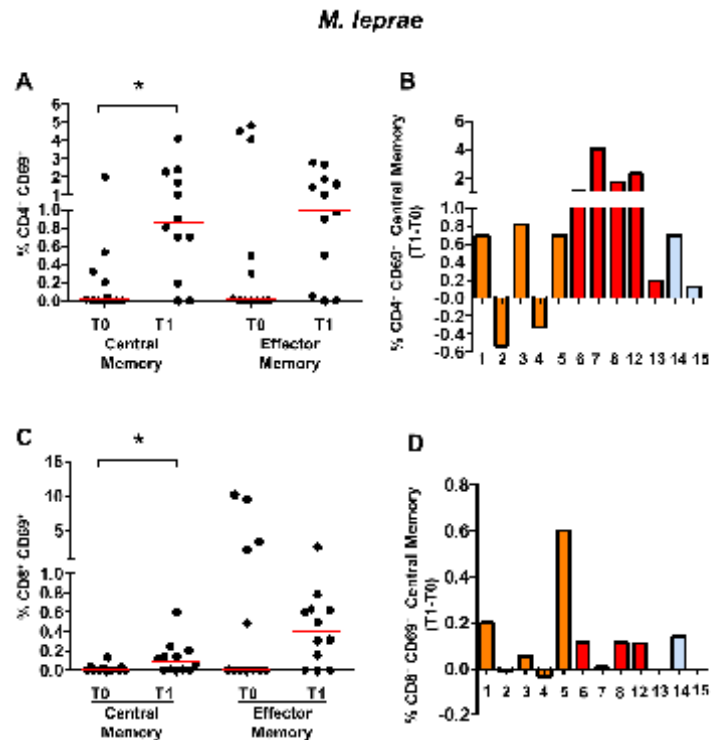


Fig 2. Frequencies of memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells responsive (CD69⁺) to *M. leprae* cell sonicates in household contacts of multibacillary leprosy patients (HCMB). Frequencies of central and effector memory CD4⁺(A) and CD8⁺(C) T cells expressing CD69 in response to 6-hour *in vitro* stimulation with *M. leprae* cell sonicate at T0 and T1. Each black circle represents one HCMB. The red lines represent the median values at the different time points. Individual lymphocyte frequencies of central memory CD4⁺ CD69⁺ T cells (B) and central memory CD8⁺ CD69⁺ T cells (D) after index case treatment and BCG vaccination of the HCMB. Each bar represents a single contact identified by the number under the bar. Orange bars represent contacts who received the first BCG dose at T0; red bars represent the HCMB who received a second BCG dose at T0; and the blue bars represent the HCMB who were not BCG vaccinated at T0. n = 12. * p < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005560.g002>

interval between the first and second evaluations was 20–26 months (HCMB# 1, 6, 7, 14). Of note, even HCMB who were not BCG vaccinated at T0 (HCMB#14 and 16) showed increased frequencies of the CD4⁺ T and CD8⁺ T cells responsive to *M. leprae* at T1. No correlation was seen between individual frequencies to *M. leprae*-responsive T cells and seropositivity to PGL-I among HCMB at any time point.

The *ex vivo* frequencies of CD4⁺ T cells in the *M. leprae*-specific peptides are shown in Fig 3. It is noteworthy that a significant increase in TCM and TEM CD4⁺ T cell frequencies in response to the *M. leprae* peptides was in evidence at T1. Interestingly, HCMB who did not receive a BCG vaccination at T0 (HCMB#14 and 16) also showed increased CD4⁺ TCM (Fig 3B) and TEM frequencies (Fig 3C) in response to *M. leprae*-specific peptides at T1. There was

Class II *M. leprae*-specific peptides

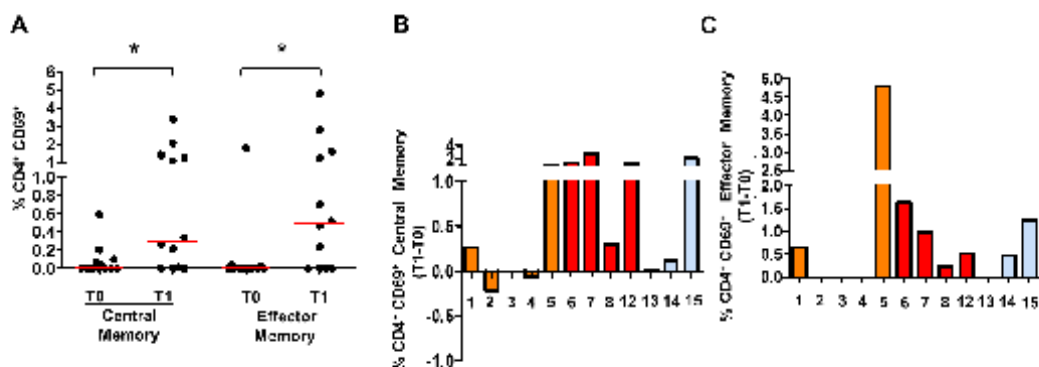


Fig 3. Frequencies of CD4⁺ T cells responsive (CD69⁺) to HLA Class II-restricted *M. leprae*-specific epitopes in household contacts of multibacillary leprosy patients (HCMB). (A) Frequencies of central and effector memory CD4⁺ T cells expressing CD69 in response to 6-hr *in vitro* stimulation with a pool of HLA class II-restricted synthetic peptides derived from *M. leprae* specific epitopes (15-mers) at T0 and T1. Each black circle represents one HCMB. The red lines represent the median values for the different time points. Changes in the individual frequencies of central (B) and effector memory T cells (C) responsive to *M. leprae* specific epitopes are shown. Each bar represents a single contact identified by the number under the bar. Orange bars represent the contacts who received the first BCG dose at T0; the red bar represents the HCMB who received a second BCG dose at T0; and the blue bars represent the HCMB who was not vaccinated at T0. n = 12. * p < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005560.g003>

no difference in response between the positive or negative HCMB to PGL-I antibodies; and the frequencies of peptide-pool specific CD8⁺ T cells were below the detection limit.

Index case treatment and BCG vaccination increase the *in vitro* levels of pro-inflammatory mediators in response to mycobacterial antigens

Next, comparisons were made among the cytokine, chemokine, and growth factor levels secreted *in vitro* by PBMC stimulated with the *M. leprae* cell sonicate or *M. leprae*-specific peptides at T0 and T1. In the unstimulated cultures, the levels of these biomarkers were either below or, in a few cases, just above the detection limit. All the individuals responded well when their cells were cultured in the presence of the superantigen staphylococcal enterotoxin B used as a positive control. Among the 17 mediators measured by a multiplex assay, a significant increase was observed at T1 in the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 and the chemokines MCP-1 and MIP-1 β . Likewise, a tendency toward higher levels of TNF (p = 0.073), IL-17 (p = 0.083), and IFN- γ (p = 0.093) (Fig 4A) was demonstrated. Among the inflammatory mediators, IL-17 and IL-1 β showed a positive correlation (R = 0.7 and p = 0.001) in response to *M. leprae* at T0 and T1 and IL-8 production levels in all individuals were above the upper detection limit. Individual behavior of each HCMB in terms of secretion of these mediators is displayed in S2 Fig. HCMB, whether vaccinated or not at T0 (HCMB#14, 15 and 16), showed increased levels of inflammatory mediators in response to *M. leprae* at T1. The increment in inflammatory mediators was observed even in those HCMB in which the interval between the first and second evaluations was 20–26 months (HCMB# 1, 6, 7, 10, 14). It is probable that a more consistent increase along with higher levels of mediator production occurred among the contacts receiving a second BCG dose at T0. Nonetheless, the differences did not reach the level of statistical significance (S2 Fig). There was no difference in response between HCMB

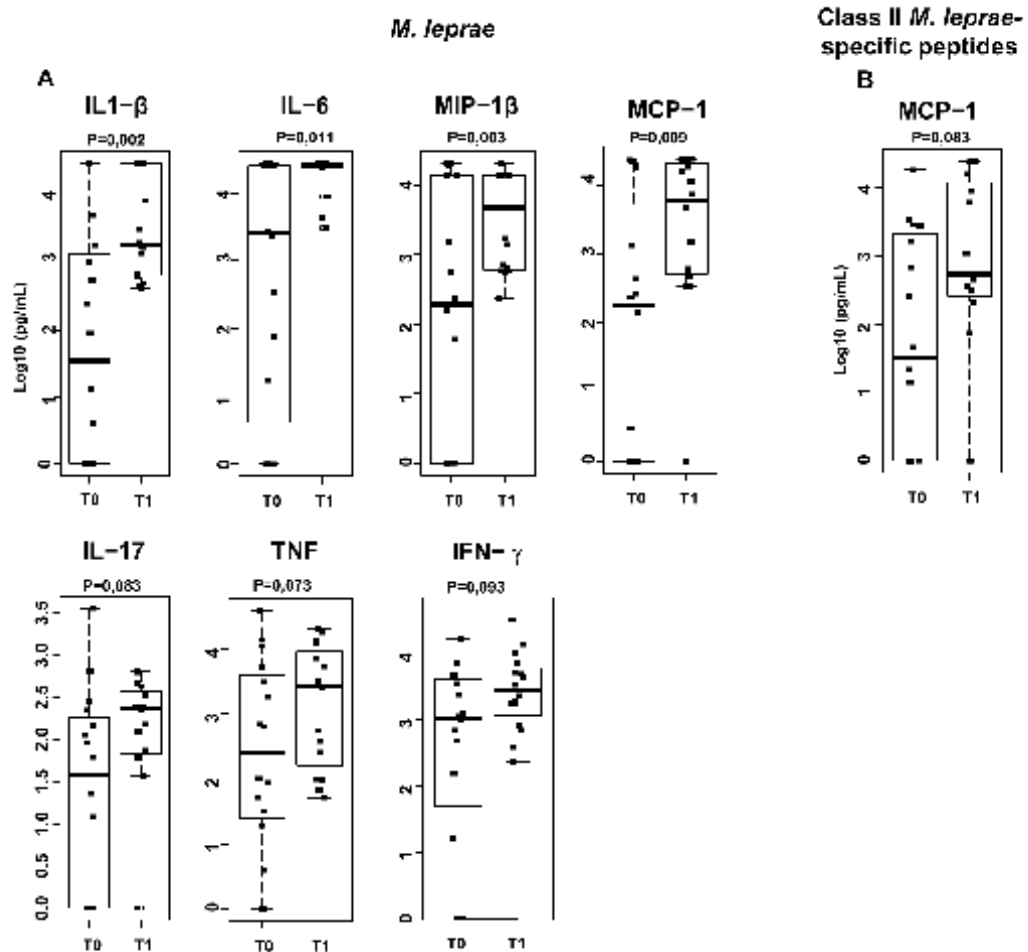


Fig 4. Effector molecule levels increase in response to *M. leprae* after index case treatment and BCG vaccination of household contacts of MB1 leprosy patients (HCMB). Levels of effector molecules in supernatants of 5-day cultures stimulated with ML (A) or a pool of HLA Class II-restricted ML-specific synthetic peptides (B) were evaluated by multiplex assays in supernatants of 5-day cultures of peripheral blood leukocytes of HCMB before (T0) and after (T1) treatment of their index cases and BCG vaccination. Box plots show median, interquartile range, sample minimum, and maximum levels. Dots represent individual donors. n = 16.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005560.g004>

anti-PGL-1 positive and negative individuals. In cultures stimulated with *M. leprae*-specific peptides, only MCP-1 levels were suggestive of a more robust response (Fig 4B).

It was then decided to evaluate if the increased levels of MCP-1, IL-1 β , IL-17, IL-6, IFN- γ , MIP-1 β , and TNF observed at T1 in response to *M. leprae* would differentiate T0 from T1 when analyzed simultaneously. In the principal component analysis (PCA), 76.9% of the total variation in response to the 7 cytokines could be narrowed down to 2 components. The first

component accounted for a full 62% of the total variation, coming close to corresponding to the average standardized log response to IL-1 β , IL-6, IFN- γ , IL-17, MCP-1, TNF, and MIP-1 β . The second component was independent of the first, totaling 14% of the remaining variation, with a close approximation to the average standardized log response to MIP-1 β and IL-6 (Table 2). Together, these cytokines did not completely differentiate T0 from T1. However, a greater heterogeneity in response at T0 was found in contrast to the homogeneity in response at T1 (Fig 5), suggesting a trend toward separation.

Discussion

The current study targeted HCMB, the group of individuals exposed to leprosy at the highest risk of developing active disease. Two factors are known to decrease the risk of disease among HCMB: i) treatment of the index case (patient) decreases exposure to live *M. leprae* [24]; and ii) BCG vaccination [9]. In the present prospective study, the impact of these two factors on the HCMB immune response to mycobacterial antigens was investigated. The frequencies of the peripheral blood memory T cells responsive to *M. leprae* and the levels of inflammatory mediators produced in *M. leprae*-stimulated cultures among HCMB were evaluated before and after BCG vaccination and treatment of their index cases.

Our findings indicate changes in the HCMB immune response to mycobacterial antigens that could account for their improved resistance to developing leprosy, as follows: i) an increase in the frequencies of memory CD4 and CD8 T cells responsive to the *M. leprae* whole-cell sonicate; ii) higher frequencies of CD4⁺ T cells that recognize *M. leprae*-specific peptides; and iii) higher production levels of the inflammatory mediators IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF, IFN- γ , MIP-1 β and MCP-1 by PBMCs in response to mycobacterial antigens. Of note, the improved response against *M. leprae* antigens in HCMB seems to be a long-lasting effect, since it was observed even after two years of follow up. Moreover, an increment of these parameters was observed even among contacts that did not receive a BCG vaccine at T0, suggesting that reduced exposure to live *M. leprae* in consequence of index cases treatment constitutes an important element in the enhanced immune response witnessed in these individuals.

Table 2. Principal component analysis.

Component	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
Component 1	4.25	3.29	62.73	62.73
Component 2	0.96	0.44	14.18	76.91
Component 3	0.52	0.10	7.73	84.64
Component 4	0.43	0.07	6.27	90.91
Component 5	0.36	0.19	5.27	96.18
Component 6	0.17	0.08	2.48	98.66
Component 7	0.09	NA	1.34	100.00
Variable	Component 1	Component 2		
IFN- γ	0.39	-0.23		
IL-17	0.39	-0.29		
IL-1 β	0.44	0.11		
IL-6	0.41	0.30		
MCP-1	0.37	0.07		
MIP-1 β	0.26	0.70		
TNF	0.36	-0.51		

Principal component analysis of the ex vivo response to *M. leprae* at T0 and T1 (cytokine levels in *M. leprae*-stimulated 5-day culture supernatants of peripheral blood leukocytes). NA, not applicable.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005560.t002>

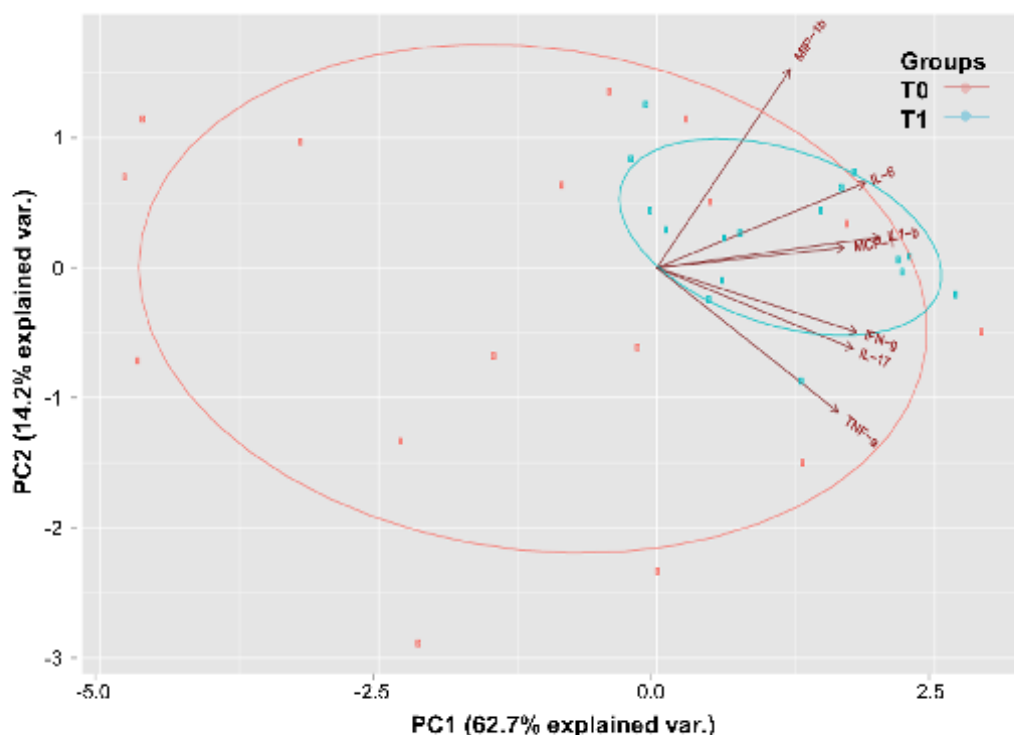


Fig 5. Pattern of cytokine response to *M. leprae* becomes more homogeneous after BCG vaccination and index case treatment. Principal component analysis scored values for components 1 and 2. Longer vectors (in brown) indicate the cytokines that responded to *M. leprae*. T0 samples are in salmon (n = 16) and T1 in blue (n = 16).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005580.g005>

Interestingly, in HCMB, an increment in both *M. leprae*-specific memory CD4⁺ and CD8⁺ T cell frequencies was observed at T1. CD4 and CD8 T cells have been implicated in the protective immune response against mycobacteria [25] and might, therefore, account for the improvement in their protective response against leprosy. Moreover, the borderline increment in their IFN- γ and IL-17 levels in response to *M. leprae* observed at T1 points to the activation of Th1 and Th17 T cell subsets, previously shown to be induced by BCG vaccination [26] and implicated in the protection against mycobacteria [27].

An important finding in the present study was the increase in CD4 T cells specific for *M. leprae* specific epitopes not found in BCG. This result is in agreement with a previous study in which increased levels of IFN- γ were observed in response to MMPI, a *M. leprae* antigen not shared with BCG, subsequent to contact vaccination [28]. This could be the result of the well-known, non-specific "adjuvant" effect of BCG on the immune response recently shown to be mediated by innate immune cell epigenetic modifications, referred to as "trained immunity" [29]. Indeed, the increase in TNF, IL-1 β , IL-6, MCP-1, and MIP-1 β mediators typically produced by monocytes supports the idea of BCG-induced "trained immunity" as a Th1/Th17 heterologous mediating mechanism of immune activation favoring disease protection of HC

of leprosy patients. Other reports have shown that most of these mediators are induced by BCG vaccination [30][31][32]. The phenotypic modification of innate immune cells by BCG has been shown to last for at least one year after vaccination [26], an interval compatible with the 6–26 month follow-up adopted in the present study. This is also in line with the long-term BCG protection effect against leprosy previously described [33].

The likely activation of Th1/Th17 T cell populations in conjunction with the simultaneous increment of the inflammatory cytokines/chemokines (TNF, IL-1 β , IL-6, MCP-1, and MIP-1 β) in response to BCG could explain the onset of paucibacillary leprosy (PB) in a small percentage of leprosy contacts after vaccination [28][10][34][35]. A similar explanation could be applied to the incidence of relatively high numbers of patients with Type 1 reactions among the previously asymptomatic contacts who developed leprosy soon after BCG [35]. According to Bagshawe et al., [34] the manifestation of PB leprosy after BCG vaccination reflects the potential of this vaccine to accelerate evolution to clinical disease in individuals who were infected prior to or immediately after vaccination. In line with this hypothesis, Duppre et al. [10] found that, for the most part, vaccinated contacts contracted leprosy from MB index cases, suggesting that subclinical infection may become overt due to vaccination-induced immune response activation. Moreover, Duppre et al. [9] reported that the incidence of PB leprosy was highest during the first year of follow-up for the PGL-I-positive vaccinated contacts in comparison with the PGL-I negative ones. In the present study, however, no contact developed leprosy post-vaccination during the 3-year follow-up. Likewise, there was no correlation between the presence of PGL-I antibodies and the specific immune response levels observed at T1. In a future study, it may be advisable to increase the sample size to more thoroughly evaluate the impact of anti-PGLI in the immune response to *M. leprae* among leprosy patient contacts.

Importantly, an increased cellular immune response to both specific and shared *M. leprae* antigens was also detected in the 3 contacts who did not receive BCG at T0. This observation is consistent with a previous finding indicating an increase in the PBMC proliferative response to *M. leprae*-antigenic preparations among HCMB a full 6 months after initiating index case treatment [12]. The analysis of the immune response to *M. leprae* specific antigens of healthy individuals with no history of household contact with leprosy patients, but living in a hyperendemic area for leprosy in Brazil, found high-level IFN- γ responses *ex vivo* to *M. leprae* in all the evaluated individuals from this group. In the same investigation, we observed a progressive reduction in IFN- γ levels with increase of persistent exposure to *M. leprae* in asymptomatic infected individuals and leprosy patients [13]. Altogether, these findings support the hypothesis that the continuous exposure to live *M. leprae* induces down regulation of the cellular effector immune response against the pathogen and that this effect is reversed upon treatment of the index case. This hypothesis is also supported by data indicating that leprosy incidence decreases significantly among household contacts after three years of index case treatment [34]. It is also known that, even among household contacts, only a small proportion of exposed individuals eventually develop active disease [11]. Overall, the sum of these observations suggests that after the initial infection, there are other yet unknown steps involved in the evolving pathogenesis of leprosy.

Data accrued from previous and the present investigations showing enhancement of *ex vivo* cell-immunity parameters against *M. leprae* among HCMB after index case treatment give weight to the hypothesis that persistent exposure may facilitate the evolution of the infection to active disease by inhibiting the effector response in contacts. The negative modulation of the effector immune response to *M. leprae*, as a result of continuous and prolonged stimulation of the immune system by the pathogen eliminated by the index case, is a possible explanation for the known high risk of HCMB to evolve from latent infection to the active disease [15][36].

M. leprae-specific regulatory T cells (Treg) are a potential cause for this down regulation of the effector immune response seen in HCMB. The recent observation of *in vitro* inhibition of immune response to *M. leprae* in lepromatous leprosy by cells with Treg phenotypic characteristics supports this hypothesis. The continuous exposure of the airways immune system of the HCMB to the live *M. leprae* aerosols expelled by the MB leprosy patients may create conditions that favor differentiation of *M. leprae*-specific Tregs, perhaps by sharing some of the mechanisms inhibiting effector T cell generation in response to environmental antigens and normal microbiome [32].

Tregs have been implicated in the pathogenesis of cancer, auto immune and infectious diseases as well as allergies. Therapeutic intervention in the Treg function has been successful in some situations, and could, together with index case treatment, be a target in the development of new and improved vaccination strategies for leprosy prevention in populations heavily exposed to leprosy. A deeper understanding of the mechanisms involved in the negative modulation of the immune response experienced by individuals persistently exposed to *M. leprae* may contribute to designing tools to more reliably identify infected individuals before there are any clinical manifestations of the disease, which would be a significant contribution toward interrupting the chain of transmission.

To our knowledge, this is the first study demonstrating that index case treatment and/or BCG vaccination of HCMB induce activation of T cell clones that recognize *M. leprae* specific epitopes not shared with BCG. This activation may at least partially explain the well-known protective effect of these measures against disease progression in HCMB

Supporting information

S1 Fig. Gates strategy for analysis. After distinction of dead cells by their area and height parameters, singlet cells were selected (A). The lymphocytes were determined via the SSC (side scatter) and FSC (forward scatter) parameters; (B) The CD4⁺CD69⁺ and CD8⁺CD69⁺ central and effector memory T cells were determined with specific antibodies (C and D). (TIF)

S2 Fig. Frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ effector memory T cells responsive (CD69⁺) to *M. leprae* (T1-T0). Change in the individual frequencies of effector memory CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) T cells expressing CD69 in response to 6-hr *in vitro* stimulation with a *M. leprae* sonicate. Each bar represents a single contact identified by the number under the bar. The orange bars represent the contacts that received the first BCG dose at T0; the red bars represent the HCMB that received a second BCG dose at T0; and the blue bar represents the HCMB not BCG vaccinated at T0. n = 12 per group. (TIF)

S3 Fig. Individual production of inflammatory mediators in response to *M. leprae*. Supernatants from 5-day cultures of peripheral blood leukocytes stimulated with a *M. leprae* sonicate were evaluated using a Multiplex assay at T0 and T1. T0 indicates the beginning of index case treatment and prior to BCG vaccination. T1 indicates after BCG vaccination and treatment of the index case. Each bar represents a single HCMB with number identification. The orange bars represent the contacts that received the first BCG dose at T0; the red bars identify the HCMB that received a second BCG dose at T0; and the blue bars, the HCMB that was not BCG vaccinated at T0. n = 16. (TIF)

Acknowledgments

The authors are grateful to Judy Grevan for editing the text. The authors also wish to thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its Luminex (Dr. Patricia Bozza and Edson F. de Assis) and flow cytometry core facilities (Citometria de Fluxo-RJ, RPT08A) in experiments and analyses.

Author Contributions

Conceptualization: GMBP MCVP LSR IMPA FMC.

Formal analysis: MRA FMdC GMBP MCVP.

Funding acquisition: GMBP MCVP.

Investigation: FMdC IMPA.

Resources: ENS ROP NCD MRA GMBP MCVP.

Supervision: GMBP MCVP ENS ROP NCD.

Visualization: GMBP MCVP FMdC MRA.

Writing – original draft: GMBP MCVP FMdC.

Writing – review & editing: ENS NCD.

References

1. WHO. Global Leprosy Update, 2015: Time for Action, Accountability and Inclusion. *Weekly Epidemiological Record*. 2016. pp. 405–420.
2. Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2015. <http://portal.saude.sa.gov.br/index.php/p1-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secreta-sa-svs/vigilancia-de-a-a-z/hansenase/11298-situacao-epidemiologica-dados> (accessed February 2017)
3. Casanova JL, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 581–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851> PMID: 11861613
4. Green AM, Difazio R, Flynn JL. IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). 2013. pp. 270–277.
5. Davey T, Rees R. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Leprosy*. 1974; 45: 121–134. PMID: 4608620
6. Noordeen SK. Elimination of leprosy as a public health problem: Progress and prospects. *Bull World Health Organ*. 1995; 73: 1–6.
7. Groenen G, Pattyn SR, Ghys P, Tshilumba K, Kuykens L, Colston MJ. A longitudinal study of the incidence of leprosy in a hyperendemic area in Zaire, with special reference to PGL-antibody results. The Yalombo Study Group. *Int J Leprosy Other Mycobact Dis*. 1990 Dec; 58(4):641–50. PMID: 2280114
8. Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatzer PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004. pp. 897–900. <https://doi.org/10.1128/CDLI.11.5.897-900.2004> PMID: 15368649
9. Düppe NC, Camacho LAB, Sales AM, Ilaramend X, Nery JAC, Sampaio EP, et al. Impact of pgl-1 seropositivity on the protective effect of bcg vaccination among leprosy contacts: A cohort study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012.
10. Düppe NC, Camacho LAB, da Cunha SS, Stuchiner CJ, Sales AM, Nery JAC, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008. pp. 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.04.015> PMID: 18514242

11. Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JAC, Samo EN, et al. Leprosy among patient contacts: A multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;
12. Godal T, Negassi K. Subclinical infection in leprosy. *Br Med J*. 1973;3: 557–559. PMID: [4580217](#)
13. Martins MVB, Guimarães MM da S, Spencer JS, Hacker MAVB, Costa LS, Carvalho FM, et al. Pathogen-specific epitopes as epidemiological tools for defining the magnitude of *Mycobacterium leprae* transmission in areas endemic for leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012.
14. Abel L, Cua VV, Oberst J, Lap VD, Due LX, Grosset J, Lagrange PH. Leprosy and BCG in southern Vietnam. *Lancet*. 1990 Jun 23; 335(8704):1536.
15. Fine PE, Steine JA, Pönnighaus JM, Bliss L, Sauli J, Chihana A, et al. Household and dwelling contacts as risk factors for leprosy in Northern Malawi. *Am J Epidemiol*. 1997; 146:91–102. PMID: [9215227](#)
16. Zodpey SP, Ambekar NN, Thakur A. Effectiveness of Bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. *J R Inst Public Heal* 2005; 119: 209–216.
17. Cole ST, Eigmeier K, Paulhil J, James KD, Thomson NR, Wheeler P R, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 401: 1007–11.
18. Ministério da saúde. Portaria n° 1.401, de 14 de Agosto de 1991. Diário Oficial da União, Brasília, 16 Agosto 1991. p. 16707.
19. Gomes LH, Otto TD, Vasconcelos EA, Ferrão PM, Maia FM, Moreira AS, et al. Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian Vaccine Strain against Tuberculosis. *J Bacteriol* 2011; 193: 5600–1. <https://doi.org/10.1128/JB.05827-11> PMID: [21914899](#)
20. Ministério da Saúde. Manual de Normas de Vacinação. Manual de Normas de Vacinação. 2001. p. 72.
21. Spencer JS, Dockrell H, Kim HJ, Marques MAM, Lockwood D, Martins MVB. Identification of Specific Proteins and Peptides in *Mycobacterium leprae* Suitable for the Selective Diagnosis of Leprosy. *J Immunol* 2005; 175: 7930–8. PMID: [16339528](#)
22. Mardia KV, Kent J T, Bibby JM. Multivariate Analysis. *J Appl Math Mech*. 1981; 61: 206.
23. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.; 2016. 3-900051-07-0
24. Vijayakumaran P, Jesudasan K, Manimozhi N. Fixed-duration therapy (FDT) in multibacillary leprosy; efficacy and complications. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1996; 64: 123–127. PMID: [8690969](#)
25. Stenger S. Cytolytic T cells in the immune response to mycobacterium tuberculosis. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33: 483–7. PMID: [11515755](#)
26. Kleinrinhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J Ina Immunol*. 2014; 6: 152–158.
27. Gopal R, Lin Y, Obermayer N, Slight S, Nuthalapati N, Ahmed M, et al. IL-23-dependent IL-17 drives Th1-cell responses following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Eur J Immunol* 2012; 42:364–373. <https://doi.org/10.1002/eji.201141569> PMID: [22101830](#)
28. Lima MC, Pereira GM, Rumjanek FD, Gomes HM, Duppre N, Sampaio EP, et al. Immunological cytokine correlates of protective immunity and pathogenesis in leprosy. *Scand J Immunol* 2000; 51: 419–428. PMID: [10736116](#)
29. Kleinrinhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LAB, Iltis DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guérin induces NOD2-dependent non-specific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012. pp. 17537–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202870109> PMID: [22988082](#)
30. Lalor MK, Smith SG, Royd S, Gorak-Stolinska P, Weir RE, Blitz R, et al. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine*. 2010. pp. 1635–1641. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.11.004> PMID: [19941997](#)
31. Smith SG, Lalor MK, Gorak-Stolinska P, Blitz R, Beveridge NER, Worth A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* PPD-induced immune biomarkers measurable in vitro following BCG vaccination of UK adolescents by multiplex bead array and intracellular cytokine staining. *BMC immunology*. 2010. p. 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-35> PMID: [20609237](#)
32. Lalor MK, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Ben-Smith A, Weir RE, Smith SG, et al. BCG vaccination induces different cytokine profiles following infant BCG vaccination in the UK and Malawi. *Journal of Infectious Diseases*. 2011. pp. 1075–1085. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir515> PMID: [21881123](#)
33. Rodrigues LC, Kerr-Pontes LRS, Fietas M/C, Barreto ML. Long lasting BCG protection against leprosy. *Vaccine*. 2007. pp. 6842–6844. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.032> PMID: [17728023](#)
34. Bagshawe A, Scott GC, Russell DA, Wigley SC, Merianos A, Berty G. BCG vaccination in leprosy: final results of the trial in Karimui, Papua New Guinea, 1963–79. *Bull World Heal Organ*. 1989; 67: 389–99.

35. Richardus RA, Bullin CR, Alam K, Kundu K, Geluk A, Richardus JH. Clinical manifestations of leprosy after BCG vaccination: An observational study in Bangladesh. *Vaccine*. 2015. pp. 1562–1567. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.017> PMID: 25701674
36. de Matos HJ, Duppre N, Alvim MF, Machado Veias LM, Sarno EM, Struchiner CJ. Leprosy epidemiology in a cohort of household contacts in Rio de Janeiro (1987–1991). *Cad Saude Publica*. 1999; 15: 533–42. PMID: 10502149
37. 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: 2773.

