



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Marques de Carvalho

Resposta imune celular *Mycobacterium leprae*-específica *in vitro* de contatos de pacientes com hanseníase multibacilar no início e durante o tratamento do caso índice.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Marques de Carvalho

Resposta imune celular *Mycobacterium leprae*-específica *in vitro* de contatos de pacientes com hanseníase multibacilar no início e durante o tratamento do caso índice.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Rio de Janeiro

2013



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda Marques de Carvalho

Resposta imune celular *Mycobacterium leprae*-específica *in vitro* de contatos de pacientes com hanseníase multibacilar no início e durante o tratamento do caso índice.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 05/09/2013.

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno - Instituto Oswaldo Cruz -Presidente

Prof. Dra. Alda Maria Da-Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Orlando Ferreira Junior – Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUPLENTES:

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

Prof. Dra. Alice de Miranda Machado - Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, 05 de setembro de 2013.

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 Vidal Pessolani por me orientar com excelência ao longo desses anos, desde antes da graduação. Pelas oportunidades, por acreditar em mim, pelos conselhos, dedicação e por sua amizade. Com toda minha admiração e respeito. Muito Obrigada!

Ao Dr. Geraldo Pereira por sua excelente orientação, por ter acreditado em mim e por todos os ensinamentos valiosos, que sempre com muita paciência esteve disponível para solucionar as minhas dúvidas e por sua amizade.

À Dra. Luciana Rodrigues que acompanhou de perto cada etapa do trabalho e esteve sempre disposta a ajudar, por sua contribuição para a realização deste trabalho, sua excelente ajuda na correção e por comemorar comigo o retorno de cada contato.

À Dra. Iris Alvim por todos esses anos de amizade e com que eu aprendi muitas coisas. Por toda a sua ajuda em me ensinar citometria de fluxo e a utilizar o *software* para análise e por todos os galhos quebrados ao longo desses anos.

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 e por sua amizade.

À Dra. Roberta Olmo por toda a sua paciência ao longo desses dois anos, principalmente quanto ao recrutamento dos contatos, por dividir comigo as amostras dos contatos e por algumas vezes deixar de recrutar um indivíduo e me dar preferência e por ser a revisora deste trabalho.

À Dra. Alice Miranda por sua grande ajuda com as imagens de microscopia e por gentilmente aceitar o meu convite para participar da banca.

Ao Dr. Orlando Ferreira Junior e a Dra. Alda Maria-Da Cruz por gentilmente terem aceitado o convite para participar da banca.

À Dra. Mariana Hacker por tirar as dúvidas quanto ao melhor e mais adequado teste estatístico a ser utilizado nesse estudo.

Aos meus queridos amigos do Pavilhão de Hanseníase: Leonardo, João, Adriano, Júlio, Rosana, Paula, Karina, Sabrina, Katherine, Márcia, Rodrigo, Arthur, Juliane, Otto, Camila, Alan, Raquel, Sidra, Harrisson, Danuza, Cíntia, Thiago, Lucia e Carol. E em especial à Livia, André, Débora, Chyntia, Robertha, Thabatta, Fabrício, Vilma, Cristiana, Priscila, Augusto e ao Sr. Sales.

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

À minha mãe Alice por sempre ter acreditado em mim, por todos os momentos difíceis que passamos juntas e pelo seu amor, conselhos e apoio que foram essenciais ao longo dessa caminhada e, ao meu pai Aristides por seu amor, preocupação e por acreditar em mim.

À minha querida irmã Amélia por sempre ter acreditado em mim, pelo seu apoio, seus conselhos, sua amizade e paciência. Ao meu irmão Fernando por acreditar em mim, pelo seu apoio, orações e conselhos. Aos meus sobrinhos Alexandre Jr e Anne por me retribuírem com tanto amor e admiração e por tornarem os meus dias mais felizes.

Ao meu noivo, Roberto, pelo carinho, amizade, paciência, dedicação, por entender os momentos em que precisei ficar ausente e estar ao meu lado em todos os momentos, principalmente os mais difíceis ao longo desses dois anos. Por passar a noite acordado comigo esperando terminar os experimentos, e por saber que posso contar com você em todos os momentos.

Às minhas primas Aline, Fabiane, Camila e Ângela e as amigas Marjorie, Marcela e Laís por me apoiarem e acreditarem em mim.

Aos pacientes de hanseníase e seus contatos. Sem vocês teria sido impossível a realização deste trabalho.

Ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas e siglas.....	xi
	Lista de figuras.....	xiv
	Lista de tabelas.....	xvii
	Resumo.....	xviii
	Abstract.....	xix
1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	A hanseníase.....	1
1.2	Prevalência atual e distribuição geográfica.....	3
1.3	O <i>Mycobacterium leprae</i>	5
1.4	Formas clínicas da hanseníase.....	9
1.5	Diagnóstico.....	10
1.6	Episódios reacionais.....	12
1.7	Tratamento.....	13
1.8	Transmissão.....	13
1.9	Aspectos clínicos e imunológicos na hanseníase.....	15
1.10	Imunidade inata e adquirida na hanseníase.....	19
1.11	Papel do IFN- γ e da IL-10 na modulação da resposta imune de indivíduos infectados pelo <i>M.leprae</i>	22
1.12	Contatos de pacientes com hanseníase multibacilar e seu risco de adoecimento.....	24
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	Seleção de indivíduos e Permissão ética.....	29
3.2	Estímulos.....	30
3.3	Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS).....	31
3.4	Ensaios de estimulação <i>in vitro</i>	32
3.5	Obtenção de linfócitos provenientes de fragmentos de pele obtidos por biópsia.....	32
3.6	Processamento de rotina e colorações de fragmentos de pele obtidos por biópsia.....	33
3.7	Análise de marcadores de superfície e citocinas intracelulares por citometria de	

	fluxo.....	33
3.8	Dosagem de citocinas por sistema multiplex.....	34
3.9	Obtenção de soro.....	35
3.10	Quantificação de IgM anti-glicolipídio fenólico I (PGL-I).....	35
3.11	Análise dos dados.....	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Dados epidemiológicos dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares incluídos no estudo.....	37
4.2	Detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I no soro de contatos domiciliares de pacientes multibacilares antes e ao longo do tratamento do caso índice.....	39
4.3	Avaliação da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ respondedoras ao <i>M. leprae</i> e a peptídeos específicos do <i>M. leprae</i> em CMS de contatos domiciliares de pacientes multibacilares antes e ao longo do tratamento do caso índice.....	40
4.3.1	Sequência de análises utilizadas para identificação das subpopulações de linfócitos CD4 ⁺ CD69 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ virgens, de memória central e de memória efetora.....	40
4.3.2	Determinação das frequências de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ respondedoras ao <i>M. leprae</i> e a peptídeos específicos do <i>M. leprae</i> em CMS de contatos domiciliares de pacientes multibacilares.....	43
4.3.3	Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ virgens, de memória central e de memória efetora, respondedoras ao <i>M. leprae</i> e ao conjunto de peptídeos específicos do <i>M. leprae</i> em contatos domiciliares de pacientes multibacilares.....	45
4.3.4	Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ IFN- γ ⁺ ou IL-10 ⁺ em sangue periférico de contatos de pacientes multibacilares no início e durante o tratamento do caso índice.....	58
4.3.4.1	Sequência de análises realizada para identificação da população de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD4 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	58

4.4	Análise da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento 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>	62
4.5	Análise de subpopulações linfocitárias produtoras de IFN- γ ou IL-10 em lesão de pele de pacientes com hanseníase multibacilar.....	82
5	DISCUSSÃO	86
6	CONCLUSÕES	97
7	REFERÊNCIAS	99
8	ANEXOS	112

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
ECHP	Indivíduos sadios residentes de Bom Jardim-CE (área endêmica)
ECLP	Indivíduos sadios residentes de Meireles-CE (área de baixa endemicidade)
ECPOA	Indivíduos sadios residentes de Porto Alegre-RS (área não endêmica)
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	Contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares
HCPB	Contatos intradomiciliares de pacientes paucibacilares
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
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
µg	Micrograma
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MIP-1β	Proteína inflamatória de macrófago-1beta
mm	Milímetro
N	Normal
ND-O-BSA	natural dissacarídeo-octil-BSA
NIH/NIAID	Instituto Nacional de Saúde/Instituto nacional de alergia e doenças infecciosas
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
P38-92	Peptídeos 38-92
PARK	Gene que codifica a proteína parkina
PACRG	Gene coregulado com parkina
PB	Paucibacilar
PBS	Tampão fosfato salina
PBS/T	Tampão fosfato salina/ Tween
P.C.I	“Pool” de peptídeos reconhecidos por MHC-I
P.C.II	“Pool” de peptídeos reconhecidos por MHC-II
PDIM	Dimicocerosato ftiocerol
-PE	Ficoeritrina
PE/Cy7	Ficoeritrina Cianina 7
pg	Picograma
PGLs	Glicolipídeos fenólicos

PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
pH	Potencial de hidrogênio
PIMs	Monosídeos fosfatidilinositol
PL	Fosfolípídeos
PQT	Poliquimioterapia
SEB	Enteroxina 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- α	Fator de necrose tumoral alfa
Tregs	Células T reguladoras
T0	Início do tratamento do caso índice
T1	Durante o tratamento do caso índice
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.1. Taxa de prevalência da hanseníase por 10 mil habitantes em janeiro de 2012.....	3
Figura 1.2. Coeficiente geral de detecção de hanseníase.....	4
Figura 1.3. Cultivo de <i>M.leprae</i> em pata de camundongo.....	6
Figura 1.4. Modelo esquemático da parede celular do <i>M. leprae</i>	8
Figura 1.5. Formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966).....	9
Figura 1.6. Tipos de lesões de pele observadas em pacientes com hanseníase.....	10
Figura 1.7. Ciclo de transmissão do <i>M. leprae</i>	15
Figura 1.8. Análise histopatológica de lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	16
Figura 1.9. Modelo da modulação negativa da produção de IFN- γ pelo <i>M. leprae</i> durante infecção assintomática e doença ativa.....	27
Figura 4.1. Presença de anticorpos IgM anti PGL-1.....	39
Figura 4.2. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação de linfócitos CD4 ⁺ virgens, de memória central e de memória efetora.....	41
Figura 4.3. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação de linfócitos e CD8 ⁺ virgens, de memória central e de memória efetora.....	42
Figura 4.4. Frequências de linfócitos T respondedores ao SEB.....	45
Figura 4.5. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ respondedores ao <i>M. leprae</i> em contatos de pacientes multibacilares.....	47
Figura 4.6. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ respondedores ao P.C.I em contatos de pacientes multibacilares.....	49
Figura 4.7. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ respondedores ao P.C.II em contatos de pacientes multibacilares.....	50
Figura 4.8. Frequência de linfócitos T CD8 ⁺ respondedores ao <i>M. leprae</i> em contatos de pacientes multibacilares.....	51
Figura 4.9. Frequência de linfócitos T CD8 ⁺ respondedores ao P.C.I em contatos de pacientes multibacilares.....	52
Figura 4.10. Frequência de linfócitos T CD8 ⁺ respondedores ao P.C.II em contatos de pacientes multibacilares.....	53

Figura 4.11. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação de linfócitos CD4 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD4 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	59
Figura 4.12. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação de linfócitos CD8 ⁺ CD69 ⁺ IFN- γ ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ IL-10 ⁺	60
Figura 4.13. Frequências de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ CD69 ⁺ produtores de IFN- γ ou IL-10 nos contatos de pacientes multibacilares.....	61
Figura 4.14. Análise da produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	63
Figura 4.15. Análise da produção de TNF- α por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	64
Figura 4.16. Análise da produção de IL-1 β por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	65
Figura 4.17. Análise da produção de IL-2 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	66
Figura 4.18. Análise da produção de IL-6 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	67
Figura 4.19. Análise da produção de IL-12 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	68
Figura 4.20. Análise da produção de IL-4 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	69
Figura 4.21. Análise da produção de IL-5 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	70
Figura 4.22. Análise da produção de IL-10 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	71
Figura 4.23. Análise da produção de IL-13 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	72
Figura 4.24. Análise da produção de IL-7 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	73
Figura 4.25. Análise da produção de IL-17 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	74
Figura 4.26. Análise da produção de MCP-1 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	75

Figura 4.27. Análise da produção de MIP-1 β por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	76
Figura 4.28. Análise da produção de G-CSF por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	77
Figura 4.29. Análise da produção de GM-CSF por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares.....	78
Figura 4.30. Histopatologia da lesão de pele de paciente com hanseníase multibacilar.....	83
Figura 4.31. Análise de subpopulações linfocitárias produtoras de IFN- γ ou IL-10 em lesão de pele de pacientes com hanseníase multibacilar.....	84

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 3.1. Peptídeos específicos sintéticos derivados da sequência do genoma do <i>M. leprae</i>	31
Tabela 4.1. Dados epidemiológicos dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares incluídos no estudo.....	38
Tabela 4.2. Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares no início e ao longo do tratamento do caso índice.....	44
Tabela 4.3. Visão global do aumento das frequências de linfócitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao <i>M. leprae</i> , P.C.I e P.C.II em T1 de cada contato domiciliar incluído no estudo.....	56
Tabela 4.4. Visão global do aumento das frequências de linfócitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao <i>M. leprae</i> , P.C.I e P.C.II em T1 de cada contato domiciliar incluído no estudo.....	57
Tabela 4.5. Visão global do aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta ao <i>M. leprae</i> em T1 de cada contato domiciliar incluído no estudo.....	80
Tabela 4.6. Visão global do aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta ao P.C.I em T1 de cada contato domiciliar incluído no estudo.....	80
Tabela 4.7. Visão global do aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta ao P.C.II em T1 de cada contato domiciliar incluído no estudo.....	81

RESUMO

Os indivíduos com hanseníase multibacilar (MB) apresentam uma baixa capacidade de produzir IFN- γ em resposta ao *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da doença, e consequentemente, apresentam uma alta carga bacilar constituindo as principais fontes de disseminação e transmissão do bacilo. Por outro lado, contatos intradomiciliares destes doentes constituem o grupo de indivíduos com maior risco de adoecimento. O presente estudo tem 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 indivíduos com hanseníase MB, até hoje pouco esclarecidos. Para isto, avaliamos as frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora recém-ativados em resposta ao *M. leprae* ou conjuntos de peptídeos nãoâmeros (restritos a MHC de classe I, P.C.I) e pentadecâmeros (restritos a MHC de classe II, P.C.II) específicos do *M. leprae* em células mononucleares de sangue periférico (CMS) dos contatos domiciliares no início (T0) e ao longo do tratamento do caso índice (T1). Em paralelo, os níveis de 16 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados por CMS destes contatos estimuladas *in vitro*, em T0 e T1, com os antígenos mencionados. Nove contatos foram avaliados, dos quais sete foram vacinados com BCG em T0. Na maioria dos contatos, independente da vacinação ou não com BCG, observou-se um aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ de memória efetora a pelo menos um dos antígenos utilizados em T1. Detectou-se, também, um aumento consistente de células T CD8⁺ de memória efetora respondedoras a P.C.I. Observou-se variações nas frequências de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-10 *M. leprae* específicas no sangue periférico dos contatos. Entretanto, com o tamanho atual da amostragem populacional não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre tempos avaliados. A vacinação com BCG gerou um perfil de resposta imune Th1 com aumento da secreção de IFN- γ em seis dos sete contatos vacinados. Observamos, ainda, um aumento significativo da produção de G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6 e MIP-1 β em resposta ao *M. leprae* ou a, pelo menos, um dos conjuntos de peptídeos *M. leprae*-específicos em T1. A partir dos dados obtidos, foi possível observar 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. Numa última etapa do trabalho, padronizamos um protocolo para isolamento de células provenientes de lesões de pele de pacientes MB. Nossos dados iniciais sugerem uma abundância de células T CD8⁺ nestas lesões, concordando com observações anteriores. 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*. Além disso, a caracterização funcional particularmente das células T CD8⁺ específicas para P.C.I seria de grande relevância para o entendimento da resposta imune protetora na hanseníase, com potencial aplicação no desenvolvimento de vacinas mais eficazes para o controle da doença.

ABSTRACT

Individuals with multibacillary leprosy (MB) have a low capacity to produce IFN- γ in response to *Mycobacterium leprae*, etiological agent of leprosy, and consequently, have a high bacterial load, being the main sources of dissemination and transmission of the bacillus. Household contacts (HC) of these patients constitute the group of individuals at highest risk for leprosy. The aim of the present study is to understand the mechanisms of cellular immune response downregulation by *M. leprae* in healthy individuals with high exposure to *M. leprae* and patients with MB leprosy, a phenomenon that remains poorly understood until today. In this work we evaluated the frequencies of recently activated naive, central memory and effector memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells, in response to *M. leprae* and a pool of *M. leprae*-specific peptide nonamers (MHC class I-restricted, P.C.I) and pentadecamers (MHC class II-restricted, P.C.II) in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HC at the beginning (T0) and during the treatment of the index case (T1). We also compared the levels of 16 cytokines, chemokines and growth factors secreted by PBMC of these contacts stimulated *in vitro* with the same antigens at T0 and T1. Nine contacts were evaluated, which seven were vaccinated with BCG at T0. Most of the HC, independently of BCG vaccination, showed increased frequency of CD4⁺ effector memory to at least one of the antigens used in T1. A consistent increase of CD8⁺ effector memory responsive to P.C.I was also detected. It was observed variations in the frequencies of CD4⁺ and/or CD8⁺ T cells producing IFN- γ or IL-10 *M. leprae*-specific by PBMC from HC. However, with the current size of the sample population was not observed statistically significant differences between the time points studied. The BCG vaccine generated a Th1 immune response profile with increased secretion of IFN- γ in six out of seven vaccinated contacts. We also have observed a significant increase in the production of inflammatory mediators, such as G-CSF, GM-CSF, MCP-1, IL-6 and MIP-1 β in response to *M. leprae* or at least one of the *M. leprae*-specific peptide pools at T1. It was observed in the our data that index case treatment and consequent elimination of the live *M. leprae* source from the environment, together with BCG vaccination contributed to the increase in *M. leprae*-specific cellular immune response in HC of MB patients. In the final step of this work, we standardized a protocol for isolation of cells from biopsies of skin lesions of MB patients. In agreement with previous observations, our initial data suggest an abundance of CD8⁺ T cells. A detailed analysis of the functional phenotype of the cells present in lepromatous lesions may contribute to the definition of cell populations involved in negative modulation of the immune response against *M. leprae*. The functional characterization, particularly of CD8⁺ T cells specific to P.C.I, would be of great relevance to understand the protective immune response in leprosy, with potential application in the development of more effective vaccines to control the disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* um patógeno intracelular obrigatório que infecta preferencialmente macrófagos e células de Schwann(1), causando incapacidades e deformações físicas. Historicamente a doença ficou conhecida como “lepra”, termo derivado do latim “Lepros” que significa escamoso. Os primeiros documentos que relatam a existência da hanseníase no Brasil são de 1696, onde o governador Artur de Sá e Menezes procurava dar assistência no Rio de Janeiro aos “miseros leprosos” já então em número apreciável e que eram lançados para o lado mais obscuro da sociedade. Como na época não existia tratamento, os doentes apresentavam lesões ulcerantes na pele, deformidades e perda das extremidades o que era também considerado uma marca de desonra relacionada ao pecado (2). O estado de São Paulo, no início da década de 30 do século XIX, adota o modelo de isolamento compulsório aos hansenianos. Em 1954, a Organização Mundial da Saúde (OMS) envia uma comissão ao Brasil, a qual recomendou o fim do isolamento compulsório, a exemplo de outros países (3). 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 residiria em torno do nome da doença (4). 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.

A hanseníase pode afetar indivíduos em todas as faixas etárias e em ambos os sexos e diversos fatores podem contribuir para a transmissão da doença. Um estudo desenvolvido entre populações expostas ao *M. leprae* demonstrou que o risco de desenvolver a hanseníase também está associado com a pouca escolaridade, condições precárias de habitação e condições sócio-econômicas (5)(6). Além disso, fatores genéticos também podem influenciar no processo de adoecimento e no curso clínico da hanseníase (7). Polimorfismos na região promotora para o gene da Linfotóxina-alfa (LTA) foram descrito como um fator genético de risco para o adoecimento (Alcais e

col., 2007). Mira e colaboradores identificaram polimorfismos em uma região promotora compartilhada por dois genes: *PARK2*, que codifica para uma E-3 ubiquitinina ligase denominada Parkin e *PACRG* estando associados a uma maior susceptibilidade para a doença. Esse estudo revelou uma nova via da imunidade dependente de ubiquitina na infecção com *M. leprae* (8). Outros estudos de polimorfismos em diversos genes como no receptor da vitamina D, TNF- α , IL-10, IFN- γ , genes do complexo HLA e receptores do tipo toll-1 (TLR-1) (9) também foram associados como fatores de risco para o desenvolvimento da hanseníase (10),(8),(11),(12), (13), (14), (11).

Em 1981, a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu a quimioterapia combinada com três drogas, conhecida como poliquimioterapia (PQT), com o objetivo de reduzir o tempo de tratamento e o aparecimento de formas resistentes do bacilo a uma única droga. A hanseníase tem cura e o tratamento com a PQT é altamente eficaz e gratuito.

1.2. Prevalência atual e distribuição geográfica

Embora a PQT tenha contribuído significativamente para a diminuição da prevalência da hanseníase (15), a hanseníase permanece até os dias atuais como um problema de saúde pública. Durante o ano de 2011 foram detectados 219.075 novos casos de hanseníase no mundo (16). Na **Figura 1.1** podemos observar o Brasil em destaque com 1-2 casos por 10 mil habitantes, assim como, Micronésia e Sudão do Sul com mais de 2 casos por 10 mil habitantes. Em 2011, o Brasil detectou 33.955 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 17,6/100 mil habitantes. Neste mesmo ano, foram registrados 2.420 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos e um coeficiente de detecção desse grupo etário de 5,2 por 100 mil habitantes, refletindo a precocidade de exposição ao agente etiológico da doença, evidenciando assim, a força de transmissão da doença e sua tendência (17). Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase no Brasil, algumas regiões demandam intensificação das ações para eliminação da doença, justificadas por um padrão de alta endemicidade (18).

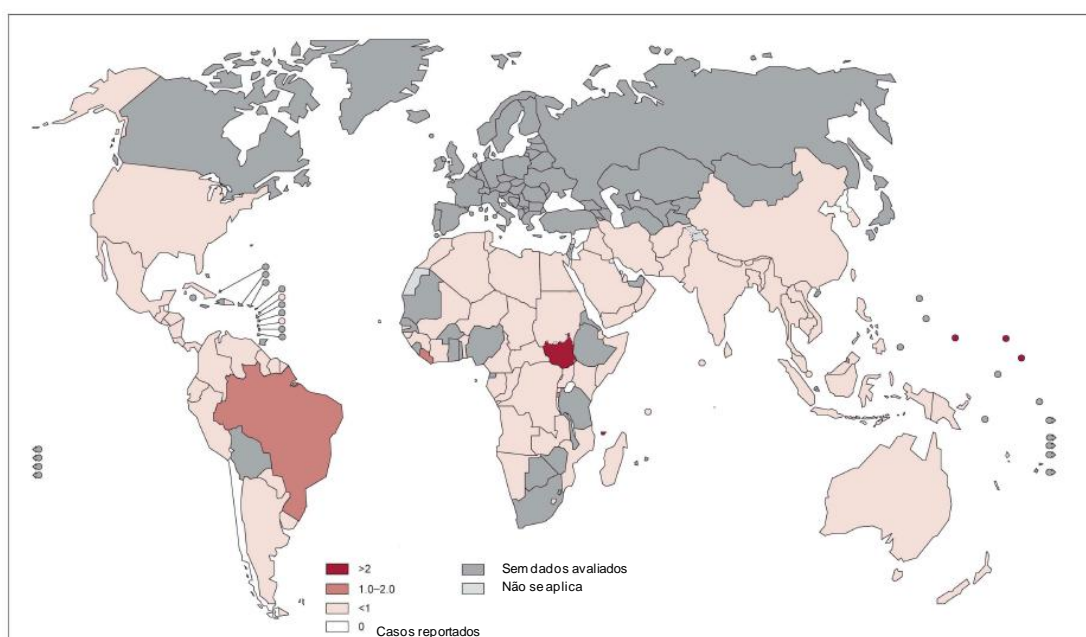


Figura 1.1. Taxa de prevalência da hanseníase em janeiro de 2012 por 10 mil habitantes. (WHO, 2013). Modificado a partir de http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2011.pdf.

Dos 33.955 novos casos registrados no Brasil em 2011, 6.865 novos casos foram detectados na região norte, 13.953 na região nordeste, 6.008 na região sudeste, 1.376 casos na região sul e 5.754 na região centro-oeste. Dos 6.008 novos casos detectados na

região sudeste, 1719 casos foram detectados no estado do Rio de Janeiro, onde 978 pacientes desenvolveram a forma multibacilar da hanseníase (19). De acordo com o coeficiente geral de detecção no ano de 2010, Tocantins, Pará, Maranhão e Piauí foram classificados como hiperendêmicos, com mais de 40 casos novos por 100 mil habitantes. Os estados do Rio Grande do Norte, Minas Gerais e São Paulo apresentaram média endemidade com 8,2, 8,0 e 4,3 casos novos por 100 mil habitantes respectivamente. O Rio Grande do Sul foi considerado de baixa endemidade por apresentar menos de dois casos novos por 100 mil habitantes. Os outros estados foram considerados com endemidade alta ou muito alta, como é o caso do Rio de Janeiro (**Figura 1.2. A**). Como podemos observar na **Figura 1.2. B** diversos municípios do Rio de Janeiro apresentam um coeficiente geral de detecção considerado muito alto para os parâmetros do Ministério da Saúde, sendo os municípios de Parati, Guapimirim e Cardoso Moreira considerados hiperendêmicos.

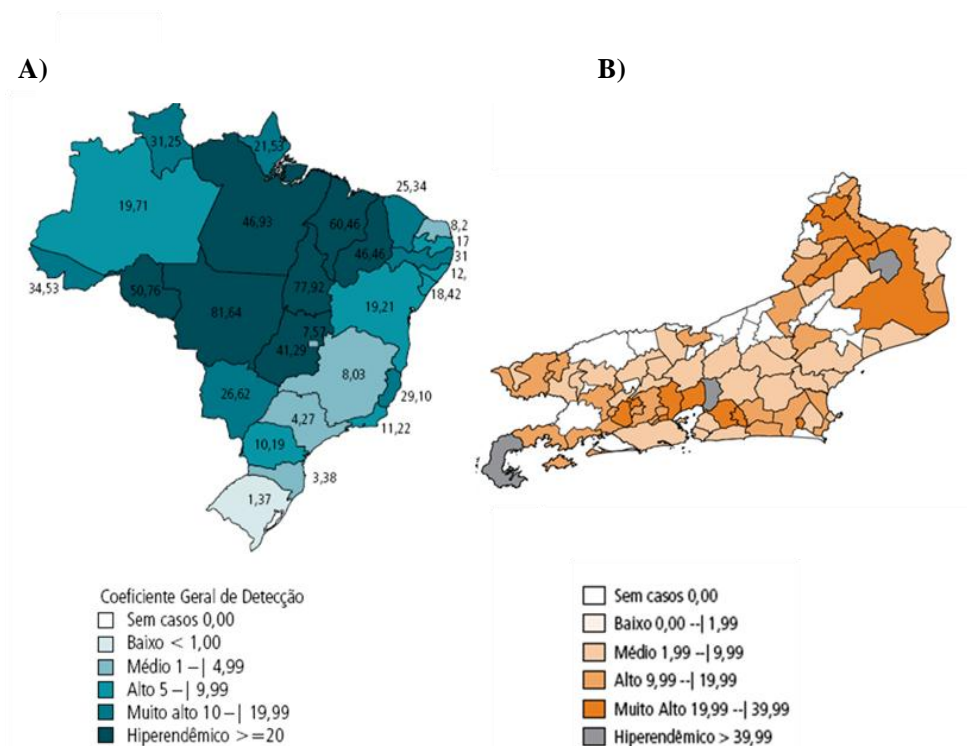


Figura 1.2. Coeficiente geral de detecção de hanseníase. A) Coeficiente geral de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes nas Unidades da Federação em 2010. Adaptado de Ignott & Paula, 2010 (20). **B)** Coeficiente geral de detecção por municípios do Rio de Janeiro em 2010 (adaptado de Secretaria de vigilância em saúde-Ministério da Saúde (21).

1.3. O *Mycobacterium leprae*

Também conhecido como bacilo de Hansen, o *Mycobacterium leprae* foi descoberto por Gerhard Henrick Armauer Hansen em 1873 na Noruega. É um patógeno intracelular obrigatório, multiplica-se lentamente in vivo, por divisão binária, não sendo possível cultivá-lo in vitro até os dias atuais (22). Infecta preferencialmente as células de Schwann do sistema nervoso periférico e fagócitos mononucleares (1).

O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e se caracteriza por não apresentar micélios ou apresentá-los de forma rudimentar. As micobactérias estão entre os mais importantes microorganismos patogênicos, causando doenças como a hanseníase e a tuberculose. O *M. leprae* apresenta forma de bastonete reto ou levemente curvado de 1-8 micrômetros de comprimento por 0,3 micrômetros de diâmetro, com extremidades arredondadas. São imóveis, não formando endósporos ou cápsulas e são considerados Gram-positivos embora não sejam bem corados por esse método (23). O *M. leprae* faz parte do grupo dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) não se descolorando por solventes orgânicos acidificados após coloração com corantes básicos, ou seja, cora-se pela fucsina e não se descora pelos ácidos e álcoois quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen.

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 a fim de se obter o bacilo viável para estudo. Em 1960, Shepard demonstrou que o coxim plantar de camundongos infectados com 10^3 a 10^4 bacilos podia sustentar uma multiplicação limitada com cerca de um milhão de bacilos (24). Com a descoberta do tatu de nove bandas, *Dasypus novencintus*, como hospedeiro suscetível à infecção pelo *M. leprae*, estudos bioquímicos e imunológicos sobre este patógeno foram realizados a partir dessa imensa e importante fonte de bacilo. O *M. leprae* pode ser facilmente ser recuperado dos linfonodos, baço e especialmente do fígado do tatu de nove bandas. O fígado deste animal é bastante substancial, pesando cerca de 150 gramas e é a fonte mais importante de *M. leprae*. Os níveis de infecção podem ser superiores a 10^{10} bacilos por grama de tecido de fígado, produzindo 150 mg ou mais a partir de um único fígado (25). Em 2001, Truman e Krahenbuhl demonstraram que embora seja possível obter um grande número de *M. leprae* de tatus infectados, a viabilidade de *M. leprae* proveniente de patas de camundongos é superior (26).

A inoculação de pequenas quantidades de *M. leprae*, usualmente entre 10^3 e 10^4 bacilos provenientes de biópsias humanas em coxim plantar de camundongos Balb/c, promove uma multiplicação limitada do *M. leprae* durante 9 a 12 meses (24). O crescimento do bacilo é usualmente limitado ao sítio de inoculação, embora possa ocorrer um pequeno espalhamento para outros tecidos superficiais (27). Em camundongos imunocompetentes, um inóculo de alguns milhares de bacilos crescem localizadamente alcançando a quantidades de aproximadamente um milhão de bacilos por pata. Essencialmente não há doença na pata desses camundongos, e as mudanças histopatológicas consistem em pequenos granulomas contendo poucos linfócitos e muito poucos bacilos, não ocorrendo disseminação da infecção nesses animais.

A supressão da resposta imune de camundongos por timectomia e irradiação, resulta no aumento da infecção nas patas e disseminação do bacilo para órgãos internos e tecidos periféricos, demonstrando que a habilidade de aumentar a infecção pela depleção da função das células T em um camundongo congenitamente atímico, ou nude, proporciona um hospedeiro adequado, naturalmente sensível à infecção pelo *M. leprae* (28). Nesses camundongos nude a multiplicação de *M. leprae* na pata parece ser disseminada alcançando 10^{10} ou mais bacilos. Histopatologicamente, o tecido da pata infectada apresenta macrófagos altamente infectados com *M. leprae* (**Figura 1.3**). Assim, o desenvolvimento desse modelo de camundongo permite a realização de culturas com um grande número de bacilos altamente viáveis para uso experimental (29), (26), (30).

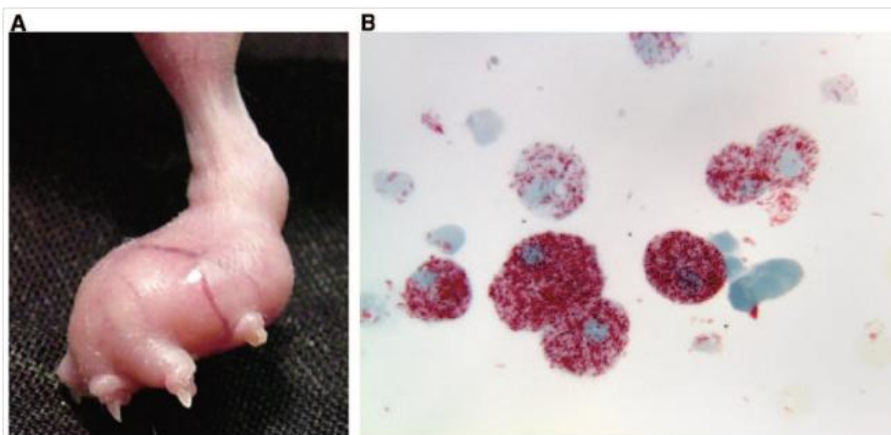


Figura 1.3. Cultivo de *M. leprae* em pata de camundongo. A) Pata edemaciada de camundongo nude 6 meses após infecção com 5×10^7 de *M. leprae*. B) Macrófagos altamente infectados provenientes da pata do camundongo (31). Aumento x1000.

A parede celular do *M. leprae* é considerada um componente chave na interação do bacilo com o ser humano, seu principal hospedeiro natural. A parede celular do *M. leprae* (**Fig 1.4**) contém peptidoglicana ligada à camada de galactana a qual se ligam cadeias ramificadas de arabinana, formando juntamente com a camada de peptidoglicana, uma zona eletro-densa em torno do *M. leprae*. Os ácidos micólicos são ligados nas extremidades das cadeias de arabinana formando o folheto interno de uma falsa bicamada lipídica. O folheto externo é composto por uma rica variedade de ácidos micólicos e ácidos micoserósicos assim como glicolípídeos fenólicos (PGLS), formando uma zona electrotransparente. Lipoglicanas como lipomanana e lipoarabinomanana, conhecidas por se ancorarem à membrana plasmática, também são encontradas na parede celular do *M. leprae* (31).

O glicolípídeo fenólico I (PGL-I) é um glicolípídeo antigênico muito abundante e encontrado unicamente no *M. leprae* (32), (33). A porção glicídica da molécula de PGL-1 é composta por um único trissacarídeo, sendo seu principal determinante antigênico o dissacarídeo terminal. Anticorpos monoclonais foram usados na análise desse determinante antigênico do PGL-1 e foi mostrado que a remoção do açúcar da parte terminal resultou na perda da ligação de muitos anticorpos, enquanto a remoção dos ácidos graxos da cadeia longa da molécula não teve efeito na ligação dos anticorpos (34). O PGL-1 em si ou em formas de neoglicoproteínas semi-sintéticas contendo o dissacarídeo terminal sintético ou o trissacarídeo inteiro quimicamente conjugado a albumina de soro bovino ou humano, tem sido de grande utilidade no diagnóstico sorológico, confirmando a forma multibacilar da doença. O PGL-1 também possui implicações no tropismo do *M. leprae* pelas células de Schwann através de ligações específicas a laminina e possui um importante papel na regulação negativa da resposta imune inflamatória inibindo a maturação e ativação de células dendríticas e facilitando a persistência do *M. leprae* no hospedeiro (35).

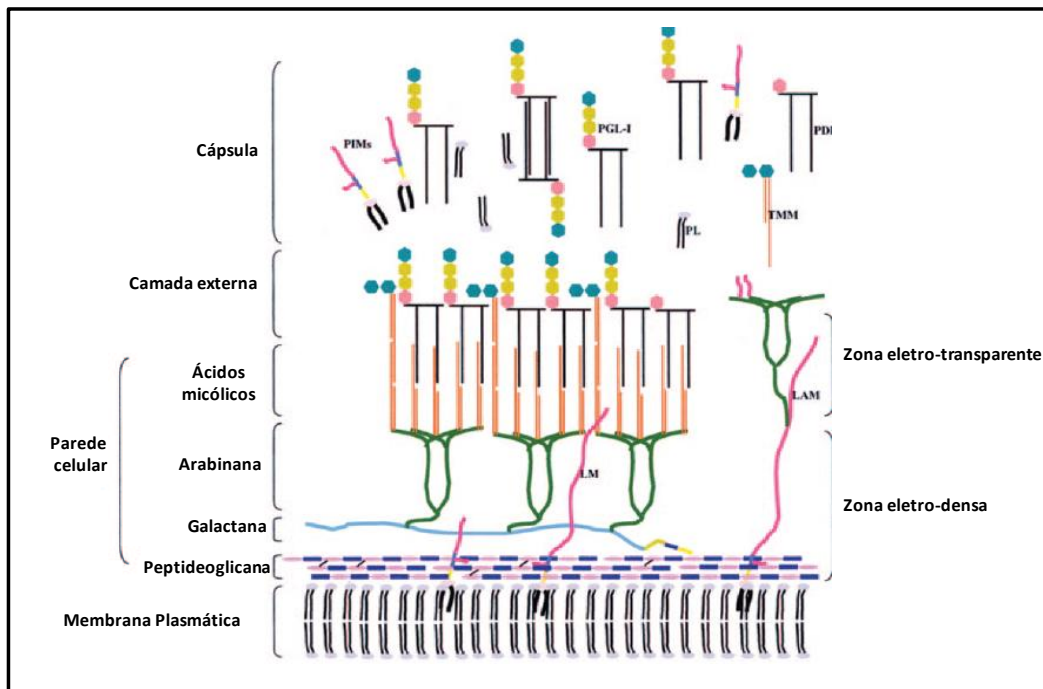


Figura 1.4. Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*. A membrana plasmática é envolvida por uma parede celular composta por peptidoglicana ligada covalentemente a arabinogalactana. Ácidos micólicos estão ligados aos resíduos terminais de arabinose. A camada mais externa apresenta: Glicolípido fenólico 1 (PGL-1), monomicolato trealose (TMM), ácidos micocerosóicos (PDIMs), monossídeos fosfatidilinositol, Fosfolípídeos(PL). Adaptado de Vissa e Brennan, 2001(36).

O sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* proveniente de lesões de pele de um paciente lepromatoso revelou uma redução evolutiva sofrida pelo *M. leprae* quando o seu genoma foi comparado ao do *M. tuberculosis*. Somente 49,5% do genoma do *M. leprae* possui genes funcionais, enquanto 27% são pseudogenes, ou seja, possui sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico similares a genes normais, mas não são capazes de codificar uma proteína e 23,5% do genoma são genes ainda não codificados. A deleção de genes no *M. leprae* eliminou muitas importantes vias de atividades metabólicas, cadeia respiratória anaeróbica, do sistema catabólico e seus circuitos regulatórios (37). A perda massiva de genes e a presença de mutação em diversas áreas metabólicas poderia explicar a dificuldade de se cultivar o *M. leprae in vitro* até os dias atuais (36).

1.4. Formas Clínicas da Hanseníase

A hanseníase manifesta-se através de um amplo espectro de formas clínicas, determinado pela intensidade da resposta imune celular do paciente ao *M. leprae*. A hanseníase dificilmente leva à morte, mas constitui a principal causa de neuropatia periférica e a lesão neural sendo observadas em todas as formas clínicas da doença. No pólo tuberculóide (TT) estão os doentes que desenvolvem resposta protetora ao bacilo, pois possuem uma imunidade mediada por células controlando a disseminação da doença e por isso apresentam um baixo índice baciloscópico. Já o polo lepromatoso, é representado por aqueles indivíduos que apresentam um alto índice baciloscópico devido à ineficiente resposta celular contra a bactéria resultando na doença lepromatosa disseminada (LL) e que apresentam uma alta carga bacilar. Entre esses pólos, há pacientes com quadros intermediários: "borderline" tuberculóide (BT), "borderline-borderline" (BB) e "borderline" virchowiano (BL), onde a resposta imune celular é maior ou menor de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide ou lepromatoso respectivamente (Ridley e Jopling, 1966) (**Figura 1.5**). A grande maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não adoecem. 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 (38)

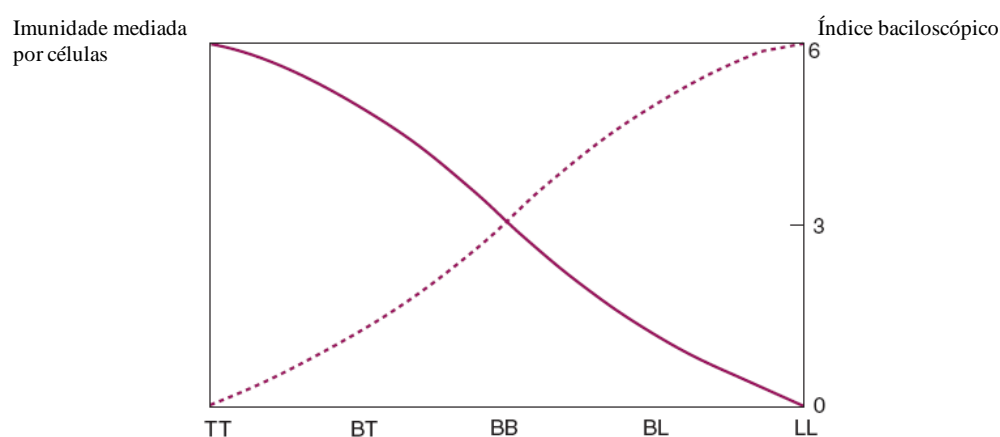


Figura 1.5. Formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966).

A linha tracejada indica o índice baciloscópico que como pode ser observado é bem elevado em pacientes do polo LL e zero no 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-Tuberculóide), BT (Borderline-Tuberculóide), BB (Borderline-Borderline), BL (Borderline-Lepromatoso), LL (Lepromatoso-Lepromatoso). Adaptado de Walker e Lockwood (2006). (41).

1.5. Diagnóstico

A hanseníase manifesta-se através de sinais e sintomas dermatológicos e neurológicos que podem levar à suspeição diagnóstica da doença. As alterações neurológicas, quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente, podem causar incapacidades físicas que podem evoluir para deformidades (39).

O diagnóstico da hanseníase é feito pelo exame clínico, onde, os profissionais de saúde realizam a anamnese para obtenção da história clínica e epidemiológica do indivíduo, identificam lesões de pele com alteração de sensibilidade, realizam avaliação neurológica identificando neurites, incapacidades e deformidades, além disso, identificam se o indivíduo já apresenta características do estado reacional da doença, acompanhado de exame baciloscópico em esfregaços de linfa e de exame histopatológico (39). Como ilustrado na **Figura 1.6.** as lesões mais comuns são: nódulos caracterizados por lesões sólidas mais palpáveis que visível (caroços internos), manchas pigmentares ou discrômicas, placas caracterizadas por lesões sólidas com elevação superficial e circunscrita e infiltração culminando em um aumento da espessura e consistência da pele (40).

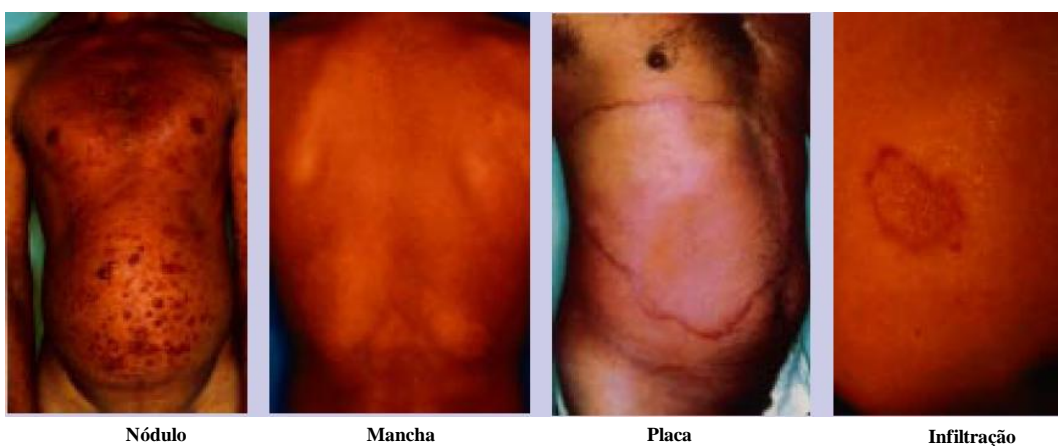


Figura 1.6. Tipos de lesões de pele observadas em pacientes com hanseníase. (39).

Apesar da falta de sensibilidade ser característica predominante das lesões de hanseníase, cerca de 30% das lesões não são anestésicas, o que pode dificultar ainda mais o diagnóstico da doença (41). A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu aos países endêmicos que adotassem uma simplificação do critério diagnóstico de acordo com o índice baciloscópico (IB) feito a partir de esfregaços de linfa e o número de lesões. De um modo geral, pacientes tuberculóides (TT, BT e 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 baciloscopia de esfregaço de linfa deve ser utilizada como exame complementar para a identificação de casos PB e MB de difícil classificação clínica. A baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independente do número de lesões. O resultado negativo não exclui o diagnóstico da doença (40).

Testes imunológicos têm sido utilizados como ferramenta complementar no diagnóstico da hanseníase. O teste de Mitsuda é utilizado na hanseníase para avaliar a habilidade do indivíduo em montar uma resposta granulomatosa após injeção intradérmica de bacilos mortos. A resposta imune é mensurada pelo tamanho em milímetros (mm) da induração após 28 dias. Pacientes BT e TT apresentam uma resposta positiva (induração > 5 mm), enquanto pacientes LL tipicamente não apresentam resposta. Outro teste imunológico é realizado utilizando o PGL-I devido a sua especificidade. Baseados no PGL-I nativo ou nos derivados semissintéticos, numerosos testes sorológicos têm sido desenvolvidos para detectar a presença de anticorpos IgM, IgG e IgA, principalmente pela técnica de ensaio imuno enzimático (ELISA). Os anticorpos encontrados são predominantemente da classe IgM e aumentam nas formas multibacilares (MB). Já a grande maioria dos pacientes paucibacilares (PB) são soronegativos, visto que a positividade sorológica está relacionada com a carga bacilar do indivíduo. O teste ML Flow é um método simples e rápido que se baseia na detecção de anticorpos específicos para PGL-I no sangue. Este teste permite assim distinguir entre pacientes MB e PB, permitindo a escolha do esquema terapêutico mais adequado ao paciente (42). A correlação entre esse teste e a técnica de ELISA mostrou alta sensibilidade na classificação de pacientes com a forma severa da doença (97,4%) e alta especificidade em comparação com grupos controle (90,2%) (43). A reação em cadeia da polimerase (PCR) que possui alta especificidade também é uma técnica aplicada ao diagnóstico laboratorial da hanseníase. Essa técnica

permite a identificação e amplificação de regiões específicas do *M. leprae* em amostras biológicas utilizando genes alvos do patógeno (44). (45)

1.6. Episódios reacionais na hanseníase

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 (45). Os episódios reacionais podem levar a piora do quadro clínico dos pacientes, aumentando o dano neural e contribuindo para o surgimento de incapacidades físicas.

A reação do tipo 1, também conhecida como reação reversa se desenvolve gradualmente e seu curso natural 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 motor. Em casos severos as lesões podem se tornar ulcerantes. A reação do tipo 2, também conhecida como eritema nodoso leproso, 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 pacientes em estado reacional apresentam nódulos eritematosos que podem se desenvolver 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. Iridociclite e episclerite, orquite, artrite e miosite também pode acompanhar essa reação. Em casos severos as lesões também podem ser tornar ulcerantes (31).

Em um estudo realizado por Nery e colaboradores, os autores observaram que 57% dos pacientes multibacilares incluídos no estudo evoluíram para algum dos quadros reacionais durante o tratamento poliquimioterápico. Os autores também observaram que 91% dos pacientes LL apresentaram eritema nodoso, enquanto 93% dos pacientes BB e 57% dos pacientes BL apresentaram reação reversa (46).

1.7. Tratamento

A PQT constitui a principal forma de controle da hanseníase, sendo indispensável para a interrupção da transmissão da doença e sua eliminação como um problema de saúde pública. A PQT desenvolvida pela OMS é constituída por rifampicina, dapsona e clofazimina com apresentação em quatro tipos de cartelas ou “blisters”, de acordo com a classificação operacional de cada caso. 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 (39).. Na tomada mensal de medicamentos é feita uma avaliação do paciente, para acompanhar a evolução de suas lesões de pele e comprometimento neural, verificando-se se há presença de neurites ou estados reacionais, sendo a regularidade do tratamento fundamental para a cura do paciente.

1.8. Transmissão

Acreditava-se que o ser humano era o único hospedeiro natural do *M. leprae*. Porém em 2011 Truman e colaboradores demonstraram por comparações genômicas que o *M. leprae* isolado de pacientes com hanseníase no Estado da Louisiana, nos Estados Unidos das Américas e os que infectam naturalmente os tatus desta região possuem sequências genômicas idênticas, sendo considerada uma única cepa responsável pela infecção nos dois hospedeiros. Os resultados desse trabalho apontam para os tatus como fonte de infecção, sugerindo que a hanseníase seria uma zoonose nesta região. Em 1999, Matsuoka e colaboradores relataram a presença de DNA de *M. leprae* em amostras de água de locais de alta prevalência para a hanseníase na Indonésia (47). Material genético do *M. leprae* também foi identificado em amostras de solo de áreas endêmicas na Índia (48)

Entretanto, acredita-se que a transmissão ocorra principalmente através do contato de indivíduo para indivíduo e que o *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 (49). Silva e colaboradores demonstraram a interação *in vitro* do *M. leprae* com células do epitélio alveolar e nasal de humanos. Os

autores observaram que o *M. leprae* é capaz de entrar em ambos os tipos celulares e que ambas são capazes de sustentar a sobrevivência da bactéria. Além disso, os autores demonstraram que a entrada de *M. leprae* no septo nasal de camundongos resultou na infecção de macrófagos e de células epiteliais no tecido pulmonar, mantendo a ideia de que as vias aéreas constituem uma importante rota de entrada para o *M. leprae* no corpo humano (50). Em 2012, Martins e colaboradores demonstraram que em áreas de alta prevalência, a maioria dos indivíduos sem histórico prévio de contato com a doença são infectados pelo *M. leprae* (51), corroborando com a ideia de que não é necessário um contato íntimo e prolongado com um paciente de hanseníase para a transmissão da doença (52). Esta observação também explica o porquê de uma boa proporção de casos incidentes surgir entre indivíduos sem histórico de contato prévio com um paciente de hanseníase (53), (54) e reforça a ideia bastante difundida na hanseníase de que o *M. leprae* é um patógeno de alta infectividade e baixa patogenicidade. Como pode ser observado na **Figura 1.7**, a principal fonte de transmissão são os pacientes multibacilares e, após a exposição ao *M. leprae*, menos de 10% dos indivíduos irão desenvolver a doença. Entretanto, indivíduos superexpostos ao bacilo, principalmente os que já apresentam sorologia positiva para o PGL-I e que possuem um maior risco de adoecer (55), mas que são assintomáticos, podem estar contribuindo para a disseminação do *M. leprae* no ambiente. A identificação e tratamento de indivíduos ainda num estágio inicial da doença é de grande importância para uma eficiente interrupção da cadeia de transmissão do *M. leprae*.

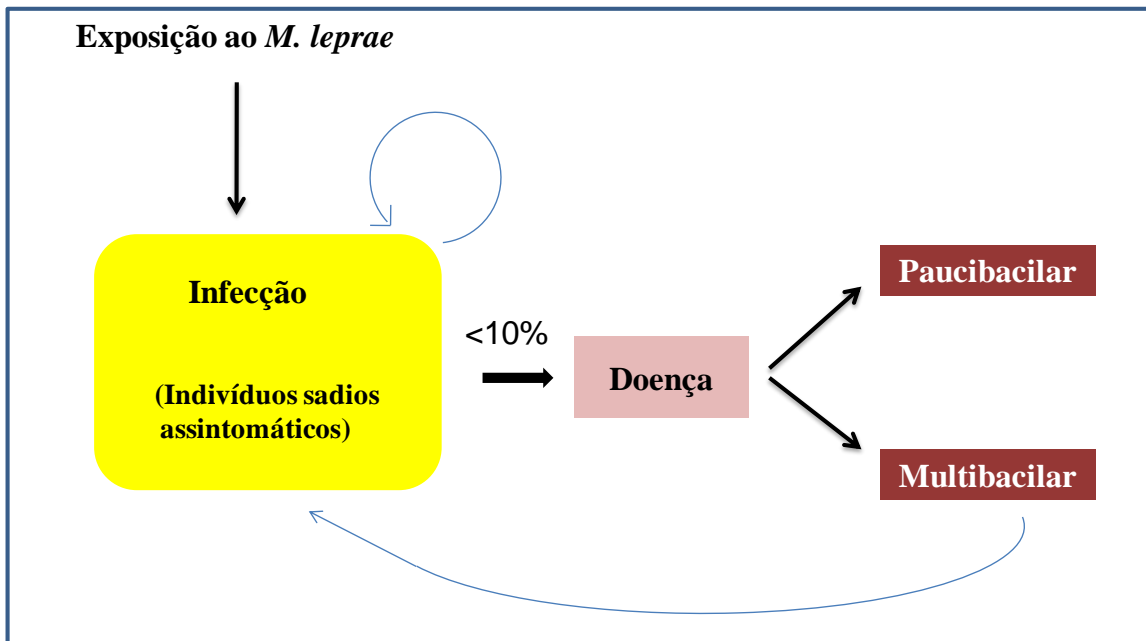


Figura 1.7. Ciclo de transmissão do *M. leprae*. Os pacientes multibacilares são considerados a principal fonte de eliminação de bacilo viável no ambiente. Após a exposição ao *M. leprae* menos de 10% dos indivíduos irão desenvolver a doença, no entanto os indivíduos assintomáticos, mas que já apresentam uma carga bacilar devido à superexposição ao *M. leprae* podem estar contribuindo para a disseminação do bacilo, participando da cadeia de transmissão. Adaptado de Visschedijk et al., 2000 (56).

1.9. Aspectos clínicos e imunológicos na hanseníase

Em 1966 Ridley e Jopling descreveram o microambiente das lesões de pele de pacientes com hanseníase caracterizando o pólo tuberculóide e o pólo lepromatoso. A análise histológica de fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com alto grau 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). No outro polo as análises revelaram a presença de macrófagos espumosos na derme contendo grande número de bacilos caracterizando os pacientes lepromatosos (LL). A maioria dos pacientes, entretanto, apresentou características entre as duas formas polares e foram subdivididos em borderlines lepromatosos (BL), borderlines-borderlines (BB) e borderlines tuberculóides (BT).

A **Figura 1.8** demonstra os diferentes perfis imunológicos encontrados na lesão de pele de um paciente tuberculóide e de um paciente lepromatoso. Na **Figura 1.8.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 dos nervos e a presença de células gigantes dentro do granuloma. Na **Figura 1.8. B** podemos observar um infiltrado inflamatório difuso, epiderme achatada, faixa ulna e macrófagos indiferenciados com aspectos característicos de uma lesão de paciente do polo lepromatoso.

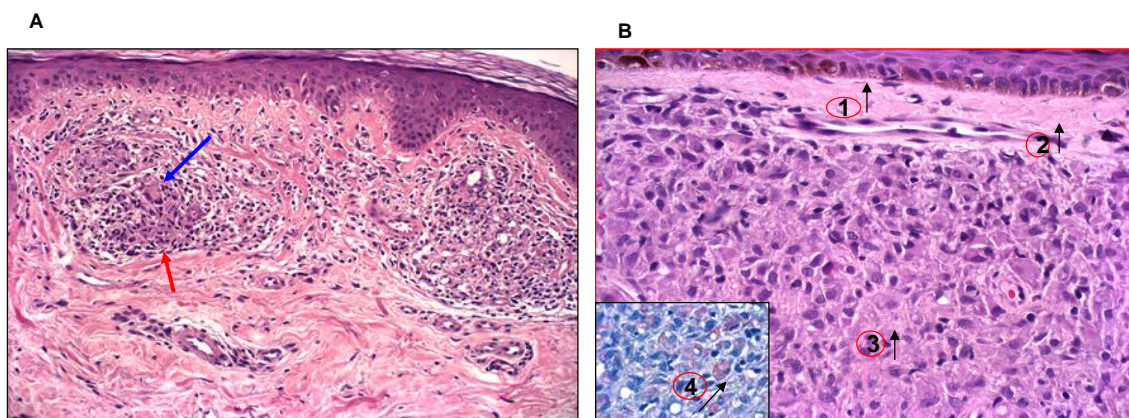


Figura 1.8. Análise histopatológica de fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com hanseníase. A) lesão de pele de um paciente tuberculóide (coloração por hematoxilina e eosina 200x). A seta azul indica a presença de células epitelióides ao redor dos vasos sanguíneos e dos feixes dos nervos, seta vermelha indica a presença de células gigante 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 ulna, 3- macrófagos indiferenciados, 4- macrófagos altamente infectados. Imagens gentilmente cedidas pela Dra. Alice Miranda do Laboratório de Hanseníase-Fiocruz.

Em 1983, Kaplan e colaboradores através da microscopia eletrônica descreveram detalhadamente a ultraestrutura das células encontradas nas lesões de pele de pacientes com as formas polares e intermediárias da hanseníase. As lesões de pele de pacientes LL são difusas, pouco organizadas com infiltrados celulares em torno das estruturas de pele ou com localização perivascular. Os macrófagos parasitados situam-se em uma matriz de colágeno dérmico, ocasionalmente e em matrizes paralelas. As células de Schwann apresentam inúmeros bacilos, nervos desmielinizados e pequenos vasos sanguíneos apresentando parede espessa com poucas células aderidas a sua superfície. Biópsia realizada em qualquer parte da derme revela a presença de

macrófagos espumosos com núcleo alongado, nucléolos proeminentes e bordas finas de heterocromatina.

Já os pacientes borderlines lepromatosos (BL) apresentam em suas lesões a derme contendo um grande número de células inflamatórias com um aumento da presença de linfócitos T, com ocasionais fagócitos mononucleares do tipo epitelióide. A maioria dos fagócitos mononucleares se encontram infectados. Ocasionalmente os macrófagos apresentam aparência alongada com pouco volume citoplasmático com lisossomos e mitocôndrias evidentes, sugerindo que estes macrófagos são recrutados recentemente, ao contrário dos macrófagos encontrados nas lesões de pele de pacientes LL.

Os pacientes classificados como BB representam uma forma intermediária da histologia com um pouco menos de células linfóides do que as encontradas nos infiltrados de pacientes tuberculóides (BT e TT) e uma incomum mistura de fagócitos mononucleares. De acordo com a observação dos autores (57), os linfócitos estavam frequentemente próximos aos macrófagos espumosos e aos mastócitos. Cerca de metade dos fagócitos mononucleares apresentava típica morfologia de célula epitelióide, com vacúolos, grânulos, retículo endoplasmático e mitocôndrias proeminentes.

Interessantemente, a análise de fragmentos de pele de pacientes TT e BT revelou a presença de muitas células e uma aparência de resposta granulomatosa com células epitelióides e células gigantes multinucleadas predominantes. Os fagócitos mononucleares estavam próximos aos linfócitos que eram predominantemente CD4⁺. Uma significativa proporção dessas células nas lesões apresentou mitocôndrias com aparente inchaço, as células epitelióides intactas eram alongadas com abundante conteúdo citoplasmático apresentando diversas e pequenas mitocôndrias. Os fagócitos desse polo aparentavam ser ativos. Organismos ou debris celulares não foram encontrados dentro dos fagócitos e nem nos sítios extracelulares (57).

Diversos trabalhos na literatura demonstraram a diferença entre a razão de linfócitos T CD4 e CD8 nos pólos da hanseníase (58), (59), (60), (61), (62), (63), (64), (65), (66), (67), indicando que em lesões de pele de pacientes do pólo tuberculóide predomina a população de linfócitos T CD4 com uma razão CD4:CD8 de 1,9:1 e nas lesões de pacientes do pólo lepromatoso a população é predominantemente de linfócitos T CD8⁺ com uma razão de CD4:CD8 de 0,6:1 sendo a razão CD4: CD8 nas lesões independente da razão encontrada no sangue dos pacientes.

Utilizando anticorpos monoclonais Modlin e colaboradores (59) fizeram a distinção das populações de células T encontradas em lesões de pacientes do polo lepromatoso e tuberculóide. Os autores demonstraram que células com o fenótipo de memória superaram em quatorze vezes a mais o número de células com fenótipo virgem encontrada nas lesões de pacientes TT e que células citotóxicas estavam em grande quantidade nas lesões de TT, sugerindo que essas células podem ter um papel na mediação da localização, ativação e maturação do macrófago levando a uma restrição ou eliminação do patógeno. Interessantemente, células T CD4⁺ são distribuídas por toda a lesão, enquanto as células CD8⁺ são encontradas apenas na periferia das lesões dos pacientes TT. Em contraste as lesões de pacientes TT, em lesões de pacientes LL as células CD8⁺ estão distribuídas por toda a lesão e as células CD4⁺ apresentam preferencialmente um fenótipo virgem enquanto as CD8⁺ observadas são predominantemente de fenótipo supressor. Deste modo, os autores propuseram que essas células CD8⁺ com fenótipo supressor estariam regulando negativamente a ativação dos macrófagos e suprimindo a resposta imune mediada por células nesses pacientes (59). Entretanto, os resultados das experiências realizadas por diferentes grupos não foram suficientes para a caracterização de um linfócito T supressor na hanseníase (68)

As diferenças entre o polo lepromatoso e polo tuberculóide em resposta ao *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 (69), além disso, clones de linfócitos T CD8 isolados de lesão de pacientes LL produzem grande quantidade de IL-4 (70). Os diferentes padrões de resposta imune entre pacientes tuberculóides e lepromatosos também foi investigado por Yamamura e colaboradores. Neste estudo os autores utilizaram o paradigma T helper 1(Th1) e T helper 2 (Th2) para explicar os diferentes perfis de resposta. Através da análise de expressão gênica de citocinas a partir de RNA mensageiro extraído de lesões de pacientes, os autores observaram que a expressão de IL-2, linfotóxina alfa e IFN- γ é aumentada em lesões de pacientes tuberculóides e a expressão de IL-4, IL-5 e IL-10 é predominante nas lesões de pacientes lepromatosos (71). Misra e colaboradores também demonstraram através da análise da expressão gênica e produção de citocinas em células mononucleares de sangue periférico que pacientes tuberculóides apresentam um padrão de resposta do tipo Th1, enquanto

pacientes lepromatosos apresentam um padrão de resposta do tipo Th2 (72). Apesar dos pacientes lepromatosos possuírem elevados níveis de anticorpos anti-PGL-1 contra proteínas do *M. leprae*, a resposta humoral não confere proteção por tratar-se de um patógeno intracelular (31).

1.10. Imunidade inata e adquirida na hanseníase

Durante a resposta imune inata, padrões moleculares associados ao patógeno presentes em muitos micro-organismos são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão expressos pelas células do sistema imune no sítio de exposição inicial. Uma classe dos receptores de reconhecimento padrão possui as lectinas do tipo C dependentes de cálcio que se ligam especificamente a moléculas de carboidrato presentes nos patógenos e facilitam a internalização para o processamento e apresentação de antígenos. Uma segunda categoria dos receptores de reconhecimento padrão é formada pelos receptores do tipo toll. A ativação destes receptores pode desencadear a liberação de produtos antimicrobianos, exercendo um ataque preliminar ao patógeno, assim como um aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias e de produção de citocinas ativando o sistema imune adaptativo. Uma terceira classe importante de receptores para o combate às micobactérias são os receptores do sistema complemento (31).

As células dendríticas possuem um papel na modulação da resposta imune inata ao *M. leprae* (73). A captura do *M. leprae* pelas células dendríticas e subsequente produção local de citocinas e quimiocinas pode regular a inflamação e manipular o curso da imunidade mediada por células em uma resposta do tipo Th1 ou Th2 ao *M. leprae*. Células dendríticas demonstram ser eficientes apresentadoras de antígenos do *M. leprae*. (74), (75). Fragmentos de pele obtidos por biópsia de pacientes com hanseníase revelou 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 (76). Interessantemente, estudos *in vitro* revelaram que lipoproteínas de *M. leprae* podem ativar monócitos e células dendríticas derivadas de monócitos através do receptor do tipo toll 2 (76). Sinsimer e col., demonstraram que o *M. leprae* possui um papel ativo no controle da liberação de citocinas dos monócitos através de sinais regulatórios positivos e negativos envolvendo PI3K, NF-kappaB, e caspase-1 (77).

Macrófagos são fagócitos altamente heterogêneos e podem ser classificados segundo sua polarização: M ϕ -1 ou M ϕ -2. Essa polarização ocorre em resposta a citocinas e/ou produtos microbianos. O perfil M ϕ -1 é classicamente induzido por citocinas como IFN- γ , TNF e GM-CSF ou ainda por estímulos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Por outro lado, tem sido demonstrado que IL-4 e IL-13, além de inibirem a ativação de M ϕ -1, são capazes de induzir a polarização para M ϕ -2 (78). Somente macrófagos polarizados para o perfil M ϕ -1 são capazes de secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios como IL-12, IL-23, IL-1 β , IL-18, IL-6 e TNF. Além disso, esse mesmo perfil é responsável por participar de respostas do tipo Th1. M ϕ -1 compartilham um perfil de mediadores pró-inflamatórios de células dendríticas maduras. Por outro lado, M ϕ -2 são associados com a supressão da resposta Th1 através da secreção de IL-10. Adicionalmente, M ϕ -2 secretam níveis consideráveis de IL-8, MCP-1, MIP-1 β e RANTES, o que sugere um potencial papel ativo dessas células em recrutar e interagir com outros tipos celulares e participar na regulação da imunidade celular. (79). As células T possuem um importante papel na resistência ao *M. leprae*, como evidenciado pela abundante multiplicação do bacilo em patas de camundongos timectomizados (27) e congenitamente atímicos (28). Pacientes LL não são imunocomprometidos e não são propensos a câncer ou a infecções oportunistas que afligem pessoas com imunodeficiência. A anergia imunológica associada aos pacientes LL é específica aos antígenos do *M. leprae* (80).

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 tem a capacidade de se expandir rapidamente após uma segunda exposição ao antígeno (81). Sieling e colaboradores (2006) demonstraram que a expressão do antígeno leucocitário humano (CLA) é regulada durante o curso da infecção pelo *M. leprae* sugerindo que a resposta das células T aos antígenos micobacterianos direciona as células T antígeno-específicas para o sítio da infecção (82).

Baseando-se nesses dados, diversos tipos celulares podem estar envolvidos na ausência de resposta seletiva ao *M. leprae* pelos pacientes LL. Um fenótipo celular interessante no contexto de modulação da resposta imune são as células T reguladoras (Tregs) – que são caracterizadas pela expressão da molécula CD25 e do fator de transcrição nuclear Foxp3. As Tregs CD4⁺CD25^{high} Foxp3⁺ são heterogêneas e consistem células distintas das Tregs de origem tímica (83), (84) e também das Tregs que podem ser induzidas nas populações de células virgens (85), (86), (87) ou células T de memória (88), (89), (90), (91) na periferia. Entretanto, essas subpopulações necessitam de diferentes níveis de antígeno para a sua ativação e podem apresentar uma dependência distinta de citocinas para a sua expansão e homeostasia (92). As células T regs podem mediar a supressão de células T CD4⁺, CD8⁺, linfócitos B e células do sistema imune inato por vários mecanismos diferentes(93), regulam a resposta imune por produção de citocinas anti-inflamatórias, privação de citocinas, lise de células efectoras, alterações metabólicas na célula alvo e inibição da função das células dendríticas (93), (94). Como as células Tregs são dependentes da IL-2 para sobrevivência e função de supressão e expressam altos níveis do receptor da IL-2 (CD25), elas competem com a célula efectora pela utilização desta citocina, resultando em apoptose dessas células por privação de IL-2 (95).

Stejic-Vukmanovic e colaboradores investigaram a cinética pela qual células T CD4⁺ Foxp3⁺ se acumulam e proliferam na pele durante uma resposta imune secundária *in vivo* em relação às células T de memória no mesmo sítio. Indivíduos previamente imunizados com bacille Calmette-Guérin (BCG) foram desafiados na pele com proteína derivada de tuberculina purificada (PPD). Os dados demonstraram que após o desafio com PPD, as células T CD4⁺ de memória e as CD4⁺Foxp3⁺ aumentaram em paralelo durante o curso da reação (88).

Palermo e colaboradores demonstraram que as T regs possuem um importante papel na interação parasita hospedeiro na hanseníase. Neste trabalho, os autores demonstraram que as Tregs estão presentes em maior proporção no sangue periférico e em lesões de pele de pacientes lepromatosos. Um aumento da expressão de IL-10 e CTLA-4 também foi observado nesses indivíduos, sugerindo que as Tregs contribuem para a multiplicação descontrolada do *M. leprae* nesses pacientes.

Dados da literatura também tem demonstrado o papel das células B produtoras de IL-10 conhecidas como células B reguladoras (Bregs) na manutenção do equilíbrio

necessário para a tolerância. Diversos modelos de doenças têm demonstrado que as células Bregs impedem a inflamação através da expansão de células T reguladoras (96). Além disso, um estudo recente demonstrou que as Bregs suprimem potencialmente a resposta das células T antígeno específicas e direcionam a resposta humoral para a produção de IgG4 que possui propriedades anti-inflamatórias (97).

1.11. Papel do IFN- γ e da IL-10 na modulação da resposta imune de indivíduos infectados pelo *M. leprae*.

Uma ampla variedade de células da resposta imune inata e adquirida podem produzir IFN- γ . Sua produção é controlada por citocinas secretadas pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente por IL-12 e IL-18. IL-12 promove a secreção de IFN- γ pelas células natural killer (NK) e a combinação de IL-12 e IL-18 aumenta a produção de IFN- γ por células NK e células T (98). Além disso, 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 IL-27 e participa na diferenciação de células T CD4⁺ virgens para o fenótipo Th1 (99). 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 inúmeros quimioatraentes e moléculas de adesão, influencia na troca de isotipo dos anticorpos produzidos pelas células B e também possui um papel regulador inibindo o desenvolvimento de células CD4⁺ do tipo Th 2 (100) IFN- γ é uma citocina chave na ponte entre a resposta imune inata e adquirida do sistema imune.

Os pacientes lepromatosos apresentam uma baixa capacidade de produzir IFN- γ em resposta ao *M. leprae* e, conseqüentemente, apresentam uma baixa resposta imune celular, possibilitando a lenta replicação e disseminação do bacilo (101), (102). O IFN- γ é considerado uma molécula chave na resposta protetora contra o *M. leprae* não só em pacientes como em contatos domiciliares (103), (104) e pode ser visto nas formas intermediárias da doença. Kaplan e colaboradores demonstraram que administração intradérmica a longo e curto prazo de IFN- γ resultou em um aumento do fluxo de células mononucleares e razão CD4/CD8 nas lesões de pele de pacientes, mas não reverteu a ausência de resposta dos leucócitos circulantes ao *M. leprae* (105). O efeito imunoestimulador do IFN- γ foi também observado em um estudo realizado por

Sampaio e colaboradores, onde os autores realizaram ensaios clínicos utilizando inoculação de IFN- γ em lesões de pacientes multibacilares e puderam observar um aumento na atividade microbicida dos macrófagos presentes nas lesões inoculadas (106). A geração de IFN- γ pelo hospedeiro é essencial para a imunidade protetora contra micobactérias. Indivíduos com deficiência na cadeia do receptor do IFN- γ são mais susceptíveis à infecção por micobactérias (107).

Em humanos a IL10 é produzida principalmente por monócitos, células T (principalmente as células T reguladoras e células com perfil Th2), células B, macrófagos e células dendríticas (108). Sua função primária é limitar a produção de citocinas e quimiocinas induzidas por ligantes de receptores do tipo toll (principalmente LPS) em macrófagos e células dendríticas. A IL-10 afeta diretamente a função dos macrófagos/monócitos através da regulação negativa da expressão da molécula de superfície MHC e das moléculas co-estimulatórias CD80/CD86 nessas células (109) Além disso, a IL-10 aumenta a sobrevivência das células B em humanos, bem como a sua proliferação, diferenciação e troca de isotipo (110). A IL-10 promove a proliferação de linfócitos B alterando o ambiente das células T helper, suprimindo a inflamação e a atividade dos macrófagos por inibir a produção de IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-18 e o fator tumoral de necrose alfa (TNF- α) e outras citocinas (111), (112). A IL-10 também está associada ao aumento da expressão de IDO e CD163 no macrófago de pacientes lepromatosos, em um sistema que favorece o bacilo (mecanismo de escape). (113).

Anderson e colaboradores demonstraram que células CD4⁺CD25-Foxp3- do perfil T helper 1 são a principal fonte de IL10 que suprime a resposta imune na leishmaniose cutânea crônica (114). Na infecção por *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular, células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e IL-10 parecem ter um papel central na regulação do sistema imune, resolução da infecção e, finalmente na sobrevivência do hospedeiro onde a principal fonte de IL-10 era proveniente de células Th1. Neste modelo de infecção, células Th1 específicas para *Toxoplasma gondii* passaram a expressar IL-10 após restimulação *in vitro* e após um tempo prolongado de cultura as células retornaram ao fenótipo anterior passando a não produzir mais esta citocina, sugerindo que a expressão de IL-10 por uma célula Th1 é induzida em resposta à infecção do hospedeiro (115). Estes dados indicam um papel regulador importante da IL-10 sobre a função efetora promovida pelo IFN- γ e esta condição poderia estar

contribuindo para a supressão da resposta imune patógeno-específica observada em indivíduos infectados pelo *M. leprae*.

1.12. Contatos de pacientes com hanseníase multibacilar e seu risco de adoecimento

A identificação de indivíduos com risco de desenvolver a hanseníase e seu diagnóstico precoce é crucial para o controle efetivo da doença. As principais características que facilitam o surgimento da doença entre indivíduos saudáveis são a consanguinidade e proximidade com um paciente de hanseníase e a carga bacilar deste paciente, pois a exposição frequente e prolongada ao *M. leprae* é o maior determinante para o adoecimento (6). 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 quando comparados a indivíduos sadios não expostos ao *M. leprae* (116). Em 1991, Sampaio e colaboradores demonstraram que a perda de resposta imune ao *M. leprae* entre pessoas expostas pode ser preditivo de susceptibilidade (103).

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 intra-dermica com Bacilo de Calmett Guérin (BCG) nos contatos de pacientes que são considerados o grupo com maior risco de desenvolver a doença (39). Em 2004 Cunha e colaboradores demonstraram 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 riscos (contatos), a vacinação com BCG conferiu cerca de 50% de proteção, sendo esta proteção aumentada em 25% com a repetição da vacina (117). Sarno e colaboradores também demonstraram que vacinação e a revacinação com BCG possui um papel protetor entre os contatos intradomiciliares. Entretanto, as principais conclusões do estudo apontam para uma necessidade urgente de estratégias adicionais de controle da hanseníase em áreas com alta incidência da doença (118). 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 o contato seja

vacinado com mais uma dose e se o contato apresentar duas cicatrizes de BCG, nenhuma dose é prescrita (119). Estudos têm demonstrado que uma vez tendo recebido a vacinação com BCG (a primeira ou a segunda dose) e o caso-índice é tratado, o risco de se contrair a hanseníase diminui (120).

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 interromper a cadeia de transmissão ajudando a prevenir as incapacidades decorrentes de doença não tratada. (121). Hacker e colaboradores 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 bacterianos iniciais e finais menores e uma menor prevalência de reação à doença. 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 (122). Através de análise de dados multinível que permitiu a observação dos efeitos das variáveis no grupo dos pacientes e dos contatos simultaneamente, Sales e colaboradores 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 (6). O maior risco de adoecimento entre os indivíduos que possuem uma relação muito próxima com o caso índice também foi relatado por outros autores (123). 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% (6).

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 bacteriológico, independentemente da resposta sorológica, devem ser monitorizados. Estes contatos podem ser considerados como um grupo alvo para a quimioprofilaxia (120).

Martins e colaboradores utilizaram peptídeos *M. leprae* específicos como ferramenta para a definição da magnitude de transmissão do *M. leprae* em áreas endêmicas para a hanseníase. Nesse estudo os autores avaliaram a produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico de indivíduos com diferentes históricos de exposição ao *M. leprae* estimuladas com *M. leprae* sonicado e com peptídeos *M. leprae* específicos. Uma correlação entre os grupos de indivíduos saudáveis em relação à produção de IFN- γ e o grau de exposição ao *M. leprae* demonstra que em áreas de alta prevalência, a exposição ao *M. leprae* é independente de um histórico de contato prévio com um paciente de hanseníase, 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 comparados aos observados nos contatos de pacientes com hanseníase. Como pode ser observado na **Figura 1.9**, 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 ao *M. leprae*, e diminuem mais ainda nos pacientes com hanseníase. A relativa baixa de resposta dos contatos de pacientes com hanseníase multibacilar em comparação com os contatos de hanseníase paucibacilar sugere que a evolução da infecção latente para doença ativa está intimamente relacionada com a progressiva redução na produção de IFN- γ patógeno específico e em paralelo com um aumento da carga bacilar nesses indivíduos (51) (**Figura 1.9**).

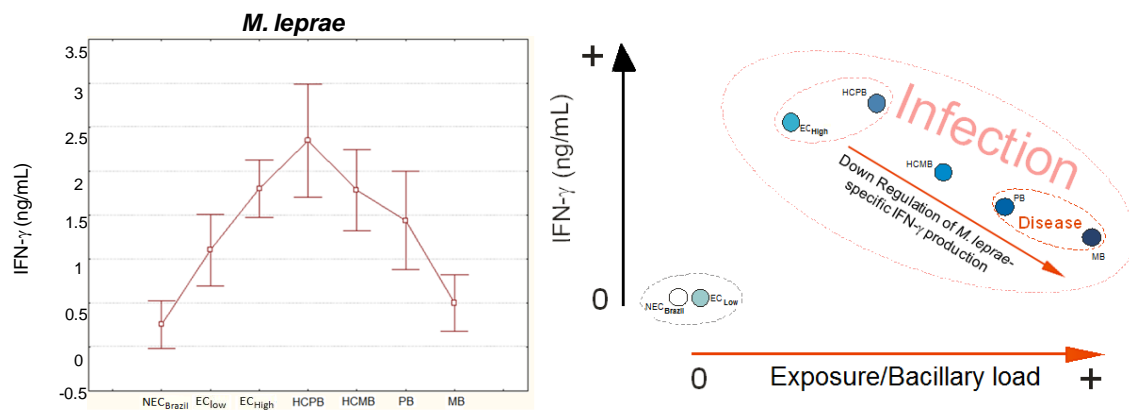


Figura 1.9. Modelo da modulação negativa da produção de IFN- γ pelo *M. leprae* durante infecção assintomática e doença ativa. NECBRAZIL= indivíduos de área não endêmica, EC LOW= controles de área endêmica (baixa prevalência), EC HIGH=(controles de área endêmica (média prevalência), HCPB=contatos domiciliares de pacientes paucibacilares, HCMB= Contatos domiciliares de pacientes multibacilares, PB= pacientes paucibacilares, MB=pacientes multibacilares Adaptado de Martins e colaboradores, 2012 (51).

Baseando-se nas informações mencionadas acima, contatos de pacientes multibacilares, devido a sua maior exposição ao *M. leprae* e maior risco de adoecimento, representam um grupo com grande importância para o estudo dos mecanismos envolvidos na modulação negativa da resposta imune celular antígeno específica na infecção pelo *M. leprae*. Entender os mecanismos envolvidos na modulação da resposta ao *M. leprae* durante a infecção latente têm relevância potencial para uso no desenvolvimento de um teste diagnóstico precoce ou vacina para a hanseníase.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Compreender os mecanismos de modulação negativa da resposta imune celular *M. leprae* específica em indivíduos saudáveis com alta exposição ao *M. leprae* e em indivíduos com hanseníase multibacilar.

Objetivos específicos:

- 1) Analisar, através de um estudo prospectivo, alterações na resposta imune celular *M. leprae* específica em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar no início e durante o tratamento do caso índice avaliando os seguintes parâmetros:
 - A frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora, respondedoras aos antígenos mencionados;
 - A frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora, respondedoras aos antígenos mencionados, produtoras de IFN- γ e/ou IL-10;
 - O perfil de citocinas e quimiocinas secretadas pelas CMS em resposta ao *M. leprae*, conjunto de peptídeos nonâmeros e pentadecâmeros específicos do *M. leprae*.
- 2) Comparar os níveis de anticorpos anti-PGL-I nos contatos domiciliares no início e ao longo do tratamento do caso índice;
- 3) Isolar e determinar a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ e/ou IL-10 presentes em lesões de pele de pacientes multibacilares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. 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. Todos os contatos passam pelos exames de rotina (dermatológico, neurológico e/ou avaliação fisioterápica) e fazem sorologia para PGL-1 (ML Dipstick). Os contatos com sorologia anti-PGL-1 negativa são 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, são realizados o teste de Mitsuda e o Laser Doppler, independente da suspeição da hanseníase. Todos os contatos recebem a vacina BCG-ID, conforme recomendação do Ministério da Saúde. Até o momento foram examinados em torno de 7.500 contatos dos pacientes registrados no serviço. Fragmentos de lesões de pele de pacientes com hanseníase não tratados foram coletadas no Ambulatório Souza Araújo – FIOCRUZ-RJ. Cada paciente foi avaliado através de exame clínico e dermatológico, do índice bacteriológico (IB) 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 para a presença de cicatriz da vacinação 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). Para a proteção e bem estar dos indivíduos incluídos neste estudo, não foi divulgado o nome de nenhum dos participantes.

3.2 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 do *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 do *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 do *M. leprae*. Esses peptídeos foram previamente testados quanto a indução de IFN- γ em CMS de pacientes com hanseníase e seus contatos e controles de áreas endêmicas e não endêmicas para a hanseníase (124). A tabela 1 mostra os peptídeos utilizados e suas respectivas sequências de aminoácidos.

Tabela 3. 1. Peptídeos específicos sintéticos derivados da sequência do genoma do *M. leprae*.

	Peptídeos	Sequências
Conjunto de peptídeos apresentados via MHC de classe I (P.C.I)	p52	QLLGQTADV
	p61	LILGLLPAI
	p68	LLEEGVIVL
	p69	RLDGTTLEV
Conjunto de peptídeos apresentados via MHC de classe II (P.C.II)	p38	TRLLTVVVVKQRSKAF
	p51	AAALEQLLGQTADVA
	p56	FDEYRAMFALSAMD
	p59	MLILGLLPAILPACG
	p65	EAVLLRLDGTTLVE
	p67	SGRVTYLNPVGKWM
	p70	MQEYRGLTSHTPCCR
	p71	LDIYTTTLARDMAAIP
	p73	DAEWLKLTSGLRPR
	p85	NYEVSPIFARWPRNR
	p88	DDIWRTLASAVITGN
	p91	LATVQYDDRRRFTKE
p92	LQAYSNFLFGRTSAMQ	

3.3. 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.

3.4. Ensaio de estimulação *in vitro*

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 do *M. leprae* ($10 \mu\text{g/mL}$) e mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 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 CO_2 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.

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

Após o diagnóstico do paciente com a forma BL da hanseníase, 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 de dispase a 4 mg/mL e colagenase a $0,5 \text{ mg/mL}$ (Roche Applied Science, Indinópolis, IN, USA) e soro fetal bovino (SFB) 10% (Hyclone, UT, USA) em RPMI 1640 (método adaptado de Moura e col., 2007). Em seguida, a solução com os fragmentos da derme foram colocados em uma cubeta de teflon, e mantidos em estufa a 37°C com 5% de atmosfera de CO_2 “overnight”. Após esse período, as células foram lavadas com meio RPMI 1640 por três vezes utilizando a centrifugação por $500 \times g$ durante 10 minutos sob-refrigeração. Após as lavagens, as

células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e foram contadas por exclusão em azul de tripan. Em seguida foi realizada a análise de marcadores de superfície e citocinas intracelulares por citometria de fluxo (descrito no item 3.7).

3.6. Processamento de rotina e colorações de fragmentos de pele obtidos por biópsia

A biópsia de pele foi realizada sobre lesão típica (escolhida no exame clínico). O fragmento de pele obtido pela biópsia foi então fixado em formol tamponado a 10% e incluída em parafina, após desidratação e clarificação. Cortes seriados, cortados em micrótomo, com 5µm de espessura foram corados pelo método de Hematoxilina e Eosina, para avaliação geral das camadas de pele e pelo método de Wade para pesquisa de bacilos álcool-ácido-resistentes no infiltrado inflamatório, filetes nervosos e na parede vascular. As lâminas foram analisadas de forma descritiva em microscópio ótico e os aspectos considerados relevantes foram registrados em microfotografias.

3.7. Análise de marcadores de superfície e citocinas intracelulares por citometria de fluxo

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, 600G 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, 600G, 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 kit violeta para distinção de células mortas fixadas (Invitogen catálogo: 536847) 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 controle 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 a placa foi incubada durante 30 minutos a 4°C protegida da luz. Após esse período a placa foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado por duas. Em seguida, os poços foram ressuspensos com 200 µL de tampão de permeabilização-PERM2 (BD Biosciences) diluído 1 vez em água miliQ. A placa foi passada no vortex cuidadosamente durante 1 minuto e incubada a temperatura ambiente, protegida da luz durante 10 minutos. Após esse período, os poços foram lavados por mais duas vezes com 150 µL de PBS 0,1% de azida sódica e 0,1% de albumina de soro bovino (BSA). Em seguida as células foram marcadas com os anticorpos intracelulares IFN- γ -PE (Biolegend) e IL-10-APC (Biolegend) e seus respectivos controles de isotipo (biolegend) durante 30 minutos a 4°C e protegida da luz. Após esse período de incubação os poços foram lavados duas vezes com 150µL de PBS com 0,1% de azida, em seguida foram ressuspensos com 200 µL de paraformaldeído 1% e as células foram transferidas para tubos de citometria para posterior leitura em citômetro de fluxo FACSAria (BD Biosciences). As porcentagens das células com os fenótipos virgens, de memória central, de memória efetora, IFN- γ^+ e IL-10 $^+$ 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. As análises de citometria de Fluxo foram realizadas no programa Flowjo versão 7.5. Em anexo, são apresentadas as análises contendo o controle isotópico.

3.8. Dosagem de citocinas 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-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , G-CSF, GM-CSF,) e três quimiocinas (MCP-1, IL-8, MIP-1 β) foram avaliadas usando o kit (Bio-Plex Pro Human Cytokine 17-plex Assay, Bio-Rad, EUA) que contém 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).

3.9. Obtenção de soro

Amostras de sangue periférico dos indivíduos incluídos no estudo foram coletadas em tubos vacuntainer sem heparina, incubadas a temperatura ambiente e então processadas para obtenção do soro. Para tal, o sangue foi centrifugado a 900 *xg*, sem freio, sob-refrigeração durante 10 minutos. O soro obtido foi aliquoteado e estocado a -20°C para utilização em testes.

3.10. Quantificação de IgM anti-glicolipideo fenólico I (PGL-I)

Em uma microplaca de 96 poços com fundo chato foi feita a adsorção do D-BSA (antígeno), o qual estava a 0,25 µg/mL em cada poço (1:4000 partindo de estoque a 1mg/ml). Foram adicionados 50 µL/poço do antígeno previamente diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,5 , incubando-se a microplaca na geladeira por no mínimo 24 horas. Ao término da incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µL de tampão PBS-tween 20 a 0,3% (PBS/T) e então bloqueados com BSA 3% em TBS/T por 1 hora a 37°C. Os poços foram novamente lavados 3 vezes com 200 µL de TBS/T. Adicionou-se 50 µL de soro diluído 1:200 em BSA 1%., incubando-se a 37°C por 1 hora. Após nova lavagem dos poços com PBS/T, o conjugado anti-IgM (Sigma),

previamente diluído 5000 vezes (1:5000) em solução PBS-T com 1 % de BSA. Após incubação a 37°C por 1 hora, os poços foram lavados 4 vezes com PBS/T, adicionando-se 100 µL do substrato TMB (Sigma). A reação foi parada com 50 µL de ácido sulfúrico a 2,5 N e a intensidade da coloração determinada através de leitura a 450 nm em leitor de microplacas

3.11. Análise dos dados

Os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism 5 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.

4. RESULTADOS

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

Os contatos domiciliares 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 $9 \pm 2,8$ 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). Onde o padrão da resposta imune antígeno-específica destes indivíduos foi analisado nestes dois diferentes momentos (T0 e T1). Ao longo do estudo recrutamos dezessete contatos domiciliares, entretanto apenas nove destes (53%) retornaram no segundo momento estabelecido. O grupo de nove indivíduos recrutados nos dois diferentes tempos de exposição ao bacilo foi composto por dois homens e sete mulheres com idades entre 19 e 63 anos. Na **Tabela 4.1.** é possível observar o histórico de vacinação com a BCG e dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo, bem como algumas informações sobre o diagnóstico do caso índice.

Tabela 4.1. Dados epidemiológicos dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares incluídos no estudo.

Contatos domiciliares	Cicatriz de BCG em T0 / n° de cicatrizes	Vacinação com BCG em T0	Anticorpos IgM anti-PGL-I (D.O.)	Relação de parentesco com o caso índice	Tempo de convivência com o caso índice	Informações sobre o caso índice			Análise do fenótipo funcional dos linfócitos T	Análise da secreção de citocinas por CMS
						Forma clínica/ IB	T0	T1		
C1	sim / 1	Sim	Negativo (0,125)	1	46 anos	LL / 4,8	1 mês	12 meses	sim	sim
C2	sim / 1	Sim	Negativo (0,218)	2	6 anos	BL / 0,7	1 mês	14 meses	não	sim
C3	sim / 1	Sim	Positivo (0,409)	2	28 anos	LL / 4,7	2 meses	12 meses	não	sim
C4	não / 0	Sim	Negativo (0,169)	2	2 anos	BL / 2,5	1 mês	7 meses	sim	sim
C5	sim / 1	Sim	Positivo (0,675)	1	5 anos	BL / 3	2 meses	8 meses	sim	sim
C6	sim / 2	Não	Negativo (0,212)	1	19 anos	BL / 3,5	2 meses	8 meses	sim	sim
C7	não / 0	Sim	Positivo (0,306)	2	18 anos	BL / 3,5	2 meses	8 meses	sim	sim
C8	não / 0	Sim	Negativo (0,055)	2	38 anos	LL / 5	1 mês	7 meses	sim	sim
C9	sim / 2	Não	Negativo (0,141)	3	20 anos	LL / 5	1 mês	7 meses	sim*	sim

Cada contato domiciliar foi identificado com a letra C seguido de seu número.

Relação de parentesco com o caso índice: 1- Pai, mãe, filho e irmão; 2- Cônjuge; 3- enteado, cunhado, amigo.

LL, Lepromatoso Lepromatoso; **BL**, Borderline Lepromatoso; **IB**, índice baciloscópico. **CMS**, Células mononucleares sanguíneas.

T0 - meses após o início do tratamento do caso índice quando o contato domiciliar foi recrutado pela primeira vez; **T1**- meses após o início do tratamento do caso índice quando o contato domiciliar foi recrutado pela segunda vez.

* Não foi possível determinar as frequências das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora.

4.2. Detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I no soro de contatos domiciliares de pacientes multibacilares antes e após o tratamento do caso índice.

Na **Figura 4.1** podemos observar os níveis de anticorpos IgM anti PGL-I presentes no soro de contatos domiciliares de pacientes multibacilares nos tempos T0 e T1. Assumindo como ponto de corte de positividade 0,25, os contatos domiciliares 3, 5, e 7 apresentaram sorologia positiva para anticorpos IgM anti PGL-I em T0 e permaneceram positivos em T1 (**Figura 4.1 A**). Na **Figura 4.1. B** podemos acompanhar o comportamento em cada individuo dos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I nos dois diferentes tempos avaliados. No geral não houve diferença nas densidades ópticas (D.O.) entre T0 e T1, com exceção de um contato domiciliar que apresentou um leve aumento da D.O. em T1.

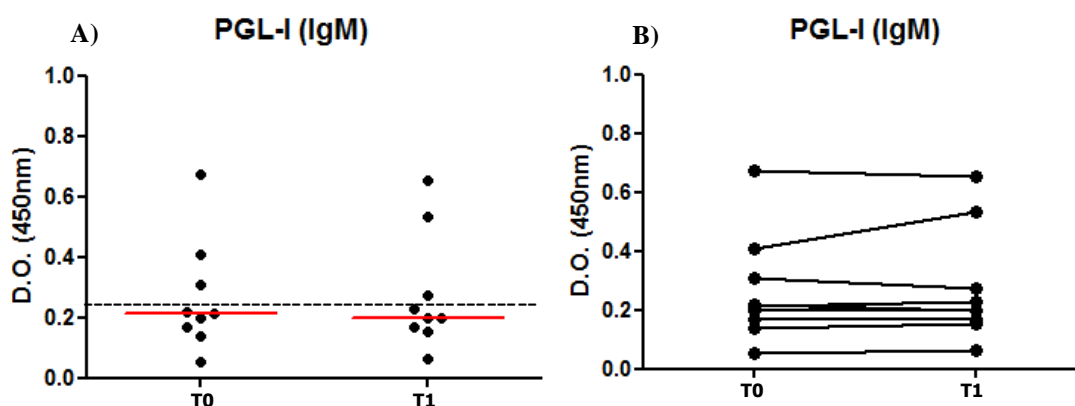


Figura 4.1. Presença de anticorpos IgM anti PGL-I. **A)** Detecção de anticorpos IgM no soro dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares (n = 9) incluídos no estudo ao início do tratamento do caso índice (T0), ao final do tratamento do caso índice (T1). Cada círculo representa um indivíduo testado. A mediana é representada pela linha vermelha e a linha tracejada representa o ponto de corte de positividade do teste. **B)** Comportamento individual da detecção de anticorpos IgM anti PGL-I em T0 e T1 dos contatos analisados nos dois diferentes tempos. Cada círculo representa a D.O. de um indivíduo testado em T0 ligada a sua respectiva D.O obtida em T1.

4.3. Avaliação da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ respondedoras ao *M. leprae* e a peptídeos específicos do *M. leprae* em CMS de contatos domiciliares de pacientes multibacilares antes e durante do tratamento do caso índice.

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

Para avaliar o impacto do tratamento do caso índice, bem como a vacinação com BCG na resposta imune protetora dos contatos domiciliares utilizamos a citometria de fluxo para analisar as frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, 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 4.2. A e 4.3 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 4.2. B e 4.3. B**). A região de linfócitos T CD4⁺ foi determinada utilizando o anticorpo específico para linfócitos T CD4⁺ juntamente com o parâmetro SSC (**Figura 4.2. C**). Já a região de linfócitos T CD8⁺ foi determinada utilizando anticorpos específicos anti-CD8 e anti-CD3 (**Figura 4.3. C**).

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 denominados: virgem (CD45RO⁻ CD62L⁺), memória central (CD45RO⁺ CD62L⁺) e memória efetora (CD45RO⁺ CD62L⁻). A partir dessas subpopulações, identificamos os linfócitos recém-ativados (CD69⁺). Nas **Figuras 4.2 e 4.3. D, E e F** podemos observar as frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora recém-ativados na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*, respectivamente.

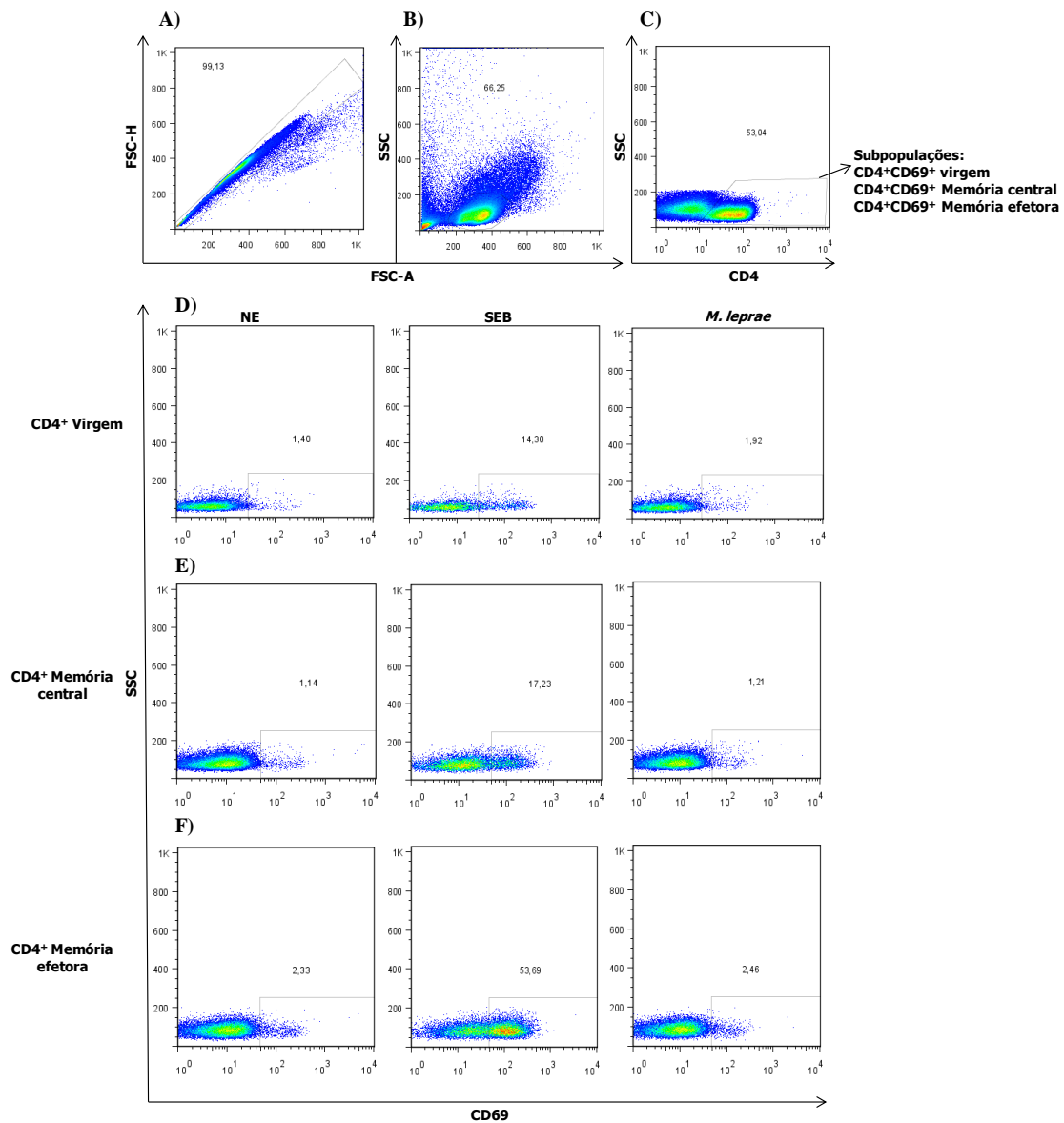


Figura 4.2. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ virgens, de memória central e de memória efetora. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSCH. **B)** Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **C)** Identificação de linfócitos T CD4⁺. **D)** Frequência de linfócitos TCD4⁺ virgens CD69⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **E)** Frequência de linfócitos TCD4⁺ memória central CD69⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. **F)** Frequência de linfócitos TCD4⁺ memória efetora CD69⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. T CD4⁺ virgens, CD4⁺ memória central, CD4⁺ memória efetora. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

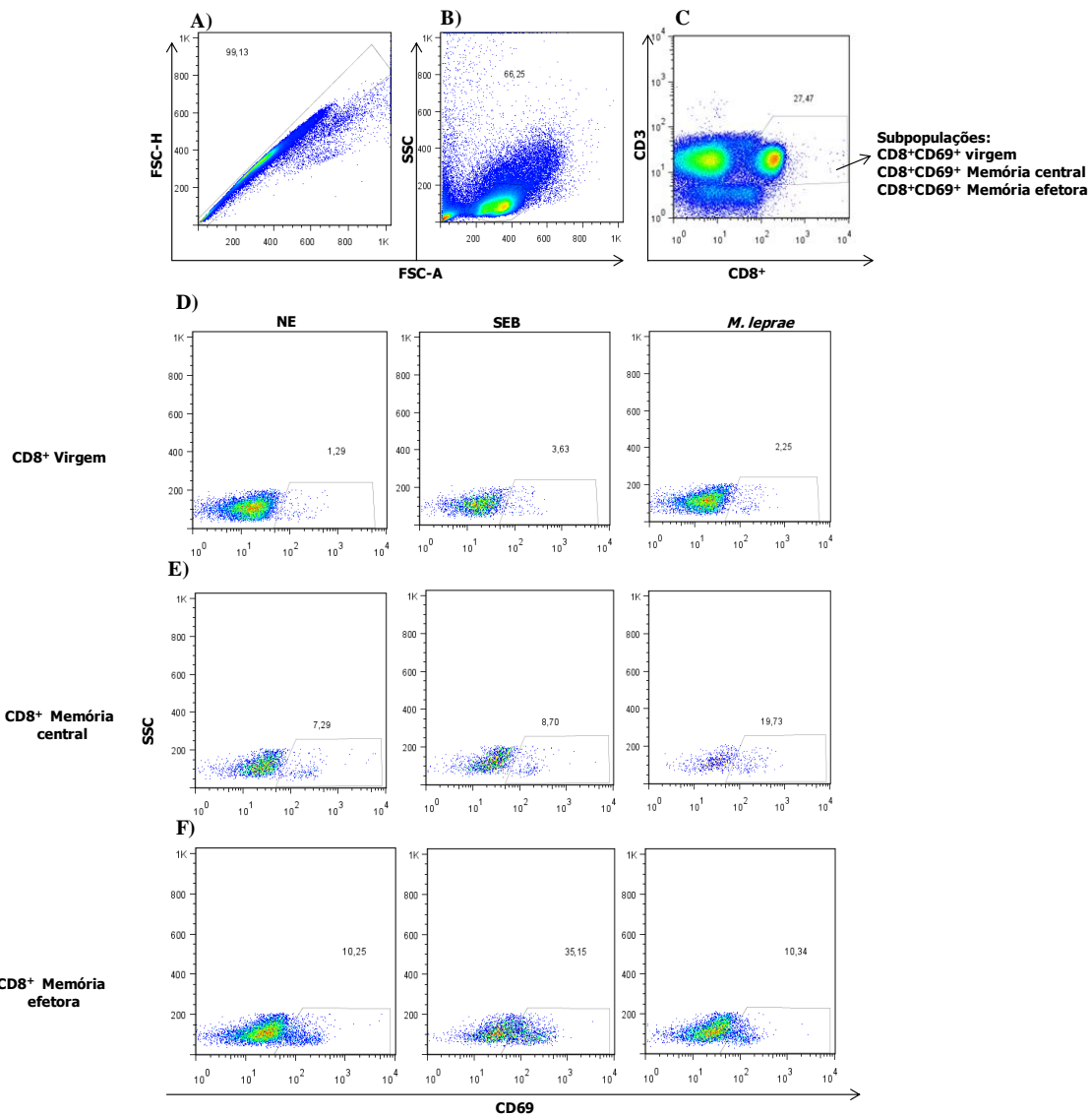


Figura 4.3. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSCH. **B)** Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **C)** Identificação de linfócitos T CD8⁺. **D)** Frequência de linfócitos TCD8⁺ virgens CD69⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **E)** Frequência de linfócitos TCD8⁺ memória central CD69⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. **F)** Frequência de linfócitos TCD8⁺ memória efetora CD69⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. **NE**, não estimulado; **SEB**, Enterotoxina B de *S. aureus*.

4.3.2. Determinação das frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ totais respondedoras ao *M. leprae* e a peptídeos específicos do *M. leprae* em CMS de contatos domiciliares de pacientes multibacilares.

As frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico dos contatos domiciliares C1, C4, C5, C6, C7, C8 e C9 nos tempos T0 e T1 foram analisadas para avaliar se a superexposição ao *M. leprae* e a vacinação com BCG influenciaria nas frequências das subpopulações de células observadas.

Inicialmente, avaliamos a frequência de células T CD4 e CD8 totais para cada estímulo utilizado. Na **Tabela 4.2** podemos observar uma heterogeneidade das frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ totais de cada indivíduo nos dois diferentes momentos analisados. Podemos observar também que a presença dos estímulos não alterou as frequência dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺.

Os contatos domiciliares de número C1, C5 e C7 apresentaram uma queda da frequência de linfócitos T CD4⁺ em T1. O contato de número C5 também apresentou uma baixa frequência de linfócitos CD8⁺ em T0, entretanto este contato apresenta uma recuperação dessas frequências em T1 e o contato domiciliar C9 apresentou frequências altas de linfócitos CD8⁺ em T0 e T1.

Tabela 4.2. Percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dos contatos domiciliares de pacientes multibacilares no início e ao final do tratamento do caso índice.

Contatos domiciliares	% CD4 ⁺ (NE)		% CD4 ⁺ (<i>M.leprae</i>)		% CD4 ⁺ (P.C.I)		% CD4 ⁺ (P.C.II)		% CD8 ⁺ (NE)		% CD8 ⁺ (<i>M.leprae</i>)		% CD8 ⁺ (P.C.I)		% CD8 ⁺ (P.C.II)	
	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1	T0	T1
C1	53	35	55,3	42,8	55,2	32,6	54,5	39,8	29	24,4	27,1	27,9	28,3	19,2	27,8	21,9
C4	52,8	54,7	55,0	55,4	53,5	55,6	46,3	57,6	13,8	17,2	23,8	17,2	14,4	18,7	10,0	17,7
C5	42,1	29,8	44,7	29,1	43,7	29,1	48,6	38,4	9,7	21,2	10,1	21,8	9,4	19,3	11,5	21,3
C6	32,2	31,2	32,6	38,7	33,7	35,4	42,4	33,7	17,8	20,6	20,6	22,7	19,8	22,7	20,0	22,8
C7	49,1	36	50,1	39,1	46,2	39,4	45,1	33,9	13,2	9,8	13,4	12,3	10,3	13,0	9,1	12,3
C8	36,4	38,1	37,2	35,9	35,7	38,1	39,5	38,0	20,3	26,1	20,3	28,6	21,9	25,7	23,6	25,9
C9	38,1	38,9	36,3	37,4	34,6	39,1	37,2	36,2	49,5	45,3	52,9	47,3	52,6	45,4	51,6	48,6

Cada contato domiciliar foi identificado com a letra C seguido de seu número.

P.C.I - Conjunto de peptídeos apresentados via MHC de classe I; **P.C.II** - Conjunto de peptídeos apresentados via MHC-II.

T0 - início do tratamento do caso índice; **T1** - final do tratamento do caso índice. NE – Não Estimulado.

As frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram calculadas a partir do número de linfócitos T totais. n=7.

4.3.3. Frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora, respondedoras ao *M. leprae* e ao conjunto de peptídeos específicos do *M. leprae* em contatos domiciliares de pacientes multibacilares.

Em seguida, avaliamos a capacidade destes indivíduos em responder a um estímulo policlonal utilizando enterotoxina B de *S. aureus* (SEB). As frequências de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ e CD8⁺ CD69⁺ com fenótipo virgem, de memória central e de memória efetora podem ser observadas nas **Figuras 4.4. A e B**, respectivamente. Como esperado, as maiores frequências de células respondedoras observadas foram as de memória efetora, mas sem diferença significativa nos tempos T0 e T1. As frequências de CD4⁺ CD69⁺ memória efetora foram maiores (**Figura 4.4. A**) quando comparadas com as frequências de CD8⁺ CD69⁺ memória efetora (**Figura 4.4. B**).

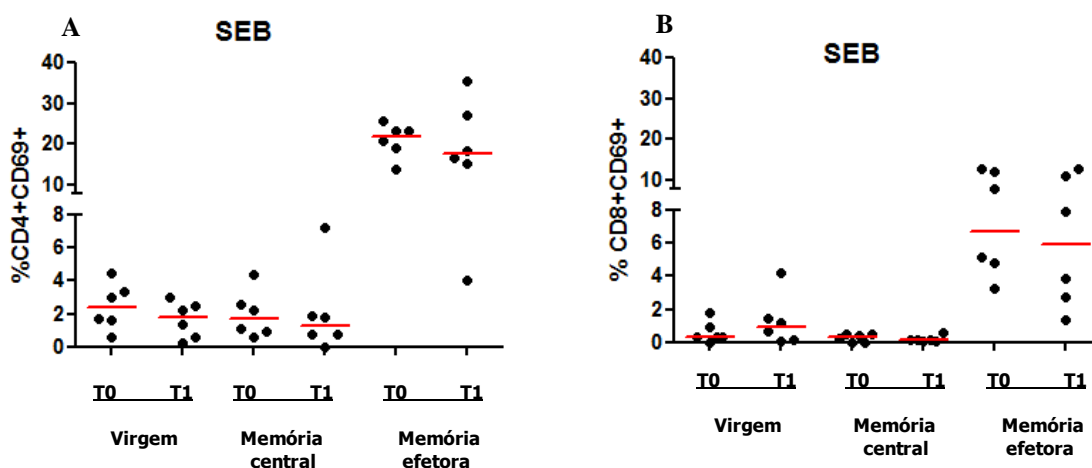


Figura 4.4. Frequências de linfócitos T respondedores ao SEB. A) Frequências de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao estímulo com SEB no início (T0) e ao final do tratamento do caso índice (T1). B) frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgem, de memória central e de memória efetora em resposta ao estímulo com SEB. Cada círculo preto representa um contato. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. n=6.

Finalmente, a frequência de células recém-ativadas pelo *M. leprae* ou pelos peptídeos sintéticos específicos do *M. leprae* [de 15 aminoácidos] e [de 9 aminoácidos] em CMS dos contatos domiciliares C1, C4, C5, C6, C7 e C8 nos dois diferentes momentos foi, então, avaliada. A partir dos dados obtidos, verificamos que a resposta dos contatos se deu de forma bastante heterogênea.

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 ao *M. leprae* poderia levar a uma diminuição da resposta *M. leprae* específica (51).

Inicialmente fomos observar o percentual de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ em resposta ao *M. leprae* nos três fenótipos avaliados: Células virgens, memória central e memória efetora. Na **Figura 4.5.A** embora não tenha sido estatisticamente significativo, é possível observar um aumento das frequências de linfócitos CD4⁺ CD69⁺ de memória central e de memória efetora ao final do tratamento do caso índice. A melhor forma encontrada para se identificar quais dos contatos apresentaram um aumento nas frequências das subpopulações de células avaliadas no estudo durante o tratamento do caso índice foi subtraindo o valor percentual das populações em T1 pelo percentual encontrado no T0 (T1-T0). Na **Figura 4.5. B** observamos a frequência individual de células CD4⁺ CD69⁺ virgens respondedoras ao *M. leprae* de cada contato. Dos seis contatos domiciliares avaliados individualmente nos dois diferentes tempos, dois apresentaram um aumento da frequência dos linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgens. Na **Figura 4.5. C** observamos que dos seis contatos domiciliares avaliados, quatro apresentaram um aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central em T1. Na **Figura 4.5. D** podemos observar que três contatos domiciliares apresentaram um aumento da população de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora em maior frequência em relação à população de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgem e de memória central. Os contatos domiciliares C4 e C8 apresentaram uma diminuição das frequências de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central e de memória efetora (**Figura 4.5. C e D**), respectivamente.

De forma bastante interessante, o contato domiciliar C6 que não foi vacinado com BCG em T0, teve a frequência dos três fenótipos aumentada em resposta ao *M. leprae* em T1. O contatos domiciliares C5 e C7, que são positivos para a presença de anticorpos IgM anti PGL-I no soro, apresentaram um aumento das frequências de

linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central em T1, mas apenas o C7 teve a frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora aumentada em T1.

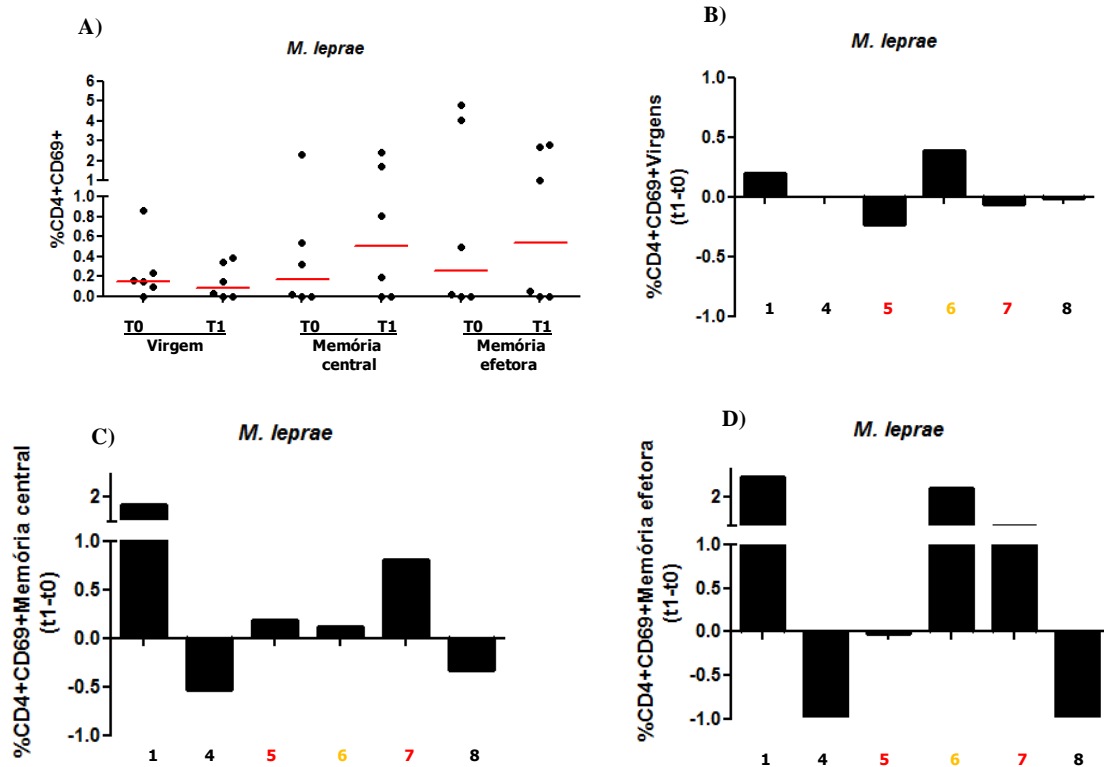


Figura 4.5. Frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ que responderam ao *M. leprae* de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ virgens, de memória central e de memória efetora no início e ao final do tratamento do caso índice. Cada círculo preto representa um contato. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. T0 indica início do tratamento do caso índice e T1 indica final do tratamento do caso índice. **B)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgem ao final do tratamento do caso índice. **C)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central ao final do tratamento do caso índice. **D)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora ao final do tratamento do caso índice. Cada barra preta representa um contato com seu respectivo número de identificação. Contatos PGL-I positivo estão identificados com a cor vermelha. Contato que não foi vacinado com BCG em T0 está identificado com a cor amarela. n = 6 por grupo.

Para avaliar a resposta imune específica ao *M. leprae*, neste estudo utilizamos um conjunto de peptídeos específicos do *M. leprae* com sequências de 9 aminoácidos que são apresentados via MHC de classe I (P.C.I) e um conjunto com sequências de 15 aminoácidos que são apresentados via MHC de classe II (P.C.II). Esses peptídeos foram testados anteriormente por Spencer e colaboradores, onde foi demonstrada a sua capacidade em induzir a produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hanseníase paucibacilar e contatos domiciliares. Além disso, os autores demonstraram que peptídeos de 9 aminoácidos ativaram preferencialmente linfócitos T CD8⁺ enquanto os peptídeos de 15 aminoácidos ativaram linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Por motivos operacionais optamos por utilizar os conjuntos de peptídeos e não os dezessete peptídeos individualmente.

As frequências de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora que responderam ao P.C.I dos contatos domiciliares C1, C4, C5, C6, C7 e C8 podem ser observadas na **Figura 4.6. A**. Observa-se um aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora em T1 em três indivíduos, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo. Com os gráficos representativos da recuperação da resposta imune ao P.C.I em T1 (T1-T0), podemos observar que apenas dois contatos domiciliares (C5 e C6) aumentaram a frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgem em T1 (**Figura 4.6.B**). Estes dois contatos que recuperaram as frequências de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgens também recuperaram a frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central e de memória efetora (**Figura 4.6. C e D**), respectivamente. O aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora em resposta ao P.C.I em T1 também foi observada no contato C8.

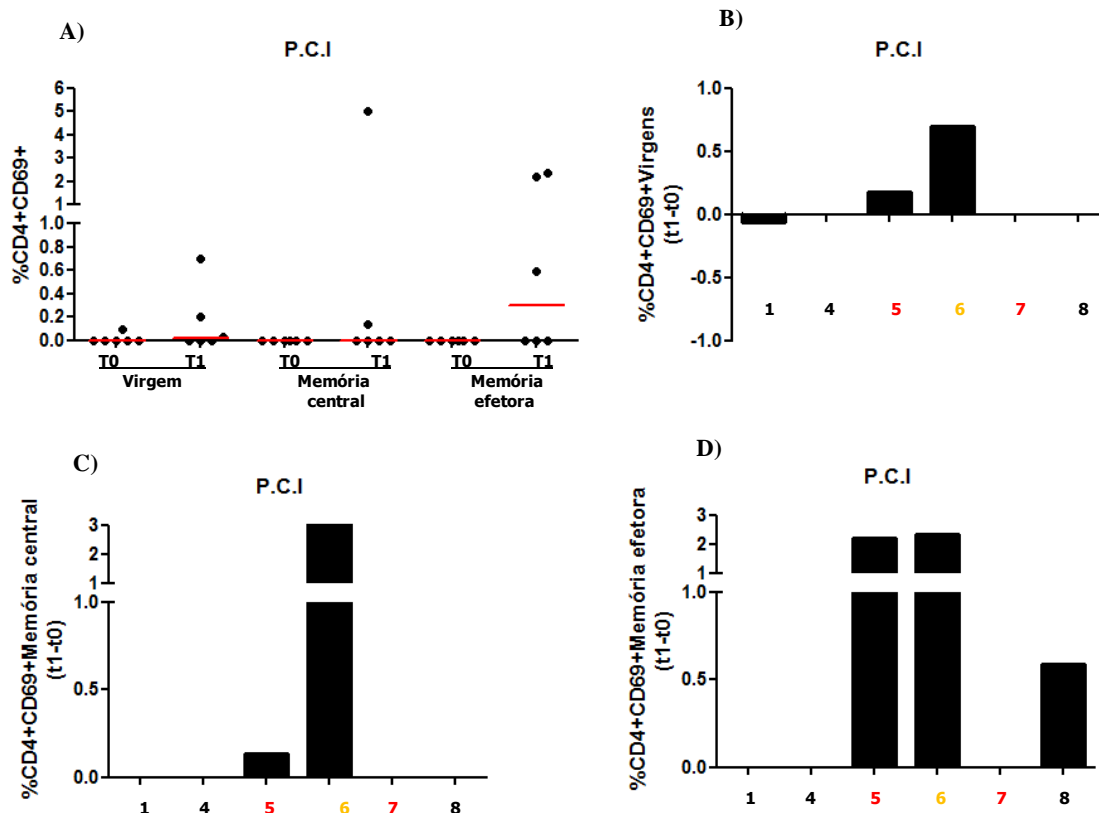


Figura 4.6. Frequência de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ que responderam ao P.C.I de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Frequência de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao P.C.I em T0 e T1. Cada círculo preto representa um contato. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. **B)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ virgens respondedoras ao P.C.I em T1. **C)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ de memória central respondedoras ao P.C.I em T1. **D)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ de memória efetora respondedoras ao P.C.I em T1. Cada barra preta representa um contato com seu respectivo número de identificação. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contato que não foi vacinado com BCG em T0 foi identificado pela cor amarela. **P.C.I-** peptídeos *M. leprae* específicos apresentados por via de MHC de classe I. n = 6.

As frequências de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ com os diferentes fenótipos respondedores ao P.C.II podem ser observadas na **Figura 4.7. A**. Não houve diferença nas frequências de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ virgens, de memória central e de memória efetora entre T0 e T1. Embora em menor frequência, é possível observar que dois contatos aumentaram a frequência de linfócitos T $CD4^+CD69^+$ virgens em T1 (**Figura 4.7. B**). De forma interessante, apenas os contatos domiciliares C1 e C6 aumentaram a

frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central e de memória efetora em T1, embora esse comportamento não tenha sido observado com a população de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ com o fenótipo virgem.

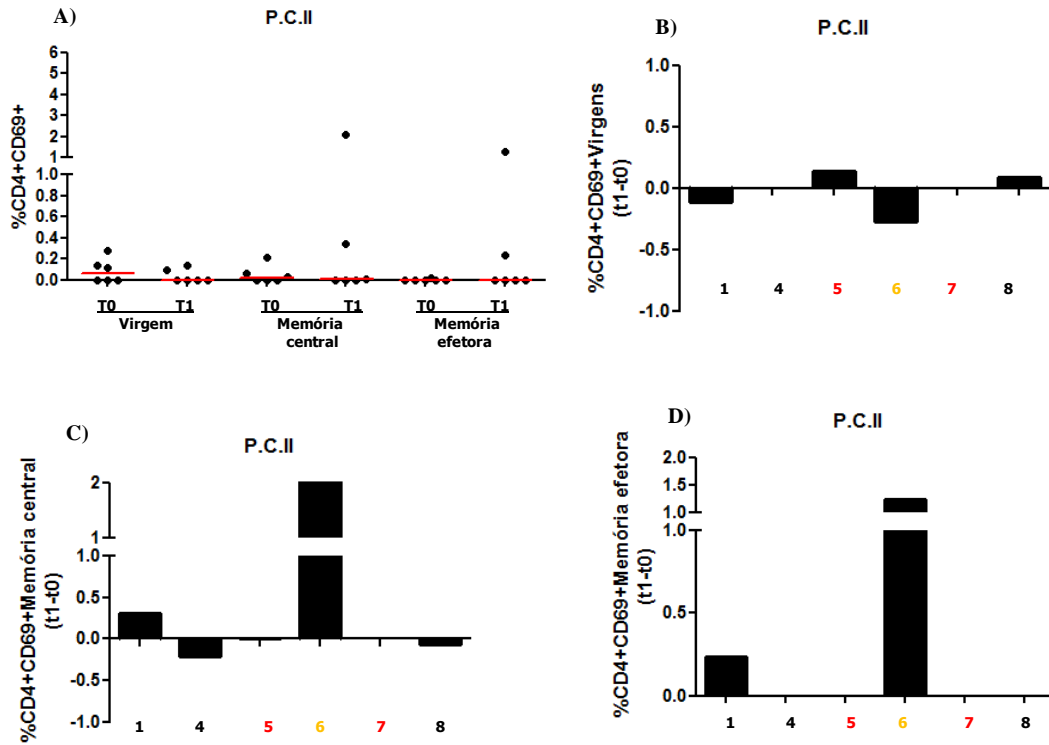


Figura 4.7. Frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ que responderam ao P.C.II de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao P.C.II em T0 e T1. Cada círculo preto representa um contato. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. **B)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgens respondedoras ao P.C.II em T1. **C)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória central respondedoras ao P.C.II em T1. **D)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ de memória efetora respondedoras ao P.C.II em T1. Cada barra preta representa um contato com seu respectivo número de identificação. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contato que não foi vacinado com BCG em T0 foi identificado pela cor amarela. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via de MHC de classe II. n = 6.

Avaliamos também as frequências de linfócitos T CD8⁺ respondedores ao *M. leprae*. A frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora podem ser observadas na **Figura 4.8 A**. Não houve diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1. Três contatos domiciliares apresentaram um

discreto aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.8. B**). De forma similar, dois contatos domiciliares apresentaram um discreto aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória central respondedora ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.8. C**). Dos seis contatos domiciliares avaliados, três aumentaram a frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória efetora e três apresentaram uma diminuição da frequência dessas células respondedoras ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.8. D**).

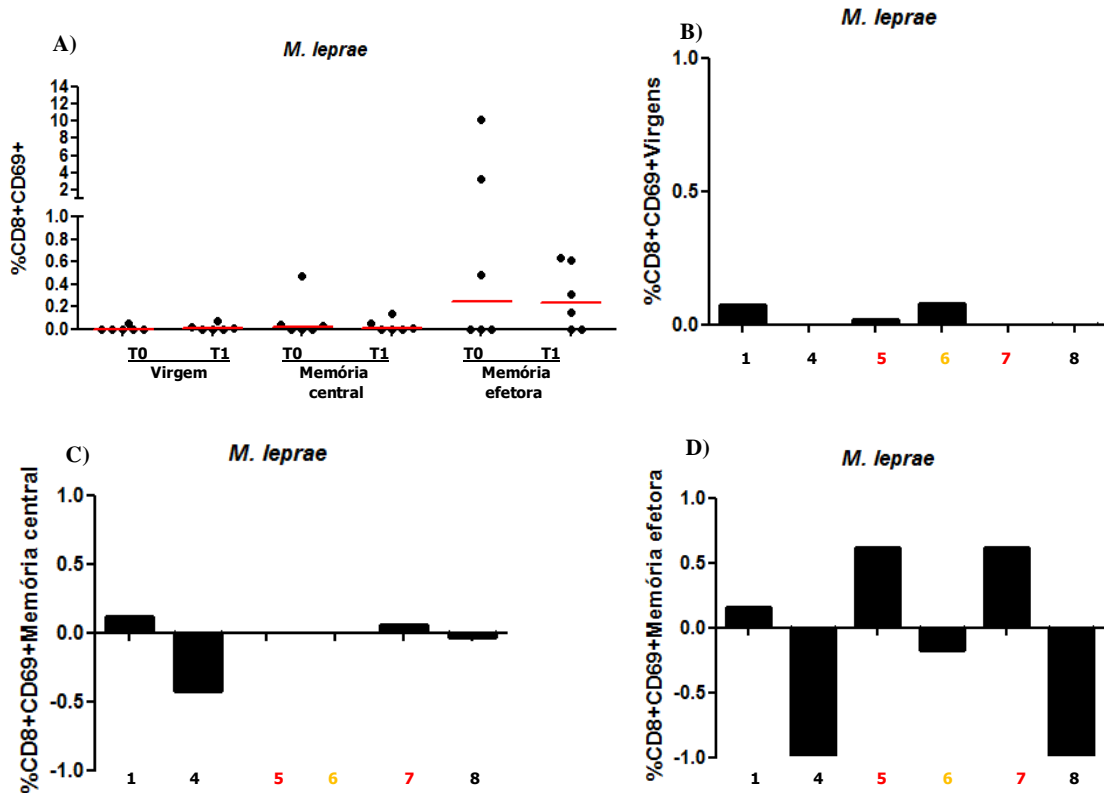


Figura 4.8. Frequência de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ que responderam ao *M. leprae* de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao *M. leprae* em T0 e T1. Cada círculo preto representa um contato. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. **B)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgem respondedoras ao *M. leprae* em T1. **C)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória central respondedoras ao *M. leprae* em T1. **D)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória efetora respondedoras ao *M. leprae* em T1. Cada barra preta representa um contato com seu respectivo número de identificação. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contato que não foi vacinado com BCG em T0 foi identificado pela cor amarela. n = 6.

As frequências de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao P.C.I podem ser observadas na **Figura 4.9. A**. Um aparente aumento da frequência de linfócitos CD8⁺CD69⁺ de memória efetora respondedoras ao P.C.I em T1 pode ser observado, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1. Apenas dois contatos domiciliares apresentaram um aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ virgens respondedoras ao P.C.I (**Figura 4.9. B**). Em menor frequência quando comparado com as frequências de memória efetora, um aumento da população de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória central em T1 pode ser observado em quatro dos seis contatos domiciliares analisados (**Figura 4.9. C**). Cinco dos seis contatos domiciliares analisados apresentaram um aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória efetora em T1 (**Figura 4.9. D**).

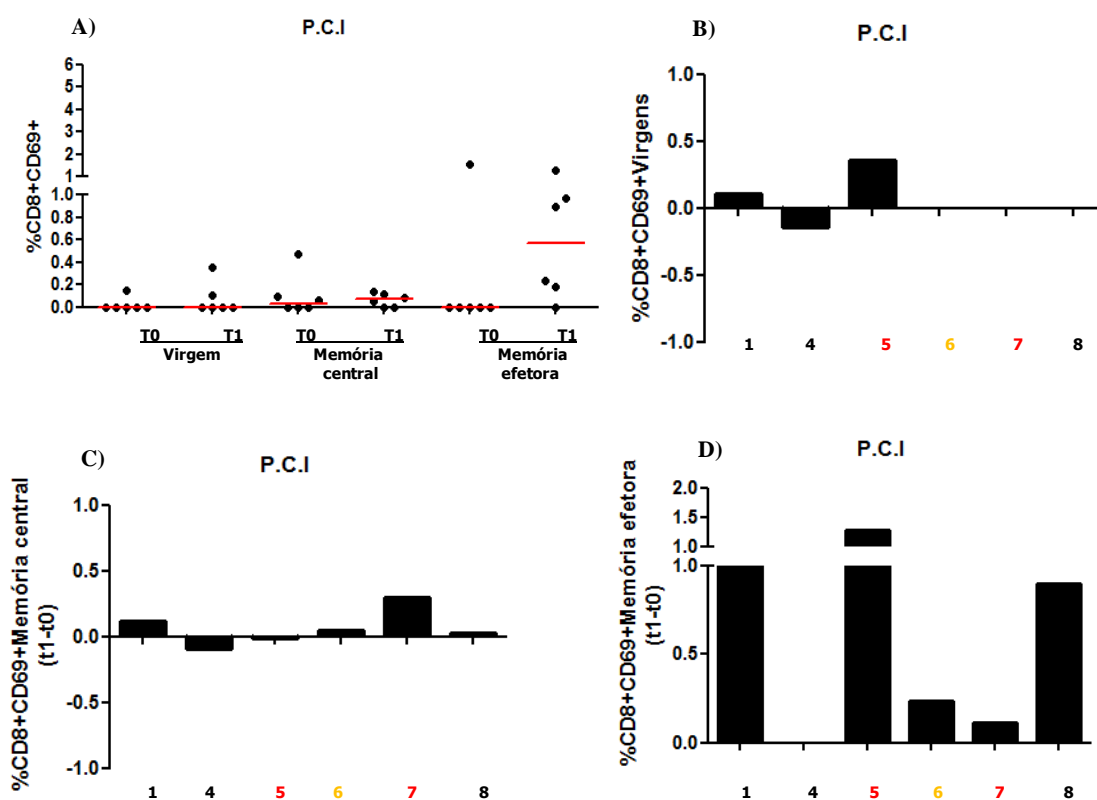


Figura 4.9. Frequência de linfócitos T CD8⁺ respondedores ao P.C.I de contatos de pacientes multibacteriais. **A)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao P.C.I em T0 e T1. Cada círculo preto representa um contato. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. **B)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgem respondedoras ao P.C.I em T1. **C)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória central respondedoras ao P.C.I em T1. **D)** Gráfico de

recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória efetora respondedoras ao P.C.I em T1. Cada barra preta representa um contato com seu respectivo número de identificação. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contato que não foi vacinado com BCG em T0 foi identificado pela cor amarela. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. n = 6.

As frequências de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao P.C.II podem ser observadas na **Figura 4.10. A**. Nenhuma diferença foi observada nos fenótipos avaliados em T0 e T1. Apenas dois contatos apresentaram um pequeno aumento das frequências de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens e de memória central respondedoras ao P.C.II (**Figura 4.10. B e C**). Dos sei contatos analisados, apenas um contato apresentou aumento na frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória efetora e três apresentaram uma diminuição dessas frequências em T1.

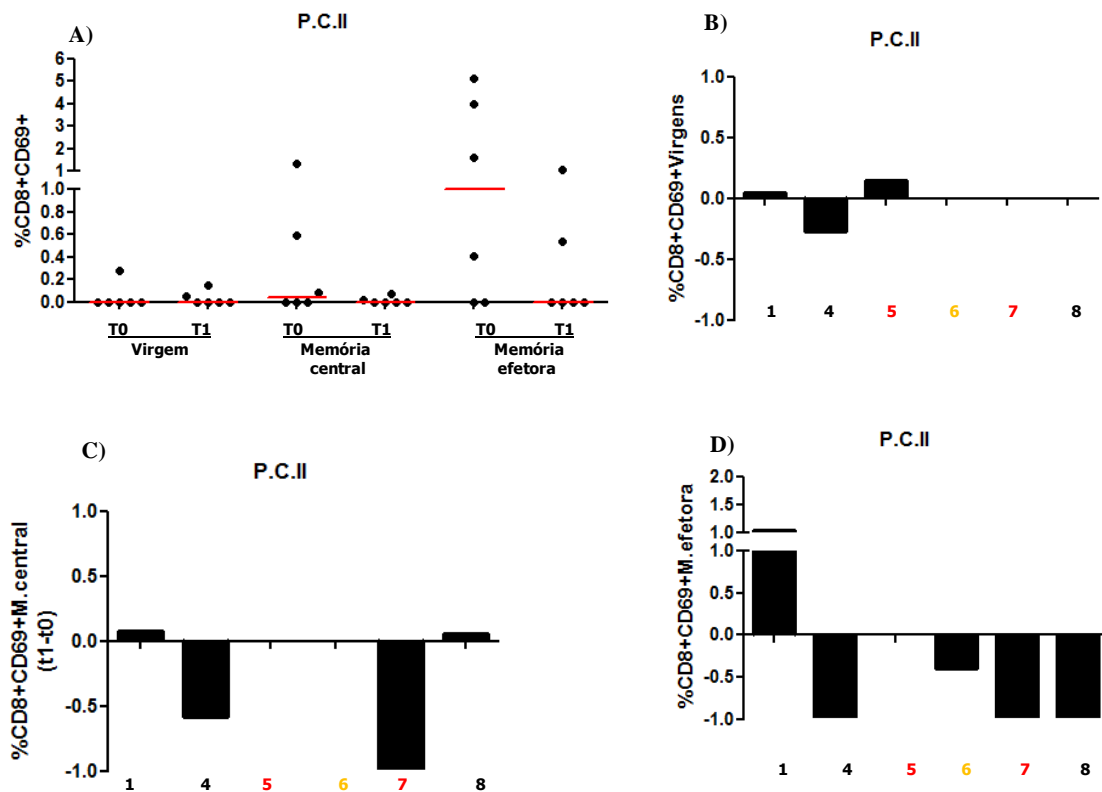


Figura 4.10. Frequência de linfócitos T CD8⁺ respondedores ao P.C.II de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora respondedoras ao P.C.II em T0 e T1. Cada círculo preto representa um contato nos dois diferentes tempos. A linha vermelha representa a mediana de cada grupo. **B)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgem respondedoras ao P.C.II em T1. **C)** Gráfico de

recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória central respondedoras ao P.C.II em T1. **D)** Gráfico de recuperação individual da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ de memória efetora respondedoras ao P.C.II em T1. Cada barra preta representa um contato com seu respectivo número de identificação. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contato que não foi vacinado com BCG em T0 foi identificado pela cor amarela. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. n = 6.

Uma visão geral da variação das frequências dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao estímulo com *M. leprae* e os peptídeos específicos do *M. leprae* comparando os tempos T0 e T1 para cada contato estudado se encontra representada na **Tabela 4.3**. As células da tabela representadas em cinza indicam aumento da frequência em T1 quando comparado com T0. As frequências dos fenótipos celulares que não apresentaram aumento em T1 estão representadas por células brancas. Na **Tabela 4.3** podemos observar quais dos indivíduos apresentaram um aumento das frequências dos linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ virgem, de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae*, P.CI e P.CII. em T1. Já na **Tabela 4.4** representamos o comportamento da variação das frequências de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ virgem, de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae*, P.CI e P.CII em T1. Embora seja possível observar um perfil heterogêneo das respostas, podemos notar que a maioria dos contatos aumentaram as frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae* e ao menos um dos conjuntos de peptídeos *M. leprae* específicos. Podemos observar também que os contatos que não foi vacinado com BCG em T0 por já apresentar duas cicatrizes vacinais neste período (contato 6) também apresentou um aumento nas frequências dos fenótipos estudados, principalmente na população e linfócitos T CD4⁺. Um outra observação é que os contatos 5 e 7 que apresentam sorologia positiva para o PGL-1 também aumentaram as frequências em T1 de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ virgens de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae* e aos peptídeos *M. leprae* específicos e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae* respectivamente.

De fato, observamos que o tratamento do caso índice e consequente diminuição da exposição contínua ao *M. leprae* por esses contatos, assim como a vacinação com BCG contribuiu para o aumento das frequências dos fenótipos estudados em T1 na maioria dos contatos.

Tabela 4.3. Visão global do aumento das frequências de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T1.

Contatos	<i>M. leprae</i>			P.C.I			P.C.II		
	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Virgem	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Memória Central	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Memória Efetora	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Virgem	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Memória Central	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Memória Efetora	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Virgem	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Memória Central	CD4 ⁺ CD69 ⁺ Memória Efetora
1									
4									
5									
6									
7									
8									

P.C.I - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Células na cor cinza representam os fenótipos que apresentaram as frequências aumentadas em T1. Células na cor branca representam os fenótipos que não apresentaram as frequências aumentadas em T1.

Tabela 4.4. Visão global do aumento das frequências de linfócitos T CD8⁺CD69⁺ virgens, de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T1.

Contatos	<i>M. leprae</i>			P.C.I			P.C.II		
	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Virgem	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Memória Central	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Memória Efetora	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Virgem	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Memória Central	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Memória Efetora	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Virgem	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Memória Central	CD8 ⁺ CD69 ⁺ Memória Efetora
1									
4									
5									
6									
7									
8									

P.C.I - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Células na cor cinza representam os fenótipos que apresentaram as frequências aumentadas em T1. Células na cor branca representam os fenótipos que não apresentaram as frequências aumentadas em T1.

4.3.4. Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ em sangue periférico de contatos de pacientes multibacilares no início e ao final do tratamento do caso índice.

4.3.4.1. Sequência de análises realizada para identificação da população de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ e de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ IL-10⁺.

Após a marcação das moléculas de superfície, realizamos a marcação intracelular para avaliarmos por citometria de fluxo a frequência de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ produtores de IFN- γ e de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ produtores de IL-10 em sangue periférico dos contatos domiciliares a fim de investigar se haveria diferença nessas frequências entre os dois diferentes momentos estudados.

Após a exclusão de células mortas, a sequência de análises realizadas para a exclusão de células grudadas, assim como a identificação da população de linfócitos e da população de linfócitos CD4⁺ (**Figura 4.11. A, B e C**) e CD8⁺ (**Figura 4.12. A, B e C**) podem ser observadas. Após a identificação da população de células CD4⁺ e CD8⁺, a identificação dos linfócitos T CD4 e CD8⁺ positivos para CD69 e IFN- γ foi realizada utilizando os anticorpos anti CD69 e anti IFN- γ . As frequências de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, estimuladas com SEB e com *M. leprae* podem ser observadas na **Figura 4.11. D**. Já as frequências de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ podem ser observadas na **Figura 4.12. D**. Por estarmos investigando a modulação negativa sofrida por indivíduos superexpostos ao *M. leprae*, e também por seu papel regulador já descrito na literatura, investigamos também a frequência de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ CD69⁺ IL-10⁺ no sangue periférico dos contatos nos dois diferentes tempos. A análise realizada para a identificação dessas frequências na ausência de estímulo, células estimuladas com SEB e células estimuladas com *M. leprae* podem ser observadas na **Figura 4.11. E e 4.12. E**, respectivamente.

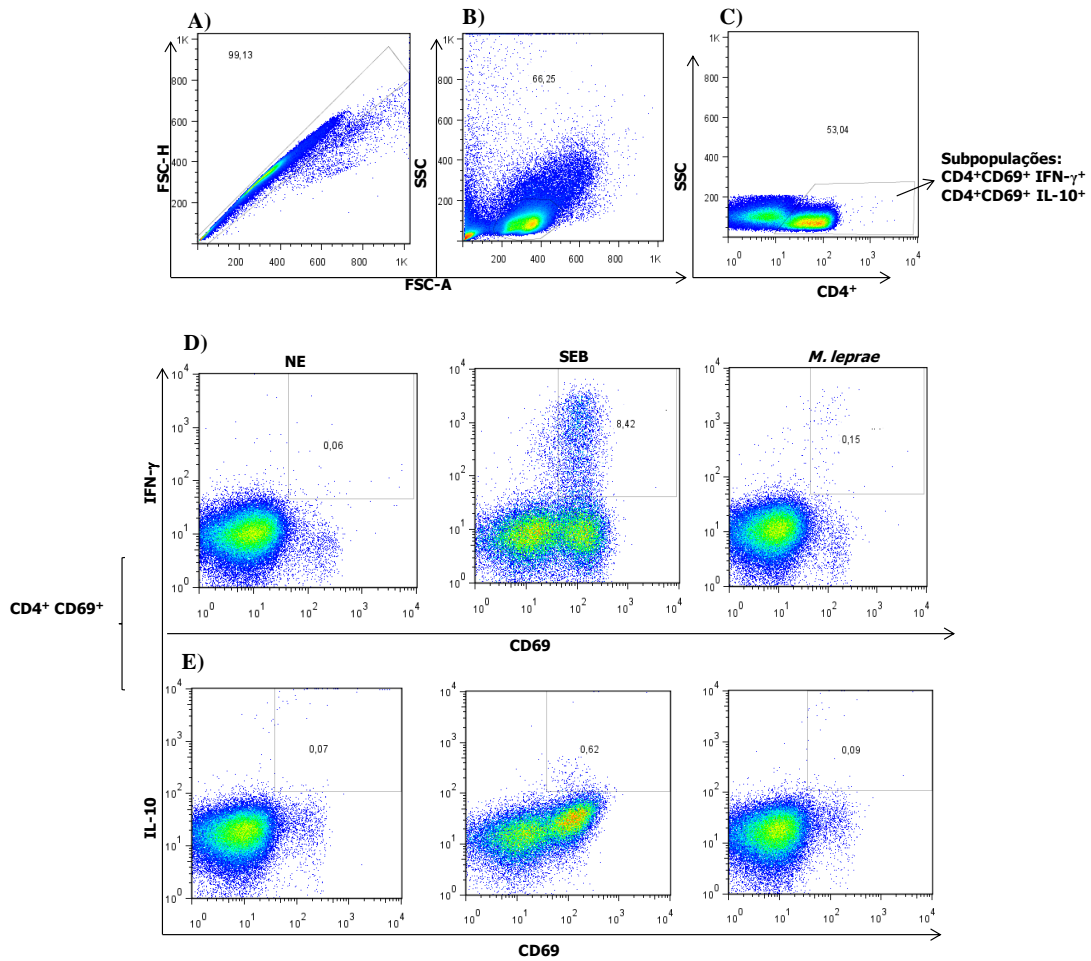


Figura 4.11. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação de linfócitos CD4⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ e CD4⁺ CD69⁺ IL-10⁺. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. **B)** Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **C)** Identificação de linfócitos T CD4⁺. **D)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. **E)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ CD69⁺ IL10⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. **NE**, não estimulado; **SEB**, Enterotoxina B de *S. aureus*. Dot plot representativo de um contato avaliado.

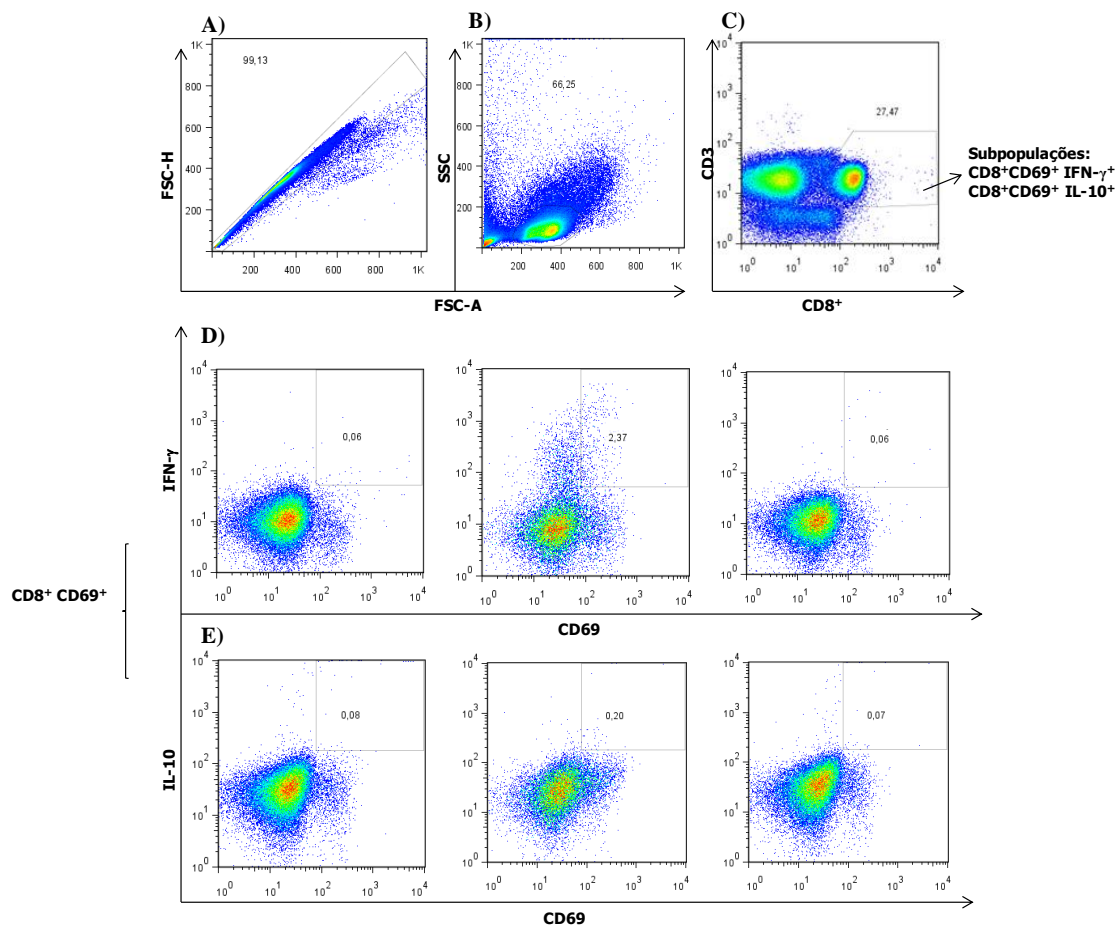


Figura 4.12. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação de linfócitos CD8⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ e CD8⁺ CD69⁺ IL-10⁺. A) Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. B) Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. C) Identificação de linfócitos T CD8⁺. D) Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. E) Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ IL-10⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e ao *M. leprae*. **NE**, não estimulado; **SEB**, Enterotoxina B de *S. aureus*. Dot plot representativo de um contato avaliado.

As frequências de linfócitos T $CD4^+ CD69^+$ e $CD8^+ CD69^+$ produtores de $IFN-\gamma$ ou IL-10 dos contatos domiciliares C1, C4, C5, C6, C7, C8 e C9 nos diferentes tempos de exposição ao bacilo podem ser observadas na **Figura 4.13**. Não houve diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1 das frequências de linfócitos $CD4^+ CD69^+ IFN-\gamma^+$ (**Figura 4.13. A**), $CD4^+ CD69^+ IL10^+$ (**Figura 4.13. B**), $CD8^+ CD69^+ IFN-\gamma^+$ (**Figura 4.13 C**) e $CD8^+ CD69^+ IL10^+$ (**Figura 4.13. D**).

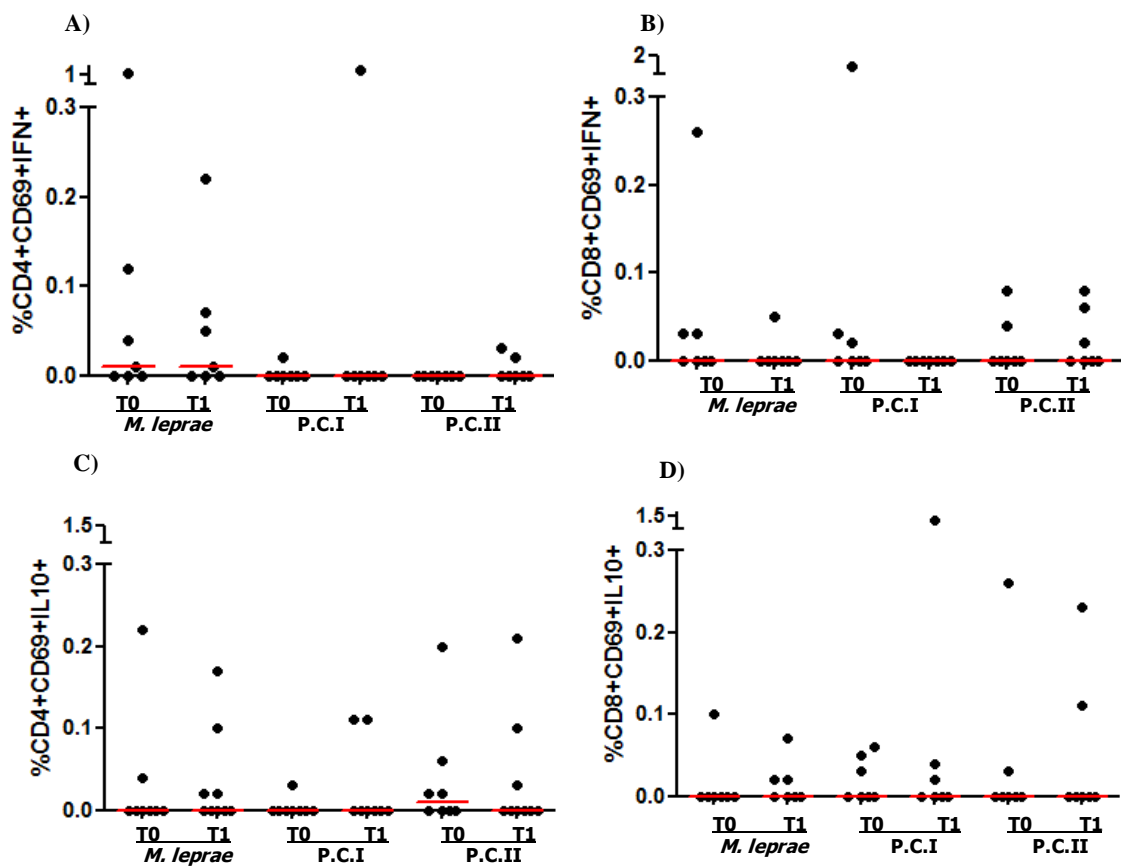


Figura 4.13. Frequências de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+ CD69^+$ produtores de $IFN-\gamma$ ou IL-10 nos contatos de pacientes multibacilares no início e ao longo do tratamento do caso índice. **A)** Frequência de linfócitos $CD4^+ CD69^+ IFN-\gamma^+$ na ausência de estímulo, em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. **B)** Frequência de linfócitos $CD8^+ CD69^+ IFN-\gamma^+$ em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. **C)** Frequência de linfócitos $CD4^+ CD69^+ IL-10^+$ em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II, em T0 e T1. **D)** Frequência de linfócitos $CD8^+ CD69^+ IL-10^+$ em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - de peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II.

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

Utilizando o sistema Luminex para dosagem de citocinas, avaliamos a produção de IFN- γ , TNF- α , 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 nos sobrenadantes das culturas de CMS de todos os contatos domiciliares (n = 9) estimuladas com *M. leprae* e peptídeos específicos do *M. leprae* nos dois diferentes tempos de exposição ao bacilo. Os resultados serão mostrados nos itens seguintes, com exceção da IL-8 que ultrapassou o maior ponto da curva padrão em todas as amostras, sendo necessária a realização de um novo teste para esta citocina com a diluição das amostras.

4.4.1. Análise da produção de IFN- γ .

A produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II nos dois diferentes tempos de exposição ao bacilo podem ser observadas na **Figura 4.14**. Embora possa ser observado um aumento da produção de IFN- γ nas CMS estimuladas com *M. leprae* em T1, não houve diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1 (**Figura 4.14. A**). O comportamento individual da produção de IFN- γ em resposta ao *M. leprae* em T0 e T1 pode ser observado na **Figura 4.14. B**. Dos nove contatos domiciliares avaliados, seis apresentaram um aumento da produção de IFN- γ em T1 em resposta ao *M. leprae*. Apenas três contatos aumentaram a produção de IFN- γ em resposta ao P.C.I (**Figura 4.14. C**) e ao P.C.II (**Figura 4.14. D**) em T1.

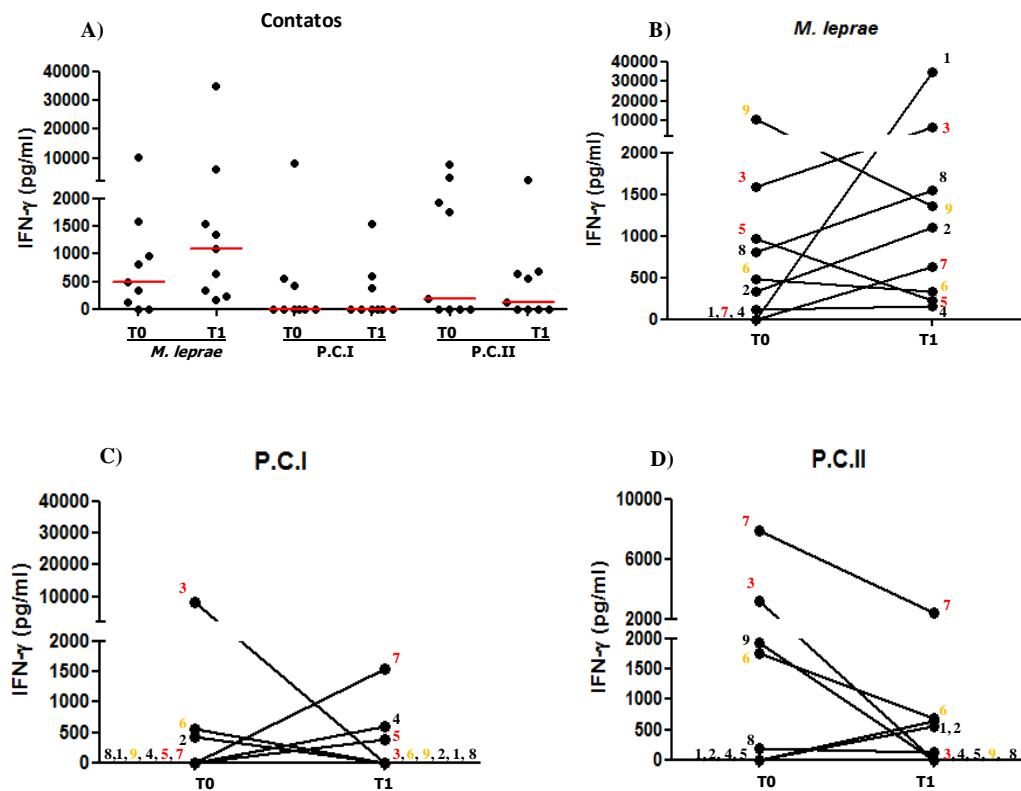


Figura 4.14. Análise da produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IFN- γ por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de IFN- γ por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de IFN- γ por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de IFN- γ por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.2. Análise da produção de TNF- α .

A produção de TNF- α em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e ao P.C.II nos dois diferentes tempos pode ser observado na **Figura 4.15. A**. Assim como para IFN- γ , um aumento da produção de TNF- α em resposta ao *M. leprae* pode ser observado em T1, embora, não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1. No gráfico de comportamento individual, podemos observar que cinco dos nove contatos domiciliares avaliados aumentaram a produção de TNF- α em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.15. B**). Três contatos domiciliares aumentaram a produção de TNF- α em

resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.15. C**), e cinco contatos domiciliares aumentaram a produção de TNF- α em resposta ao P.C.II em T1. De forma interessante, podemos observar que dois dos três contatos PGL-I positivos (C5 e C7) aumentaram a produção de TNF- α em resposta a todos os estímulos em T1 (**Figura 4.15. B, C e D**).

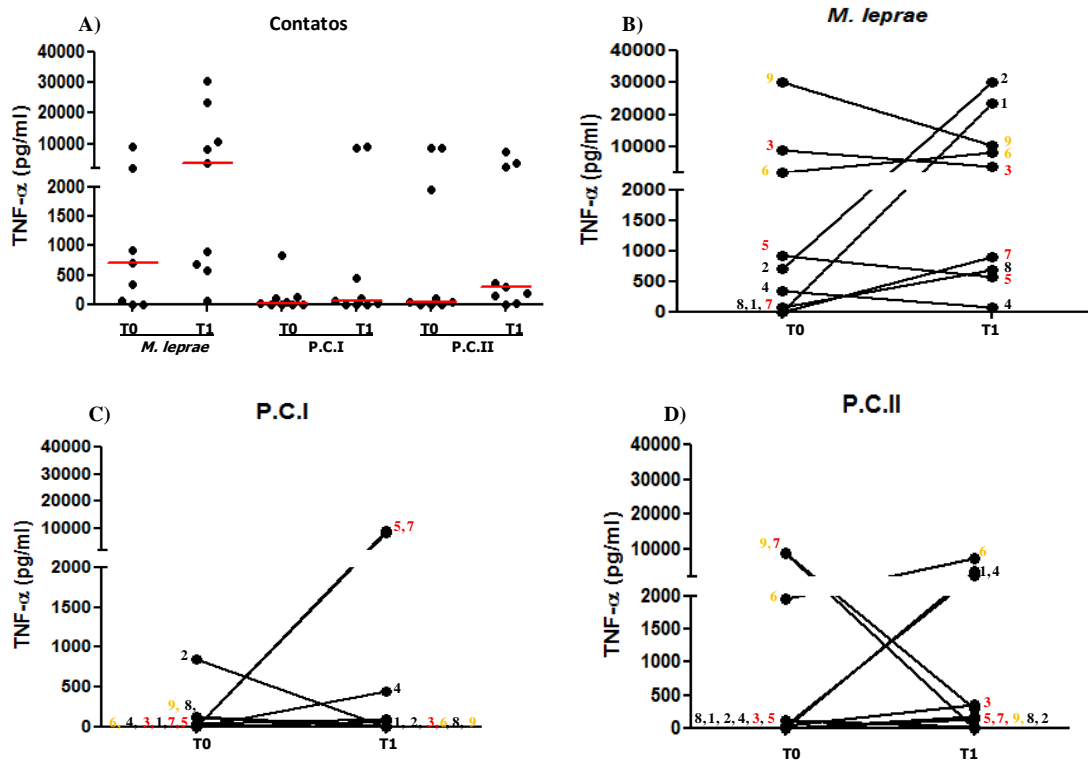


Figura 4.15. Análise da produção de TNF- α por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Produção de TNF- α por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de TNF- α por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de TNF- α por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de TNF- α por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.3. Análise da produção de IL-1 β .

A produção de IL-1 β em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II pode ser observado na **Figura 4.16. A**, embora não tenha sido estatisticamente significativo, é possível observar um aumento da produção de IL-1 β em resposta ao *M. leprae* e ao

P.C.II em T1. Cinco contatos domiciliares aumentaram a produção de IL-1 β em resposta ao P.C.I em T1(Figura 4.16. B). Em resposta ao P.C.I, apenas três contatos domiciliares aumentaram a produção de IL-1 β em T1(Figura 4.16. C) e em resposta ao P.C.II, sete dos nove contatos avaliados aumentaram a produção de IL-1 β em T1(Figura 4.16. D). De forma similar à produção de TNF- α , dois (C5 e C7) dos três contatos PGL-I positivo aumentaram a produção de IL-1 β em resposta a todos os estímulos em T1.

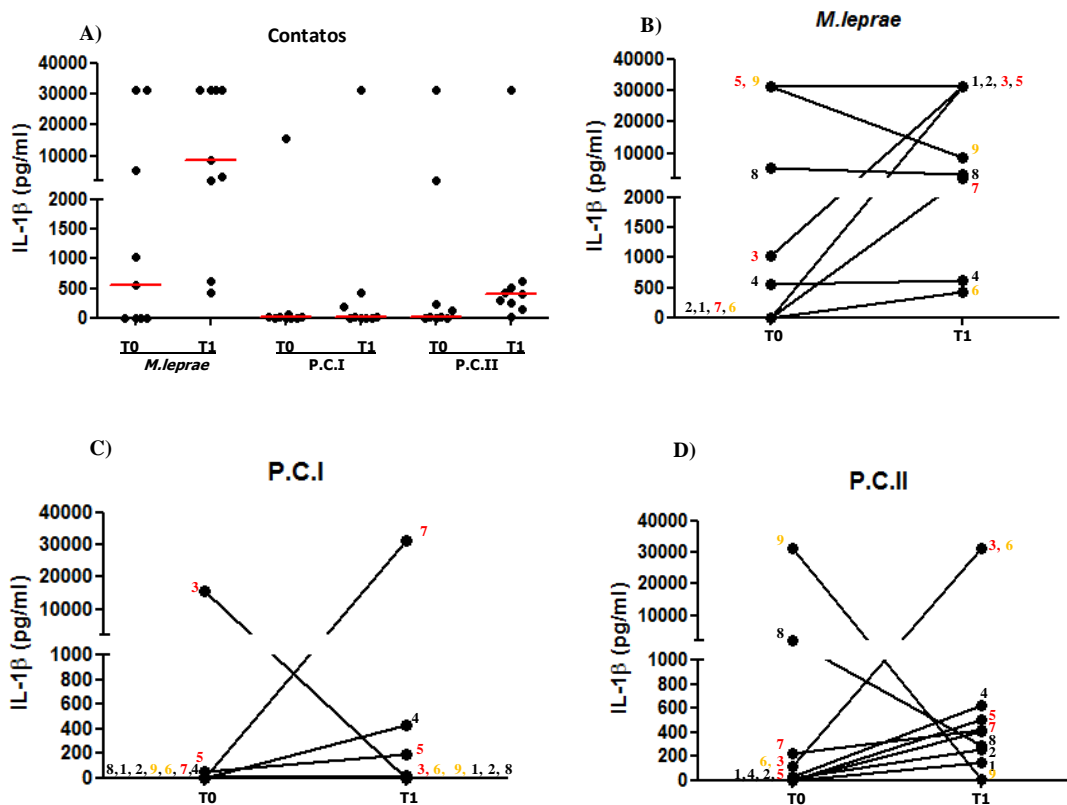


Figura 4.16. Análise da produção de IL-1 β por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-1 β por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. B) Produção de IL-1 β por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. C) Produção de IL-1 β por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. D) Produção de IL-1 β por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.4. Análise da produção de IL-2.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa na produção de IL-2 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II foi encontrada entre T0 e T1 (**Figura 4.17. A**). Apenas dois contatos domiciliares aumentaram a produção de IL-2 em resposta ao *M. leprae* em T1(**Figura 4.17. B**). Em resposta ao P.C.I e P.C.II apenas três contatos domiciliares aumentaram a produção de IL-2 em T1(**Figura 4.17. C e 4.17. D**).

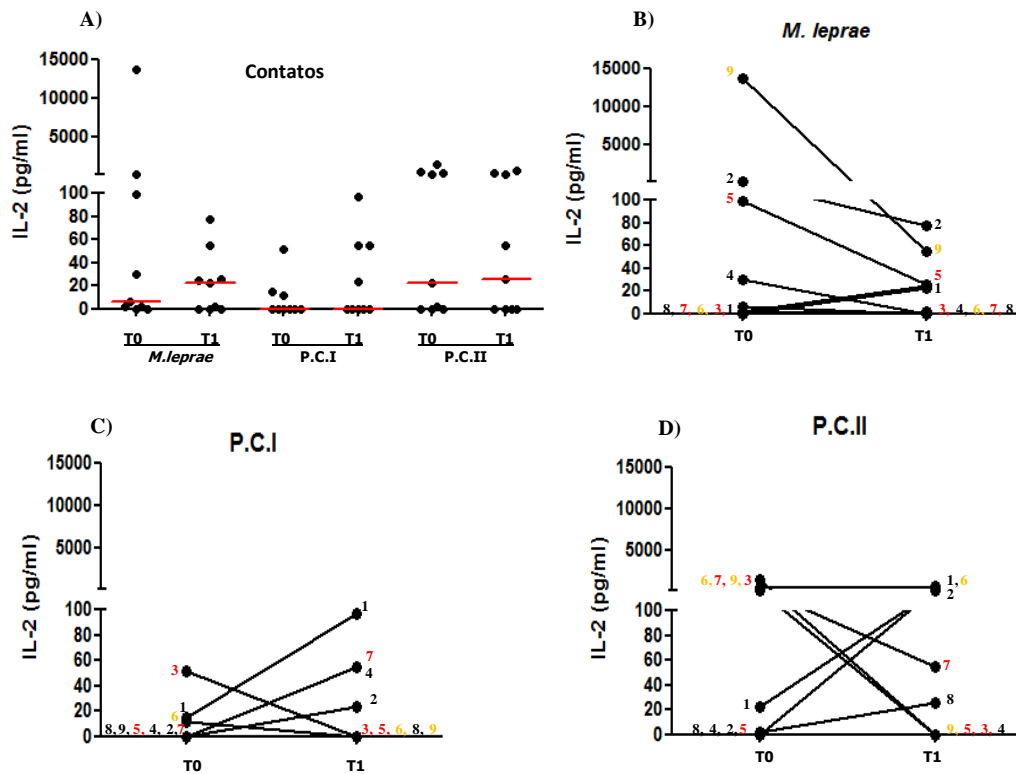


Figura 4.17. Análise da produção de IL-2 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-2 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. B) Produção de IL-2 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. C) Produção de IL-2 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. D) Produção de IL-2 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. P.C.I - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. P.C.II - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.5. Análise da produção de IL-6.

Um aumento na produção de IL-6 em resposta ao *M. leprae* pode ser observado em T1 (**Figura 4.18. A**). Embora seja possível observar que a maior parte dos contatos domiciliares aumentou a produção de IL-6 em resposta ao P.C.I e ao P.C.II em T1, estatisticamente esse aumento não foi significativo (**Figura 4.18. A**). Dos nove contatos analisados seis aumentaram a produção de IL-6 em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.18. B**). Quatro contatos domiciliares aumentaram a produção de IL-6 em resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.18. C**) e seis contatos domiciliares aumentaram a produção de IL-6 em resposta ao P.C.II em T1 (**Figura 4.18. D**).

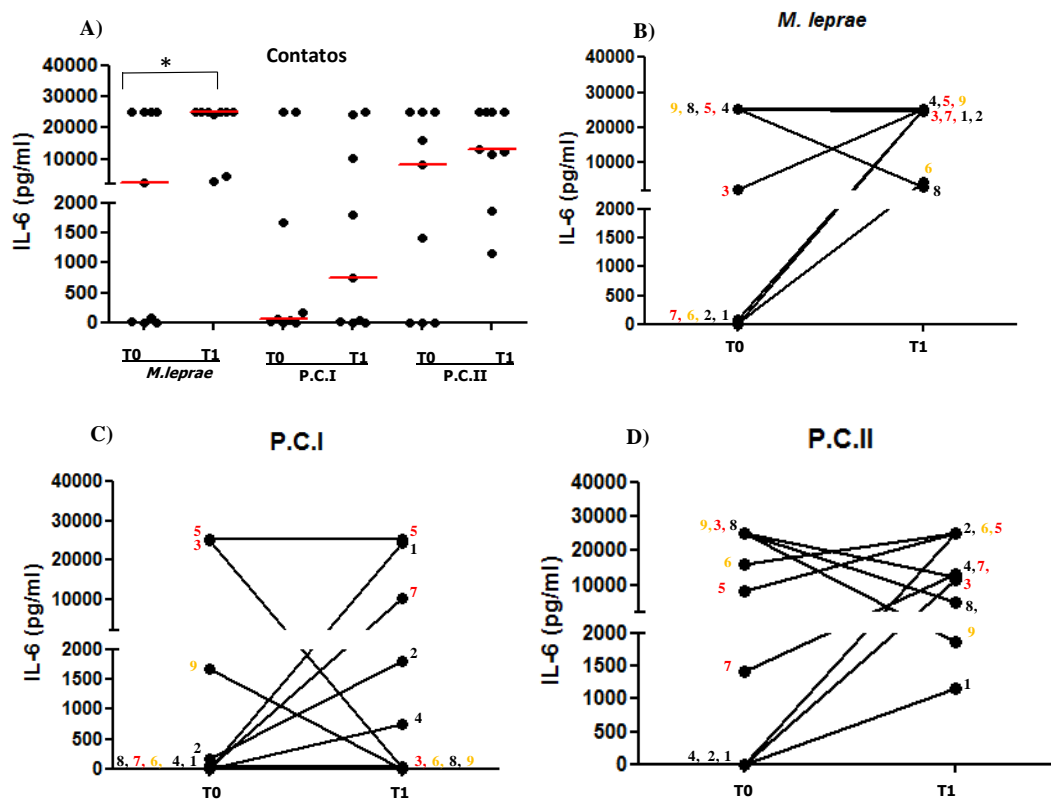


Figura 4.18. Análise da produção de IL-6 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-6 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. B) Produção de IL-6 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. C) Produção de IL-6 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. D) Produção de IL-6 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. P.C.I - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. P.C.II - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9. *p < 0,05.

4.4.6. Análise da produção de IL-12.

A produção de IL-12 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e ao P.C.II nos dois diferentes tempos pode ser observado na **Figura 4.19. A**. Foi observado um aumento da produção de IL-12 em T1 em resposta ao *M. leprae*, entretanto não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1. Com o gráfico que mostra o comportamento individual dos contatos em relação à produção de IL-12, é possível observar que em resposta ao *M. leprae* somente dois contatos aumentam a produção de IL-12 em T1 (**Figura 4.19. B**). Cinco contatos aumentaram a produção de IL-12 em resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.19. C**) e somente três contatos aumentaram a produção de IL-12 em resposta ao P.C.II (**Figura 4.19. D**).

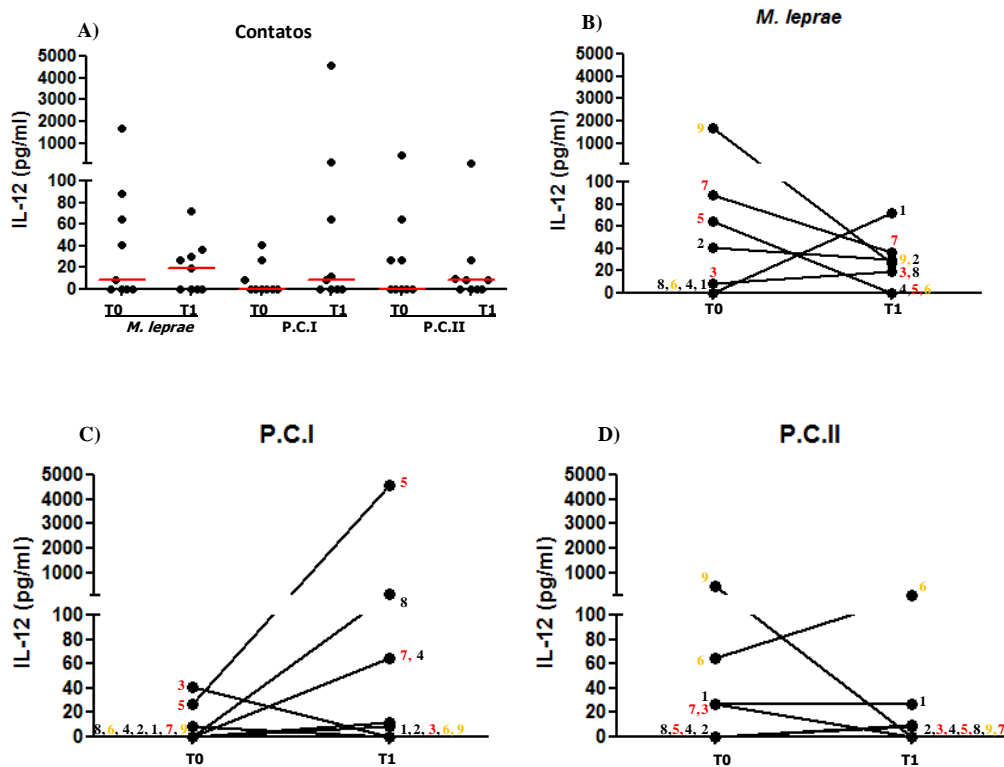


Figura 4.19. Análise da produção de IL-12 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Produção de IL-12 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de IL-12 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de IL-12 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de IL-12 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de

classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n =

4.4.7. Análise da produção de IL-4.

No presente estudo não observamos diferença estatisticamente significativa da produção de IL-4 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e ao P.C.II entre os dois tempos avaliados (Figura 4.20. A). Apenas o contato de número 9 apresentou uma queda na produção de IL-4 em resposta ao *M. leprae* em T1 (Figura 4.20. B) e em resposta ao P.C.II em T1 (Figura 4.20. D). Baixa ou nenhuma produção de IL-4 em resposta ao P.C.I foi observada em T0 e T1 (Figura 6.13.1 C).

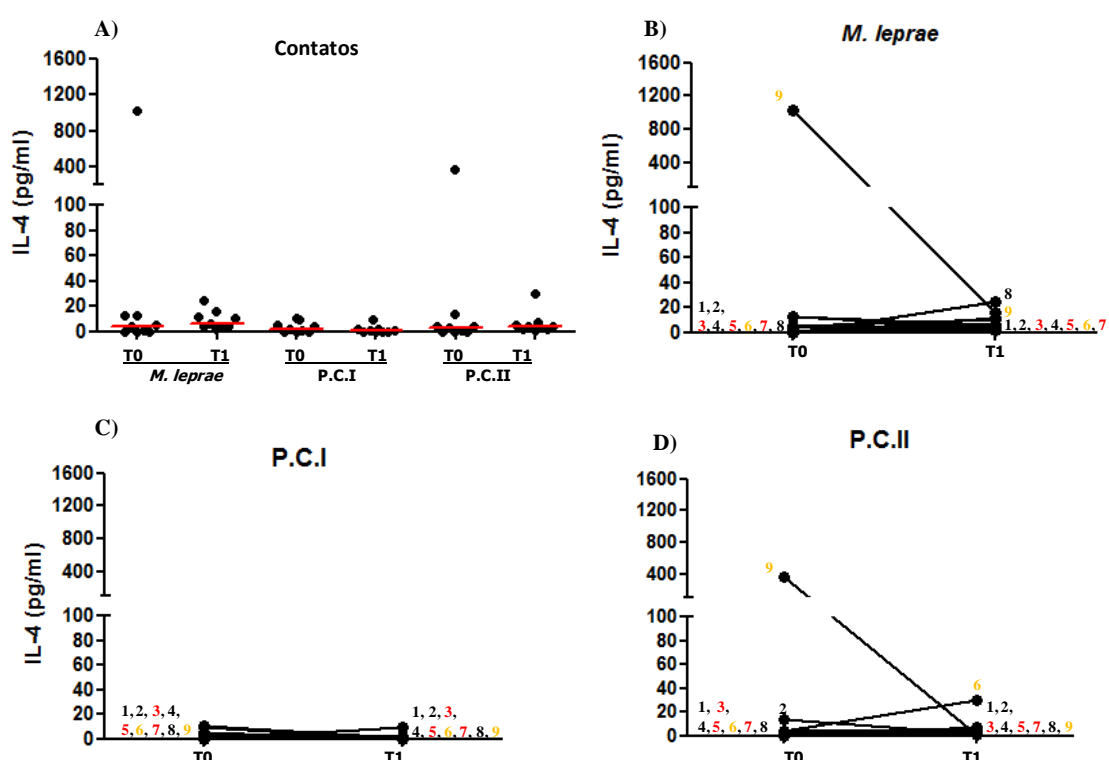


Figura 4.20. Análise da produção de IL-4 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-4 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de IL-4 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de IL-4 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de IL-4 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.8 Análise da produção de IL-5.

A produção de IL-5 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e ao P.C.II nos dois diferentes tempos pode ser observada na **Figura 4.21. A**, mas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre T0 e T1 foi encontrada. Dos nove contatos domiciliares avaliados, cinco apresentaram uma queda da produção de IL-5 em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.21. B**), três apresentaram uma queda da produção de IL5 em resposta ao P.C.I em T1(**Figura 4.21. C**) e quatro apresentaram uma queda em resposta ao P.C.II em T1 (**Figura 4.21. D**).

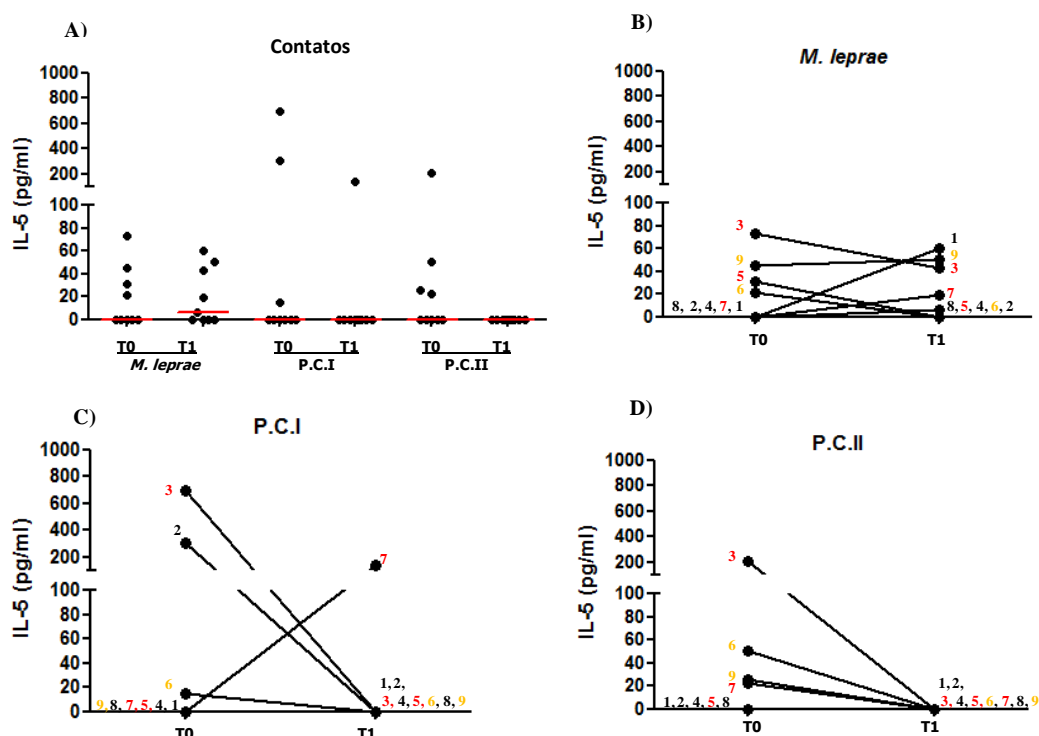


Figura 4.21. Análise da produção de IL-5 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-5 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de IL-5 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de IL-5 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de IL-5 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.9. Análise da produção de IL-10.

Não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa na produção de IL-10 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e ao P.C.II nos dois diferentes tempos (**Figura 4.22. A**). Entretanto, é possível observar que seis dos nove contatos avaliados apresentaram uma queda em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.22. B**) e quatro contatos apresentaram uma queda em resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.22. C**) e em resposta ao P.C.II em T1 (**Figura 4.22. D**).

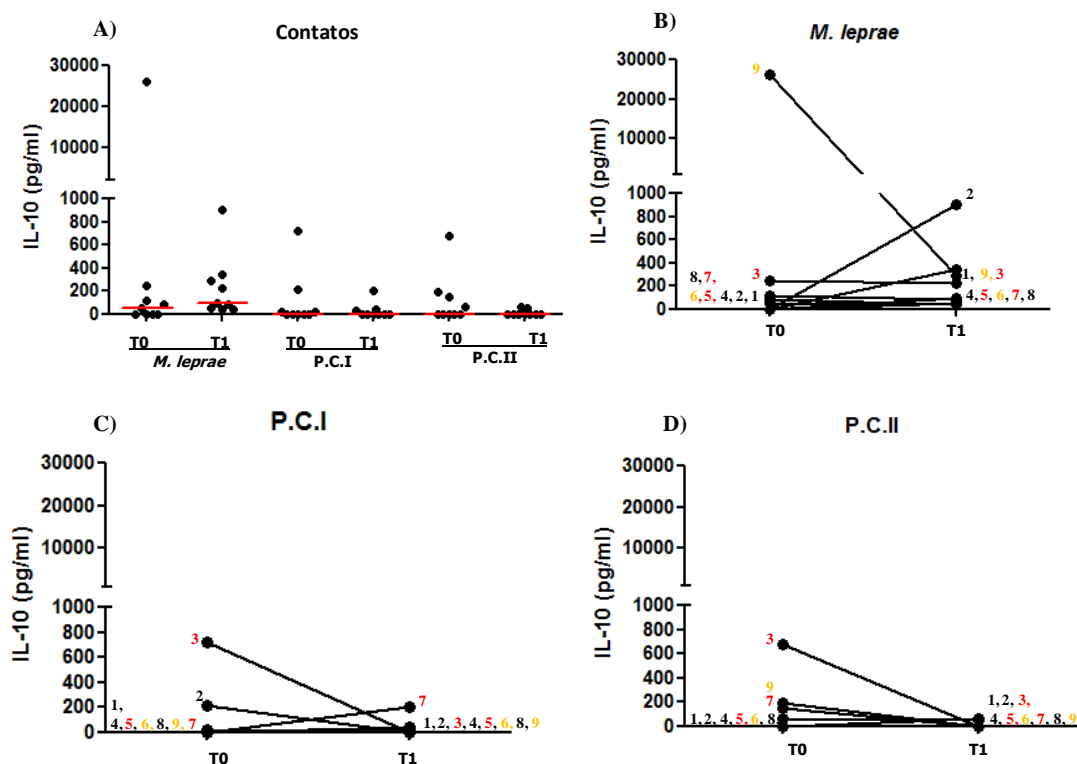


Figura 4.22. Análise da produção de IL-10 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-10 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de IL-10 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de IL-10 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de IL-10 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.10. Análise da produção de IL-13.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada quanto a produção de IL-13 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e ao P.C.II entre os dois diferentes tempos (**Figura 4.23. A**). Embora, dois contatos domiciliares tenham aumentado a produção de IL-13 em resposta ao *M. leprae* em T1, seis contatos apresentaram uma diminuição da produção de IL-13 em T1 (**Figura 4.23. B**). Embora um mesmo contato tenha aumentado a produção de IL-13 em resposta ao P.C.I e ao P.C.II em T1, dois contatos apresentaram uma queda da produção de IL-13 em resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.23. C**) e quatro também apresentaram uma queda da produção de IL-13 em resposta ao P.C.II em T1 (**Figura 4.23. D**)

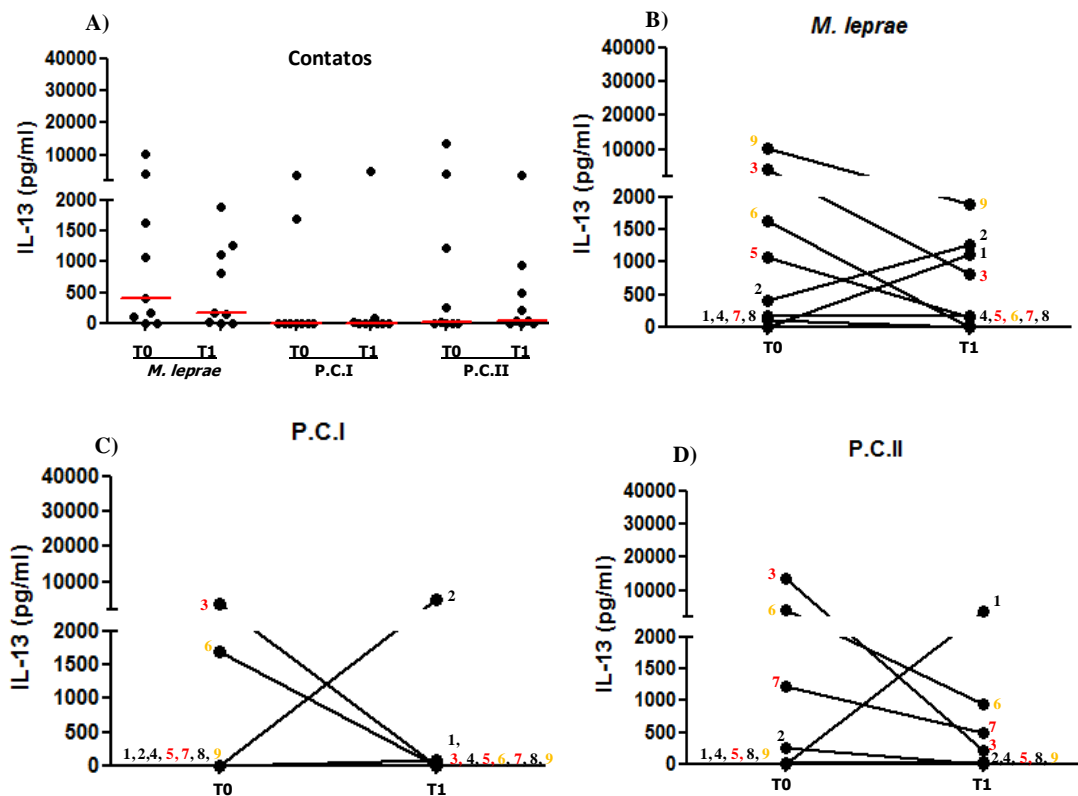


Figura 4.23. Análise da produção de IL-13 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-13 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. B) Produção de IL-13 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. C) Produção de IL-13 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. D) Produção de IL-13 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.11. Análise da produção de IL-7.

Não houve diferença na produção de IL-7 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II entre T0 e T1(Figura 4.24. A). Com o gráfico de comportamento individual observamos uma diminuição da produção de IL7 de um único contato (C9) em resposta ao *M. leprae* em T1(figura 4.24. B), esse mesmo contato também apresentou uma queda da produção de IL-7 em resposta ao P.C.II em T1(Figura 4.24. D). Apenas o C2 produziu IL-7 em resposta ao P.C.I em T0, entretanto nenhuma produção de IL7 foi observada em T1(Figura 4.24. C).

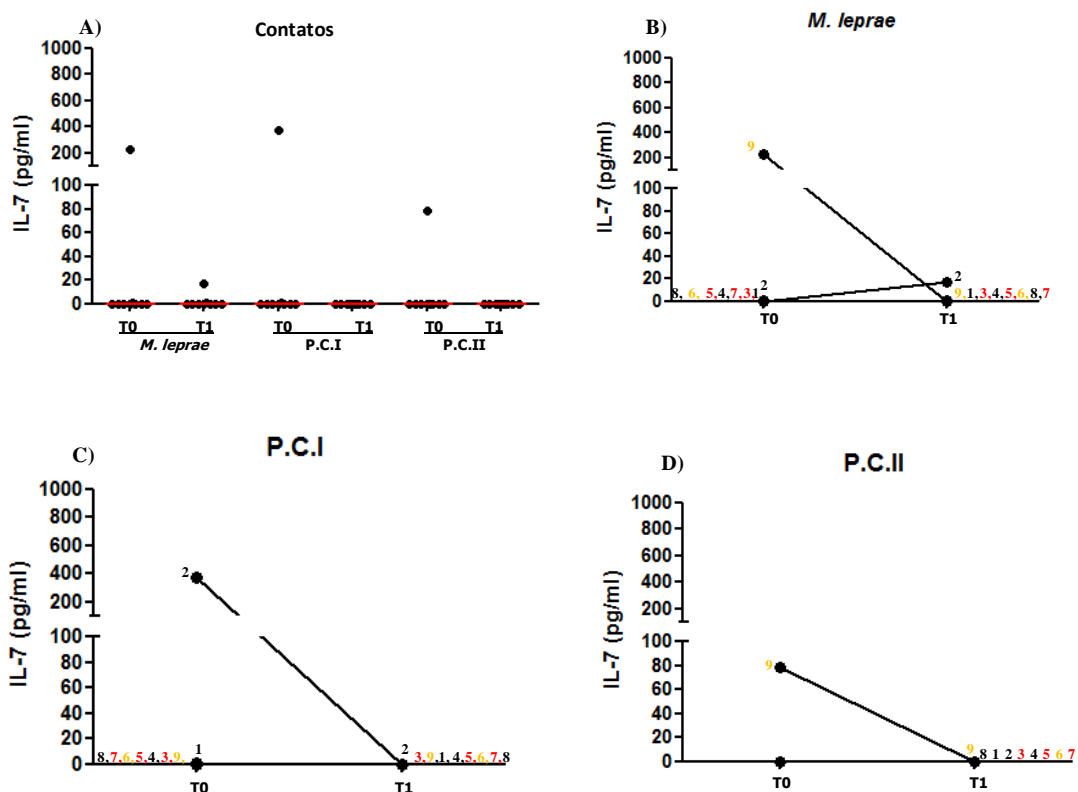


Figura 4.24. Análise da produção de IL-7 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-7 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. B) Produção de IL-7 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. C) Produção de IL-7 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. D) Produção de IL-7 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. P.C.I - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. P.C.II - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.12. Análise da produção de IL-17

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na produção de IL-17 em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II entre T0 e T1(Figura 4.25. A). No gráfico onde é possível observar o comportamento individual, notamos que apenas um contato (C1) aumentou a produção de IL17 em resposta ao *M. leprae* em T1(Figura 4.25. B) e apenas dois contatos aumentaram a produção de IL17 em resposta ao PCI e três contatos ao P.C.II em T1(Figura 4.25. C e 4.25. D), respectivamente.

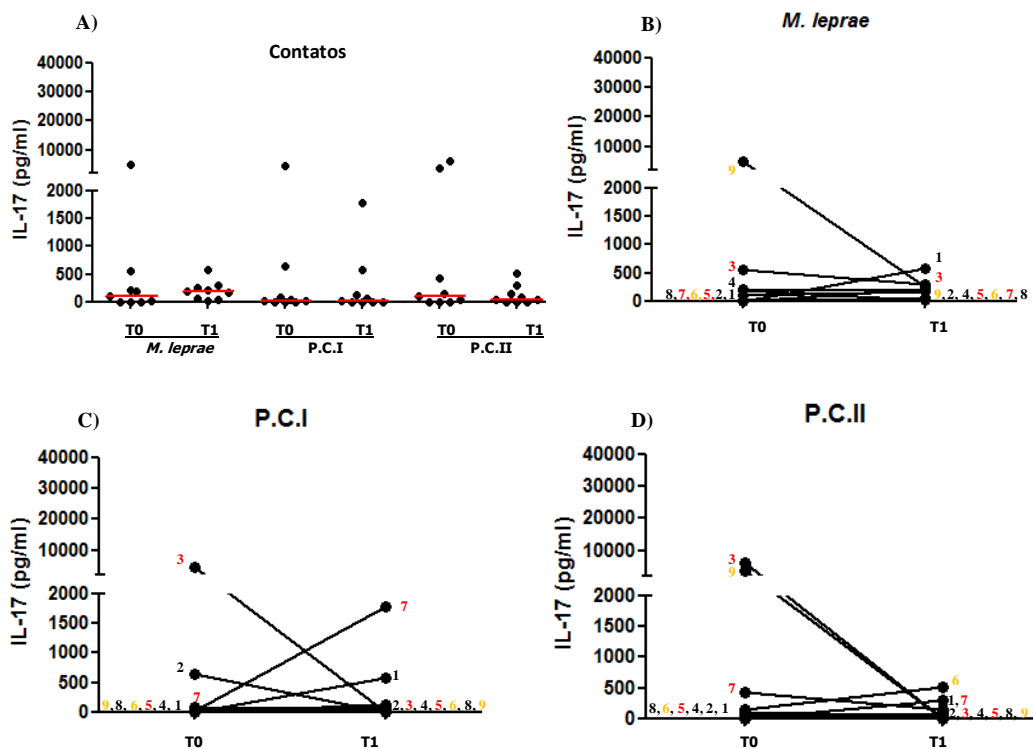


Figura 4.25. Análise da produção de IL-17 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de IL-17 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. B) Produção de IL-17 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. C) Produção de IL-17 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. D) Produção de IL-17 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9.

4.4.13. Análise da produção de MCP-1.

Interessantemente, um aumento significativo da produção de MCP-1 em resposta ao *M. leprae* e ao P.C.II em T1 pode ser observado na **Figura 4.26. A**. Observando o comportamento individual, sete dos nove contatos domiciliares analisados aumentaram a produção de MCP-1 em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.26. B**) e seis dos nove contatos apresentaram um aumento de MCP-1 em resposta ao P.C.I (**Figura 4.26. C**) e ao P.C.II em T1 (**Figura 4.26.D**).

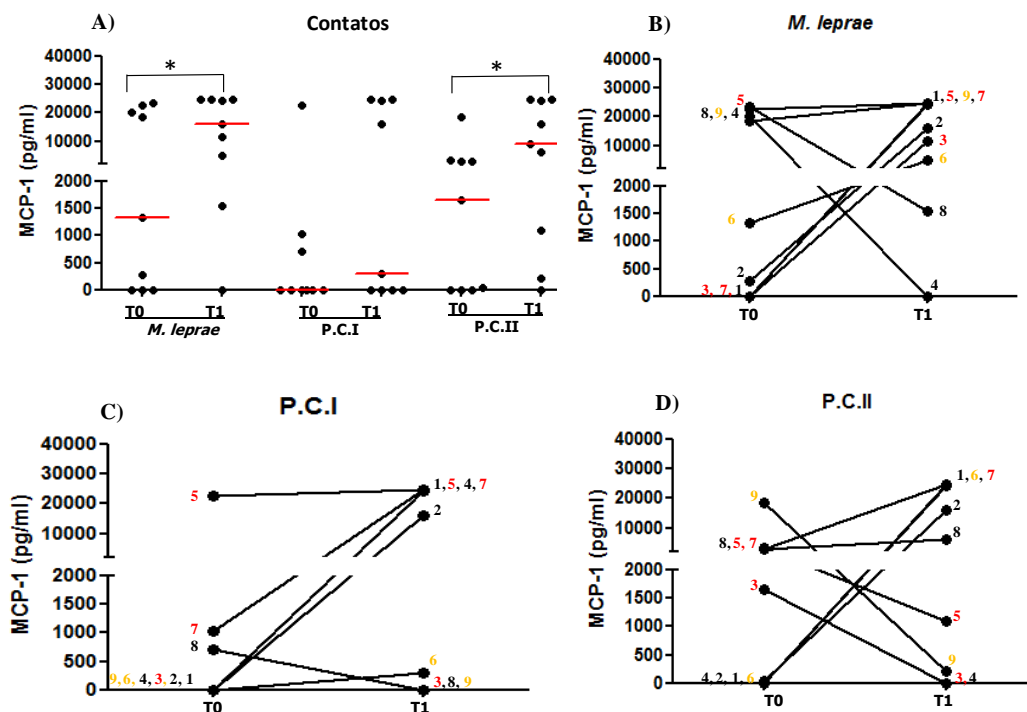


Figura 4.26. Análise da produção de MCP-1 por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de MCP-1 por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de MCP-1 por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de MCP-1 por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de MCP-1 por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9. *p < 0,05.

4.4.14. Análise da produção de MIP-1 β .

Um aumento significativo da produção de MIP-1 β em resposta ao *M. leprae* em T1 pode ser observada na **Figura 4.27. A**. Em resposta ao P.C.I e ao P.C.II não houve diferença significativa da produção de MIP-1 β entre T0 e T1. Dos nove contatos domiciliares analisados, sete apresentaram um aumento da produção de MIP-1 β em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.27. B**), quatro apresentaram um aumento de MIP-1 β em resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.27. C**) e cinco em resposta ao P.C.II em T1 (**Figura 4.27. D**).

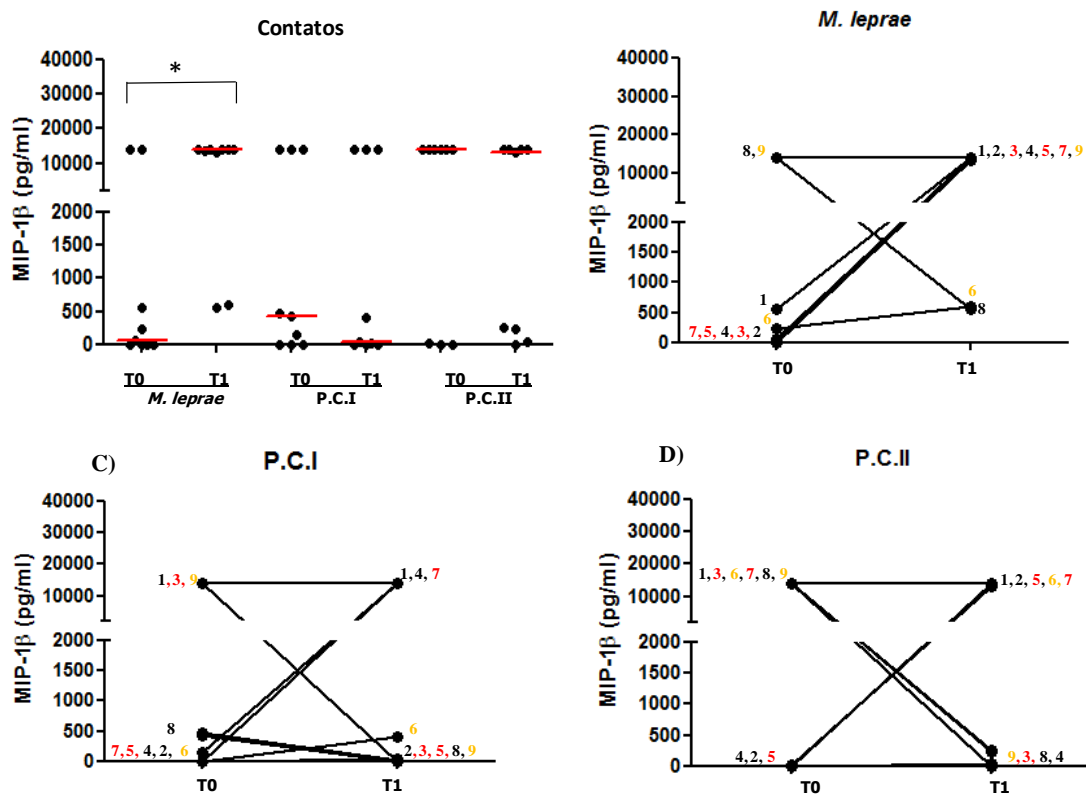


Figura 4.27. Análise da produção de MIP-1 β por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Produção de MIP-1 β por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de MIP-1 β por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de MIP-1 β por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de MIP-1 β por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9. *p < 0,05.

4.4.15. Análise da produção de G-CSF.

A produção de G-CSF em resposta ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II nos dois diferentes tempos avaliados pode ser observada na **Figura 4.28. A**. Um aumento significativo foi observado na produção de G-CSF em resposta ao P.C.II em T1. É possível observar que quatro contatos aumentaram a produção de G-CSF em resposta ao *M. leprae* (**Figura 4.28. B**). Seis dos nove contatos analisados aumentaram a produção de G-CSF em T1 em resposta ao P.C.I (**Figura 4.28.C**) e ao P.C.II (**Figura 4.28. D**).

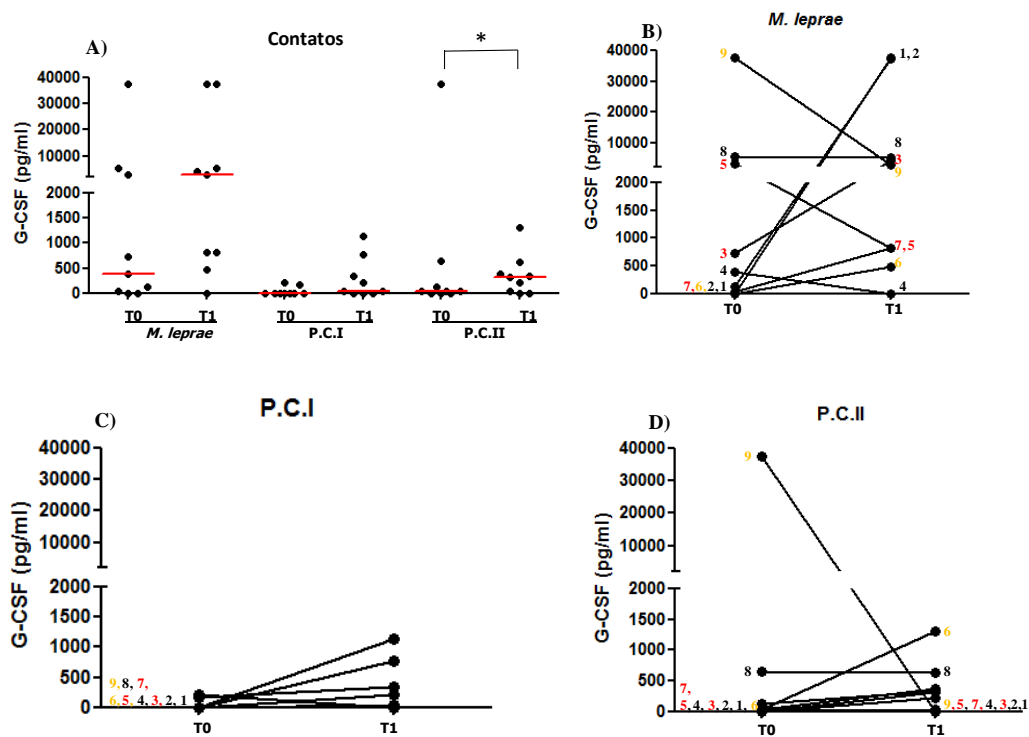


Figura 4.28. Análise da produção de G-CSF por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. **A)** Produção de G-CSF por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de G-CSF por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de G-CSF por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de G-CSF por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9. *p < 0,05.

4.4.16. Análise da produção de GM-CSF.

Finalmente, avaliamos a produção de GM-CSF e um aumento significativo pode ser observado na produção deste fator de crescimento em resposta ao P.C.I em T1 (**Figura 4.29. A**). Dos nove contatos domiciliares analisados, quatro apresentaram um aumento da produção de GM-CSF em resposta ao *M. leprae* em T1 (**Figura 4.29. B**) e seis apresentaram um aumento em resposta ao P.C.I (**Figura 4.29. C**) e cinco contatos domiciliares ao P.C.II no T1(**Figura 4.29D**).

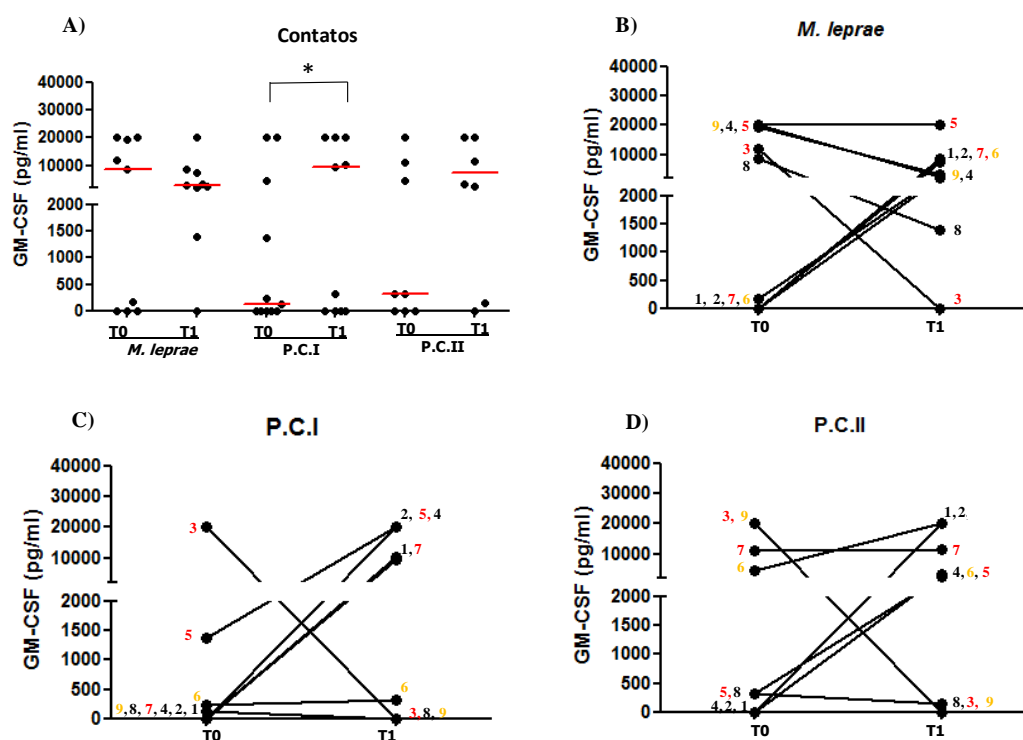


Figura 4.29 . Análise da produção de GM-CSF por células mononucleares de sangue periférico (CMS) de contatos de pacientes multibacilares. A) Produção de GM-CSF por CMS estimuladas com *M. leprae*, P.C.I e P.C.II em T0 e T1. Cada ponto preto representa um contato e a linha vermelha representa a mediana. **B)** Produção de GM-CSF por CMS estimuladas com *M. leprae* de cada contato em T0 e T1. **C)** Produção de GM-CSF por CMS estimuladas com P.C.I de cada contato em T0 e T1. **D)** Produção de GM-CSF por CMS estimuladas com P.C.II de cada contato em T0 e T1. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II. Contatos PGL-I positivo foram identificados pela cor vermelha. Contatos que não foram vacinados com BCG em T0 foram identificados pela cor amarela. n = 9. *p < 0,05.

Uma visão geral da produção das diferentes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nos dois tempos estudados, mediante ao estímulo com *M. leprae*, comparando os tempos T0 e T1 para cada contato estudado se encontra representada na **Tabela 4.5**. Na **Tabela 4.6** podemos observar quais dos indivíduos apresentaram um aumento da produção desses mediadores em resposta ao P.C.I e na **Tabela 4.7** observamos os contatos que apresentaram aumento desses mediadores em T1 frente ao estímulo com o P.C.II. As células da tabela representadas em cinza indicam aumento da produção em T1 quando comparado com T0. As citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que não apresentaram aumento em T1 estão representadas por células brancas.

Nas tabelas podemos observar que a maioria dos contatos apresentou em T1 um aumento das citocinas características do perfil Th1, fatores de crescimento e quimiocinas em resposta ao *M. leprae* e ao peptídeos *M. leprae* específicos. Essencialmente não foi observado aumento de IL-7 e IL17 em T1 para nenhum dos estímulos utilizados. A maioria dos contatos não apresentou aumento da produção de citocinas características do perfil Th2. Avaliando o fato do aumento das frequências dos fenótipos estudados, e esse aumento em T1 principalmente das citocinas do perfil Th1 e dos fatores de crescimento, observamos mais uma vez o importante papel da vacinação com BCG e do tratamento do caso índice nesse grupo de indivíduos mais expostos ao *M. leprae*.

Tabela 4.5. Visão global do aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta ao *M. leprae* em T1 (comparando T1 em relação ao T0) de cada contato domiciliar incluído no estudo.

<i>M. leprae</i>																
Contatos	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-7	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	MCP-1	MIP-1 β	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
C1																
C2																
C3																
C4																
C5																
C6																
C7																
C8																
C9																

Células na cor cinza representam as citocinas, quimiocinas e os fatores de crescimento que aumentaram em T1 frente ao estímulo com *M. leprae*. Os mediadores que não aumentaram em T1 estão representados pelas células na cor branca.

Tabela 4.6. Visão global do aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta ao P.C.I em T1 (comparando T1 em relação ao T0) de cada contato domiciliar incluído no estudo.

P.C.I																
Contatos	IFN- γ	TNF- α	IL-1 β	IL-2	IL-6	IL-7	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	MCP-1	MIP-1 β	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
C1																
C2																
C3																
C4																
C5																
C6																
C7																
C8																
C9																

Células na cor cinza representam as citocinas, quimiocinas e os fatores de crescimento que aumentaram em T1 frente ao estímulo com P.C.I. Os mediadores que não aumentaram em T1 estão representados pelas células na cor branca. **P.C.I** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe I.

Tabela 4.7. Visão global do aumento de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento em resposta ao P.C.II em T1 (comparando T1 em relação ao T0) de cada contato domiciliar incluído no estudo.

P.C.II																
Contatos	IFN-γ	TNF-α	IL-1β	IL-2	IL-6	IL-7	IL-12	IL-17	G-CSF	GM-CSF	MCP-1	MIP-1β	IL-4	IL-5	IL-10	IL-13
C1																
C2																
C3																
C4																
C5																
C6																
C7																
C8																
C9																

Células na cor cinza representam as citocinas, quimiocinas e os fatores de crescimento que aumentaram em T1 frente ao estímulo com P.C.II. Os mediadores que não aumentaram em T1 estão representados pelas células na cor branca. **P.C.II** - peptídeos *M. leprae* específicos apresentados via MHC de classe II.

4.5. Análise de subpopulações linfocitárias produtoras de IFN- γ ou IL-10 em lesão de pele de pacientes com hanseníase multibacilar.

Identificar os fenótipos celulares presentes em lesões de pele de indivíduos já com a doença ativa, nos fornece informações relevantes na compreensão dos mecanismos envolvidos na modulação negativa da resposta imune sofrida pelos contatos domiciliares de pacientes multibacilares, assim como, o papel desses fenótipos celulares no processo de evolução da fase latente para a doença ativa nesses indivíduos superexpostos ao *M. leprae*. Além de determinarmos as frequências de linfócitos T no sangue periférico de contatos em dois diferentes tempos de exposição ao bacilo, iniciamos a etapa para determinação das frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-10 por citometria de fluxo em lesões de pele de pacientes com hanseníase multibacilar. Inicialmente recrutamos dois pacientes com a forma borderline lepromatosa (BL) da hanseníase, por apresentarem uma maior quantidade de linfócitos no infiltrado infalatório da lesão, ao contrário de um paciente LL onde em suas lesões observamos uma maior concentração de macrófagos. Os pacientes possuem idades de 38 e 64 anos e ambos com IB = 3,5. Fragmentos de pele de aproximadamente seis milímetros (mm) obtidos por biópsia foram cortados em duas partes, sendo uma delas rotineiramente processada para fins de diagnóstico (embebida em parafina e corada com hematoxilina-eosina e pelo método de Wade para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes - BAAR) e a outra parte foi dissociada mecanicamente com o auxílio de um bisturi. Após a dissociação e tratamento enzimático e lavagens, as células foram contadas, no qual obtivemos cerca de 4×10^5 células em um único fragmento de pele. Em seguida, as células foram plaqueadas e as moléculas de superfície, assim como as citocinas intracelulares foram marcadas com anticorpos específicos e avaliadas por citometria de fluxo.

Na **Figura 4.30 A e B** observamos as imagens feitas por microscopia óptica da lesão de pele onde a coloração com hematoxilina/eosina foi utilizada. A seta indica um infiltrado com a presença de linfócitos e macrófagos espumosos (**Figura 4.30 A**). Na **Figura 4.30. B** é possível observar um aglomerado de linfócitos na lesão (indicado pela seta). Na figura **4.30 C**, através da coloração de WADE podemos observar a presença de BAAR em sua maior parte fragmentados, no interior dos macrófagos. Além disso, é

possível observar também um acúmulo de linfócitos nesta região, que são tipicamente encontrados em lesão de pele de pacientes que apresentam a forma clínica BL.

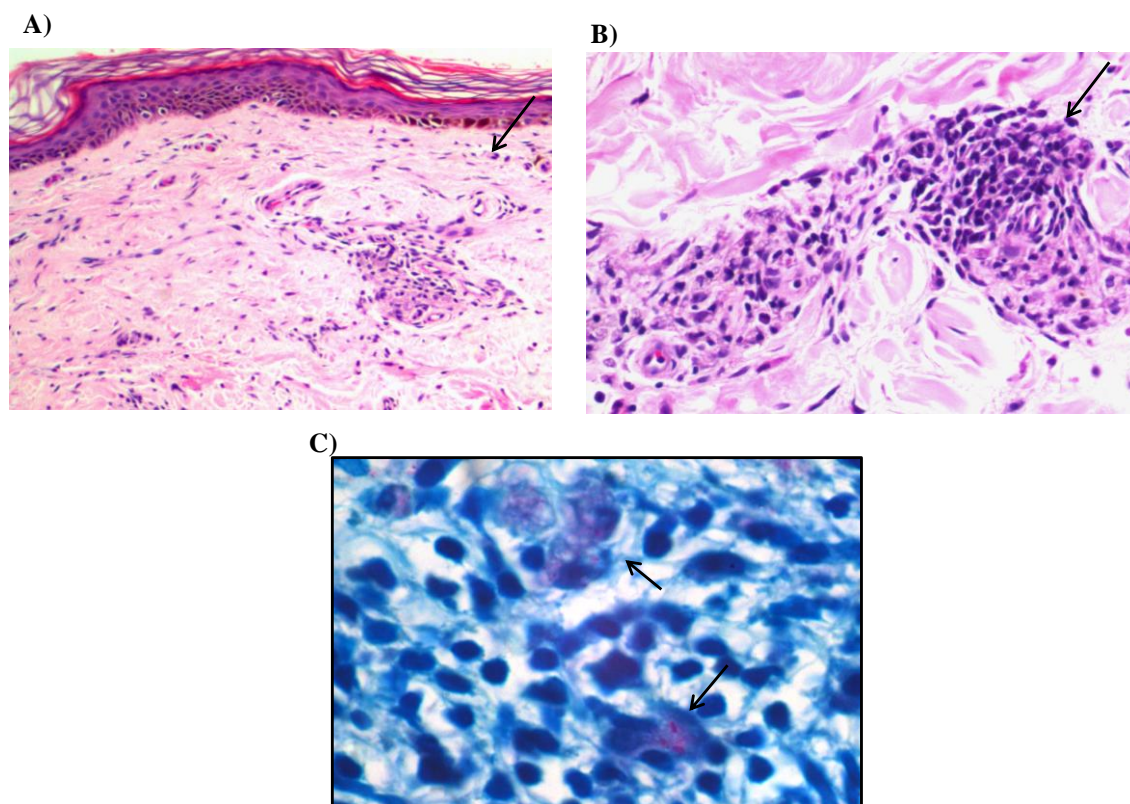


Figura 4.30. Histopatologia da lesão de pele de paciente com hanseníase multibacilar. Células provenientes de fragmentos de pele, obtidos por biópsia, de pacientes BL foram coradas como descrito em materiais e métodos e fotografadas com microscópio óptico. **A e B)** coloração hematoxilina e eosina. Aumento de 200x. **C)** coloração por WADE. Aumento de 1000x. Dados representativos de 2 pacientes.

Na **Figura 4.31** observamos as frequências de células obtidas por citometria de fluxo. Inicialmente, os aglomerados de células foram excluídos utilizando os parâmetros de tamanho FSCA x FSCH (**Figura 4.31.A**). Em seguida, selecionamos a região das células positivas para CD45 (**Figura 4.31.B**), que é um antígeno linfocitário comum e a partir dessa região os parâmetros de complexidade e granulosidade celular (SSC-A) e tamanho (FSCA) foram utilizados para selecionar a região de análise de linfócitos T (**Figura 4.31. C**). As frequências de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ da lesão de pele podem ser observadas na **Figura 4.31. D**. Notamos que a frequência de linfócitos $CD8^+$ é muito superior aos linfócitos $CD4^+$, corroborando com os dados publicados previamente na literatura (Mehra e Modlin., 1990). Neste paciente encontramos uma frequência de 0,03% linfócitos T $CD4^+$ na lesão. Por outro lado, a frequência de células $CD8^+$ foi de

66,7% nesta mesma lesão. Como a frequência de linfócitos CD4⁺ foi muito baixa, identificamos apenas os linfócitos T IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ na população de linfócitos T CD8⁺. As frequências de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ podem ser observadas na **Figura 4.31.E** e frequência de linfócitos T CD8⁺ IL-10⁺ podem ser observadas na **Figura 4.31.F** com seus respectivos controles de isotipo (**Figura 4.31.G**). A frequência de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ foi de 0,21% e a de linfócitos T CD8⁺ IL10⁺ foi de 0,36%. Particularmente, esses linfócitos T CD8⁺ parecem estar produzindo outros mediadores diferente das citocinas IFN- γ e IL-10. Como tivemos apenas dois pacientes até o momento, outros indivíduos precisam ser recrutados e outras moléculas analisadas para uma investigação mais detalhada do fenótipo e dos mediadores produzidos por esses linfócitos TCD8⁺.

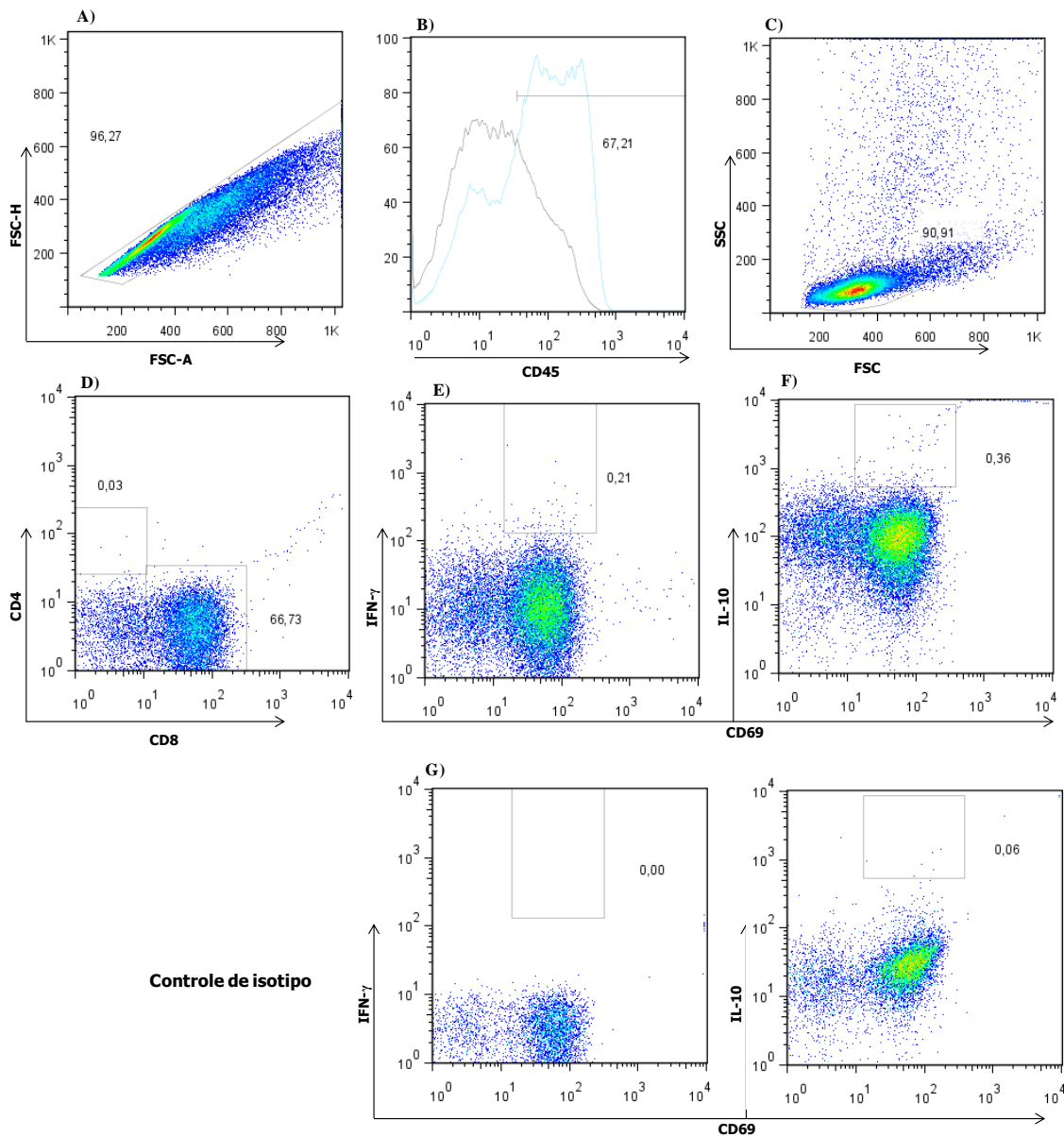


Figura 4.31. Análise de subpopulações linfocitárias produtoras de IFN- γ ou IL-10 em lesão de pele de pacientes com hanseníase multibacilar. Células provenientes de fragmentos de pele, obtidos por biópsia, de pacientes BL foram dissociadas e analisadas por citometria de fluxo como descrito em materiais e métodos. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. **B)** Identificação da população CD45⁺. **C)** A partir da identificação da população CD45⁺ a região de linfócitos T foi realizada utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **D)** Identificação de linfócitos T CD4 e CD 8⁺. **E)** Linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ . **F)** Linfócitos T CD8⁺ produtores de IL-10. **D)** controles de isotipo para IFN- γ e IL-10. Dados representativos de 2 pacientes.

5. DISCUSSÃO

A modulação negativa da resposta imune efetora ao *M. leprae*, em consequência do estímulo contínuo e prolongado do sistema imune pelo patógeno eliminado pelo caso-índice, é uma possível explicação para o conhecido alto risco de contatos domiciliares de pacientes multibacilares evoluírem da infecção latente para a doença ativa (53), (125). Entender os mecanismos envolvidos na modulação negativa da resposta imune sofrida por estes indivíduos superexpostos ao *M. leprae* foi o que nos levou a dar início a este trabalho. O entendimento destes mecanismos poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas que possibilitem identificar indivíduos infectados antes das manifestações clínicas da doença, contribuindo de maneira significativa para a interrupção da cadeia de transmissão. Para tal, foi realizado um estudo prospectivo da caracterização da resposta imune celular *M. leprae*-específica *in vitro* de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar. Esta caracterização consistiu na determinação das frequências de populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ virgens, de memória central e de memória efetora antígeno-específicas recém-ativadas no sangue periférico, assim como na quantificação dos níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados por CMS após estimulação *in vitro*, comparando dois momentos distintos de exposição ao bacilo: no início (T0) e ao longo do tratamento (T1) do caso índice. Também estabelecemos um protocolo para isolar e caracterizar fenotipicamente células presentes na lesão cutânea de pacientes BL com a finalidade de caracterizar os mecanismos de supressão da resposta imune celular *M. leprae*-específica observada nestes indivíduos.

Um total de 9 contatos foram incluídos no estudo (C1 a C9). Seguindo a recomendação da portaria do Ministério da Saúde de 1991, 7 deles foram vacinados com BCG em T0 porque apresentavam menos de duas cicatrizes vacinais. Nestes indivíduos as alterações observadas em T1 em relação a T0 seriam, assim, decorrentes tanto da vacinação com BCG como da diminuição da superexposição ao bacilo vivo em decorrência do tratamento do caso índice. Já C6 e C9 não foram revacinados porque já apresentavam duas cicatrizes. Dessa forma, foi possível avaliar nestes dois indivíduos o efeito isolado do tratamento do caso índice e consequente eliminação da fonte de *M. leprae* vivo no ambiente nas mudanças dos parâmetros imunológicos avaliados em T1.

A descoberta e elucidação da estrutura química do PGL-I em 1981 (33), e a descoberta de sua propriedade antigênica em 1982 (126) inovou a pesquisa da

hanseníase. A presença de anticorpos contra PGL-I em contatos indica a disseminação do bacilo em áreas endêmicas (43), (127), (128), (129), estando também essa positividade sorológica ao PGL-I relacionada com a carga bacilar do indivíduo (42). Em 2004, Douglas e colaboradores acompanharam durante 6 anos contatos de pacientes com hanseníase. Neste trabalho os autores demonstraram que o risco de desenvolver a hanseníase (multibacilar ou paucibacilar) é 7,2 vezes maior em contatos com sorologia positiva para o PGL-I quando comparado com contatos soronegativos, aumentando ainda em 24 vezes mais o risco de desenvolver a forma multibacilar da doença (127). No presente estudo, dos 9 contatos avaliados quanto a presença de anticorpos IgM anti-PGL-I no soro, C3, C5 e C7 apresentaram sorologia positiva para o PGL-I em T0 e permaneceram positivos em T1. No entanto no que concerne aos fenótipos celulares ativadas *in vitro*, após estímulo com *M. leprae*, não foi possível observar diferenças entre contatos PGL-I⁺ e PGL-I. Numa próxima etapa do trabalho, iremos aumentar o número de indivíduos a serem estudados a fim de confirmamos essas informações.

Determinamos, por análise através de citometria de fluxo, as frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ totais no sangue periférico destes indivíduos. Aparentemente observamos variações nas frequências dessas células no sangue periférico entre os contatos e entre T0 e T1. Entretanto, como avaliamos apenas as frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ em relação à população de linfócitos totais, na continuidade deste trabalho será incluída a realização de um hemograma para avaliar como estas frequências se expressam em números totais de células T CD4⁺ e CD8⁺ nestes indivíduos.

Numa primeira etapa do trabalho avaliamos, por citometria de fluxo, as frequências de linfócitos virgens, de memória central e de memória efetora *M. leprae*-específicos nos dois diferentes momentos. O conjunto de células T de memória funciona como um repositório dinâmico de linfócitos T antígeno-específicos que se acumula ao longo da vida do indivíduo (130). A imunidade prolongada está a cargo das células de memória central, enquanto as células de memória efetora se diferenciam a partir destas na presença do antígeno para desempenhar uma função efetora imediata (131). As células T de memória efetora recirculam através de tecidos não linfoides e curiosamente, essas células mantêm constitutivamente elevadas as suas funções efetoras como, por exemplo, atividade citolítica, entre as células T CD8⁺, sendo ativadas rapidamente sem a necessidade de um período de rediferenciação (132). Independente

do estímulo, as maiores variações de frequência entre T0 e T1 foram encontradas na subpopulação de células T de memória efetora. Isto era esperado, uma vez que estávamos analisando um grupo de indivíduos sabidamente expostos ao *M. leprae*.

Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre as medianas das frequências de células de memória central e de memória efetora respondedoras quando avaliamos a resposta ao SEB nos contatos domiciliares em T0 e T1. Ao contrário, em seis contatos domiciliares analisados, cinco apresentaram um aumento da frequência de células CD4⁺ de memória efetora em resposta a, pelo menos, um dos antígenos de *M. leprae* utilizados. Os mesmos cinco contatos também mostraram aumento da frequência de células CD8⁺ de memória efetora específicas para P.C.I. A ativação das células CD8⁺ por esse conjunto de peptídeos nãoâmeros de *M. leprae*, era esperada em função do reconhecimento preferencial destes peptídeos por MHC de classe I. Neste grupo de contatos também se observou aumento da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central, específicas a pelo menos um dos antígenos de *M. leprae*, mas de forma menos expressiva. Entre estes cinco contatos, quatro haviam recebido a BCG em T0 (C1, C5, C7, C8) e dentre estes quatro, dois eram positivos para a presença de anticorpos anti-PGL-I (C5 e C7). O quinto contato (C6) já apresentava duas cicatrizes vacinais e não havia sido vacinado em T0, sendo também negativo para a sorologia anti-PGL-I. O C4, vacinado com BCG em T0 e PGL-I negativo, não mostrou aumento na frequência de células T CD4⁺ e/ou CD8⁺ no sangue periférico específicas para nenhum dos antígenos de *M. leprae* utilizados. O fato de não termos encontrado diferença nas frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre os dois tempos em resposta ao SEB e observarmos um aumento das frequências de memória central e de memória efetora em resposta ao *M. leprae* e principalmente ao conjunto de peptídeos específicos do *M. leprae* demonstram que o aumento nas frequências dessas células observadas em T1 é em resposta especificamente ao *M. leprae*.

É importante lembrar que os peptídeos utilizados no nosso estudo não são compartilhados com BCG. Assim, poderíamos sugerir que o aumento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ peptídeos-específicos observado em T1 poderia ser favorecido por dois fatores: 1) recuperação da resposta imune por conta da diminuição da superexposição ao *M. leprae* em consequência do tratamento do caso índice; e 2) efeito adjuvante inespecífico da vacina BCG nos contatos vacinados. Lima e colaboradores já haviam observado um aparente efeito similar da vacina BCG em contatos de pacientes

multibacilares. Neste estudo os autores demonstraram que após a vacinação com BCG, os contatos aumentaram a produção de IFN- γ em resposta a um antígeno compartilhado com outras micobactérias (Complexo 85) e em resposta a uma proteína específica do *M. leprae* (MMP-I), demonstrando a estimulação inespecífica pela BCG do sistema imune (104). Este efeito imunomodulador do BCG também é bem exemplificado na sua utilização no tratamento de tumores (133).

Particularmente chama a atenção o aumento das frequências de células CD8⁺ de memória efetora específicas para P.C.I observada nos contatos em T1 pela possível contribuição destes linfócitos no controle da infecção micobacteriana. Dados da literatura têm demonstrado que as células T CD8⁺ complementam a ação das T CD4⁺ na imunidade protetora contra a infecção com bactérias intracelulares (134). As células T CD8⁺ medeiam a proteção através da secreção de citocinas do perfil T helper 1(Th1) e/ou pela lise das células infectadas do hospedeiro. Através dessa lise a bactéria intracelular é liberada, reduzindo o reservatório de células infectadas e permitindo que os macrófagos ativados capturem e matem o bacilo (1). Células T CD8⁺ possuem uma ou mais moléculas com propriedades microbidas em seus grânulos citotóxicos que são capazes de matar diretamente o *Mycobacterium tuberculosis* ((135). As subpopulação de células T CD8⁺ expressam coordenadamente CCL5, perforina e granzima como um mecanismo do hospedeiro para atrair os macrófagos infectados e matar a bactéria intracelular (136). A importância de células T CD8⁺ de memória efetora no controle da infecção por *M. tuberculosis* foi demonstrada de forma muito elegante em pacientes com artrite reumatóide tratados com imunoterapia anti-TNF- α (137). A reativação da tuberculose nos indivíduos com tuberculose latente se encontra 5 vezes aumentada naqueles em tratamento com imunoterapia anti-TNF- α (138) Neste trabalho, a causa desta reativação foi explicada pela redução nestes indivíduos de uma população de células T CD8⁺ de memória efetora com atividade microbida contra o *M. tuberculosis*, demonstrando, assim, a importância de células T CD8⁺ na defesa do hospedeiro contra o *M. tuberculosis*.

O peptídeo p69 derivado da proteína ML1419c é um dos 4 peptídeos que compõem o P.C.I. Num estudo com indivíduos residentes em Fortaleza, CE, (124), já haviam observado que 80 e 90% dos contatos de pacientes multibacilares e paucibacilares, respectivamente, eram capazes de reconhecer este antígeno produzindo IFN- γ em resposta ao mesmo. Num trabalho recente, Geluk e col., 2011 estudaram o

papel *in vivo* e o perfil funcional de células T CD8⁺ p69 específicas restritas por HLA-A*0201, utilizando camundongos transgênicos HLA-A*0201. Células T CD8⁺ específicas para p69 geradas após imunização dos camundongos com o peptídeo foram capazes de matar esplenócitos ativados com p69 *in vivo*. A função citotóxica das células T CD8⁺ p69-específicas também foi comprovada infectando esplenócitos *in vitro* com *Mycobacterium smegmatis* expressando a proteína ML1419C. Essas células foram capazes de matar 95% das micobactérias intracelulares expressando ML1419c, enquanto nenhuma redução foi observada quando o *M. smegmatis* selvagem foi avaliado. Dessa forma, os autores propõem que as células T CD8⁺ p69-específicas geradas durante a infecção natural pelo *M. leprae* sejam capazes de matar *in vivo* células infectadas com *M. leprae* e contribuir para reduzir a carga bacilar em indivíduos infectados (139). Assim, baseados nas considerações acima, poderíamos sugerir que as células CD8⁺ específicas para P.C.I, expandidas com o tratamento do caso índice e após vacinação com BCG nos contatos domiciliares, poderiam desempenhar um papel importante no controle da infecção latente em indivíduos expostos ao *M. leprae*. Um estudo detalhado do perfil funcional das células CD8⁺ específicas para P.C.I seria de grande relevância para o entendimento da resposta imune protetora na hanseníase, com potencial aplicação no desenvolvimento de vacinas mais eficazes para o controle da doença.

Partimos, numa etapa seguinte, para a análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ produtores de IFN- γ e/ou IL-10 entre T0 e T1 nos seis contatos anteriormente avaliados. A produção de IFN- γ em resposta aos antígenos de *M. leprae* é uma maneira de se mensurar a capacidade de um indivíduo em montar uma resposta imune efetora contra o patógeno (140). Também, Sampaio e col., 1991 demonstraram que a ausência de resposta imune ao *M. leprae* entre pessoas expostas ao bacilo, avaliada através da produção de IFN- γ , poderia ser preditivo de susceptibilidade à hanseníase (103). Em outro trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo, onde indivíduos com diferentes históricos de exposição ao *M. leprae* foram analisados, observamos que a evolução da infecção latente para a doença ativa está intimamente relacionada com uma progressiva redução na produção de IFN- γ patógeno-específico por CMS em paralelo com um aumento da carga bacilar nos indivíduos infectados. Por outro lado, vários estudos tem demonstrado o aumento de células T antígeno específicas produtoras de IFN- γ após vacinação com BCG (141), (142), (143)(144). Assim,

esperávamos observar em T1 um aumento da frequência de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ IFN- γ ⁺ nos contatos em resposta à vacinação com BCG associado ao tratamento do caso índice, pelo menos em resposta ao *M. leprae*, uma vez que este compartilha muitos antígenos com BCG. Já, ao contrário das células T produtoras de IFN- γ , nossa hipótese inicial era de que pudéssemos encontrar nos contatos uma maior frequência de células T produtoras de IL-10 em T0, observando um decréscimo das mesmas ao longo do tratamento do caso índice e ou vacinação com BCG. Uma série de estudos anteriores indica um papel regulador importante da IL-10 produzida por células T CD4 não reguladoras sobre a função efetora promovida pelo IFN- γ na toxoplasmosose e leishmaniose (114), (115). Assim, imaginamos que células com fenótipo funcional similar poderiam estar contribuindo para a supressão da resposta imune patógeno-específica observada em indivíduos infectados com alta exposição ao *M. leprae*. Contudo, no grupo de voluntários analisados, não foram observadas diferenças significativas nas frequências de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-10 pré e pós-vacinação com BCG, para o tamanho atual da amostra populacional. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específico produtores de IFN- γ foram observadas por Spencer e colaboradores em 2005 em indivíduos com a forma tuberculóide da hanseníase, utilizando metodologia idêntica (124). Quanto aos linfócitos produtores de IL-10, diversos fenótipos celulares, como os linfócitos T e B reguladores, podem estar igualmente envolvidos na regulação negativa da resposta imune sofrida por esses indivíduos superexpostos ao *M. leprae* que precisam ser investigadas em análises futuras.

A fim de complementar esta análise, numa etapa seguinte, mensuramos um painel de citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento secretados por CMS em resposta aos estímulos *M. leprae*, P.CI ou P.C.II nos seis contatos inicialmente incluídos acrescidos de mais três indivíduos (C2, C3 e C9) em T0 e T1. C2 e C3 foram vacinados com BCG em T0 e apresentavam sorologia negativa e positiva pra PGL-I, respectivamente. Já o C9, à semelhança do C6, não foi vacinado em T0 porque já apresentava duas cicatrizes vacinais. Para tal, utilizamos sobrenadantes de células estimuladas por 5 dias e um kit de ensaio multiplex destinado a determinação quantitativa simultânea de 17 moléculas distintas.

De um modo geral, nossos resultados corroboram dados recentes da literatura que mostram uma produção aumentada de citocinas, quimiocinas e fatores de

crescimento por células sanguíneas de indivíduos vacinados com BCG (145), (146), (147). Estes trabalhos utilizaram ensaios que permitiram a quantificação simultânea de até 42 mediadores e mostraram a indução pela vacina de um perfil complexo que varia com a população estuda.

Foi possível observar um aumento da secreção de IFN- γ , citocina produzida por células Th1, em T1 na maioria dos contatos analisados. Este resultado era esperado, uma vez que *M. leprae* e BCG compartilham muitos antígenos e a vacinação com BCG induz em adultos uma resposta tipicamente com perfil Th1(148). Os níveis de IFN- γ aumentaram em 6 dos nove contatos em resposta ao *M. leprae*, apesar da comparação entre as medianas de T0 e T1 não se mostrarem estatisticamente diferentes. O contato C4, que já não havia respondido nas análises de frequências de células T realizadas anteriormente, também não produziu IFN- γ em resposta ao *M.leprae*. De forma interessante, o C6 e o C9, os únicos que não foram vacinados com BCG em T0, mostraram níveis de produção de IFN- γ diminuídos em T1 quando comparados com T0, sugerindo que o aumento da produção de IFN- γ observado nos outros contatos em T1 em resposta ao *M. leprae* teve essencialmente a contribuição da vacina BCG. Alguns contatos responderam com aumento de produção de IFN- γ em T1 em resposta aos dois conjuntos de peptídeos *M. leprae* específicos, reforçando o efeito adjuvante inespecífico da vacina previamente descrito (104). Ainda em relação à citocinas que caracterizam uma resposta Th1, foi interessante observar que 4 dos 7 contatos vacinados com BCG mostraram aumento pronunciado na produção de IL-12 em resposta a P.C.I, dos quais três também mostraram níveis aumentados de IFN- γ em resposta a este mesmo estímulo.

Consistente com a geração de um perfil de resposta imune Th1 induzida pela vacina BCG, foi possível observar uma diminuição da produção ou ausência de alteração nos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, citocinas clássicas do perfil Th2, em resposta ao *M. leprae* e ao P.C.I ou ao P.C.II em T1 em vários dos contatos analisados.

Citocinas características do perfil Th1 como IFN- γ e IL-12 são essenciais para a imunidade protetora contra as micobactérias (149). A geração de uma resposta Th1 pelo BCG nos contatos vacinados confirma dados anteriores e reforça a eficácia da vacina em proteger contra a forma multibacilar da hanseníase. Em um estudo de acompanhamento de contatos de pacientes com hanseníase, onde 5376 contatos foram acompanhados, Duppre e colaboradores demonstraram que a administração da vacina

BCG subsequente ao diagnóstico do caso índice foi eficiente em reduzir o risco de adoecimento entre os contatos de pacientes com hanseníase (referência). A geração de uma resposta Th1-micobactéria específica pela vacinação com BCG poderia, por sua vez, acelerar o aparecimento de sintomas em indivíduos com infecção latente PGL-I positivos. Isto poderia explicar dados recentemente publicados que indicam que os contatos com sorologia positiva para o PGL-I vacinados com BCG no diagnóstico do caso índice tem um risco maior de evoluir para a doença ativa quando comparados com os contatos com sorologia positiva para o PGL-I que não foram vacinados (150).

As citocinas pró - inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6, e as quimiocinas MCP-1 e MIP-1 β mostraram aumentos consistentes na maioria dos contatos em resposta ao *M. leprae* e a pelo menos um dos conjuntos de peptídeos específicos do *M. leprae* em T1, observando-se diferenças significativas nos níveis secretados de IL-6, MCP-1 e MIP-1 β . A produção de TNF- α mostrou uma forte similaridade com a de IFN- γ , com um perfil essencialmente idêntico entre os contatos avaliados. Esta observação pode ser um indicativo da indução pela vacinação com BCG de células T polifuncionais produzindo simultaneamente IFN- γ e TNF- α potencialmente importantes na proteção contra *M. tuberculosis* (151), (152), (138). A importância do TNF- α no controle de infecções causadas por micobactérias foi demonstrada em inúmeros trabalhos. O alto risco de reativação da tuberculose em pacientes com artrite reumatóide com tuberculose latente sob terapia com anticorpos anti-TNF- α demonstrou o papel fundamental desta citocina no controle da infecção na tuberculose humana (138). O TNF- α pode ser produzido por uma variedade de células do sistema imune, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T e apresenta múltiplas funções. Além de sua participação na ativação de mecanismos microbicidas dos macrófagos e indução de quimiocinas, o TNF- α tem sido proposto como importante mediador na formação e manutenção da integridade do granuloma (149). Na hanseníase especificamente, estudos genéticos vem mostrando uma associação entre polimorfismos no gene do TNF- α com susceptibilidade à doença *per se*, evidenciando a importância desta citocina na resposta imune protetora contra o *M. leprae* (153).

A IL-1 β é produzida principalmente por macrófagos e sua importância no controle da infecção micobacteriana foi bem demonstrada no modelo murino de tuberculose (154). Camundongos deficientes em IL-1 apresentam grande

susceptibilidade à infecção por *M. tuberculosis*, contudo o mecanismo utilizado por esta citocina para limitar o crescimento micobacteriano em animais selvagens ainda é desconhecido. Já em seres humanos, o envolvimento da IL-1 no controle da infecção pelo *M. tuberculosis* tem sido demonstrada por estudos genéticos que indicam associação entre polimorfismos nos genes IL-1 e seu receptor IL-1R e susceptibilidade à tuberculose (154). A IL-6, produzida principalmente por macrófagos e linfócitos, é fortemente induzida durante a infecção micobacteriana e tem função complexa na modulação da resposta imune a estes patógenos. A presença de IL-6 parece ser necessária na geração de uma resposta imune celular protetora anti-micobacteriana durante a vacinação/infecção (154).

As quimiocinas MCP-1 e MIP-1 β , da família CC, também mostraram aumento significativo em T1 quando comparado a T0. De um modo geral as quimiocinas tem um papel importante no recrutamento de células inflamatórias (monócitos, células dendríticas, linfócitos T e células “natural killer”) para o sítio da infecção, na formação e manutenção do granuloma e modulação da resposta imune local (155). A produção destas e outras quimiocinas durante a infecção por micobactérias, assim como sua produção aumentada em indivíduos vacinados com BCG já havia sido relatada previamente (155), (146), (145).

Também observamos diferenças significativas nos níveis dos fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF que se mostraram aumentados em T1 em resposta aos estímulos *M. leprae*-específicos P.C.I e P.C.II, respectivamente. Um aumento na produção destes hormônios em indivíduos vacinados com BCG já havia sido relatado (146), (145), (147). G-CSF é produzido por células T ativadas, macrófagos, células endoteliais e células do estroma da medula óssea e atuam nos progenitores mielóides aumentando a produção de leucócitos inflamatórios. É gerado em locais de infecção e atua como um hormônio endócrino mobilizando neutrófilos da medula repondo aqueles consumidos nas reações inflamatórias. Já o (156)GM-CSF foi originalmente descoberto por sua habilidade em estimular a diferenciação de progenitores mielóides em macrófagos e neutrófilos. Utilizando modelo murino para determinar como GM-CSF poderia alterar a infecção pulmonar pelo *Mycobacterium tuberculosis in vivo*, Szeliga e colaboradores demonstraram que GM-CSF possui um papel protetor essencial preservando a estrutura alveolar e regulando os macrófagos e as células dendríticas facilitando, assim a contenção de *M. tuberculosis* no granuloma pulmonar, entretanto,

uma regulação precisa de GM-CSF no pulmão é essencial para o controle efetivo do *M. tuberculosis*.

De forma interessante, a avaliação do contato domiciliar C6 permitiu identificar o tratamento do caso índice como fator único para o aumento das frequências de linfócitos CD4⁺ principalmente de memória central e de memória efetora respondedoras ao *M. leprae*, P.C.I e P.C.II. Este contato não recebeu a vacinação com BCG por já apresentar duas cicatrizes no diagnóstico do caso índice. Em 2008, Duppre e colaboradores demonstraram a necessidade da rotina de vacinação de todos os contatos de pacientes com hanseníase além do tratamento do caso índice, independente de uma vacinação anterior. Particularmente nesse caso, o aumento das frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ respondedoras a todos os estímulos e o aumento da secreção de citocinas com propriedades pró-inflamatórias em T1 por este contato corrobora com os dados publicados por Godal e Negassi em 1973 de que a superexposição ao *M. leprae* induz uma modulação negativa da resposta imune do hospedeiro. Entretanto, quando o caso índice é tratado e a fonte de *M. leprae* no ambiente é eliminada esses contatos recuperam a resposta imune efetora contra o *M. leprae* (52).

O aumento das citocinas, quimiocinas e dos fatores de crescimento, aliado a recuperação individual das frequências de subpopulações que naturalmente estão envolvidas na resposta imune efetora contra o *M. leprae* observada nos contatos em T1, demonstram a importância da rotina de vacinação com BCG e principalmente o tratamento do caso índice para que esses indivíduos superexpostos possam recuperar a resposta imune eficiente na eliminação do bacilo. Todavia é necessário ressaltar a heterogeneidade das respostas encontradas, demonstrando a necessidade de se expandir o grupo de indivíduos estudados. Expandir o grupo de contatos para dar continuidade ao estudo possibilitaria identificar as subpopulações celulares moduladas pelo *M. leprae* no período em que esses contatos estão superexpostos e viabilizar o desenvolvimento de estratégias que atuassem diretamente na recuperação da resposta imune efetora contra o *M. leprae*, atuando dessa forma na resolução da infecção latente, evitando a doença ativa e contribuindo para a interrupção da cadeia de transmissão do bacilo. O retorno dos contatos foi a maior limitação do estudo, a maioria deles só retorna quando já estão com sinais ativos da doença. Além disso, os contatos são convidados a vir ao ambulatório Souza Araújo somente um dia na semana (às sextas-feiras), e nós restringimos mais ainda esse grupo por recrutarmos apenas os contatos domiciliares de

pacientes multibacilares para compor o T0 com até 3 meses do início do tratamento do caso índice. Como a equipe de saúde é reduzida, muitos dos contatos são convocados quando o caso índice já possui mais de três meses de tratamento, inviabilizando o recrutamento desses indivíduos para o estudo. Ao longo dos dois anos, dez dos dezessete contatos recrutados no primeiro momento retornaram no segundo momento determinado.

Finalmente, como última etapa do trabalho, visando atender o objetivo geral do estudo, estabelecemos um protocolo de isolamento de células presentes na lesão cutânea lepromatosa de forma que permita sua futura caracterização fenotípica. Nas duas biopsias analisadas até o momento, observamos uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ muito superior aos linfócitos T CD4⁺, corroborando com os dados publicados previamente na literatura (157). Caracterizar o perfil fenotípico e funcional dessas células através da análise de fatores de transcrição, padrões de metilação do DNA, moléculas de superfície e citocinas nos possibilitará entender o papel dos linfócitos T CD8⁺ encontrados em alta frequência na lesão na modulação negativa da resposta imune celular *M. leprae* específica.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo concluímos que a revacinação com BCG de contatos domiciliares de pacientes multibacilares contribui para o aumento das frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória central e de memória efetora que reconhecem tanto antígenos privativos do *M. leprae* como compartilhados com BCG. O único contato não revacinado com BCG, por já apresentar duas cicatrizes vacinais, também mostrou aumento similar das frequências de células T CD4⁺ e CD8⁺ micobactéria-específicas, reforçando a ideia de que a superexposição ao *M. leprae* vivo modula negativamente a resposta imune, e que o tratamento do caso índice igualmente contribui para a recuperação da imunidade celular antígeno-específica nestes indivíduos.

Os dados obtidos também sugerem uma contribuição importante das células CD8⁺ na imunidade protetora contra o *M. leprae*. Na maioria dos contatos analisados (cinco entre seis) observou-se aumento da frequência de linfócitos CD8⁺ específicos para um conjunto de 4 peptídeos nonâmeros privativos do *M. leprae*, incluindo o peptídeo p69. Num estudo anterior, células CD8⁺ p69-específicas geradas *in vivo* após vacinação com o peptídeo mostraram capacidade microbicida contra células infectadas com micobactéria.

Detectamos variações nas frequências de linfócitos T CD4⁺ e/ou CD8⁺ produtores de IFN- γ ou IL-10 *M. leprae* específicas no sangue periférico dos contatos. Entretanto, com o tamanho atual da amostragem populacional não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre tempos avaliados.

Também observamos que, após cultivo *in vitro* por 5 dias, as células mononucleares do sangue periférico da maioria dos contatos vacinados com BCG produziram níveis aumentados de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ e IL-12), assim como TNF- α , em resposta ao *M. leprae* e ao menos um dos conjuntos de peptídeos específicos do *M. leprae*. Além disso, um aumento significativo foi observado na produção de IL-6, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 e MIP-1 β . Já os contatos não vacinados mostraram comportamento irregular e heterogêneo com relação à produção destes mediadores ao longo do tratamento do caso índice. Estes dados se encontram em concordância com dados de vacinação com BCG publicados em outros grupos populacionais.

Finalmente, a identificação por citometria de fluxo de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ ou IL-10 a partir da lesão cutânea de pacientes multibacilares confirmou o acúmulo nestas lesões de linfócitos T CD8⁺. O fenótipo funcional dessas células será avaliado em uma próxima etapa do trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Opromolla D. Noções de hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, SP.; 1981.
3. 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.
4. Opromolla D. Noções de Hansenologia. Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato. Bauru, SP.; 2000.
5. Pönnighaus JM, Fine PE, Sterne JA, Bliss L, Wilson RJ, Malema SS, et al. Incidence rates of leprosy in Karonga District, northern Malawi: patterns by age, sex, BCG status and classification. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* 1994 Mar;62(1):10–23.
6. Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre 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):e1013.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Santos AR, Suffys PN, Vanderborgh 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Boldt ABW, Sanchez MIN, Stahlke ERS, Steffensen R, Thiel S, Jensenius JC, et al. Susceptibility to leprosy is associated with M-ficolin polymorphisms. *J Clin Immunol*. 2013 Jan;33(1):210–9.
15. WHO. Expert Comitee on Leprosy. Seventh Report. World Health Organization. 1998.
16. WHO - Prevalence of leprosy [Internet]. 2013. Available from: http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2013.pdfcc.
17. Ministério da Saúde. [Internet]. [cited 2013 Jun 17]. Available from: portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_0910112010.pdf
18. Ministério da Saúde [Internet]. 2013 [cited 2013 Jun 17]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cap_9_saude_brasil_2013.pdf
19. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde Relatório de Situação. Ministério da Saúde [Internet]. [cited 2013 Jun 18]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_rj_5ed.pdf
20. Ignotti, E P R. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: Análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. *Secr Vigilância Em Saúde Ministério Saude*. 2010. p. 185–201.
21. Secretaria de vigilância em saúde-Ministério da Saúde. 2011.
22. Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. 2006 Mar;77(1):5–24.
23. Rees R J W. The microbiology of leprosy; in *Leprosy* (ed.) R C Hastings (London: Churchill Livingstone) pp 31-52. 1985.
24. Shepard CC. THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE. *J Exp Med*. 1960 Sep 1;112(3):445–54.
25. Lloyd GM, Draper P. Separation of *Mycobacterium leprae* from contamination with armadillo-liver-derived “pigment” particles. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1986 Dec;54(4):578–83.
26. 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.
27. Rees RJ, Waters MF, Weddell AG, Palmer E. Experimental lepromatous leprosy. *Nature*. 1967 Aug 5;215(5101):599–602.

28. Colston MJ, Hilson GR. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. 1976 Jul 29;262(5567):399–401.
29. Katoch VM. Molecular techniques for leprosy: present applications and future perspectives. *Indian J Lepr*. 1999 Mar;71(1):45–59.
30. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol*. 2005 Mar;54(Pt 3):235–42.
31. 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.
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.
33. 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.
34. Young DB, Khanolkar SR, Barg LL, Buchanan TM. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*. 1984 Jan;43(1):183–8.
35. 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.
36. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8):REVIEWS1023.
37. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1007–11.
38. Jopling W, McDougall A. AC. *Handbook of leprosy*. 2. ed. 1988.
39. *Guia para o controle da hanseníase*-Ministério da saúde. Brasília; 2002.
40. *Guia de procedimentos e técnicos-Baciloscopia em hanseníase*/Ministério da saúde. 2010.
41. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull*. 2006;77-78:103–21.
42. Buhner-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.

43. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):1991–5.
44. Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol.* 2006 Sep;44(9):3154–9.
45. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209–19.
46. Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1998 Dec;40(6):363–70.
47. Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr.* 1999 Mar;71(1):61–7.
48. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2008 Sep;8(5):627–31.
49. 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.
50. Silva CAM, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013 Jul;81(7):2645–59.
51. 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 Negl Trop Dis.* 2012;6(4):e1616.
52. Godal T, Negassi K. Subclinical infection in leprosy. *Br Med J.* 1973 Sep 15;3(5880):557–9.
53. 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.
54. 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.
55. Bhurer-Sékula S. Use of ML dispartick as a tool o classify paiens.

56. 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.
57. Kaplan G, Van Voorhis WC, Sarno EN, Nogueira N, Cohn ZA. The cutaneous infiltrates of leprosy. A transmission electron microscopy study. *J Exp Med*. 1983 Oct 1;158(4):1145–59.
58. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. In situ characterization of T lymphocyte subsets in leprosy granulomas. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1982 Sep;50(3):361–2.
59. Modlin RL, Hofman FM, Meyer PR, Sharma OP, Taylor CR, Rea TH. In situ demonstration of T lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: leprosy, rhinoscleroma and sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 1983 Mar;51(3):430–8.
60. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 1983 Feb;8(2):182–9.
61. Modlin RL, Hofman FM, Horwitz DA, Husmann LA, Gillis S, Taylor CR, et al. In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1984 Jun;132(6):3085–90.
62. Modlin RL, Bakke AC, Vaccaro SA, Horwitz DA, Taylor CR, Rea TH. Tissue and blood T-lymphocyte subpopulations in erythema nodosum leprosum. *Arch Dermatol*. 1985 Feb;121(2):216–9.
63. Van Voorhis WC, Kaplan G, Sarno EN, Horwitz MA, Steinman RM, Levis WR, et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N Engl J Med*. 1982 Dec 23;307(26):1593–7.
64. Kato H, Sanada K, Koseki M, Ozawa T. [Identification of lymphocyte subpopulations in cutaneous lesions of leprosy]. *Nihon Rai Gakkai Zasshi*. 1983 Sep;52(3):126–32.
65. Sarno EN, Kaplan G, Alvaranga F, Nogueira N, Porto JA, Cohn ZA. Effect of treatment on the cellular composition of cutaneous lesions in leprosy patients. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1984 Dec;52(4):496–500.
66. Longley J, Haregewoin A, Yemaneberhan T, Warndorff van Diepen T, Nsibami J, Knowles D, et al. In vivo responses to Mycobacterium leprae: antigen presentation, interleukin-2 production, and immune cell phenotypes in naturally occurring leprosy lesions. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 1985 Sep;53(3):385–94.
67. Nilsen R, Mshana RN, Negesse Y, Menigistu G, Kana B. Immunohistochemical studies of leprosy neuritis. *Lepr Rev*. 1986 Dec;57 Suppl 2:177–87.
68. Bloom BR, Modlin RL, Salgame P. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:453–88.

69. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. 1994 Oct;191(4-5):378–87.
70. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):279–82.
71. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):277–9.
72. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*. 1995 Sep;86(1):97–103.
73. Demangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol*. 2000 Aug;78(4):318–24.
74. 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.
75. Maeda Y, Gidoh M, Ishii N, Mukai C, Makino M. Assessment of cell mediated immunogenicity of *Mycobacterium leprae*-derived antigens. *Cell Immunol*. 2003 Mar;222(1):69–77.
76. 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.
77. 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.
78. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol*. 2007 Jan;37(1):14–6.
79. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol*. 2006 Feb;79(2):285–93.
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.

81. 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.
82. 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.
83. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009 May;30(5):626–35.
84. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*. 2009 Jul;10(7):689–95.
85. Zhou R, Horai R, Silver PB, Mattapallil MJ, Zárate-Bladés CR, Chong WP, et al. The living eye “disarms” uncommitted autoreactive T cells by converting them to Foxp3(+) regulatory cells following local antigen recognition. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Feb 15;188(4):1742–50.
86. McLachlan JB, Catron DM, Moon JJ, Jenkins MK. Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin. *Immunity*. 2009 Feb 20;30(2):277–88.
87. Azukizawa H, Döhler A, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M, Malissen B, et al. Steady state migratory RelB⁺ langerin⁺ dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1420–34.
88. Vukmanovic-Stejic M, Agius E, Booth N, Dunne PJ, Lacy KE, Reed JR, et al. The kinetics of CD4⁺Foxp3⁺ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response in vivo. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3639–50.
89. Schwele S, Fischer AM, Brestrich G, Wlodarski MW, Wagner L, Schmueck M, et al. Cytomegalovirus-specific regulatory and effector T cells share TCR clonality--possible relation to repetitive CMV infections. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2012 Mar;12(3):669–81.
90. Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 15;102(11):4103–8.
91. Huang H, Dawicki W, Zhang X, Town J, Gordon JR. Tolerogenic dendritic cells induce CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation from CD4⁺CD25⁻/loFoxp3⁻ effector T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Nov 1;185(9):5003–10.
92. Long SA, Rieck M, Tatum M, Bollyky PL, Wu RP, Muller I, et al. Low-dose antigen promotes induction of FOXP3 in human CD4⁺ T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Oct 1;187(7):3511–20.

93. Shalev I, Schmelzle M, Robson SC, Levy G. Making sense of regulatory T cell suppressive function. *Semin Immunol*. 2011 Aug;23(4):282–92.
94. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol*. 2009 Oct;21(10):1105–11.
95. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353–62.
96. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221–41.
97. Van de Veen W, Stanic B, Yaman G, Wawrzyniak M, Söllner S, Akdis DG, et al. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Apr;131(4):1204–12.
98. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41–101.
99. Wenner CA, Güler ML, Macatonia SE, O’Garra A, Murphy KM. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Feb 15;156(4):1442–7.
100. Akkoc T, de Koning PJA, Rückert B, Barlan I, Akdis M, Akdis CA. Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Mar;121(3):652–658.e1.
101. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kushner P, Granelli-Piperno A, et al. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. *J Exp Med*. 1983 Dec 1;158(6):2165–70.
102. Godal T. Leprosy immunology--some aspects of the role of the immune system in the pathogenesis of disease. *Lepr Rev*. 1984 Dec;55(4):407–14.
103. 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.
104. 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.
105. 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.

106. Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med.* 1992 Jun 1;175(6):1729–37.
107. Casanova J-L, Abel L. Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:581–620.
108. Nagalakshmi ML, Murphy E, McClanahan T, de Waal Malefyt R. Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol.* 2004 May;4(5):577–92.
109. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991 Nov 1;174(5):1209–20.
110. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1995 May 1;154(9):4341–50.
111. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.
112. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 May 1;180(9):5771–7.
113. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012 Nov;42(11):2925–36.
114. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007 Feb 19;204(2):285–97.
115. Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, et al. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 2007 Feb 19;204(2):273–83.
116. 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.
117. 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.
118. 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.
119. caderno da atenção básica- nº 21. Ministério da saúde. 2007.

120. Duppre 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.
121. Ministério da saúde. 2006.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. Payne SN, Draper P, Rees RJ. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* 1982 Jun;50(2):220–1.
127. Douglas JT, Cellona RV, Fajardo TT Jr, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Sep;11(5):897–900.
128. Moura RS de, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41 Suppl 2:11–8.
129. Goulart LR, Goulart IMB. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res.* 2009 Feb;301(2):123–37.
130. 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.
131. Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science.* 2000 Oct 6;290(5489):92–7.
132. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B, Hoy A, Ponath P, Qin S, et al. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol.* 1999 Jun;29(6):2037–45.

133. Patard JJ, Guillé F, Lobel B, Abbou CC, Chopin D. [Current state of knowledge concerning the mechanisms of action of BCG]. *Progrès En Urol J Assoc Française Urol Société Française Urol*. 1998 Jun;8(3):415–21.
134. Stenger S. Cytolytic T cells in the immune response to mycobacterium tuberculosis. *Scand J Infect Dis*. 2001;33(7):483–7.
135. Stenger S, Mazzaccaro RJ, Uyemura K, Cho S, Barnes PF, Rosat JP, et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science*. 1997 Jun 13;276(5319):1684–7.
136. Stegelmann F, Bastian M, Swoboda K, Bhat R, Kiessler V, Krensky AM, et al. Coordinate expression of CC chemokine ligand 5, granulysin, and perforin in CD8+ T cells provides a host defense mechanism against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Dec 1;175(11):7474–83.
137. Bruns H, Meinken C, Schauenberg P, Härter G, Kern P, Modlin RL, et al. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8+ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1167–77.
138. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwieterman WD, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med*. 2001 Oct 11;345(15):1098–104.
139. Geluk A, van den Eeden SJF, Dijkman K, Wilson L, Kim HJ, Franken KLMC, et al. ML1419c peptide immunization induces *Mycobacterium leprae*-specific HLA-A*0201-restricted CTL in vivo with potential to kill live mycobacteria. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Aug 1;187(3):1393–402.
140. Sarno EN, Espinosa M, Sampaio EP, Vieira LM, Figueiredo AA, Miranda CF, et al. Immunological responsiveness to *M. leprae* and BCG antigens in 98 leprosy patients and their household contacts. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al*. 1988;21(3):461–70.
141. Abel B, Tameris M, Mansoor N, Gelderbloem S, Hughes J, Abrahams D, et al. The novel tuberculosis vaccine, AERAS-402, induces robust and polyfunctional CD4+ and CD8+ T cells in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jun 15;181(12):1407–17.
142. Mansoor N, Scriba TJ, de Kock M, Tameris M, Abel B, Keyser A, et al. Infant HIV-1 Infection Severely Impairs the Bacille Calmette-Guerin Vaccine-Induced Immune Response. *J Infect Dis*. 2009 Apr 1;199(7):982–90.
143. Tena-Coki NG, Scriba TJ, Peteni N, Eley B, Wilkinson RJ, Andersen P, et al. CD4 and CD8 T-cell responses to mycobacterial antigens in African children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Jul 1;182(1):120–9.
144. Hawkrigde T, Scriba TJ, Gelderbloem S, Smit E, Tameris M, Moyo S, et al. Safety and immunogenicity of a new tuberculosis vaccine, MVA85A, in healthy adults in South Africa. *J Infect Dis*. 2008 Aug 15;198(4):544–52.

145. 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. *J Infect Dis.* 2011 Oct 1;204(7):1075–85.
146. Lalor MK, Smith SG, Floyd S, Gorak-Stolinska P, Weir RE, Blitz R, et al. Complex cytokine profiles induced by BCG vaccination in UK infants. *Vaccine.* 2010 Feb 10;28(6):1635–41.
147. 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 Immunol.* 2010;11:35.
148. 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.
149. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:475–527.
150. 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 Negl Trop Dis.* 2012;6(6):e1711.
151. Beveridge NER, Price DA, Casazza JP, Pathan AA, Sander CR, Asher TE, et al. Immunisation with BCG and recombinant MVA85A induces long-lasting, polyfunctional Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ memory T lymphocyte populations. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37(11):3089–100.
152. Soares AP, Kwong Chung CKC, Choice T, Hughes EJ, Jacobs G, van Rensburg EJ, et al. Longitudinal changes in CD4(+) T-cell memory responses induced by BCG vaccination of newborns. *J Infect Dis.* 2013 Apr;207(7):1084–94.
153. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol.* 2011 May;6(5):533–49.
154. Cooper AM, Mayer-Barber KD, Sher A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. *Mucosal Immunol.* 2011 May;4(3):252–60.
155. Mendez-Samperio P, Trejo A, Perez A. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Induces CCL5 Secretion via the Toll-Like Receptor 2-NF- κ B and Jun N-Terminal Kinase Signaling Pathways. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2008 Feb;15(2):277–83.
156. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007 Apr 15;178(8):5245–52.

157. Mehra V, Modlin RL. T-lymphocytes in leprosy lesions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;155:97–109.

8. ANEXOS

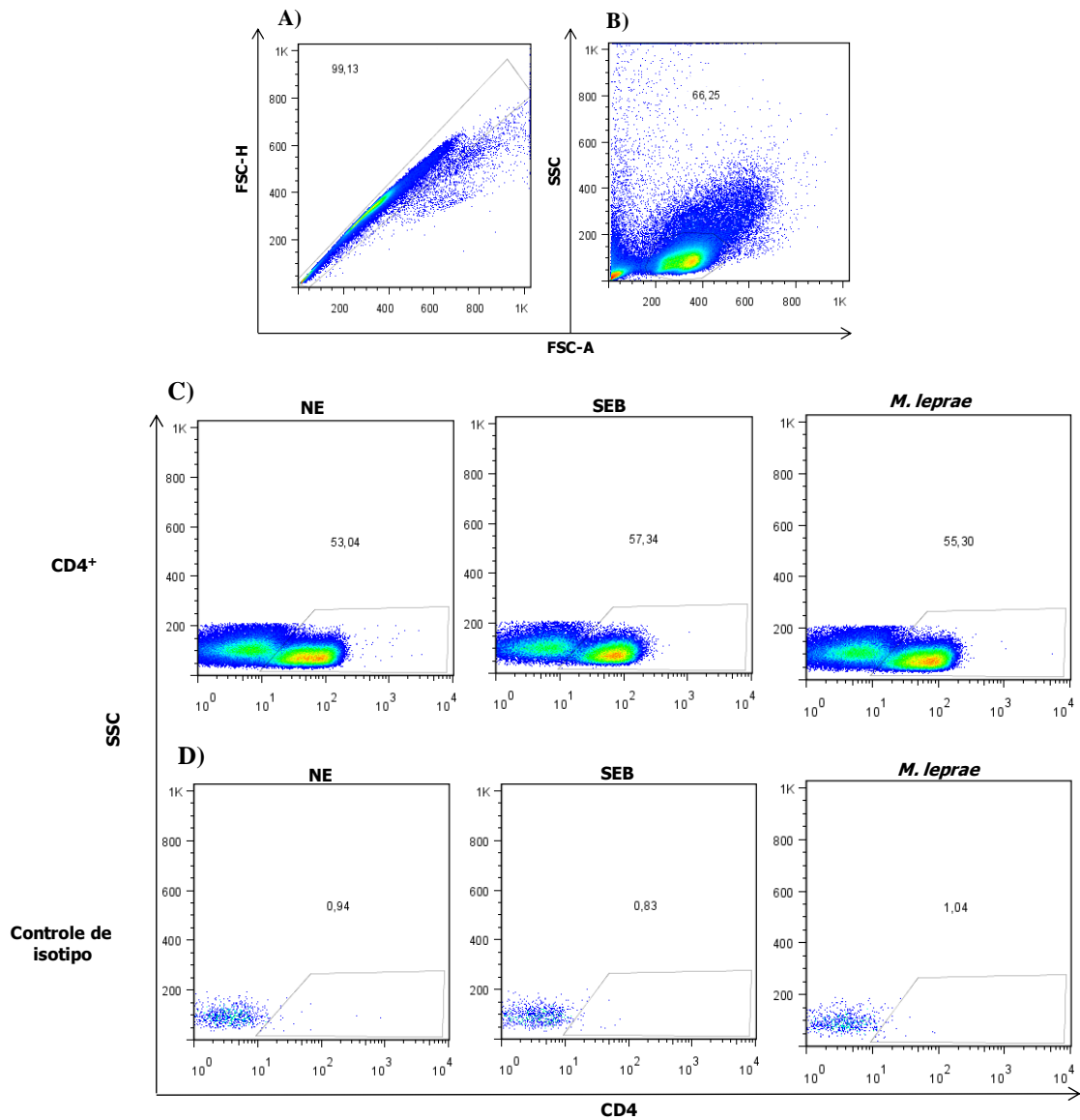


Figura 8.1. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. **B)** Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **C)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **D)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD4⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

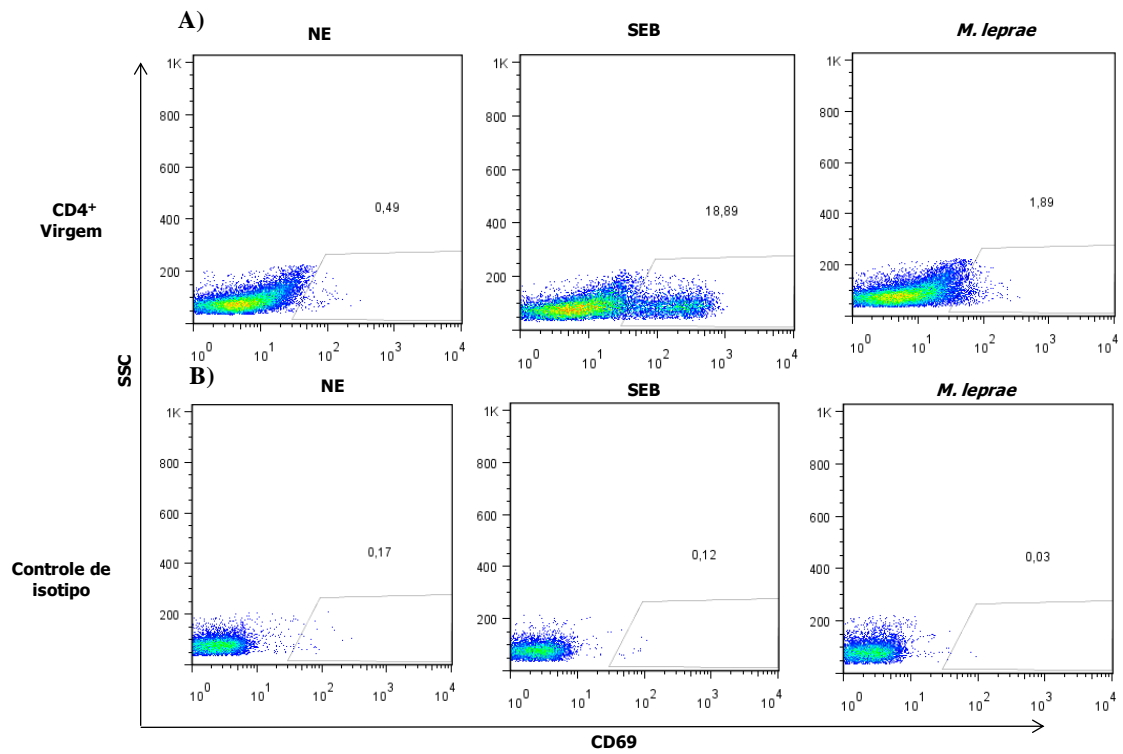


Figura 8.2. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ Virgens. **A)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ Virgem na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD4⁺ Virgem na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

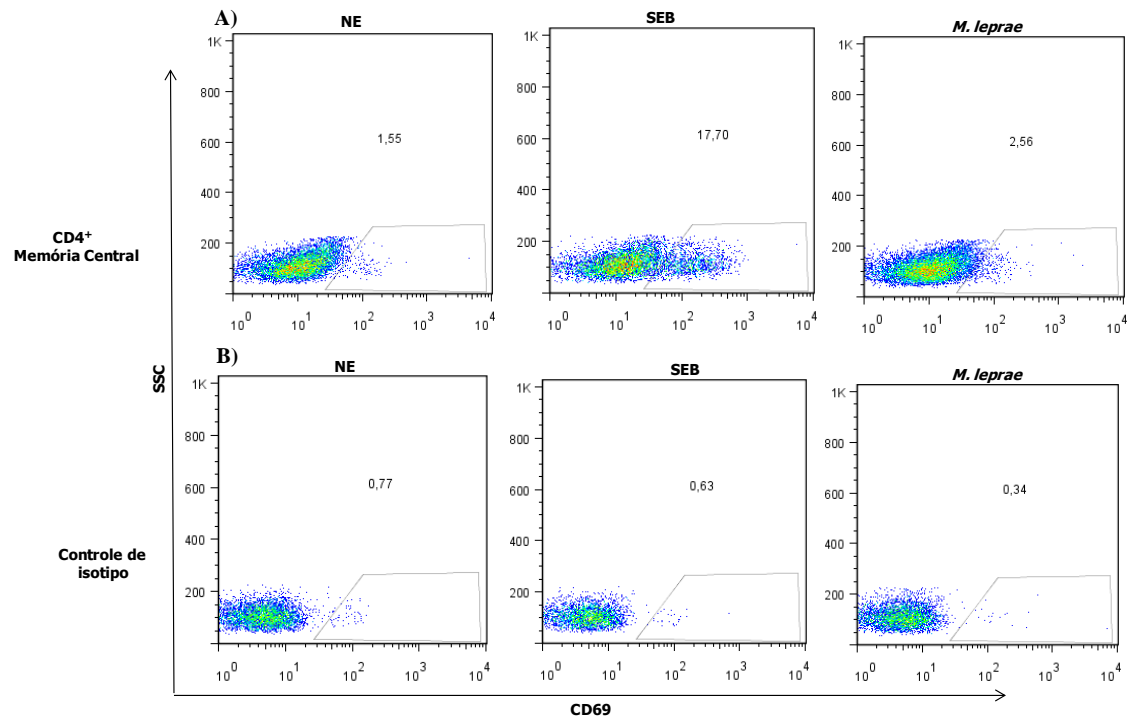


Figura 8.3. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ de Memória Central. **A)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ de Memória Central na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD4⁺ de Memória Central na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

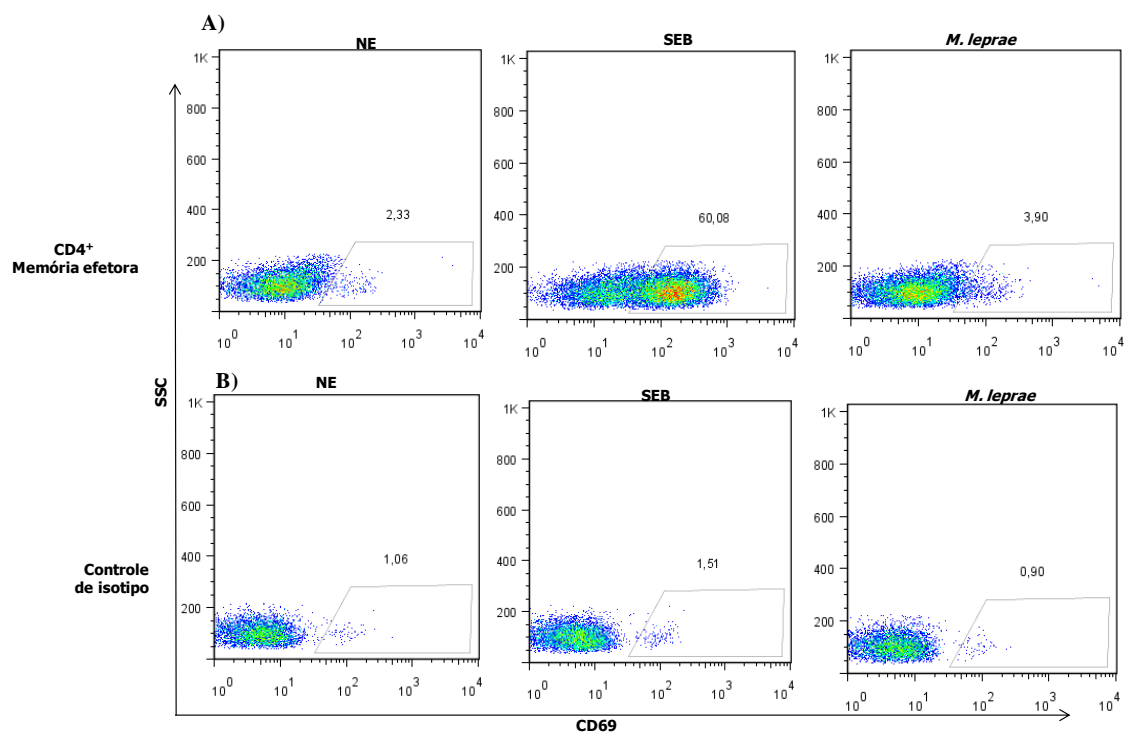


Figura 8.4. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ de Memória Efetora. A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ de Memória Efetora na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. B) Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD4⁺ de Memória Efetora na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. NE- Não estimulado, SEB- Enterotoxina B de *S. aureus*.

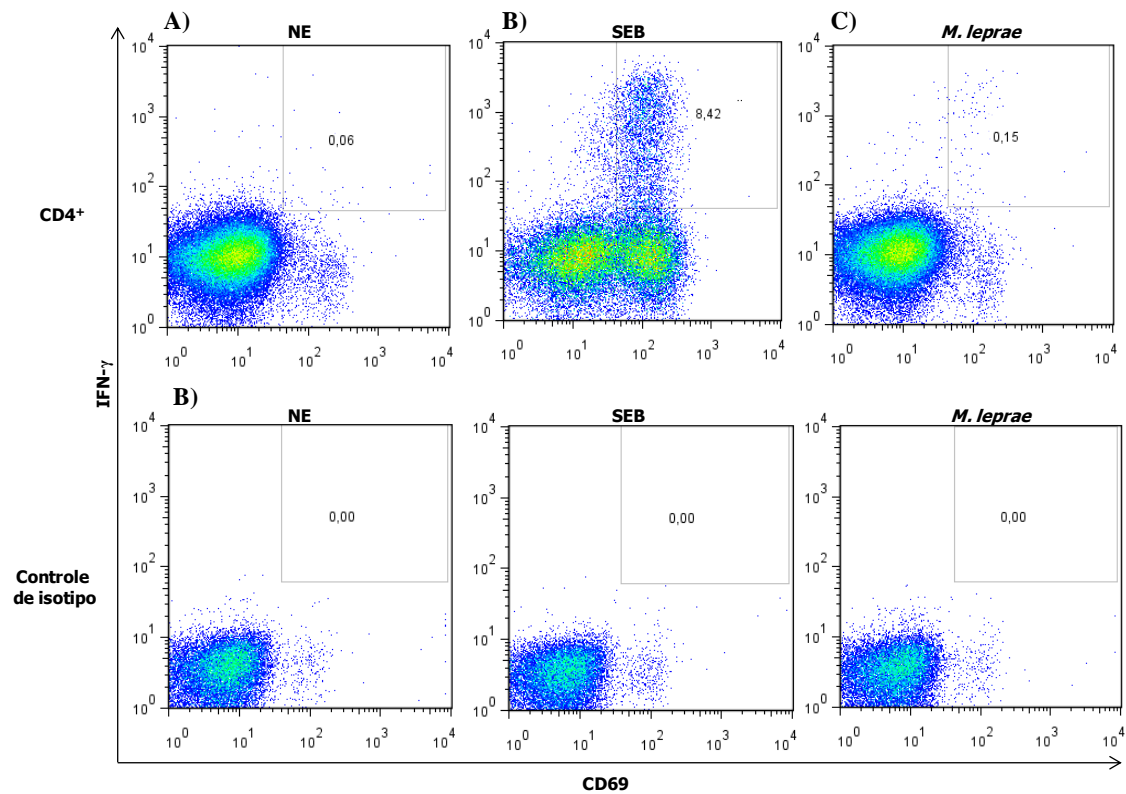


Figura 8.5. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺. **A)** Frequência de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD4⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** enteroxina B de *S. aureus*.

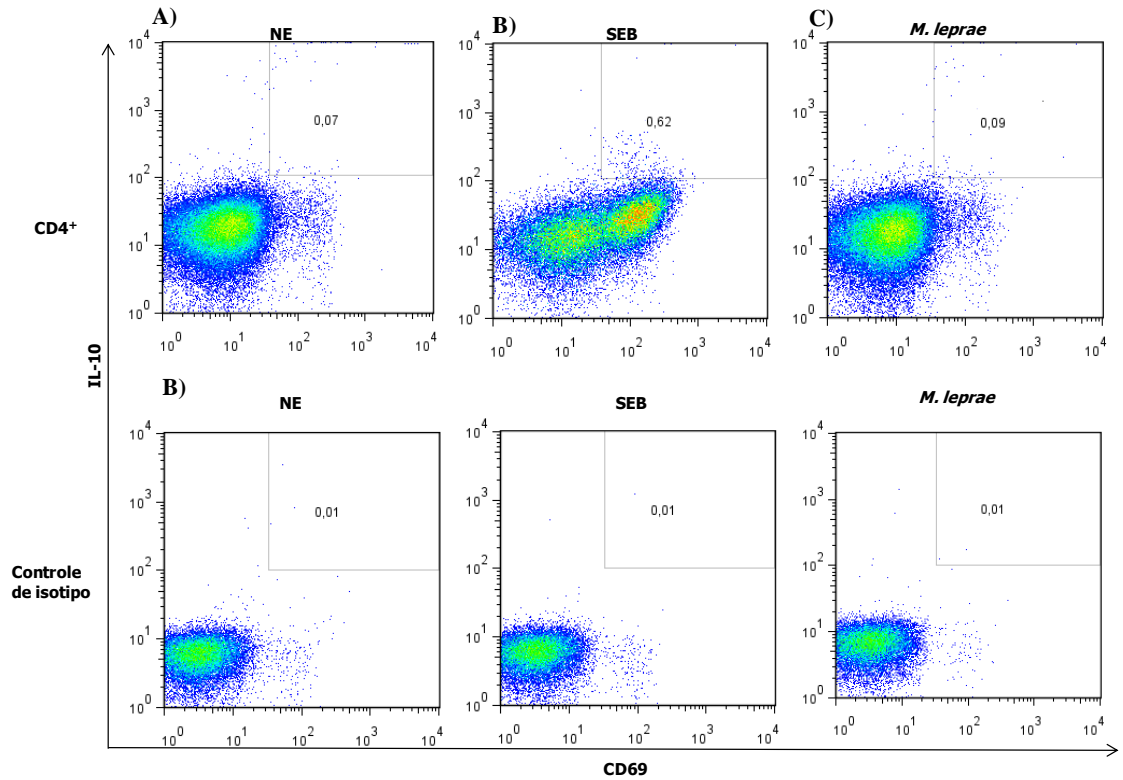


Figura 8.6. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD4⁺ IL-10⁺. A) Frequência de linfócitos T CD4⁺ IL-10⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. B) Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD4⁺ IL10⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE**- Não estimulado, **SEB**- Enterotoxina B de *S. aureus*.

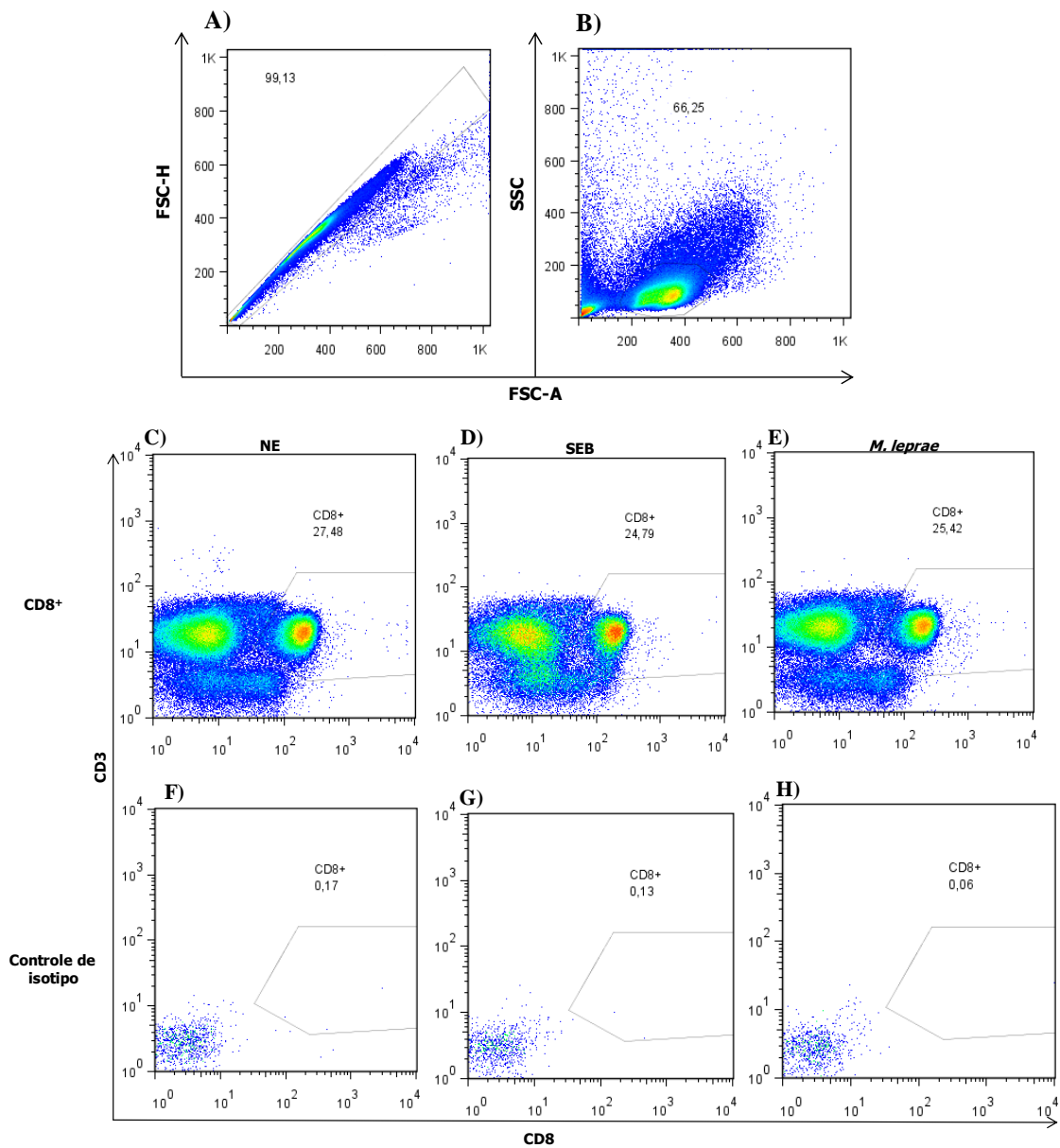


Figura 8.7. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD8⁺. **A)** Exclusão de células aglomeradas utilizando os parâmetros FSC-A x FSC-H. **B)** Identificação de linfócitos T utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A. **C)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **D)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD8⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

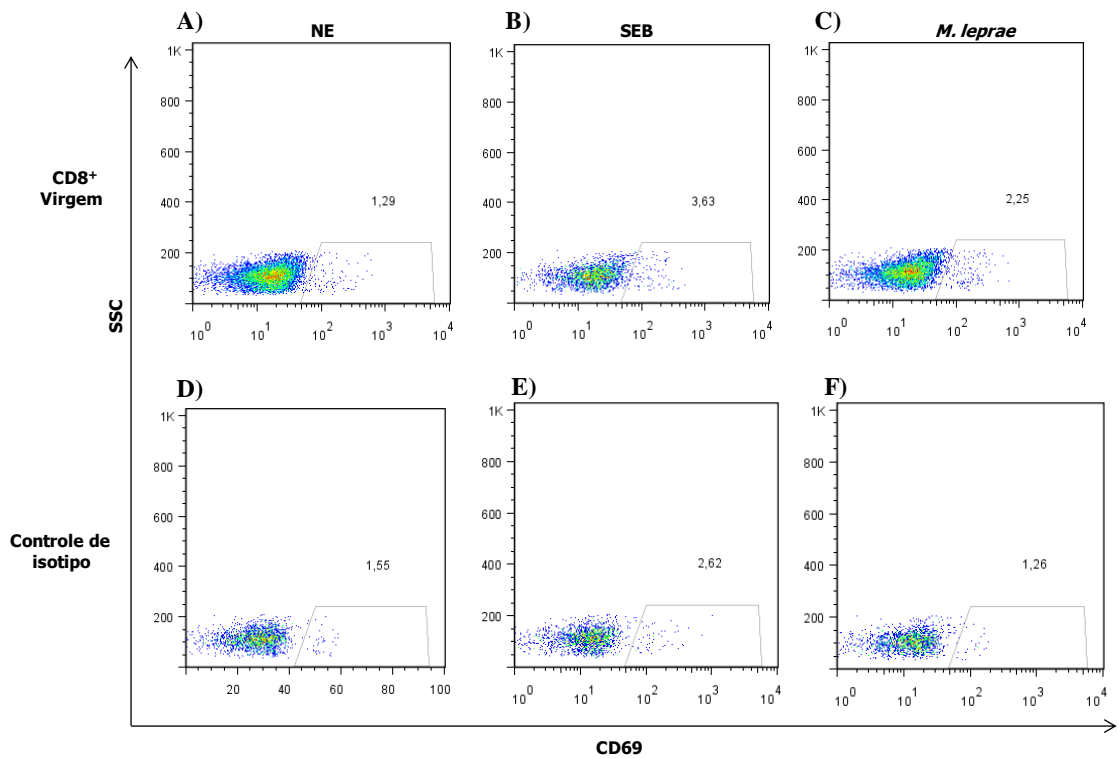


Figura 8.8. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD8⁺ Virgens. **A)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ Virgem na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD8⁺ Virgem na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

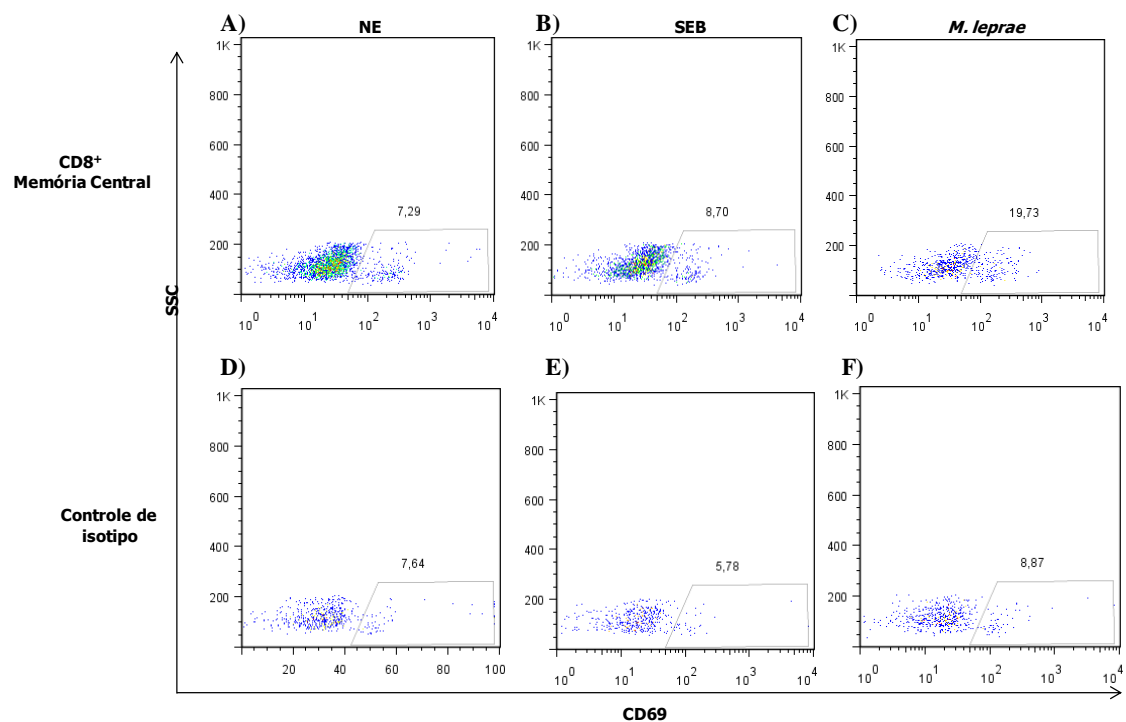


Figura 8.9. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD8⁺ de Memória Central. **A)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ de Memória Central na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD8⁺ de Memória Central na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.

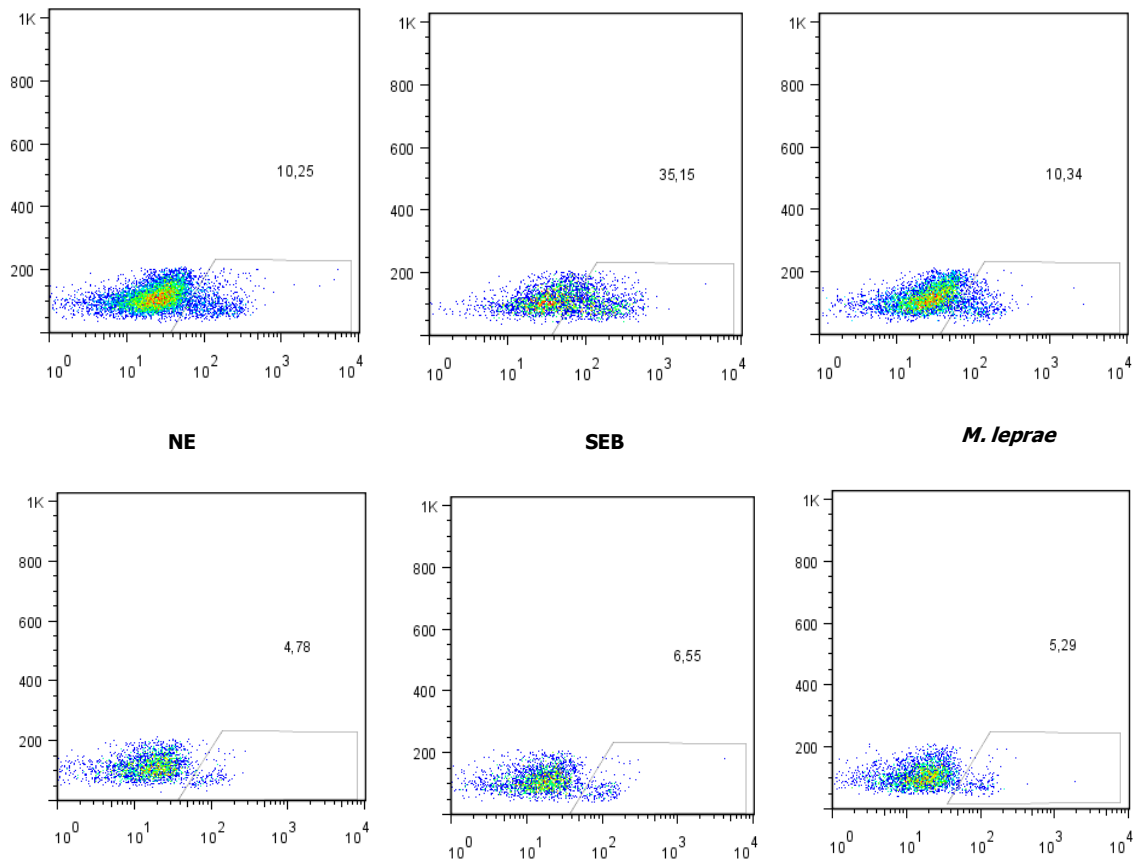


Figura 8.10. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD8⁺ de Memória Efetora. A) Frequência de linfócitos T CD8⁺ de Memória Efetora na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD8⁺ de Memória Efetora na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** enteroxina B de *S. aureus*.

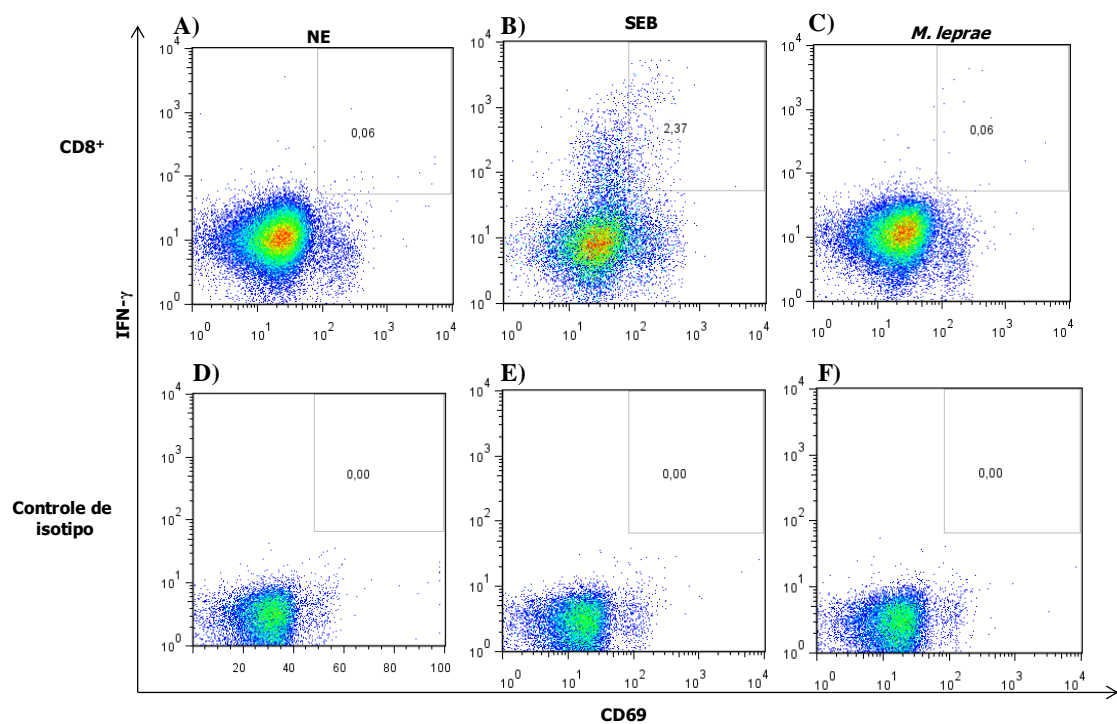


Figura 8.11. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺. A) Frequência de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. B) Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD8⁺ IFN- γ ⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. NE- Não estimulado, SEB- Enterotoxina B de *S. aureus*.

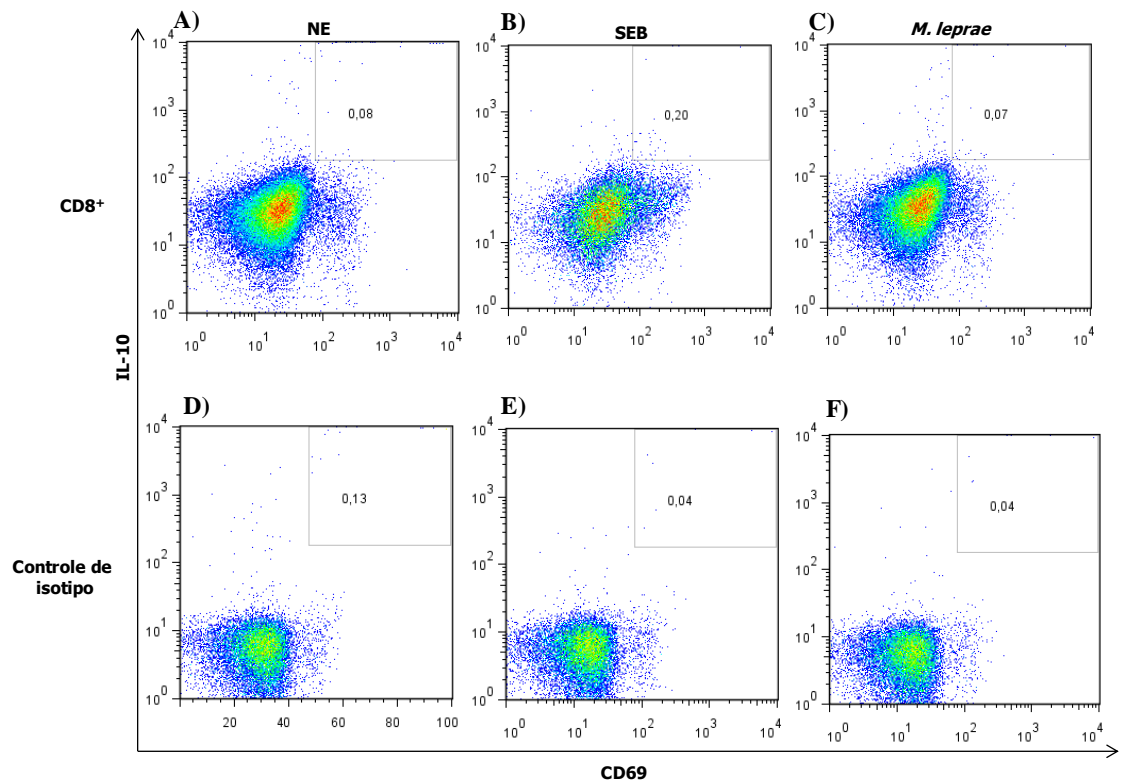


Figura 8.12. Sequência de análises por citometria de fluxo para a determinação linfócitos CD8⁺ IL-10⁺. **A)** Frequência de linfócitos T CD8⁺ IL-10⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **B)** Controle de isotipo para a frequência de linfócitos T CD8⁺ IL10⁺ na ausência de estímulo, em resposta ao SEB e *M. leprae*. **NE-** Não estimulado, **SEB-** Enterotoxina B de *S. aureus*.