



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MÁRCIO BEZERRA SANTOS

**RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium leprae* E
APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE COMO PERSPECTIVA PARA
O DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA PROGNÓSTICO E
IMUNOPROFILAXIA**

**ARACAJU
2017**

MÁRCIO BEZERRA SANTOS

**RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium leprae* E
APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE COMO PERSPECTIVA PARA
O DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA PROGNÓSTICO E
IMUNOPROFILAXIA**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau
de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Amélia Maria Ribeiro
de Jesus

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Bane
Correia

**ARACAJU
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237r Santos, Márcio Bezerra
Resposta imune a antígenos de *Mycobacterium leprae* e
apresentação clínica da hanseníase como perspectiva para o
desenvolvimento de ferramentas para prognóstico e
imunoprofilaxia / Márcio Bezerra Santos ; orientadora Amélia
Maria Ribeiro de Jesus. – Aracaju, 2017.
153 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, 2017.

1. Hanseníase. 2. Células T. 3. Antígenos. 4. Resposta imune. I.
Jesus, Amélia Maria Ribeiro de, orient. II. Título.

CDU 616-002.73

MÁRCIO BEZERRA SANTOS

**RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium leprae* E
APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE COMO PERSPECTIVA PARA
O DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA PROGNÓSTICO E
IMUNOPROFILAXIA**

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Sergipe como requisito parcial à obtenção do
grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovado em: 24 de abril de 2017.

Presidenta: Profa. Dra. Amélia Ribeiro de Jesus - UFS

1º Examinador: Prof. Dr. Malcolm Scott Duthie - IDRI

2º Examinador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida - UFS

3º Examinador: Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres - UFS

4º Examinador: Profa. Dra. Priscila Lima dos Santos - UFS

EPÍGRAFE

“O conhecimento científico é como um céu estrelado que ainda carece de muitos corpos celestes. Cada conhecimento que você produz é como uma estrela que você coloca neste céu e contribui, desta forma, com o universo da sabedoria.”

Amélia Ribeiro de Jesus, 2013

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho àqueles que são vítimas de uma sociedade injusta e desigual, às vítimas do egoísmo, da insensibilidade humana e de todas as formas de preconceito. Àqueles que padecem de tantas injúrias sociais, físicas ou mentais. Àqueles a quem o conhecimento possa trazer esperança e a possibilidade de melhorias na qualidade de vida e, sobretudo, para o real avanço da ciência e sociedade.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Amélia Ribeiro de Jesus. Por ter acreditado em mim, por ter me aceitado como aluno de doutorado e, dessa forma, ter me permitido seguir na carreira acadêmica. Sou imensamente grato pelos tantos momentos de orientação, ensinamentos e risadas. Agradeço também pelos conselhos e sobretudo, pela amizade que construímos ao longo desses 4 anos. Sua sabedoria e entusiasmo são contagiantes. Amélia é inspiração para quem ama a ciência. É uma cientista brilhante, uma professora memorável e uma mulher íntegra, altruísta que traz luz e alegria aonde quer que vá.

Ao chefe do Laboratório de Biologia Molecular, Professor Dr. Roque Pacheco de Almeida. Seu exemplo de médico, professor e cientista é deveras modelo de inspiração. Seu empenho, sua coragem e sua dedicação pelo progresso da ciência e por melhorias na saúde da população em nossa região é exemplo para todos. Muito obrigado por tudo, meu caro professor.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Cristiane Bane Correia. Obrigado pela colaboração primordial para as análises de citometria de fluxo. Suas ideias, experiência e conhecimento científico foram fundamentais para o sucesso desse trabalho. Sou muito grato por todo apoio e pela amizade que construímos nesse período. Nossa parceria será duradoura.

À professora Dra. Tatiana Rodrigues de Moura, que muito contribuiu com ideias, sugestões e orientações durante o desenvolvimento desta tese. Sou imensamente grato por ter me levado ao Laboratório de Biologia Molecular (LBM) e pela bela amizade que permanece desde o meu mestrado.

Aos amigos do grupo de pesquisa em Hanseníase, especialmente à Daniela Teles de Oliveira, Rodrigo Anselmo Cazzaniga, Marise do Vale Simon, Mônica Barrios e aos alunos do PIBIC (Crisuellen Varjão, Alex Ferreira e Nancy Santos Bio). Agradeço pela colaboração em todas as quintas-feiras realizando as coletas no ambulatório de dermatologia. Mas também pelo laço de amizade que firmamos nesses anos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Luana Serafim, Fabrícia Alvisi, Roseane Nunes, Meirielly Lima, Lucas Magalhães, Diego Tanajura e Nalu Peres. De modo especial, agradeço à Micheli Barbosa, Aline Barreto e Priscila Lima por todo apoio durante a realização dos experimentos dessa tese. A colaboração de vocês foi essencial para a conclusão da pesquisa.

À equipe do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário (HU-UFS). Agradeço à Lenise Albuquerque, Jonnia Sherlock, Enfermeira Kátia e aos demais residentes de dermatologia pelo apoio fundamental na identificação e avaliação clínica dos pacientes que participaram desse estudo.

Ao Infectious Diseases Research Institute (IDRI). Agradeço ao chefe do IDRI, Dr. Steven Reed e ao Dr. Malcolm Scott Duthie pela colaboração firmada entre IDRI e o LBM e pelo fornecimento dos antígenos bruto e recombinantes de *Mycobacterium leprae*. Agradeço também por terem me aceitado no IDRI para realização do meu Doutorado Sanduíche. Agradeço de modo especial ao Dr. Malcolm Duthie pela supervisão e orientação durante minha experiência nos laboratórios do IDRI. Seu conhecimento e rigor científico contribuíram sobremaneira para minha formação enquanto cientista e pesquisador.

Aos pacientes com hanseníase e controles contactantes que participaram da pesquisa. A todos vocês: meu muito obrigado.

À CAPES, que através do Projeto de Incentivo à Pesquisa em Parasitologia, coordenado pela Profa. Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, pela concessão da bolsa para a realização do doutorado sanduíche no IDRI.

Aos meus pais, Mileno (*in memoriam*) e Lenilda, por toda educação, incentivo e amor. Agradeço de modo especial à minha mãe, que como educadora em essência e mesmo ante todas as adversidades, buscou incansavelmente investir e prover uma educação de qualidade para os seus filhos. Você sempre soube que este era o melhor caminho para o desenvolvimento, a mudança e a formação de pessoas honestas, responsáveis, compromissadas e determinadas. A senhora sabia, sem sombra de dúvidas, que a educação era fundamental para enfrentar e conquistar o mundo. Muito obrigado por tudo!

Ao meu irmão (Maciel), à minha cunhada (Janine Oliveira), ao meu sobrinho (João Lucas) e a todos os meus parentes que sempre me incentivaram e foram entusiastas do meu objetivo de seguir a carreira acadêmica.

Aos grandes amigos que a vida acadêmica me trouxe: Allan Dantas, Aline Barreto, Júnior Cavalcante, Noêmia Melo, Maria de Oliveira, Thiago Amorim, Patrícia Sanches, Luciana Borges e Sergio Jimenez. A amizade, o carinho e incentivo de vocês foram fundamentais durante esse doutorado. Sei também que os laços de amizade criados entre nós permanecerão. Obrigado a todos por tudo.

E de modo especial à *Deus* pelos desafios enfrentados, que me permitiram engrandecer; pelas pessoas e oportunidades maravilhosas que pude conhecer e vivenciar; e sobretudo pelas conquistas que realizei. A ti, *mãe natureza*, agradeço pela minha existência.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ML – *Mycobacterium leprae*

PB – Paucibacilar

MB – Multibacilar

HHC – do inglês: Household contacts

HI – Hanseníase Indeterminada

HT – Hanseníase Tuberculóide

HD – Hanseníase Dimorfa

HV – Hanseníase Virchowiana

IL – do inglês: Indetermined Leprosy

TT - do inglês: Tuberculoid Tuberculoid

BT – do inglês: Boderline Tuberculoid

BB – do inglês: Boderline Boderline

BL – do inglês: Boderline Lepromatous

LL – do inglês: Lepromatous Leprosy

PQT – Poliquimioterapia

MDT – do inglês: Multidrug Therapy

LR – do inglês: Leprosy Reaction

RR – Reação Reversa

ENH – Eritema Nodoso Hansênico

RR – do inglês: Reverse Reaction

ENL – do inglês: Erythema Nodosum Leprosum

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

PBMC – do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cell

CD4 – do inglês: cluster of differentiation 4

CD8 - do inglês: cluster of differentiation 8

CD25 - do inglês: cluster of differentiation 25

FoxP3 – do inglês: Forkhead Box P3

CTLA-4 (ou CD125 - Cluster of Differentiation 152) – do inglês: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

Th1 – do inglês: T helper 1

Th2 - do inglês: T helper 2

Treg – do inglês: T regulatory

Th17 - do inglês: T helper 17

IgG – Imunoglobulina G

TLR – do inglês: Toll-like Receptor

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-10 – Interleucina 10

IL-12p70 – Interleucina 12p70

IL-17 – Interleucina 17

IL-21 – Interleucina 21

IL-22 – Interleucina 22

IL-23 – Interleucina 23

IFN- γ – do inglês: Interferon gamma

TNF- α – do inglês: Tumor Necrosis Factor alfa

TGF- β – do inglês: Transforming Growth Factor beta

HbR – do inglês: Hemoglobin Receptor

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

HIV – do inglês: Human Immunodeficiency Virus

ELISA - do inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

IDRI – do inglês: Infectious Diseases Research Institute

LID-1 – do inglês: Leprosy IDRI Diagnostic-1

PADL – do inglês: Protein Advanced Diagnostic of Leprosy

WHO – do inglês: World Health Organization

ALM - do inglês: American Leprosy Missions

SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

PNCH – Plano Nacional de Controle da Hanseníase

GIS – do inglês: Geographic Information System

RESUMO

SANTOS, M. B. 2017. **RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS DE *Mycobacterium leprae* E APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA HANSENÍASE COMO PERSPECTIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTAS PARA PROGNÓSTICO E IMUNOPROFILAXIA**

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica e de evolução lenta causada pelo *Mycobacterium leprae*. A literatura sugere que menos de 1% dos indivíduos infectados pelo bacilo evolui com a doença. O padrão genético dos indivíduos e diferenças nos mecanismos da resposta imune do paciente influenciam na susceptibilidade ou resistência à infecção e apresentação clínica da doença. Os estudos mais recentes estabeleceram o papel das respostas de células Th1, Th2 e Treg na imunopatogênese da hanseníase. No entanto, diversos mecanismos das células Th17 e o papel da resposta imune inata na doença ainda não estão bem estabelecidos. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar o papel da resposta imune na apresentação clínica da hanseníase e o uso de antígenos brutos e recombinante de *M. leprae* como perspectiva para o desenvolvimento de ferramentas de prognóstico e imunoprofilaxia. Para investigar o envolvimento das células da resposta imune na patogênese da hanseníase, analisamos o perfil de citocinas em lesões, nos soros, e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com antígenos de *M. leprae* em pacientes com hanseníase e controles contactantes sadios (CCS). As células T CD4⁺IL-17⁺ e que expressam IL-17A, IFN- γ e IL-10 foram avaliadas por microscopia confocal em biópsias de lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide (HT, n = 9) e virchowiana (HV, n = 8). As citocinas inflamatórias foram dosadas em amostras de soro de 23 paucibacilares (PB), 28 multibacilares (MB) e em 23 CCS, pela técnica de Luminex. O fenótipo de linfócitos produtores de IL-17A e IFN- γ foi determinado por citometria de fluxo. Além disso, PBMC de pacientes com hanseníase e de CCS foram estimuladas com os antígenos brutos de *M. leprae* (MLCS), *M. tuberculosis* (PPD) e recombinante de *M. leprae*, (ML2028), e o perfil de citocinas e o fenótipo das células T CD4⁺ e CD8⁺ multifuncionais (produtoras de IFN- γ , IL-2 ou TNF- α) de memória efetora e central foram analisados. Observamos que as lesões de HT expressaram mais células CD4⁺IL-17A⁺ do que as de HV. Níveis mais elevados de IFN- γ sérico foram detectados em pacientes com as formas HT e em MB que apresentavam reações hansênicas (MB RH⁺). Concentrações mais elevadas de IL-17A e IL-1 β foram observadas nos soros de pacientes PB do que em MB. As análises das células *ex vivo* por

citometria de fluxo revelaram maior frequência de células Th17 nos pacientes com hanseníase tuberculóide (HT) em comparação com aqueles com hanseníase virchowiana (HV). Estes resultados indicam que a resposta Th17 está associada a uma resposta inflamatória efetiva que se apresenta nas formas PB, mas não estão associadas à resposta inflamatória durante as reações hansênicas. A resposta Th1 também está associada às formas PB, entretanto altos níveis de IFN- γ foram associados também aos episódios de reação hansênica. As análises multiparamétricas por citometria de fluxo revelaram maior frequência de células T multifuncionais antígeno-específicas em CCS, do que em pacientes com hanseníase. Nossos dados indicam que controles contactantes, quando estimulados com antígenos brutos e com o ML2028 recombinante, produziram mais células T multifuncionais e isto sugere que estas células proporcionam uma resposta imunológica mais eficaz contra a infecção por *M. leprae*, podendo explicar a ausência de doença nesses indivíduos. Estes dados sugerem que esses antígenos são capazes de induzir uma resposta protetora e indutora de células T multifuncionais de memória e abrem perspectivas para o desenvolvimento futuro de imunoprevenção com estes antígenos de *M. leprae*. Além disso, o estudo dá suporte à busca de induzir uma resposta Th1 e Th17 em indivíduos em risco de adquirir a doença, mesmo que haja uma proteção parcial, pois neste caso haveria uma proteção contra formas mais graves MB, e reduziria também a transmissão da doença. Esta tese é composta por um artigo aceito para publicação sobre a resposta de células Th17 e Th1 nas formas clínicas da hanseníase e outro submetido sobre a resposta a antígenos recombinantes de *M. leprae* na indução de células T multifuncionais.

Palavras-chaves: Hanseníase; Células Th17; Células T Multifuncionais; Antígenos Recombinantes; Imunopatogênese.

ABSTRACT

SANTOS, M.B. 2017. **IMUNE RESPONSE TO *Mycobacterium leprae* ANTIGENS AND THE CLINICAL PRESENTATION OF LEPROSY AS A PERSPECTIVE TO THE DEVELOPMENT OF TOOLS FOR DISEASE PROGNOSTIC AND IMMUNOPROPHYLAXIS.**

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. It is estimated that less than 1% of the individuals infected with *M. leprae* develop the disease. Several authors suggest that the genetic pattern and variations in the mechanisms of the patient's immune response influence the susceptibility or resistance to disease. The most recent studies have established the role of Th1, Th2 and Treg cell responses in immunopathogenesis of leprosy. However, several mechanisms of the immune response that act in clinical evolution still lack clarification, such as the role of Th17 cells, and the innate immune response. The objective of this study was to evaluate the role of the immune response in the clinical presentation of leprosy and the use of *M. leprae* recombinant antigens as a perspective for the development of prognostic and immunoprophylaxis tools. To investigate the involvement of immune response in the pathogenesis of leprosy, we analyzed the cytokine profile in lesions, in serum, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) stimulated with *M. leprae* antigens in leprosy patients and household contactants (HHC). CD4⁺IL-17⁺ T cells expressing IL-17A, IFN- γ and IL-10 were evaluated by confocal microscopy in lesions from patients with tuberculoid (TT, n = 09) and lepromatous leprosy (LL, n = 08). Inflammatory cytokines were measured in serum samples from 23 paucibacillary (PB) patients, 28 multibacillary (MB) and 23 HHC, using the Luminex technique. The phenotype of lymphocytes producing IL-17A and IFN- γ was determined by flow cytometry. In addition, PBMC from leprosy patients and HHC were stimulated with crude *M. leprae* (MLCS) and *M. tuberculosis* (PPD) and a recombinant antigen of *M. leprae* (ML2028), and the cytokine profile and the CD4⁺ and CD8⁺ multifunctional T cells (producing IFN- γ , IL-2 or TNF- α) of effector and central memory were analyzed. We observed that TT lesions expressed more CD4⁺IL-17A⁺ cells than LL. Higher levels of IFN- γ were detected in PB patients, but also in MB patients who presented leprosy reactions (LR) at the time of evaluation (MB LR⁺). Significantly, higher concentrations of IL-17A and IL-1 β were observed in serum from PB than in from MB patients. *Ex vivo* cell analysis by flow cytometry revealed higher frequency of Th17 cells in TT than LL patients, and it is not

high in LL patients with LR. These results indicate that the Th17 cells are associated with an effective inflammatory response that occurs in PB presentation of leprosy but were not associated with the inflammatory response in LR. Th1 response was also associated with PB presentation. However, high levels of IFN- γ were also associated with LR. Multiparameter analyzes by flow cytometry revealed a higher frequency of multifunctional T cells specific for *M. leprae* antigens in HHC than in leprosy patients, and it might explain the absence of disease in these individuals. These data indicate that these antigens are capable of inducing a more effective immune response and multifunctional T cell memory against *M. leprae* infection, and open perspectives for the future development of immunoprophylaxis with *M. leprae* antigens. Additionally, this study support the attempt to induce a Th1 and Th17 response in individuals at risk of acquiring the disease, even considering this could induce only a partial protection, because it would protect against the most severe MB forms of leprosy, and reduce the disease transmission. This Thesis includes one paper accepted for publication, about the role of Th1 and Th17 cells in subjects with different clinical forms of leprosy, and another paper submitted about the immune response to *M. leprae* crude and recombinant antigens.

Key words: Leprosy; Th17 cells; Multifunctional T cells; Recombinant Antigens; Immunopathogenesis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral.....	31
2.2 Específicos.....	31
3. DESENHO EXPERIMENTAL 1.....	34
4. ARTIGO 01. Distinct roles of Th17 and Th1 cells in inflammatory responses associated with the paucibacillary presentation of leprosy and leprosy Reactions.....	36
5. DESENHO EXPERIMENTAL 2.....	71
6. ARTIGO 02. Differences in multifunctional antigen-specific T cells may account for the diverse outcomes of <i>Mycobacterium leprae</i> infection.....	73
7. DISCUSSÃO.....	108
8. CONCLUSÕES.....	117
9. PERSPECTIVAS.....	120

REFERÊNCIAS.....	122
APÊNDICE.....	131
A) Artigos produzidos durante o Doutorado.....	131
ANEXOS.....	141
A) Questionário Investigativo.....	141
B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Maiores de 18 anos)	145
C) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Menores de 18 anos)	148

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase (ou doença de Hansen) é uma doença infecciosa crônica e de evolução clínica lenta causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) [1,2]. O *M. leprae* é um patógeno intracelular que exibe tropismo tecidual por células da pele e células de Schwann de nervos periféricos e apresenta geralmente período de incubação prolongado (variando média de 2 a 7 anos) [2,3].

Estudos epidemiológicos tem demonstrado que a hanseníase apresenta maior incidência em populações com baixa escolaridade, precariedade nos serviços de saúde e na infraestrutura domiciliar [3–5]. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de novos casos de hanseníase relatados em todo o mundo em 2014 foi de 213.899, distribuídos em 121 países, especialmente em áreas da África, Ásia e Américas. Além disso, do total de casos notificados em 2014 pela OMS, 125.785 (59%) ocorreram na Índia, 31.064 (15%) no Brasil e 17.025 (8%) na Indonésia [6]. Esses dados indicam, portanto, que apesar do sucesso alcançado com a implementação da poliquimioterapia (PQT), a incidência da hanseníase não apresentou declínio satisfatório [7]. Além disso, estima-se que entre 1 a 2 milhões de pessoas no mundo vivem atualmente com alguma deformidade física ou deficiência decorrentes de complicações clínicas da hanseníase e continua a ser uma das principais causas de neuropatia e incapacidade entre as doenças transmissíveis [3].

O Brasil é o país responsável pela endemia da hanseníase no continente americano, abrangendo 93,8% dos casos relatados [8]. A taxa de detecção de casos novos em 2014 foi de 15,44 casos por 100.000 habitantes, a taxa de grau de incapacidade física

2 foi de 0,99 por 100.000 habitantes e a taxa de detecção em menores de 15 anos foi de 5,03 casos por 100.000 habitantes [3]. A maior prevalência tem sido relatada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste [8]. Além disso, as regiões com maior desigualdade social apresentam os maiores coeficientes de detecção e prevalência de hanseníase, o que reforça os argumentos de que indicadores socioeconômicos e ambientais também são importantes preditores da infecção por *M. leprae* [9].

Os sinais clínicos da hanseníase podem ser escassos no início da doença, o que pode levar ao diagnóstico tardio ou até mesmo a erros de diagnóstico [10,11]. Além disso, a doença pode manifestar-se através de um amplo espectro de sinais e sintomas e o diagnóstico baseia-se primariamente nas características dos sinais clínicos (lesões dérmicas e neurológicas) e no exame histopatológico [1]. Com base nisso, os pacientes podem ser categorizados segundo a classificação operacional, para fins de tratamento e que baseia-se no número de lesões e no exame baciloscópico, como multibacilares (MB, quando há mais de 5 lesões cutâneas ou índice baciloscópico $\geq 2^+$) ou paucibacilares (PB, quando há menos de 5 lesões cutâneas ou índice baciloscópico $< 2^+$) [1,2]. Além dessa classificação, há ainda um amplo espectro de formas clínicas da hanseníase que foi estabelecido por Ridley e Jopling em 1966 [12]. Eles estratificaram a hanseníase em cinco formas clínicas (abrangendo critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos e bacteriológicos). Há as formas polares da doença, Hanseníase Tuberculoide (HT) e Hanseníase Virchowiana (HV), e as formas clínicas intermediárias que incluem Dimorfa Tuberculoide (HDT), Dimorfa (HD) e Dimorfa Virchowiana (HDV) [12,13]. A forma Indeterminada (HI) foi posteriormente adicionada a esta classificação [13].

A forma de HI é considerada a fase inicial da doença. O paciente apresenta manchas hipocrômicas ou eritematosas-hipocrômicas ou áreas circunscritas na pele com algum distúrbio de sensibilidade. Pode ocorrer também perda de pelos e ausência de horripilação. As lesões podem ser únicas ou múltiplas, com locais e tamanhos variados. Nesta forma clínica não há envolvimento de troncos nervosos e, portanto, os pacientes não apresentam grau de incapacidade física e não são contagiantes. A histopatologia mostra infiltrado inflamatório mononuclear perieural e perianexial inespecífico, que interpretado com os critérios clínicos sugerem hanseníase. Não são visualizados bacilos na lesão [1,13].

A forma HT é caracterizada por máculas hipocrômicas ou eritematosas. As lesões são difusamente infiltradas e com bordas bem delimitadas. Os pacientes podem apresentar de 1 a 5 lesões e geralmente com distribuição assimétrica. Podem ocorrer danos neurais, com alterações sensoriais (hipoestesia e anestesia) e alterações autônomas (hipoidrose e alopecia). O envolvimento dos troncos nervosos geralmente ocorre próximo às lesões cutâneas. A histopatologia mostra infiltrado inflamatório mononuclear com formação de granulomas, podendo haver destruição de anexos e terminações nervosas. Há macrófagos e linfócitos dos tipos $CD4^+$ e $CD8^+$. Habitualmente não são visualizados bacilos na lesão [1,12,13].

Na forma HV não ocorre a formação de granuloma e isto leva a uma replicação incontrolável do bacilo com infiltração contínua na pele e nos nervos periféricos. As lesões apresentam limites imprecisos e aspecto ferruginoso. Quando há intensa infiltração na face e orelhas, com acentuação dos sulcos faciais e conservação do cabelo, configura um quadro clínico denominado de "faces leonina", sinal peculiar na HV. Nesta forma

clínica, além do mais, os doentes têm cargas elevadas de bacilo em todo o corpo e é, portanto, a forma mais contagiosa da doença. Contudo, a transmissão é interrompida com o estabelecimento da PQT. A histopatologia apresenta-se com extenso infiltrado de macrófagos ricos em corpos lipídicos e cheios de bacilos, formando aglomerados, denominados globias. Os corpos lipídicos dão aspecto esponjoso aos macrófagos e há poucos linfócitos nas lesões, sendo a maioria do tipo CD8⁺ [1,12,13].

Entre esses dois pólos da doença (HT e HV), existem as formas intermediárias, classificadas como Hanseníase Dimorfa (HD). Pacientes HD têm manchas circulares e hipocrômicas. As lesões costumam ser bem delimitadas e difundidas na periferia. No entanto, algumas lesões não têm limites precisos na periferia (lesões "irregulares", "favo de mel" ou "queijo suíço"). A carga bacilar é elevada sendo, portanto, uma forma contagiosa. Os nervos periféricos são frequentemente afetados e este envolvimento é intenso e extenso. A neuropatia periférica pode ser perpetuada por vários anos após a cura clínica da infecção. Na forma HD, a histopatologia é intermediária entre as formas HT e HV. Quando há semelhança das lesões às observadas na forma HT, é considerada como Dimorfa Tuberculoide (HDT). Quando apresenta lesões semelhantes às da forma HV, é classificada como Dimorfa Virchowiana (HV) [1,12,13].

A infecção e lesão de nervos periféricos é uma complicação relevante na hanseníase, embora os mecanismos subjacentes à lesão do nervo não sejam ainda completamente esclarecidos [7,10,14]. O bacilo possui tropismo pelas células nervosas e bainha de Schwann dos nervos periféricos. A lesão nervosa é desencadeada por um processo inflamatório composto de células epitelioides ou macrófagos repletos de bacilos. A intensidade, extensão e distribuição do acometimento nervoso dependem da forma

clínica e da fase evolutiva da lesão. Estes podem ocorrer gradualmente, no curso da doença, ou de forma aguda, em associação com rápidas mudanças na resposta imune, conhecidas como reações hansênicas. Assim, as reações hansênicas (RH) além de serem episódios debilitantes e por vezes de difícil controle, predis põem ou agravam as lesões neurológicas e são responsáveis pela incapacidade física, outra complicação importante da doença [14]. As RH são um fenômeno de inflamação aguda que pode ocorrer antes, durante ou após o tratamento. Estima-se que 30-50% dos pacientes apresentarão episódios reacionais em algum momento durante o curso da doença [1,2]. As RH podem ser classificadas como reação reversa, ou reação do tipo 1 (RR), e eritema nodoso hansênico (ENH), ou reação de tipo II [15]. Pacientes com RH podem apresentar inflamação neural intensa, dolorosa, resultando em perda súbita e até permanente de funções sensoriais, autônomas e até motoras. Na ausência de intervenção precoce, o paciente pode evoluir com sequelas graves que são responsáveis pelo forte estigma social e comprometimento significativo da qualidade de vida [13].

O tratamento precoce e ininterrupto da doença pode reduzir o risco de transmissão do bacilo e, conseqüentemente, minimizar o número de novos casos e facilitar a eliminação da hanseníase [7]. Os avanços nas pesquisas e no tratamento nas últimas duas décadas para eliminar a hanseníase, através do uso generalizado da PQT, foi importante para reduzir a prevalência da doença, porém as taxas de detecção de casos novos se estabilizaram na última década e a hanseníase permanece endêmica em várias regiões localizadas em alguns países, a exemplo das Filipinas, Indonésia, China, Índia e Brasil [10,16–19]. Diante desse cenário ainda preocupante, são requeridos o desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico, estratégias de tratamento e uma vacina específica.

Estima-se que uma pequena porcentagem (menos de 1%) dos indivíduos que entram em contato com *M. leprae* desenvolve a doença. Diversos autores sugerem que o padrão genético e variações nos mecanismos da resposta imunológica do paciente influenciam na susceptibilidade ou resistência à doença [1,2,10]. As respostas das células T helper tipo 1 (Th1 - mediadas sobretudo por IFN- γ) estão relacionadas com o controle da replicação e disseminação do *M. leprae* e está presente na forma tuberculoide da hanseníase. Nessa forma clínica, ocorre a formação de granulomas nas lesões epidérmicas [1,11,20–22]. Alternativamente, as respostas das células T helper tipo 2 (Th2) e T reguladoras (T reg – mediada sobretudo pela citocina anti-inflamatória IL-10 e TGF- β) estão associadas às apresentações clínicas multibacilares da hanseníase. Essas formas clínicas são caracterizadas por macrófagos nas lesões epidérmicas que são amplamente infectados e incapazes de controlar a replicação do *M. leprae* [1,2,20,21,23]. As células Treg são um dos tipos de células da resposta imune mais potentes que suprimem a função das células T efectoras. Essas células exercem regulação negativa da resposta imunológica durante infecções intracelulares [21,23,24].

Estudos prévios demonstraram papel protetor tanto da IL-1 β como da IL-17 (citocinas da resposta Th17) contra patógenos intracelulares [25,26], outros estudos têm investigado a ação dessas citocinas na patogênese da hanseníase [15,21,24,27,28]. Saini e colaboradores [27] demonstraram a liberação mais elevada de isoformas de IL-17 em sobrenadante de PBMC após a estimulação, de pacientes HT e controles contactantes. Em outro estudo, o mesmo grupo sugeriu que o aumento de citocinas associadas a células Th17 pode contribuir para a inflamação envolvida no eritema nodoso hansênico (ENH) [21]. Apesar de pesquisas mostrarem como as respostas Th1, Th2 e Treg podem

influenciar na imunopatogênese da hanseníase, o impacto de mecanismos imunológicos sobre a persistência do *M. leprae* e a gravidade da doença ainda carecem de esclarecimentos. Em particular, o papel das células Th17, assim como o papel da resposta imune inata e da geração de células T de memória multifuncionais, relacionadas com a evolução clínica da hanseníase e à ocorrência de episódios reacionais e lesões neurológicas, tem sido objetos de estudo em alguns grupos de pesquisa com hanseníase.

A impossibilidade de cultivo do bacilo *in vitro* limitou por décadas o avanço de pesquisas com a hanseníase, pela impossibilidade de realizar melhor avaliação dos mecanismos microbicidas de fagócitos e da resposta imune inata e adaptativa específica para antígenos. Contudo, o sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* em 2001 permitiu o desenvolvimento de antígenos recombinantes deste bacilo (15). Desde então, progressos consideráveis vêm sendo realizados e um grande número de antígenos da *M. lepra* foram testados *in vitro* [10,11,29].

Diversos estudos vêm avaliando o papel desses antígenos recombinantes *in vitro* e em pacientes com hanseníase e controles contactantes. A maioria destes estudos avaliaram sobretudo a resposta humoral, analisando o reconhecimento de IgG por antígenos recombinantes e visando o diagnóstico da doença. Duthie e colaboradores [30] avaliaram a capacidade dos antígenos de *M. leprae* (ML0405 e ML2331) serem reconhecidos por IgG em soro de pacientes de hanseníase. Além disso, uma quimera, resultante da fusão dessas duas proteínas de *M. leprae*, designada *Leprosy IDRI Diagnostic 1* [LID-1] apresentou promissora capacidade de diagnóstico da hanseníase. Testando o LID-1 no soro de indivíduos que desenvolveram hanseníase, essa quimera foi capaz de diagnosticar a doença com 6 a 8 meses antes da manifestação dos sintomas

clínicos [31]. Num estudo subsequente, Duthie e colaboradores [19] realizaram a fusão quimérica de poliepítopos (ML0405, ML2311, ML2055, ML0049, ML0050 ML0091 e ML0411). Esta quimera foi denominada de *Protein Advanced Diagnostic Leprosy* (PADL). PADL apresentou ação complementar ao LID-1 e permitiu o melhor diagnóstico da hanseníase, sobremaneira em MB em comparação com os controles. Em outro estudo, Spencer e colaboradores avaliaram os antígenos recombinantes de *M. leprae* (ML1877, ML0841, ML2028, ML2038, ML0380 e ML0050) e demonstraram que as respostas dos pacientes com hanseníase (MB e PB) a ML2028 e ML2038 eram geralmente fortes [32]. O ML2028 é um antígeno recombinante de *M. leprae*, membro do complexo Ag85B e cuja homologia com o *Mycobacterium tuberculosis* Rv1886c é de 83,3% [32]. Outros estudos, buscaram avaliar a resposta imune celular e a produção de IFN- γ , com o objetivo de identificar antígenos candidatos à vacina. Um estudo realizado em paciente com hanseníase e controles na cidade de Goiânia (Estado de Goiás, Brasil) avaliou a resposta de células T induzidas por antígenos de *M. leprae* [33]. Os dados deste estudo demonstraram que vários antígenos (ML0276, ML0840, ML1623, ML2044 e 46f) induziram elevados níveis de IFN- γ em controles contactantes e pacientes PB. Estas proteínas foram, portanto, classificadas como imunogênicas. Estes resultados identificaram vários antígenos candidatos potenciais que podem ser úteis tanto para o diagnóstico de hanseníase como para o desenvolvimento de vacina. Em outro estudo, foi demonstrado que células T antígeno-específicas de camundongos reconheceram a proteína ML0276 e que houve maior produção de IFN- γ [34]. Os autores avaliaram também se o antígeno ML0276 poderia ser utilizado como constituinte de uma vacina para proporcionar proteção contra a infecção experimental por *M. leprae*. Os dados demonstraram que a combinação de ML0276 com um agonista do receptor Toll-like 4 (TLR4) (EM005), TLR7 ou TLR9 (CpG DNA) durante a imunização induziu uma forte

resposta Th1 que limitou a inflamação local na infecção por *M. leprae*. Diante disso, alguns desses antígenos demonstraram ser promissores como potenciais candidatos a uma vacina específica e para o desenvolvimento de testes rápidos para o diagnóstico precoce da doença. Contudo, ainda há diversos aspectos a serem esclarecidos sobre o papel desses antígenos na imunopatogênese e na proteção da hanseníase. A maioria desses antígenos não foi avaliada acerca da indução de resposta Th17, assim como sobre os efeitos na resposta imune inata.

Com o desenvolvimento das técnicas de citometria de fluxo e das análises multiparamétricas, foi possível avaliar as funções efectoras e de memória de células T em nível celular [35,36]. As células T multifuncionais, também referidas como células T polifuncionais, são células T CD4⁺ ou CD8⁺ que se desenvolvem em células T IFN γ ⁺TNF⁺IL-2⁺ e apresentam duas ou mais funções [35,37–39]. As células T CD4⁺ normalmente podem permanecer como células T de memória ou diferenciarem-se em efectoras, ou podem morrer por apoptose logo após sua ativação [35,39]. Além disso, células T CD4⁺ e CD8⁺ multifuncionais induzidas por antígenos têm um papel essencial na proteção contra uma variedade de doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares como já reportado na leishmaniose [37,38,40] e na tuberculose [41,42]. A capacidade destas células de permanecerem como células T de memória ou efectoras tem implicações importantes para o desenvolvimento de vacinas para evitar reinfecções. Embora vários estudos tenham investigado o papel dos antígenos recombinantes e sua indução na expressão de células T multifuncionais em algumas doenças infecciosas, não há dados na literatura sobre a expressão dessas células em pacientes com hanseníase.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a resposta imune a antígenos de *Mycobacterium leprae* na apresentação clínica da hanseníase e o papel de antígenos brutos e recombinante de *M. leprae* como possível ferramenta para analisar prognóstico e utilização como imunoprofilaxia na doença.

2.2. Específicos

2.2.1. Analisar o papel de células Th17 e de citocinas inflamatórias associadas com as formas e complicações clínicas da hanseníase, como as reações hansênicas e lesões neurológicas.

Hipótese: Citocinas inflamatórias da resposta imune Th17 e/ou Th1, estão associadas com as formas clínicas paucibacilares da hanseníase. Enquanto as formas multibacilares são associadas à uma supressão dessas respostas por uma predominância da resposta Th2/T regulatórias.

2.2.2. Avaliar a produção de citocinas das respostas Th1 e Th17, induzidas por antígenos bruto e recombinante “*in vitro*”, nas formas clínicas da hanseníase e em controles contactantes.

Hipótese: Alguns antígenos bruto e recombinante de M. leprae podem induzir a expressão de citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-2, IL-17), que estão associadas com o controle da replicação do bacilo e o desenvolvimento da doença.

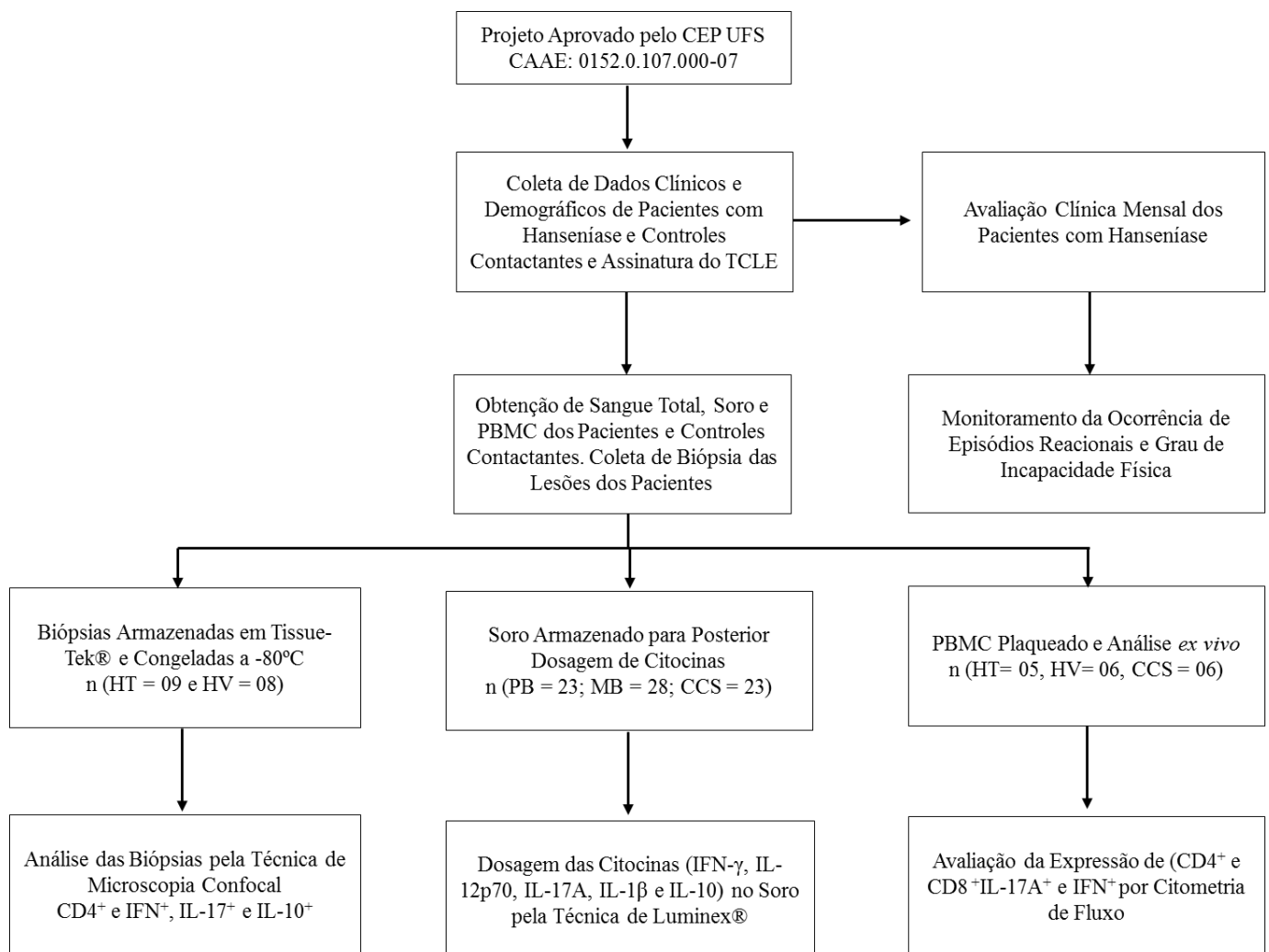
2.2.3 Avaliar a expressão de células T multifuncionais, induzidas por antígenos bruto e recombinante “*in vitro*”, nas formas clínicas da hanseníase e em controles contactantes.

Hipótese: Alguns antígenos bruto e recombinante de M. leprae podem induzir a expressão de células T multifuncionais, efetoras e de memória, que estão associadas com a proteção contra o desenvolvimento da doença.

DESENHO EXPERIMENTAL 1

3. DESENHO EXPERIMENTAL 1

Objetivo 2.2.1 Analisar o papel de células Th17 e de citocinas inflamatórias associadas com as formas e complicações clínicas da hanseníase, como as reações hansênicas e lesões neurológicas.



ARTIGO 01

4. ARTIGO 01

Distinct roles of Th17 and Th1 cells in inflammatory responses associated with the paucibacillary presentation of leprosy and leprosy reactions

Márcio Bezerra Santos; Daniela Teles de Oliveira; Rodrigo Anselmo Cazzaniga; Crisuelle Santana Varjão; Priscila Lima dos Santos; Micheli L. B. Santos; Cristiane Bane Correia; Daniela R. Faria; Marise do Vale Simon; João Santana Silva; Walderez O. Dutra; Steven G. Reed; Malcolm S. Duthie; Roque Pacheco de Almeida and Amélia Ribeiro de Jesus

O artigo foi submetido e aceito na revista *Scandinavian Journal of Immunology*, conforme documento a seguir.

17/04/2017 Email – bio_marcio2006@hotmail.com
<https://outlook.live.com/owa/?path=/mail/inbox/rp> 1/1

Scandinavian Journal of Immunology - Decision on Manuscript ID SJI-17-031.R3

13-Apr-2017

Scandinavian Journal of Immunology
<onbehalf+olli.vainio+oulu.fi@manuscriptcentral.com>

qui 13/04/2017 10:57

Para:bio_marcio2006@hotmail.com <bio_marcio2006@hotmail.com>;
marciobioparasito@gmail.com <marciobioparasito@gmail.com>;

Dear Prof. Santos:

It is a pleasure **to accept** your revised manuscript entitled "**Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Paucibacillary Presentation of Leprosy and Leprosy Reactions**" in its current form for publication in the Scandinavian Journal of Immunology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

To minimise publication time of your manuscript it is important that all electronic artwork is supplied to the editorial office in the correct format and resolution. We recommend that you consult the Illustration guidelines at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/digill.asp> if you need advice on any aspect of preparing your artwork.

If you wish your paper to be OnlineOpen you are required to complete the OnlineOpen payment form available from our website at:
https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Thank you for your contribution. On behalf of the Editors of the Scandinavian Journal of Immunology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Olli Vainio
Associate Editor, Scandinavian Journal of Immunology
olli.vainio@oulu.fi

Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions

Th17 Immune Response in Leprosy

Márcio Bezerra Santos^{*1}; Daniela Teles de Oliveira^{*}; Rodrigo Anselmo Cazzaniga^{*}; Crisuelle Santana Varjão^{*}; Priscila Lima dos Santos^{*}; Micheli L. B. Santos^{*}; Cristiane Bane Correia^{*}; Daniela R. Faria[†]; Marise do Vale Simon^{*}; João Santana Silva²; Walderez O. Dutra[†]; Steven G. Reed¹; Malcolm S. Duthie¹; Roque Pahceco de Almeida^{*3 4} and Amélia Ribeiro de Jesus^{*3 4}

^{*}Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brazil;

[†]Department of Morphology, Laboratory of Biologia das Interações Celulares, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ¹Infectious Diseases Research Institute (IDRI), Seattle, Washington, USA; ²Department of Biochemistry and Immunology. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP); ³Departament of Medicine (UFS), Sergipe Brasil; ⁴Instituto de Investigação em Imunologia, INCT, CNPq.

Corresponding author

Márcio Bezerra Santos

Laboratory of Molecular Biology, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brazil.

Rua Cláudio Batista, S/N, Hospital Universitário, Bairro Sanatório, Aracaju, Sergipe
CEP 49060-100

E-mail: bio_marcio2006@hotmail.com

Fax and telephone number: 557921051806

Abstract

It is well established that helper T cell responses influence resistance or susceptibility to *Mycobacterium leprae* infection, but the role of more recently described helper T cell subsets in determining severity is less clear. To investigate the involvement of Th17 cells in the pathogenesis of leprosy, we determined the immune profile with variant presentations of leprosy. Firstly, IL-17A, IFN- γ and IL-10 were evaluated in conjunction with CD4⁺ T cell staining by confocal microscopy of lesion biopsies from tuberculoid (TT) and lepromatous (LL) patients. Secondly, inflammatory cytokines were measured by multiplex assay of serum samples from Multibacillary (MB, n = 28) and Paucibacillary (PB, n = 23) patients and household contacts (HHC, n = 23). Leprosy patients were also evaluated for leprosy reaction occurrence: LR⁺ (n = 8) and LR⁻ (n = 20). Finally, peripheral blood mononuclear cells were analyzed by flow cytometry used to determine the phenotype of cytokine-producing cells. Lesions from TT patients were found to have more CD4⁺IL-17A⁺ cells than those from LL patients. Higher concentrations of IL-17A and IL-1 β were observed in serum from PB than MB patients. The highest serum IFN- γ concentrations were, however, detected in sera from MB patients that developed leprosy reactions (MB LR⁺). Together, these results indicate that Th1 cells were associated with both the PB presentation and also with leprosy reactions. In contrast, Th17 cells were associated with an effective inflammatory response that is present in the PB forms but were not predictive of leprosy reactions in MB patients.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. There is strong evidence that the genetic background and immunological response influence susceptibility to leprosy [1-3]. Antigen-specific T helper type 1 (Th1) cell responses, mediated by IFN- γ , control *M. leprae* multiplication and are associated with the paucibacillary (PB) presentation that contain the bacilli within granulomas in epidermal lesions [1, 4-7]. Alternatively, T helper type 2 and T regulatory cell responses (Th2 and Treg, respectively), are mediated by the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β , and are associated with the multibacillary (MB) presentations characterized by uncontrolled *M. leprae* replication and the presence of foamy macrophages within epidermal lesions [4, 5, 8]. Treg are one of the most potent cell types, with eventual regulation of effector T cell responses to limit the tissue pathology that often occurs during intracellular infections [5, 8, 9].

In addition to Th1 and Th2 cells, a CD4 cell subset that preferentially produces IL-17 has been identified (Th17) [5, 10-12]. Th17 cells have been implicated in the outcome of experimental encephalitis, sclerosis rheumatoid arthritis, leishmaniasis, filariasis, psoriasis and tuberculosis [11, 13-18]. IL-17 induces pro-inflammatory cytokines and chemokines, with subsequent recruitment and activation of neutrophils [9, 13, 15, 19]. IL-1 β , another pro-inflammatory cytokine associated with inflammasome development, is involved in the differentiation of Th17 cells [13, 20-23]. Although several studies have demonstrated a protective role of both IL-1 β and IL-17 against particular intracellular pathogens and their associated diseases [13, 15], relatively few reports have investigated these cytokines in the pathogenesis of leprosy [5, 9, 10, 24-28]. In separate studies, it has

been reported that significantly greater expression and release of IL-17 isoforms occurs following antigen stimulation of PBMC from tuberculoid patients and healthy contacts relative to lepromatous leprosy patients [10]; it has been suggested that the increase in Th17 cell-associated cytokines may contribute to inflammation within lesions [5]; and IL-17A has been implicated in the erythema nodosum leprosum (ENL) complication [29].

Despite our understanding of how Th1 and Th2 responses can influence leprosy, the impact on *M. leprae* persistence and the severity of disease are less clear for many other immune mechanisms. In particular, the role of Th17 cells, as well as innate and adaptive immune responses related to IL-17-driven responses, remains to be thoroughly delineated and consolidated [1, 8, 9, 26, 30]. With emphasis on Th17 responses, the aim of this study was to analyze, in a consolidated manner, the inflammatory cytokine profile associated with the major diverse clinical presentations of leprosy. To do this we examined cytokine expression in (i) lesions, (ii) serum samples and (iii) peripheral blood stimulated with mycobacterial antigens. We analyzed the cytokine profile according to both the primary leprosy presentation (MB or PB) and with consideration of the subsequent occurrence of reactional episodes. Improving our understanding of the immune response associated with the clinical manifestations of leprosy has the potential to reveal biomarkers that could aid case management, as well as provide important insight for the development of safe vaccines and immunotherapies [29].

Material and Methods

Ethical approval

This project involved research on human subjects and adhered to the protocols from Brazilian Consul for ethics in research (CONEP). The project was approved by the Ethics and Research Committee of the Federal University of Sergipe, CAAE 0152.0.107.000-07.

Study subjects and procedures

All individuals attended the ambulatory clinic (DES)MANCHA-Federal University of Sergipe at the University Hospital and were enrolled after thorough examination for signs of leprosy, leprosy reactions and neurological disabilities. All recruits had a scar indicating prior BCG vaccination and all signed a free and clarified term of knowledge (informed consent) and responded to an investigative questionnaire to provide demographic and clinical data. Patients were classified as MB (n = 28) or PB (n = 23) prior to treatment by multidrug therapy (MDT) for leprosy, according to Brazilian Ministry of Health and International Leprosy Association (ILA) standards. Patients were also thoroughly evaluated for leprosy reaction occurrence: LR+ (n = 8) and LR- (n = 20). The LR patients included 6 with reversal reaction (RR) and 2 with erythema nodosum leprosum (ENL). Based on histopathological analyses, patients were further classified as either indeterminate (IL; 9), true tuberculoid (TT; 14), borderline (encompassing borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB) and borderline lepromatous (BL) classifications; a total of 12) or lepromatous leprosy (LL; 8). Biopsies were obtained from skin lesions of 9 TT and 8 LL patients to permit immunohistochemistry and analysis by confocal microscopy. These patients were examined by two dermatologists and did not

present with LR at the time of biopsy and blood sample collection. A total of 23 household contacts of the patients (HHC) were recruited to serve as controls living under the same economic and environmental conditions as patients. These contacts are also more likely to have been exposed to *M. leprae* than the general population. Serum was collected from all subjects and stored at -80 °C until analyses.

Immunofluorescence and confocal microscopy

Skin biopsies of TT and LL patients, not presenting with reactional episodes, were treated with 30% sucrose at 4°C for 30 min prior to storage in TissueTeK at -80°C. Individual 4-5µm cryosections were cut and placed in saline-pre-coated slides and fixed for 10 minutes with acetone. Slides were incubated with phosphate buffered saline (PBS) for 15 minutes. Standard hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to assess tissue integrity, and to establish the location and intensity of the inflammatory infiltrate. Immunofluorescence staining was conducted by incubating with FITC- or PE-labeled monoclonal antibodies binding CD4 and either IFN- γ , IL-17 or IL-10. Isotype control antibodies were used to control for non-specific binding (Biolegend, San Diego, CA) [31]. Sections were incubated with antibodies overnight at 4°C, then extensively washed with PBS, counter-stained with DAPI and mounted using anti-fade mounting media (Molecular Probes, USA). Slides were protected from light and kept at 4°C until imaging with a Bio-Rad MRC 1024 laser scanning confocal system running the software LASERSHARP 3.0 coupled to a Zeiss Axiovert 100 microscope stand. A water-cooled argon UV laser (488 nm) or a krypton/argon laser was used to excite the preparation (through its 363 nm line, 488 nm line or 568 nm line), and light emitted was selected with band pass filters (522/35 for FITC and DAPI, 598/40 for PE). For each section, the inflammatory infiltrate was located and an area presenting uniform infiltrate was selected for analysis. A minimum

of 3 fields of view were captured within this area. Image analysis and processing were performed with Lasersharp software (Bio-Rad), Confocal Assistant, Photoshop (Adobe Systems) and Image Tool. The total number of cells in each acquired field was counted and the average number of cells per section calculated for each patient. This calculation was performed for each fluorescent parameter analyzed. The counts were performed blindly by two different individual researchers and results were expressed as the average of cells per field for each fluorescence parameter. Values were then averaged for each group. Normal, healthy skin sections from plastic surgery served as negative control in all staining procedures.

Measurement of cytokine levels and flow cytometry

To evaluate the Th1 and Th17 immune response, serum from 51 leprosy patients (23 PB and 28 MB) and 23 HHC were collected and stored at -80 °C. Concentrations of the cytokines IL-12p70, IFN- γ , IL-17A, IL-1 β and IL-10 were measured by Luminex multiplex analyses (Milliplex kit - Human T_H17 Magnetic Bead Panel, Panomics, Affymetrix, Fremont, CA). Assays were performed according to the manufacturer's instructions.

To determine which cells were producing cytokines, PBMC from subsets of TT (n = 5), LL (n = 6) and HHC (n = 6) were seeded at 1×10^6 cells/ml in plates with 48 wells (Greiner CELLSTAR®) and cultured with RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, New York, USA) for 6 hours at 5% CO₂, 37°C. Subsequently, GolgiPlug (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) was added to the cells and incubated for an additional 12 hours. At the end of culture period, cells were stained for cell surface markers CD3 (V500), CD4 (FITC) and CD8

(PE-Cy5) and intracellular cytokines IL-17A (PE) and IFN- γ (PE-Cy7). All antibodies were purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Purified mouse IgG1 (final concentration of 10 μ g/ml; Bioscience) was used as an isotype control. Cells were suspended in staining buffer and events were acquired using the BD FACS Canto II. Analysis of the acquired datasets was performed using FlowJo v10 (FlowJo LLC) software.

Statistical analysis

Cytokine concentrations were compared across the different subgroups and according to clinical forms of leprosy. Mean, median and standard deviation of the groups were calculated. D'Agostino and Pearson tests were applied to data that demonstrated a normal distribution. Statistical differences between the groups were determined by Mann-Whitney U tests. Correlation between cytokine levels were performed by Spearman correlation. All analyses were performed using Graph Pad Prism version 5.0. Statistical analysis of confocal imaging data was performed using JMP statistical software from SAS. Comparisons of means for a given parameter were made by non-parametric (one tailed, considering unequal variance of groups) t-tests. Results were considered statistically different when a p -value < 0.05 was obtained.

Results

Composition of study groups

Patients presenting as MB or PB were of similar age to HHC. The proportion of men presenting with MB (57.2%) was, however, significantly higher than that presenting with PB (26.1%; p -value = 0.04) (**Table 1**). As expected, MB patients had more lesions (6.58

± 2.85) than the PB patients (1.91 ± 1.59 ; p -value < 0.0001) and the occurrence of reactional episodes was significantly higher in MB than PB (71.4% vs. 17.4%, p -value = 0.0002). We also observed that neurological disability occurred more frequently in MB than PB patients (60.7% vs. 30.4%, p -value = 0.04).

Differential expression of regulatory cytokines within leprosy lesions

To reveal potential differences in the cytokine expression of leprosy patients, we analyzed biopsies from patients at the opposing poles of disease (the TT and LL presentations). As expected, higher numbers of cells expressing IFN- γ , and CD4 in conjunction with IFN- γ , were observed in the lesions of TT relative to the lesions of LL (**Figure 1A and B**, p -value = 0.01). Microscopy also revealed significantly more cells expressing IL-17A in the lesions of TT patients compared to LL patients (**Figure 2A**). Further analysis indicated IL-17A co-localized with CD4 (**Figure 2B and 2C**). No difference was observed, however, in the number of total of CD4⁺ T cells expressing IL-10 (**Figure 3A, B and C**). Taken together, these data confirm that TT have a higher frequency of Th17 cells in their lesions than LL, suggesting a role for IL-17A, together with Th1 cells, in controlling bacterial multiplication.

Circulating cytokine levels

We next analyzed circulating cytokine levels of patients to assess the systemic immune response. For these analyses, we considered MB patients within 2 categories i.e, either without subsequent leprosy reactions (LR⁻) or with subsequent leprosy reactions (LR⁺). Regarding to conventional Th1 responses, we observed higher concentrations of serum IL-12p70 in PB (66.6 ± 14.04 pg/ml) than MB without leprosy reaction (MB LR⁻) (56.4 ± 9.57 pg/ml; p -value = 0.009), or MB with leprosy reaction (MB LR⁺) (56.8 ± 8.2

pg/ml; p -value = 0.09) and HHC (52.5 ± 7.51 pg/ml; p -value = 0.0001 **Figure 4A**). Similarly, a higher concentration of serum IFN- γ in PB (74.9 ± 38.7 pg/ml) than HHC (54.7 ± 17.5 pg/ml; p -value = 0.009; **Figure 4B**), but we also observed that MB LR⁺ patients presented with the highest levels of IFN- γ (90.2 ± 45.5 pg/ml; p -value = 0.02). However, MB LR⁺ did have lower levels of IL-10 (110.3 ± 31 pg/ml) than MB LR⁻ (136.8 ± 47.3 pg/ml), while no differences were observed in IL-10 levels of PB (115.5 ± 30.9 pg/ml) and MB LR⁻ (**Figure 4C**). Taken together, this indicates that PB patients and MB LR⁺ exhibit a greater systemic inflammatory response and lower down regulatory response.

Higher concentrations of IL-17A were observed in serum from PB patients (47.2 ± 11.4 pg/ml) than MB patients without leprosy reaction (LR⁻, 40.5 ± 6.3 pg/ml; p -value = 0.003) or with leprosy reaction (LR⁺; 38.5 ± 14.7 pg/ml; p -value = 0.02) and HHC (37.3 ± 6.8 pg/ml; p -value = 0.001; **Figure 4D**). Given its involvement in Th17 responses, we also measured serum IL-1 β levels. PB presented higher levels of IL-1 β (62.1 ± 13.6 pg/ml) than MB LR⁻ (53.2 ± 19.5 pg/ml; p -value = 0.04) and HHC (50.5 ± 9.8 pg/ml; p -value = 0.0007; **Figure 4E**). These data further support the involvement of Th17 in PB leprosy but not in predicting leprosy reactions. Positive correlations were observed between IL-17A and IL-1 β concentrations (**Figure 5A**; Spearman $r=0.59$, p -value <0.0001), as well as between IL-17A and either IFN- γ ($r = 0.67$) or IL-12p70 ($r = 0.57$) (**Figure 5B-C**). There was, however, no correlation between IL-17A and IL-10 ($r = 0.21$) (**Figure 5D**). Taken together, although differences were quite minor, these systemic data generally corroborate the observations made within lesions.

We next determined which cells were contributing to the elevated levels of IL-17A and IFN- γ in TT patients. No differences were observed in the proportion of CD4⁺ or CD8⁺ T cells within PBMC of TT, LL and HHC (**Figure 6B and Figure 6C, respectively**). However, the percentage of CD4⁺ T cells producing IL-17A was higher in TT ($\% \pm SD$; 0.24 ± 0.12) and HHC (0.19 ± 0.15) than in LL (0.08 ± 0.06 ; p -value = 0.04). Similarly, the percentage of CD8⁺ T cells producing IL-17A was higher in TT (0.29 ± 0.28 ; p -value = 0.03) than LL (0.11 ± 0.1) and HHC (0.04 ± 0.06) (**Figure 6C**). Surprisingly, IFN- γ levels in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells were higher in LL ($\% \pm SD$ 0.16 ± 0.12) when compared with TT (0.03 ± 0.04) and HHC (0.11 ± 0.09) (**Figure 6B-C**). These data are consistent with the IFN- γ levels observed in serum samples. All patients were managed throughout their treatment and we observed that the LL patients with the higher levels of IFN- γ developed LR (dots identified in the Figure 6). Taken together, our data reinforce the role of IFN- γ in LR at the same time as indicating the presence of Th17 cells in the circulation of TT patients.

Discussion

Previous studies have reported roles for Th1, Th2 and Treg cells in the clinical evolution of leprosy [1, 5, 8-10, 13]. In this study we examined the relationship of Th17 cells and the clinical presentation of leprosy. Microscopy of lesions and flow cytometry of PBMC from patients revealed that TT patients had greater numbers of CD4⁺IL-17⁺ cells than LL patients. Expanded analyses indicated that serum IL-17A concentrations are elevated in PB patients and suggest that Th17 responses are associated with the development of this clinical form. We did not, however, observe differences in IL-17A levels between MB patients that did or did not develop reactional episodes, suggesting that Th17 cells are not

predictive of leprosy reactions. A role of Th17 has been observed in limiting other intracellular infections [13, 32, 33], and our data suggests a similar protective role for Th17 cells during leprosy.

IL-1 β regulates Th17 polarization and its interplay with IL-23 amplifies Th17 responses [34]. In the present study, we observed high levels of IL-1 β in PB patients. IL-1 β mediates many diseases by initiating and potentiating immune and inflammatory responses. Moreover, IL-1 β knockout mice have increased susceptibility to *Shigella*, *Salmonella*, *C. albicans* and *S. aureus* infection [35]. Our data indicate that IL-1 β and IL-17A are associated with the PB clinical presentation and indicate that these cytokines contribute to the control of *M. leprae* infection.

Our data also corroborate the association of IFN- γ and IL-12p70, which regulate Th1 responses, with the PB forms of leprosy and show that there is a correlation between IL-17A and IFN- γ . Consistent with this we observed more cells expressing IFN- γ in the lesions of TT patients than in lesions from LL patients. These data support the argument that both Th1 and Th17 responses interact to help control of the proliferation and dissemination of *M. leprae*.

Our data indicate that LL patients who had serum IFN- γ concentrations over 50 pg/ml were more likely to present with reactional episodes or neurological disabilities (80% and 60%, respectively). Moreover, reactional MB patients presented higher levels of IFN- γ than others groups. Considering that these LL patients also presented with higher percentages of CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ T cells, these data suggest that patients that respond with high levels of IFN- γ , develop exacerbated inflammatory response and

progression to more aggressive clinical forms of leprosy. This strengthens the observation that similar to other infectious diseases, such as mucosal leishmaniasis, there is a need for a balance between pro- and anti- inflammatory responses in leprosy [36-38]. While Saini and colleagues study similarly found an association of the Th17 response with the PB forms of leprosy [10], they reported that leprosy reactions (Type 1 and 2) are also associated with Th17 response [5]. We did not, however, observe differences in IL-17 levels between MB LR+ and MB LR- at the time of initial diagnosis, indicating that Th17 are not predictive of inflammatory episodes associated with leprosy reactions.

The development of Th17 is under the master transcription factor ROR γ t [5, 10] and lymphocytes from ROR γ - and ROR γ T-deficient individuals also display an impaired IFN- γ response to *Mycobacterium*. This mutation has been associated with susceptibility to *Candida albicans* and *Mycobacterium* infection. Okada and colleagues [26] described a bi-allelic RORC mutation that cause a lack of functional ROR γ and ROR γ T isoforms and an absence of IL-17A/F-producing T cells, with the suggestion that IL-17 is important for protective responses to *C. albicans* and systemic protection against *Mycobacterium*. While an impaired IFN- γ response increases the susceptibility to mycobacterial infections, our results demonstrate that in addition to the critical role of the Th1 response and IFN- γ production in protection against *M. leprae*, the actions of IL-17A/F and Th17 cells are also involved. The role of IL-17A may not be exclusively limited to T helper cell subsets, as IL-17A has also been detected in CD8⁺ T cells, $\gamma\delta$ T cells, NK cells and neutrophils [13, 39]. IL-17A attracts neutrophils to defend against different pathogens [13, 39] and has been associated with other immune mechanisms that help to control other infectious diseases such as visceral leishmaniasis and tuberculosis [32, 33]. Taken together, our data further indicates that a combination of Th1/Th17

responses exert a protective effect during *M. leprae* infection and guide the development of the PB presentations of this disease. However, we highlight the need for studies that seek at clarifying the molecular and genetic mechanisms involved in the regulation of Th17 cells and the role of innate immunity in the clinical forms of leprosy. Furthermore, it is required to investigate the mechanisms involved in the inflammatory response associated with leprosy reactions mediated by IFN- γ , and if the Th1/Th17 plays a distinct role on the different leprosy reactions (type 1 and 2). In this present study, due to the small number of patients with ENL (n = 2) we recognize the limitations to investigate the role of Th17 in this type of reaction.

In summary, as expected, IL-12p70 and IFN- γ (Th1 profile) were associated with the PB forms of leprosy. We also showed a role of Th17 in PB clinical forms by different methods: immune response in lesion (local response), serum (systemic response) and PBMC by flow cytometry (cells producing cytokines spontaneously) from leprosy patients and HHC. Taken together, our data indicates that Th17 cells are associated with effective inflammatory response that promotes the PB forms in leprosy, but these cells are not predictive of the subsequent development of inflammatory leprosy reactions in MB patients. This suggests that Th17 cells are protective against *M. leprae* infection and promote the milder clinical forms of leprosy.

Acknowledgments

This work was funded by Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC)/SE/FUNTEC/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grants: CNPq n°12/2009, Process n° 019.203.02712/2009-8 (ARJ). ARJ and RPA are CNPq investigators. MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, Process: 454848/2014-5 (ARJ). We would like to thank also the residents and dermatologists of Dermatology Clinic-HU/UFS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We also thank Professor Michael W. Lipscomb for excellent suggestions on the manuscript.

Conflict of interest statement

The authors state no financial or commercial conflicts of interest.

References

- 1 Simon M, Scherlock J, Duthie MS, Ribeiro de Jesus A. *Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy*. Drug Development Research. 2011;72:509-27.
- 2 de Oliveira DT, Bezerra MM, de Almeida JA, Duthie M, Reed S, de Jesus AR. *Neurological disability in leprosy: incidence and gender association in Sergipe, Brazil*. Geospat Health. 2012 Sep;6:S125-9.
- 3 Duthie MS, Gillis TP, Reed SG. *Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine*. Hum Vaccin. 2011 Nov;7:1172-83.
- 4 Dupnik KM, Bair TB, Maia AO et al. *Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy*. J Infect Dis. 2015 May 15;211:1658-76.
- 5 Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. *Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF-beta and Increase in IL-6*. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Apr;10:e0004592.
- 6 Duthie MS, Saunderson P, Reed SG. *The potential for vaccination in leprosy elimination: new tools for targeted interventions*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 2012;107:7.
- 7 Duthie MS, Orcullo FM, Abbelana J, Maghanoy A, Balagon MF. *Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy*. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Apr;100:3267-75.

- 8 Palermo ML, Pagliari C, Trindade MA *et al.* *Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy.* Am J Trop Med Hyg. 2012 May;86:878-83.
- 9 Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. *Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy.* PLoS Negl Trop Dis. 2016 Jan;10:e0004338.
- 10 Saini C, Ramesh V, Nath I. *CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy.* PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2338.
- 11 Wang X, Zheng XY, Ma C *et al.* *Mitigated Tregs and augmented Th17 cells and cytokines are associated with severity of experimental autoimmune neuritis.* Scand J Immunol. 2014 Sep;80:180-90.
- 12 Bretscher PA. *On the mechanism determining the TH1/TH2 phenotype of an immune response, and its pertinence to strategies for the prevention, and treatment, of certain infectious diseases.* Scand J Immunol. 2014 Jun;79:361-76.
- 13 Akdis M, Burgler S, Cramer R *et al.* *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases.* J Allergy Clin Immunol. 2011 Mar;127:701-21 e1-70.
- 14 Yang C, He D, Yin C, Tan J. *Inhibition of Interferon Regulatory Factor 4 Suppresses Th1 and Th17 Cell Differentiation and Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.* Scand J Immunol. 2015 Oct;82:345-51.
- 15 Bi Y, Yang R. *Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions.* Scand J Immunol. 2012 Jun;75:543-52.

- 16 Eysteinsdottir JH, Sigurgeirsson B, Olafsson JH *et al.* *The role of Th17/Tc17 peripheral blood T cells in psoriasis and their positive therapeutic response.* Scand J Immunol. 2013 Dec;78:529-37.
- 17 Halvorsen EH, Stronen E, Hammer HB, Goll GL, Sollid LM, Molberg O. *Interleukin-15 induces interleukin-17 production by synovial T cell lines from patients with rheumatoid arthritis.* Scand J Immunol. 2011 Mar;73:243-9.
- 18 Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. *Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis.* Scand J Immunol. 2011 Jul;74:1-13.
- 19 Bellemore SM, Nikoopour E, Schwartz JA, Krougly O, Lee-Chan E, Singh B. *Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice.* Clin Exp Immunol. 2015 Dec;182:261-9.
- 20 Burgler S, Ouaked N, Bassin C *et al.* *Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells.* J Allergy Clin Immunol. 2009 Mar;123:588-95, 95 e1-7.
- 21 Soong L, Henard CA, Melby PC. *Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis.* Semin Immunopathol. 2012 Nov;34:735-51.
- 22 Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM, Engwerda CR. *Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis.* PLoS Negl Trop Dis. 2014 Jul;8:e2914.
- 23 Martinon F, Tschopp J. *Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation.* Cell Death Differ. 2007 Jan;14:10-22.

- 24 Aarao TL, de Sousa JR, Botelho BS, Fuzii HT, Quaresma JA. *Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy*. Microb Pathog. 2016 Jan;90:64-8.
- 25 Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E et al. *Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25 (high)FoxP3 (+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines*. Arch Dermatol Res. 2014 Nov;306:793-801.
- 26 Okada S, Markle JG, Deenick EK et al. *IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to Candida and Mycobacterium in humans with bi-allelic RORC mutations*. Science. 2015 Aug 7;349:606-13.
- 27 Khadge S, Banu S, Bobosha K et al. *Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal*. BMC Infect Dis. 2015 Oct 28;15:477.
- 28 Sampaio LH, Sousa ALM, Barcelos MC, Reed SG, A. SMM, Duthie MS. *Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31:9.
- 29 Martiniuk F, Giovinnazzo J, Tan AU et al. *Lessons of leprosy: The emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity*. J Drugs Dermatol. 2012;11:5.
- 30 Gulia A, Fried I, Massone C. *New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy*. F1000 Med Rep. 2010;2.
- 31 Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr. et al. *Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and*

cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun. 2005 Dec;73:7853-9.

32 Pitta MG, Romano A, Cabantous S et al. *IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani*. J Clin Invest. 2009 Aug;119:2379-87.

33 Torrado E, Cooper AM. *IL-17 and Th17 cells in tuberculosis*. Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Dec;21:455-62.

34 Schmidt RL, Lenz LL. *Distinct licensing of IL-18 and IL-1beta secretion in response to NLRP3 inflammasome activation*. PLoS One. 2012;7:e45186.

35 Netea MG, Simon A, van de Veerdonk F, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Joosten LA. *IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes*. PLoS Pathog. 2010 Feb;6:e1000661.

36 Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D. *TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against Leishmania (Viannia)*. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jun;5:e1204.

37 Singh OP, Stober CB, Singh AK, Blackwell JM, Sundar S. *Cytokine responses to novel antigens in an Indian population living in an area endemic for visceral leishmaniasis*. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6:e1874.

38 Stober CB, Lange UG, Roberts MTM, Alcamí A, Blackwell JM. *IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine Leishmania major Infection*. The Journal of Immunology. 2005;175:2517-24.

39 Lee DJ, Li H, Ochoa MT *et al.* *Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy.* J Infect Dis. 2010 Feb 15;201:558-69.

Table 01. Demographic and clinical characteristics of patients and household contacts.

Variables		PB (n=23)	MB (n=28)	HHC (n=23)	p value
Age	Variation	11-81	10-68	20-72	*0.43
	Mean $\pm$ SD	49.61 $\pm$ 18.95	43.57 $\pm$ 15.94	46.87 $\pm$ 14.51	
Male n (%)		6 (26.1%) ^a	16 (57.2%) ^b	10 (43.5%)	**0.04
Number of lesions	Variation	1-5	2-14	--	*< 0.0001
	Mean $\pm$ SD	1.91 $\pm$ 1.59	6.58 $\pm$ 2.85	--	
Positive bacilloscopy n (%)		0	10 (35.7)		
Leprosy reactions n (%)		4 (17.4%)	20 (71.4%)	--	**0.0002
Physical disability n (%)		7 (30.4%)	17 (60.7%)	--	**0.04
Physical disability degree n (%)	Degree 1	6 (26.1%)	14 (50%)	--	**0.07
	Degree 2	1 (4.3%)	3 (10.7%)	--	

*Mann-Whitney test; ** Fisher exact test

Figures

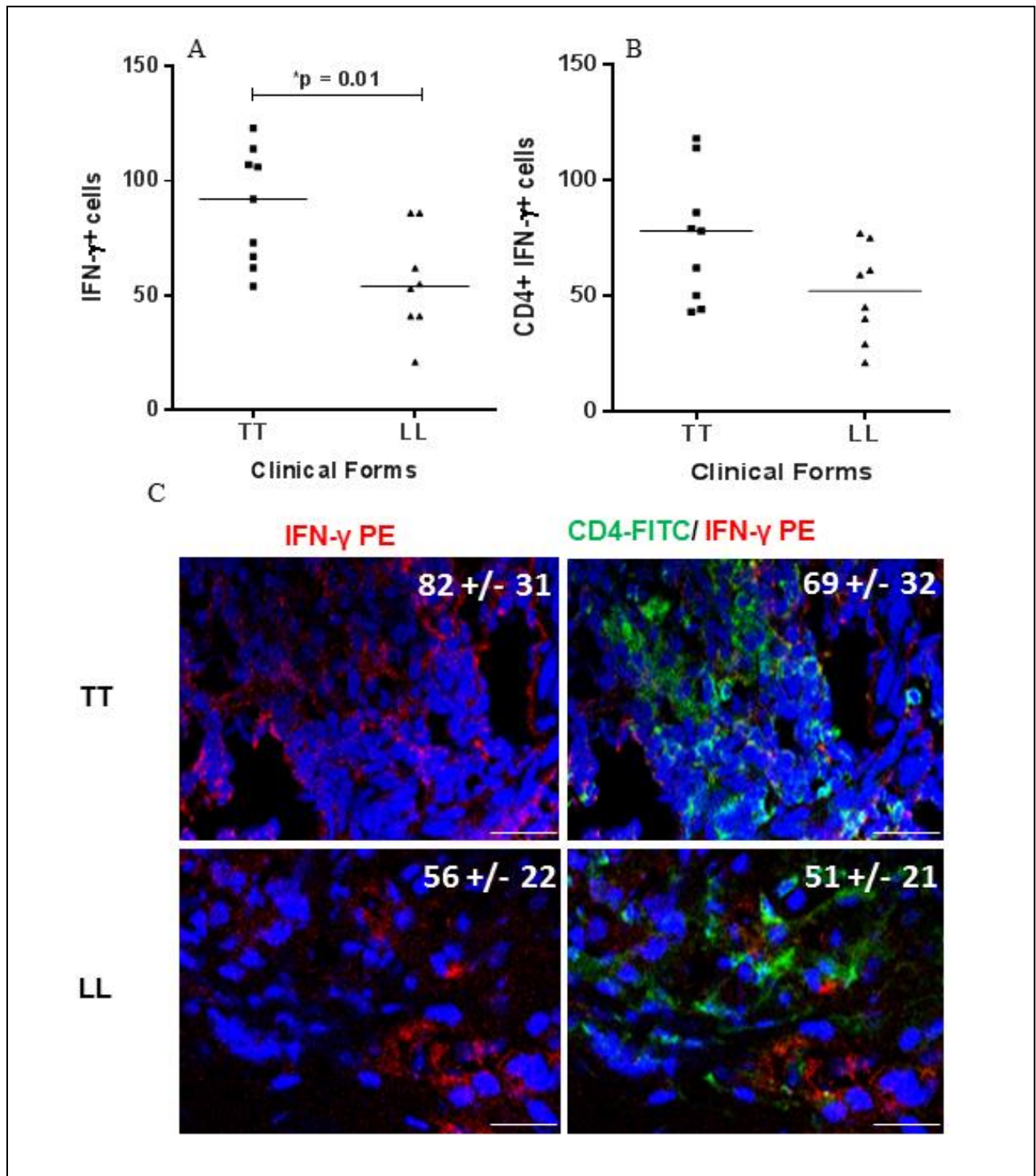


Figure 1. IFN- γ expression in lesions of TT and LL patients. A) Number of IFN- γ + cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. B)

Number of CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. (C) Representative confocal microscopy analyses for total IFN- γ ⁺ and for CD4⁺ IFN- γ ⁺ cells in TT and LL lesions. Frozen tissue sections were stained with PE-labeled anti-IFN- γ antibody (red), FITC-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (green) and DAPI (blue), as described in Materials and Methods. The three optical sections for each patient were obtained, simultaneously, with 363, 488 and 568 lines of argon/krypton lasers and the proper set of filters. The overlay for CD4 (green), IFN- γ (red) and DAPI (blue) in TT and LL lesions is shown on the right hand panels. The cells that are double positive for each pair of staining (CD4⁺ IFN- γ ⁺) appear in yellow. Values represent the average $\pm$ standard deviation of each group. * indicates $p < 0.05$, comparing TT and LL. The bar represents 10 μ m.

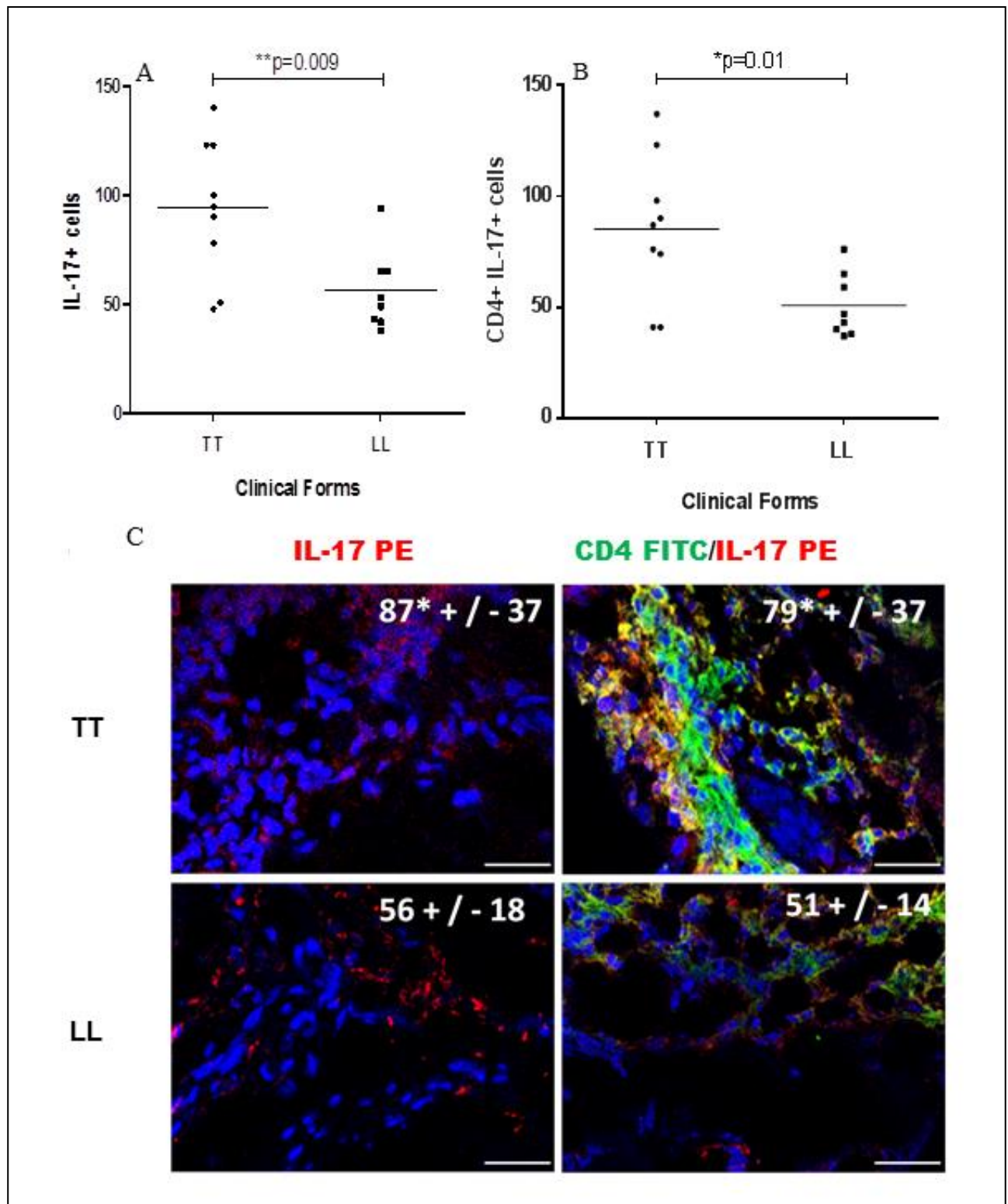


Figure 2. IL-17 expression in lesions of TT and LL patients. A) Number of IL17+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. B) Number of

CD4+IL17+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. (C) Representative confocal microscopy analyses for total IL-17+ and for CD4+IL17+ cells in TT and LL lesions. Frozen tissue sections were stained with PE-labeled anti-IL-17 antibody (red), FITC-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (green) and DAPI (blue), as described in Materials and Methods. The three optical sections for each patient were obtained, simultaneously, with 363, 488 and 568 lines of argon/krypton lasers and the proper set of filters. The overlay for CD4 (green), IL-17 (red) and DAPI (blue) in TT and LL lesions is shown on the right hand panels. The cells that are double positive for each pair of staining (CD4+IL-17+) appear in yellow. Values represent the average $\pm$ standard deviation of each group. * indicates $p < 0.05$, comparing TT and LL. The bar represents 10 μ m.

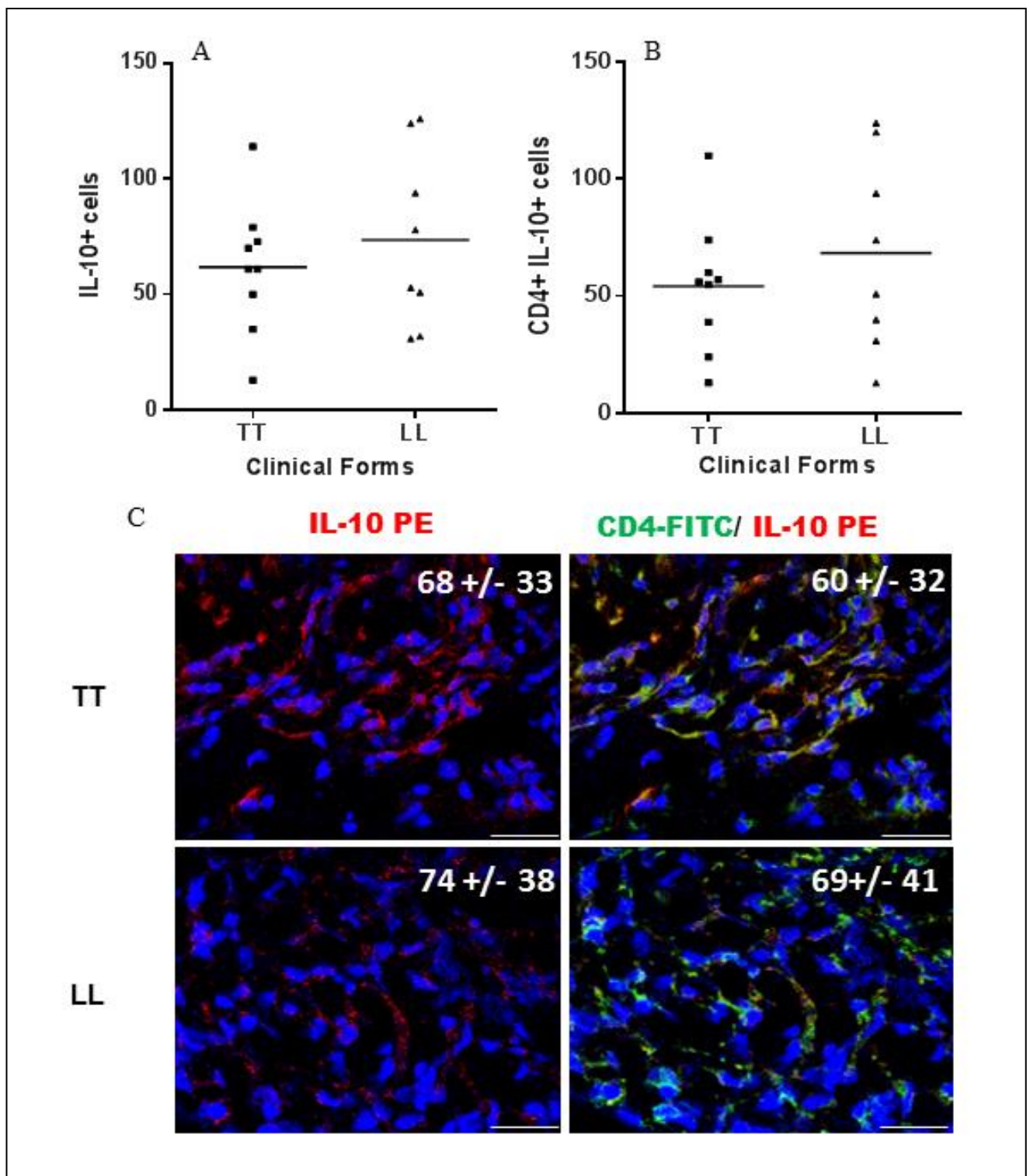


Figure 3. IL-10 expression in lesions of TT and LL patients. A) Number of IL-10+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL) (n= 8) lesions. B) Number of CD4+ IL-10+ cells in Tuberculoid (TT) (n=9) and Lepromatous Leprosy (LL)

(n= 8) lesions. (C) Representative confocal microscopy analyses for total IL-10⁺ and for CD4⁺ IL-10⁺ cells in TT and LL lesions. Frozen tissue sections were stained with PE-labeled anti-IL-10 antibody (red), FITC-labeled anti-CD4 monoclonal antibodies (green) and DAPI (blue), as described in Materials and Methods. The three optical sections for each patient were obtained, simultaneously, with 363, 488 and 568 lines of argon/krypton lasers and the proper set of filters. The overlay for CD4 (green), IL-10 (red) and DAPI (blue) in TT and LL lesions is shown on the right hand panels. The cells that are double positive for each pair of staining (CD4⁺ IL-10⁺) appear in yellow. Values represent the average $\pm$ standard deviation of each group. * indicates $p < 0.05$, comparing TT and LL. The bar represents 10 μ m.

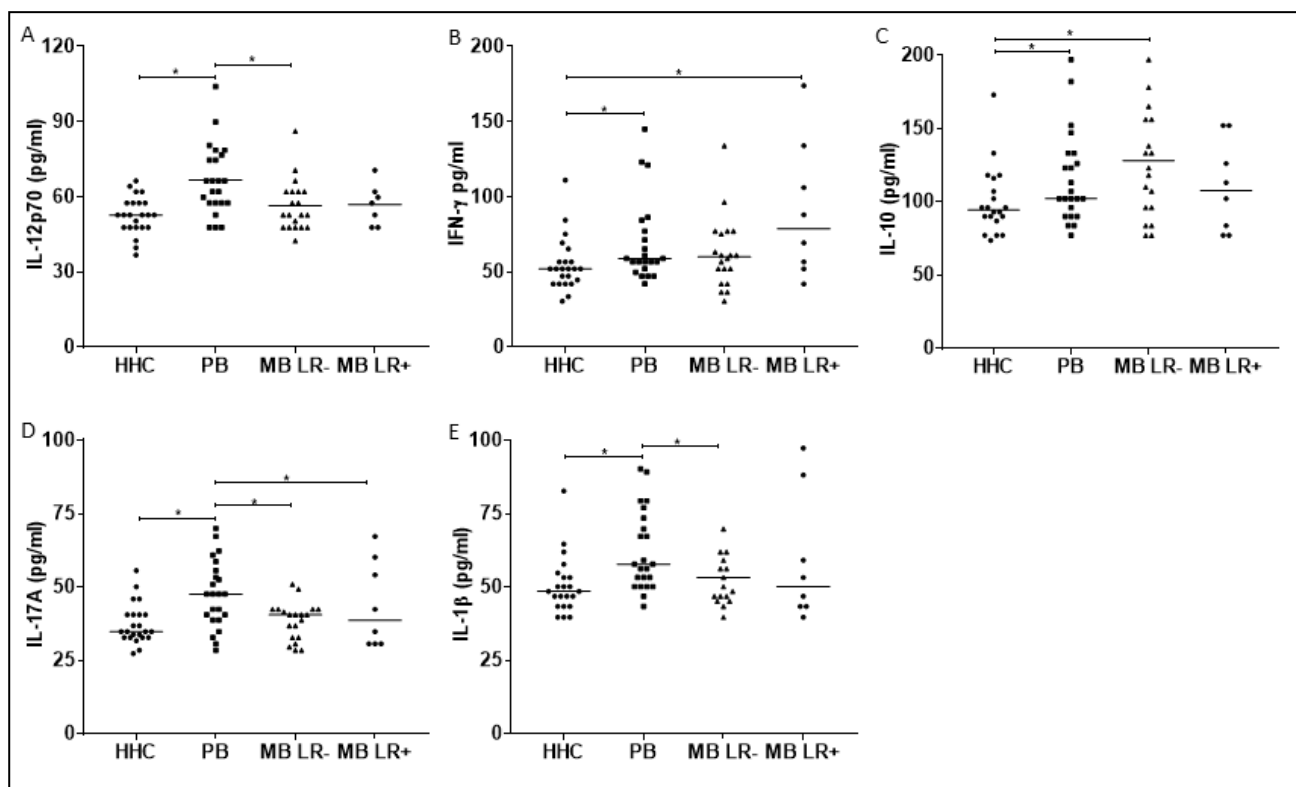


Figure 4. Circulating cytokine levels of leprosy patients and contacts. Concentrations of serum (A) IL-12p70, (B) IFN- γ , (C) IL-10, (D) IL-17A and (E) IL-1 β from PB, MB (with Leprosy reaction LR+ and without leprosy reaction LR-) and household contacts (HHC). Cytokine concentrations were collected and determined by Luminex assay. A minimum of 15 patient samples were used per cohort. Statistically significant differences between groups are at a p value < 0.05.

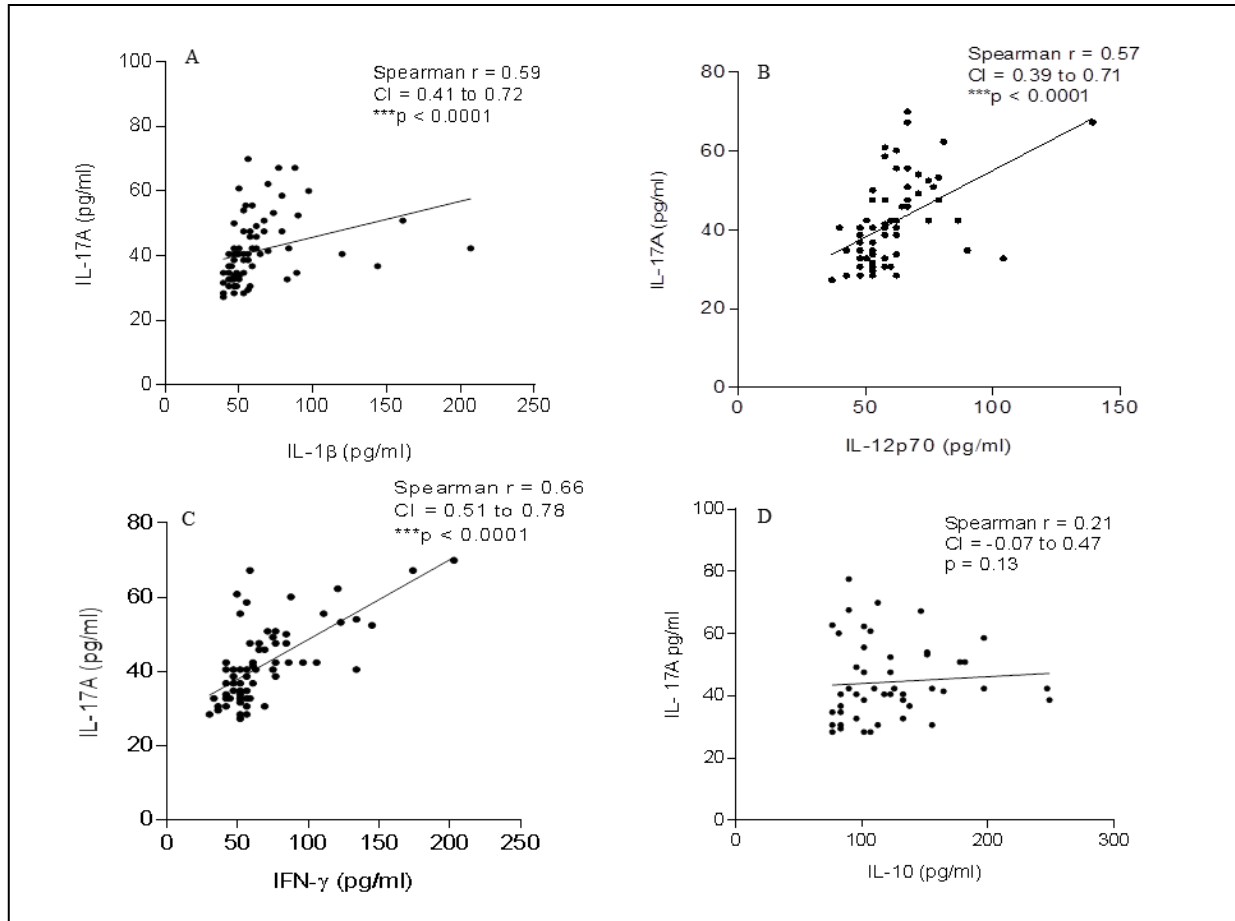


Figure 5. Correlation among serum cytokines. Cytokine concentrations from PB (n = 23) and MB (n = 28) leprosy patients and HHC (n = 23) samples were analyzed by Luminex Technique and correlation between the cytokines values were determined by Spearman test. CI = Confidence Interval. *Asterisks indicate statistically significant correlations, at a p value < 0.05 .

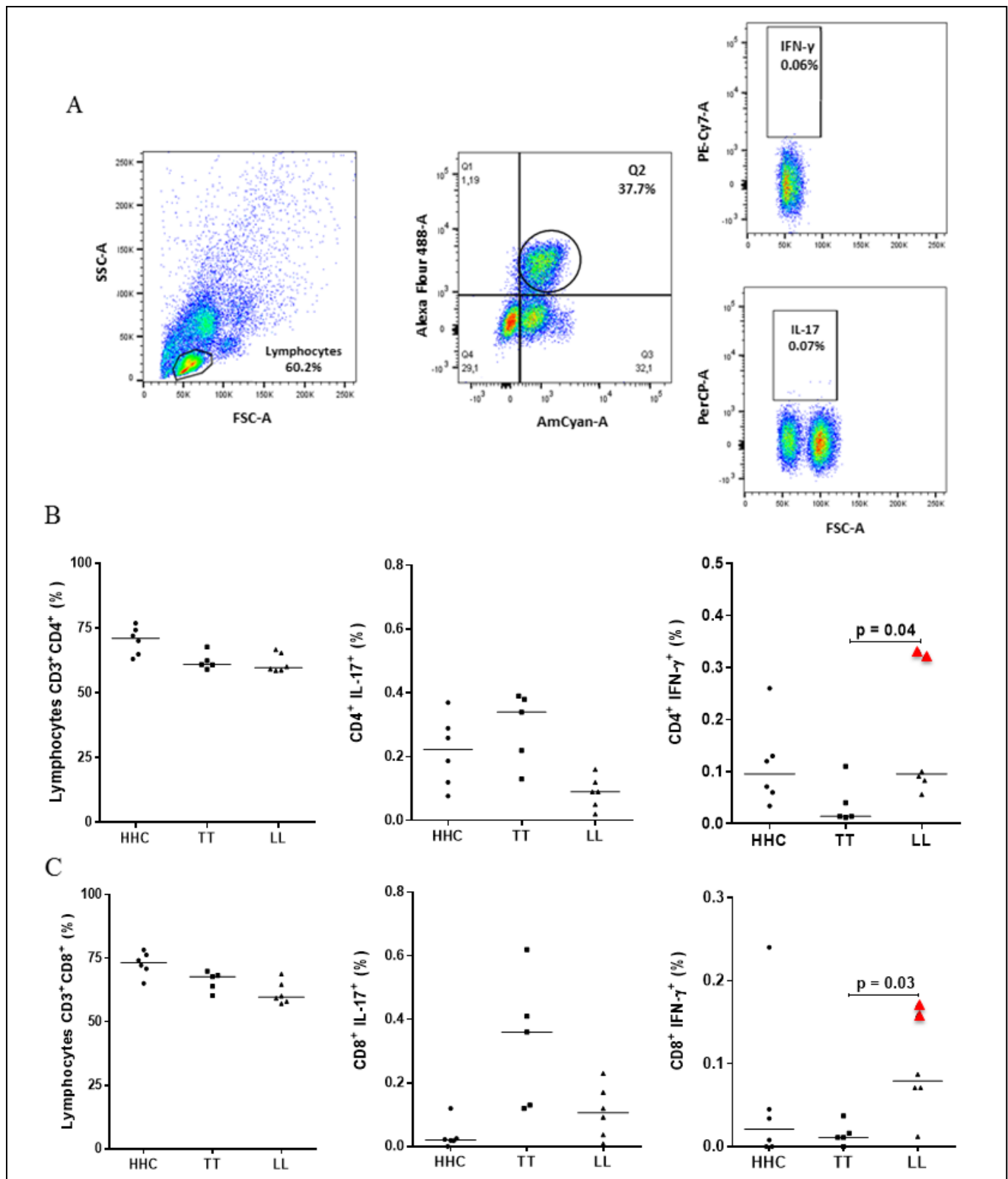


Figure 6. Cellular source of IL-17 and IFN- γ in leprosy patients and contacts. (A)

Representative flow cytometry analysis showing CD3⁺CD4⁺ IL-17A and IFN- γ

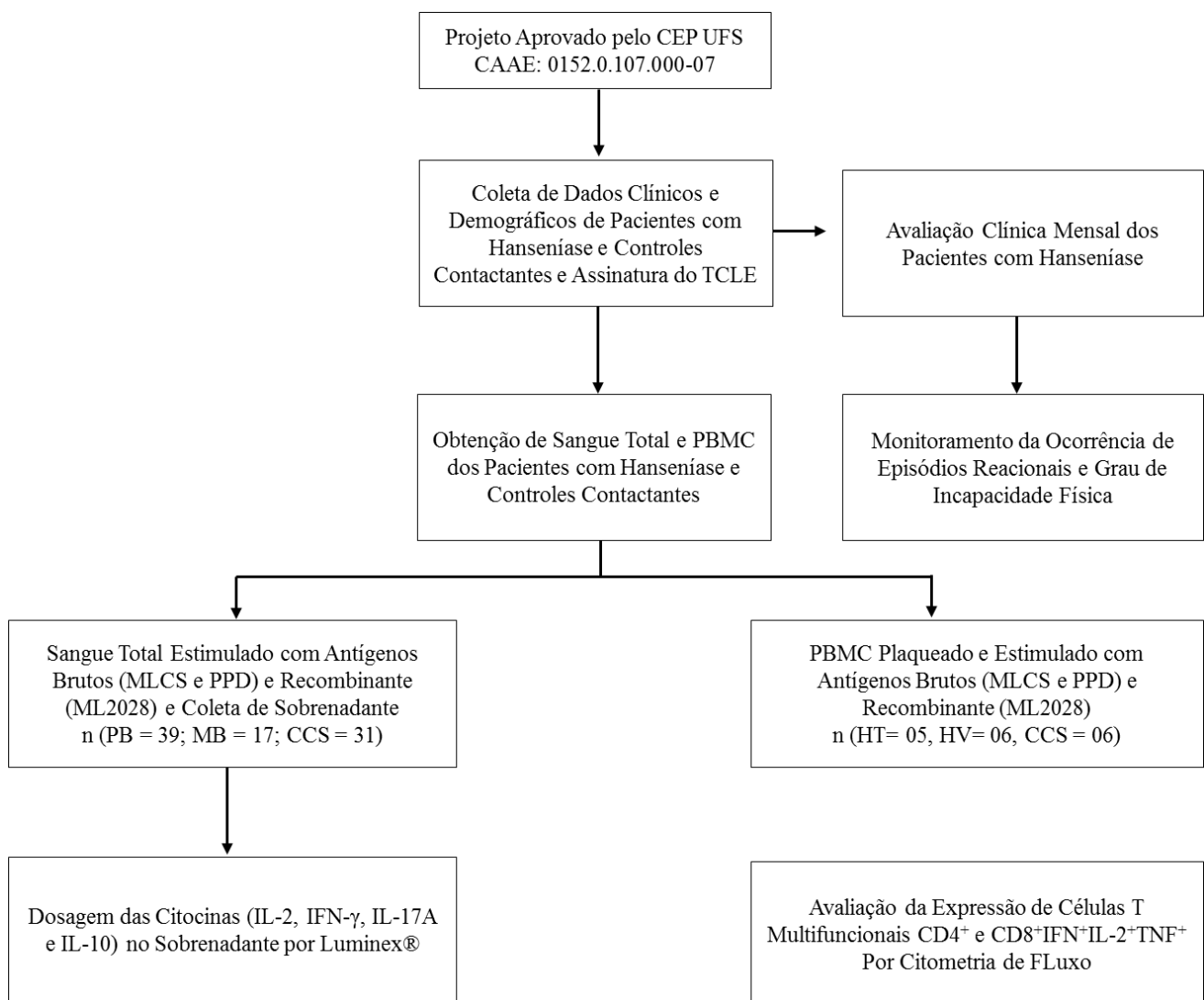
production. (B) Percentage of CD3⁺CD4⁺ T helper cell expression and (C) CD3⁺CD8⁺ T cytotoxic cell expression of IL-17A⁺ and IFN- γ ⁺ in PBMCs isolated from peripheral blood of TT (n = 5), LL (n = 6) and contact controls (n = 6). The red dots in CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ graphics indicate the LL patients who developed leprosy reaction later.

DESENHO EXPERIMENTAL 2

5. DESENHO EXPERIMENTAL 2

Objetivo 2.2.2. Avaliar a produção de citocinas das respostas Th1 e Th17, induzidas por antígenos bruto e recombinante “*in vitro*”, nas formas clínicas da hanseníase e em controles contactantes.

Objetivo 2.2.3. Avaliar a expressão de células T multifuncionais, induzidas por antígenos bruto e recombinante “*in vitro*”, nas formas clínicas da hanseníase e em controles contactantes.



ARTIGO 2

6. ARTIGO 2

Differences in multifunctional antigen-specific T cells may account for the diverse outcomes of *Mycobacterium leprae* infection

Márcio B. Santos; Marise do V. Simon; Micheli L. B. Santos; Aline S. Barreto; Rodrigo A. Cazzaniga; Daniela T. de Oliveira; Alex R. Ferreira; Nanci C. Santos-Bio; Steven G. Reed; Malcolm S. Duthie; Roque P. de Almeida; Cristiane B. Correia and Amélia R. de Jesus

O artigo 2 foi submetido na revista *International Journal of Medical Microbiology*. Estamos aguardando o parecer dos revisores.

Preview your submission IJMM_2017_137

International Journal of Medical Microbiology

<EvisSupport@elsevier.com>

Qui 06/04/2017 09:08

Para: bio_marcio2006@hotmail.com

06 de Abril de 2017 09:08am

Dear Dr. Santos,

A submission preview has been generated for your manuscript **Differences in multifunctional antigen-specific T cells may account for the diverse outcomes of Mycobacterium leprae infection.**

Please log into EVISE®

at http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=IJMM to preview your manuscript and complete the submission.

Please disregard this message if you have already previewed your manuscript and completed the submission.

Kind regards,

International Journal of Medical Microbiology

This message was sent automatically. Please do not reply.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

Differences in multifunctional antigen-specific T cells may account for the diverse outcomes of *Mycobacterium leprae* infection

Márcio B. Santos^{1,2,3}; Marise do V. Simon²; Micheli L. B. Santos²; Aline S. Barreto²; Rodrigo A. Cazzaniga²; Daniela T. de Oliveira²; Mônica R. Barrios²; Alex R. Ferreira^{2,4}; Nanci C. Santos-Bio^{2,4}; Steven G. Reed³; Malcolm S. Duthie³; Roque P. de Almeida^{2,4,5}; Cristiane B. Correia² and Amélia R. de Jesus^{2,4,5}

¹Departament of Health Education, Universidade Federal de Sergipe (UFS), Brazil.

²Laboratory of Molecular Biology (UFS), Universidade Federal de Sergipe, Brazil.

³Infectious Diseases Research Institute (IDRI), Seattle, Washington, USA.

⁴Departament of Medicine (UFS), Sergipe Brazil.

⁵Instituto de Investigação em Imunologia, INCT, CNPq.

Corresponding Author

Amélia Ribeiro de Jesus

Laboratory of Molecular Biology (UFS), Universidade Federal de Sergipe, Brazil. Rua Cláudio Batista, S/N, Hospital Universitário, Bairro Sanatório, Aracaju, Sergipe, CEP 49060-100.

Phone number/FAX:+557921051806 E-mail: ameliaribeirodejesus@gmail.com

Abstract

Leprosy is a slowly evolving chronic manifestation of *M. leprae* infection. Given that multifunctional CD4 T cells capable of simultaneously secreting combinations of interferon- γ (IFN- γ), interleukin (IL)-2 or tumor necrosis factor (TNF) have now been indicated as beneficial for the successful immune outcome of several infections, we hypothesized that they may similarly contribute to the evolution of *M. leprae* infection. To test this hypothesis, we evaluated antigen-specific T cell responses of a total of 87 subjects. Peripheral blood mononuclear cells of control individuals (31 HHC) and leprosy patients (39 PB and 17 MB) were incubated with crude antigen extracts or the recombinant ML2028 antigen. Assessment of the cytokines secreted into the culture supernatants by multiplex assay revealed antigen-specific production of IFN- γ and IL-2 from cells of HHC and PB, confirming the Th1 bias of their responses. We then used multiparameter flow cytometry to determine the source of these cytokines. These analyses revealed a population of multifunctional antigen-specific T cells in HHC that was larger than that observed in PB patients. Our data indicate that HHC generate multifunctional antigen-specific T cells and suggest that these provide a more effective immune response against *M. leprae* infection that prevents the development of leprosy.

Key words: Leprosy; Recombinant antigens; Multifunctional T cells; CD4 T cells; CD8 T cells; Immunopathogenesis.

Introduction

Leprosy, or Hansen's disease, is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (Dupnik et al., 2015; Simon et al., 2011). The widespread use of multidrug therapy (MDT) over the last three decades has caused a large reduction in the prevalence of leprosy (Escamilla-Tilch et al., 2014; Fonseca et al., 2017). Despite these immense efforts, however, new case detection rates have stabilized over the last few years. Leprosy remains as a public health concern in a number of localized regions, including India and Brazil (de Oliveira et al., 2012; Duthie et al., 2012, 2011).

There is now strong associative evidence that the genetic background and the immunological response influence both susceptibility to, and outcome of, leprosy (Fonseca et al., 2017; Simon et al., 2011). T helper 1 (Th1) and T helper 17 (Th17) cells are observed in paucibacillary (PB) patients and are associated with control of *M. leprae* replication (Attia et al., 2014; Balaram et al., 2009; Dupnik et al., 2015; Fonseca et al., 2017; Kohli et al., 2015; Saini et al., 2016). In contrast, T helper 2 (Th2) and T regulatory (Treg) cells are associated with the multibacillary (MB) presentations that present with heavily infected macrophages in their epidermal lesions (Dupnik et al., 2015; Fonseca et al., 2017; Kohli et al., 2015; Palermo et al., 2012; Saini et al., 2016). Several attempts have been made to develop a vaccine specifically for leprosy but, at present, BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) is the only vaccine available (Rubio Reyes et al., 2016). Regardless, systematic meta-analyses indicate that BCG vaccination has a protective efficacy of approximately 50% (Duthie et al., 2012).

Although Th1 cells are associated with protective responses against *M. leprae* infection, assessment of the T cell response by measuring only IFN- γ production may not fully reflect the protective potential of the response (Seder et al., 2008). Multiple studies have failed to discriminate healthy, but possibly infected individuals (household contacts - HHC) from PB patients on the basis of antigen-specific IFN- γ production (Duthie et al., 2012; Simon et al., 2011). The development of multiparameter flow cytometry has allowed the analysis of T-cell effector functions at the single cell level (Seder et al., 2008; Talker et al., 2015), revealing that CD4⁺ T cells that secrete only IFN- γ have a limited capacity to develop into memory cells (Darrah et al., 2007; Seder et al., 2008). Recently, several studies have evaluated the frequency of multifunctional Th1 cells, characterized by their simultaneous secretion of multiple cytokines (IFN- γ , IL-2 and TNF- α) in various conditions (Darrah et al., 2007; Guha et al., 2013; Seder et al., 2008; Talker et al., 2015). These studies have demonstrated that the proportion of multifunctional Th1 cells positively correlates with protection against cancers and infectious diseases, including leishmaniosis (Guha et al., 2013; Macedo et al., 2012) and *Mycobacterium tuberculosis* infection (Leung-Theung-Long et al., 2015; Lichtner et al., 2015).

The sequencing of *M. leprae* genome, in 2001, have allowed the designing of recombinant antigens (Cole et al., 2001). Considerable progress has been made and several antigens have been tried as potential use in clinical and immunological fields. Over the last decade, the Infectious Diseases Research Institute (IDRI) has working on an ambitious research program to develop new tools to aid in leprosy control efforts. The ultimate goal of this program is to provide a vaccine to prevent leprosy, but they also recognize diagnostic screening to permit targeted interventions to assist in the control of the disease (Duthie et al., 2016, 2014, 2012, 2011, 2007; Raman et al., 2009). The identification of new antigens

that are the target of the cellular immune response may be promising for diagnosis and immunoprophylaxis in leprosy (Duthie et al., 2016, 2011, 2010, 2008; Raman et al., 2009). Furthermore, how these antigens are recognized is likely the key to protective response. Thus, this research aimed to evaluate the immune response to the recombinant antigen ML2028 and the presence of multifunctional T cells induced in vitro by this antigen.

Material and methods

Ethical considerations

This project adheres to the protocols of the Brazilian Council for ethics in research (CONEP). The Ethics and Research Committee of the Federal University of Sergipe approved the study (CAAE 0152.0.107.000-07). All subjects signed a free and clarified term of knowledge (IC) and then responded to an investigative questionnaire to collect demographic and clinical data.

Study subjects and procedures

The study volunteers were attended in the dermatology ambulatory of the project (DES)MANCHA-Federal Sergipe at the University Hospital (Aracaju city, Brazil). Each subject was thoroughly examined for the presence of leprosy, leprosy reactions and neurological disabilities. Each patient was classified as having one of the clinical forms as characterized by Ridley-Jopling prior to treatment by conventional multidrug therapy (MDT) for leprosy, in accordance with the Brazilian Ministry of Health and International Leprosy Association (ILA) standards. Exclusion criteria were being under 5 and above

70 years old and diseases that affect immune response, as HIV, HTLV-I, diabetes and neurological diseases. A total of 87 subjects were included: 39 PB, 17 MB patients and 31 HHC. As previously mentioned, based on histopathological analysis, patients were further classified as: Indeterminate (IL), Tuberculoid (TT), Borderline (BL) or Lepromatous (LL) Leprosy. HHC were subjects living in close and prolonged contact with the patients and were commonly the patient's spouse.

Antigen stimulation assays

All immunological evaluations were performed before treatment was initiated. Whole blood was collected into tubes with heparin (10 IU/ml). Briefly, the blood was then seeded in 24 well-plates and incubated with crude antigen from *M. tuberculosis* (PPD – Purified Protein Derivative) at 1 µg/ml; crude antigen from *M. leprae* (MLCS) at 10 µg/ml; the recombinant antigen from *M. leprae* (ML2028) at 10 µg/ml; phytohemagglutinin (PHA) at 10 µg/ml or media alone (RPMI 1640: Gibco, Grand Island, New York, USA). Incubations were conducted for 24 hours at 5% CO₂, 37°C before collection of plasma. Concentrations of the cytokines IL-2, IFN-γ, IL-10 and IL-17A were determined by Luminex analyses, according to the manufacturer's instructions (Milliplex kit - Human Th17 Magnetic Bead Panel, Panomics, Affymetrix, Fremont, CA).

Multiparameter flow cytometry

To identify and quantify any multifunctional T cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque PLUS™, GE-Healthcare, Menio-Park, NJ). PBMC from subsets of TT (n =5), LL (n =6), HHC (n =6) and control (n =6) were seeded at 1x10⁶ cells/ml in 48 well-plates (Greiner-CELLSTAR®), incubated

with PPD (1 µg/ml), MLCS (10 µg/ml) or ML2028 (10 µg/ml) diluted with RPMI 1640 (Gibco, Grand-Island, New York, USA) for 6 hours at 5% CO₂, 37°C before the subsequent addition of GolgiPlug (BD-Biosciences, Franklin Lakes, NJ) for an additional 12 hours. At the end of culture period, cells were washed and incubated with antibodies for cell surface markers CD3 (V500), CD4 (FITC) and CD8 (PE-Cy5) and intracellular cytokines IL-2 (BV421), TNF-α (PE) and IFN-γ (PE-Cy7) (BD Biosciences, San Diego, CA). Cells were resuspended in staining buffer and events were acquired using the BD FACS Canto II. Analysis of the acquired datasets was performed using FlowJo (FlowJo-LLCv10) software. To evaluate multiple parameters, we performed Boolean gating analysis [15]. Comparison of frequency, median fluorescence intensity (MFI) and integrated MFI (iMFI) was made on a per group basis. iMFI is the value resulting from the multiplication of the frequency of a cytokine-producing subset of cells with the MFI for that cytokine [15]. All frequencies, MFI and iMFI values are reported after background subtraction of the frequency or iMFI of the identically gated population of cells from an unstimulated comparator of the same sample.

Statistical analysis

Cytokine concentrations were compared across the different subgroups (PB, MB and HHC) and according to clinical forms of leprosy. Mean, median and standard deviation of the groups were calculated. D'Agostino and Pearson tests were applied to analyze data that exhibited normal distribution. Statistical differences between the groups were determined by Mann-Whitney U tests. Comparisons of means for a given parameter were made by non-parametric (two-tailed, considering unequal variance of groups) t-tests. Correlation between cytokine levels was performed by Spearman correlation test. All

analyses were performed by GraphPad Prism software, version 7. Results were considered statistically different at a p -value < 0.05 .

Results

Demographic and clinical characteristics of study groups

No significant differences were observed between the age of patients presenting as PB or MB when compared to HHC, although the proportion of men presenting with MB (58.8%) was higher than that presenting with PB (28.2%; p -value = 0.02; **Table 1**). As expected, MB patients had a greater number of lesions (mean $\pm$ standard deviation (SD) 10.24 ± 4.69) than the PB patients (2.13 ± 2.66 ; p -value < 0.0001). The occurrence of reaction episodes was also significantly higher in MB than PB patients (64.7% vs. 30.77%, p -value = 0.01).

Antigen-specific secretion of Th1 cytokines by PB and HHC

To begin to assess the response of patients, we first analyzed the cytokine levels secreted following incubation of whole blood with crude (PPD and MLCS) or recombinant (ML2028) antigens. We detected both IFN- γ and IL-2 in the plasma from PB patients stimulated with PPD and MLCS (**Table 2**). Similarly, and indicating *M. leprae* exposure or potential low level infection, blood from HHC also secreted elevated levels of IFN- γ and IL-2. These results were in contrast with those obtained with blood from MB patients, where low or undetectable levels of these cytokines were observed. Differences were not observed between the groups in either IL-10 or IL-17A, both of which were detected at

only very low levels. Taken together, these data indicate a Th1-biased anti-mycobacterial response in both PB and HHC.

We also incubated blood with a recombinant version of the ML2028 protein. Relating to antigen-specific Th1 responses, we observed higher concentrations of IFN- γ in PB (31.5 ± 85.1 pg/ml) and HHC (87.6 ± 298.9 pg/ml) than in MB (2.9 ± 4.05 pg/ml; **Table 2**). Higher concentrations of IL-2 were also observed in samples stimulated with ML2028 in PB (7.59 ± 50.7 pg/ml) and HHC (12.8 ± 16.1 pg/ml) than in MB (4.6 ± 40.3 pg/ml). Interestingly, strong correlations were observed between these cytokines in the responses against each antigen (**Supplementary Figure 1**). As with the crude antigens, differences were not observed in IL-10 or IL-17A levels following incubation with ML2028. These data indicate that responses to ML2028 are similar to those against the whole *M. leprae* bacteria and can therefore be used as a proxy of the anti-*M. leprae* response.

To further examine any potential impact of circulating cytokines, we stratified patients according to the more refined Ridley-Jopling classification. We observed high levels of both IFN- γ and IL-2 in the supernatant of cells from TT patients stimulated with PPD and MLCS (**Figure 1A-E**). Higher levels of IFN- γ were reported in IL (11.8 ± 20.9 pg/ml) and TT (6.6 ± 8.7 pg/ml) patients supernatant stimulated with ML2028, as compared to LL (1.6 ± 0.5 pg/ml; **Figure 1C**). Higher levels of IL-2 were also identified in IL (11.9 ± 8.8 pg/ml) and TT (12.4 ± 8.6 pg/ml) as compared to LL patients (4.3 ± 4 pg/ml; **Figure 1F**). Statistical differences were not observed in IL-10 levels (**Figure 1G-I**). However, we observed higher levels of IL-17A in HHC than those in LL patients (**Figure 1J-L**).

These data indicate the presence of mycobacteria-specific, IL-2 and IFN- γ producing cells in the blood of HHC and PB patients.

Recent data indicates that the quality of the Th1 response impacts its ability to protect against intracellular pathogens (Seder et al., 2008). The presence of multifunctional cells simultaneously producing Th1 cytokines appears preferable to cells secreting only one of these cytokines. Positive correlations were observed between IL-2 and IFN- γ concentrations in supernatant stimulated with PPD (Spearman $r = 0.89$, p -value < 0.0001), MLCS (Spearman $r = 0.79$, p -value < 0.0001) and ML2028 (Spearman $r = 0.61$, p -value < 0.0001) (**Figure 2A-C**). The correlation in IFN- γ and IL-2 levels suggests that they may be being produced simultaneously by multifunctional T cells.

Multifunctional CD4⁺ T cells are more abundant in HHC than leprosy patients

To determine the phenotype of the antigen-specific cytokine-producing cells, we first assessed the iMFI (frequency and cytokine-producing capacity) of IFN- γ ⁺, IL-2⁺ and TNF⁺ CD4⁺ T cells. Differences were not observed in percentage of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes between the groups assessed (**data not shown**). Following flow cytometry, in support of our ELISA data, our analyses revealed high expression of CD4⁺IL-2⁺ iMFI in samples from HHC (279.6 ± 684.9) and TT patients (329.8 ± 659.6 ; **Figure 3A**) after incubation with ML2028. We observed also high expression of CD4⁺TNF- α ⁺ iMFI in HHC (8.7 ± 17.9 ; **Figure 3B**). We observed elevated expression of CD4⁺IFN- γ ⁺ iMFI in HHC (11.68 ± 28.6 ; **Figure 3C**) than in LL patients (0.0 ± 0.0) samples stimulated with PPD.

As the iMFI is a product of both frequency and quantity, high iMFI values could arise due to a greater frequency of cells that are each producing only small quantities of cytokine. We therefore used a multi-gating strategy to determine the proportion of antigen-specific cells that were producing the Th1 cytokines, gating for cells that were producing combinations of the cytokines (either all three together, combinations of two or individually). MLCS stimulus presented also higher expression of CD4⁺IFN- γ IL-2⁺TNF- α ⁺ and CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻TNF- α ⁺ in HHC than in TT and LL (**Figure 3D**). We observed high expression of triple positive and CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻TNF- α ⁻ in control and HHC (**Figure 3E**) after PPD stimulus. Similarly, the incubation with ML2028 presented higher expression of CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ in control (0.022 ± 0.01) and HHC (0.017 ± 0.01) than in TT (0.003 ± 0.002) and LL (0.001 ± 0.002) patients (**Figure 3F**). ML2028 was also recognized by elevated proportions of CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁻ (0.026 ± 0.06), CD4⁺IFN- γ ⁻IL-2⁺TNF- α ⁺ (0.094 ± 0.22) and CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻TNF- α ⁺ (0.044 ± 0.1) in HHC. ML2028 stimulus presented, however, higher expression of CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁻TNF- α ⁻ in LL (0.077 ± 0.05) and TT (0.016 ± 0.01), than in control (0.009 ± 0.01) and HHC (0.003 ± 0.00).

We grouped the results of all cells triple⁺, double⁺ and single⁺ (**Figure 3G**) and observed that ML2028 stimulus presented more percentage of triple⁺ (11.29%) and double⁺ (19.96%) in control and triple⁺ (1.22%) and double⁺ (11.7%) in HHC group. PPD stimulus expressed also more percentage of triple⁺ (12.27%) in HHC and double⁺ (22.9%) in control group. ML2028, PPD and MLCS stimulus presented similar percentage of triple⁺, double⁺ and single⁺ cells in TT and LL patients. Taken together, these data suggest that ML2028 recombinant antigen presented multifunctional CD4⁺T cell (IFN- γ , IL-2 and TNF- α triple and double positive) expression, similar to PPD, that have currently

been used to vaccinate against leprosy in HHC. It should be mentioned that these evaluations of the contacts subjects were collected before BCG revaccination.

HHC presented elevated expression of multifunctional CD8⁺T cell

We assessed also the percentage of total CD3⁺/CD8⁺ lymphocytes. However, no differences were observed in percentage of these cells stimulated with these antigens (**data not showed**). MLCS stimulus presented elevated CD8⁺IL-2⁺ iMFI in controls, but similar values were observed in other groups (**Figure 4A**). Cells stimulated with PPD presented high expression of CD8⁺IL-2⁺ and CD8⁺TNF- α ⁺ iMFI in LL patients (**Figure 4A-B**). Nevertheless, ML2028 stimulus expressed higher CD8⁺TNF- α ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ iMFI in HHC than TT and LL patients (**Figure 4B-C**). PPD and MLCS expressed also elevated CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ (triple⁺ cells) in control and HHC (**Figure 4D and E**, respectively). We identify also that ML2028 stimulus presented high CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ expression in control (0.006 ± 0.008) and HHC (0.005 ± 0.009) and higher percentage of CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ in HHC (1.55 ± 1.7) than in TT (0.25 ± 0.43) patients (**Figure 4F**). ML2028 stimulus presented, however, higher expression of CD8⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ in LL (0.06 ± 0.07) than in control (0.0 ± 0.0). After grouping all kind of positive cells, we observed that ML2028 stimulus presented high expression of triple⁺ cells in HHC (5.03%) and control (1.6%; **Figure 4G**). The stimulation with PPD and MLCS, similarly, presented triple⁺ cells expression in control and HHC. These data indicate that ML2028 stimulus presented either high expression of multifunctional CD8⁺T cell (triple⁺), especially in HHC.

Discussion

Recent studies, particularly into vaccine efficacy, have reported the role of multifunctional T cells in chronic infectious diseases as HIV (Omosa-Manyonyi et al., 2015), Leishmaniosis (Guha et al., 2013; Macedo et al., 2012) and Tuberculosis (Leung-Theung-Long et al., 2015; Lichtner et al., 2015). These studies reinforce the role of multifunctional T cells in central and effector memory generation and suggest that some antigens might be promising for vaccines development. However, this is the first study that analyzed multifunction T cells expression in leprosy patients and controls stimulated with crude and a recombinant antigen from *M. leprae*.

Regarding to leprosy disease, it presents slowly chronic clinical evolution and the multidrug treatment is effective, but current treatments are long term, about half of the patients present reactional episodes and some of them develop physical disabilities (de Oliveira et al., 2012; Duthie et al., 2012; Fonseca et al., 2017; Simon et al., 2011). In this study through the evaluation of the immune response of leprosy patients and HHC recognized by recombinant antigens (ML2028, PPD and MLCS), we demonstrate the higher expression of multifunctional T cells in HHC than in leprosy patients. The multifunctional CD4⁺ T cells usually have three potential features: they can remain as memory or effector T cells; they can further differentiate into less-functional T cells; or they can die following activation (Seder et al., 2008). Therefore, these abilities have important clinical implications and our findings suggest that these cells can be involved in the protection against *M. leprae* infection and leprosy development in HHC.

We have found that the recombinant antigen of *M. leprae* (ML2028), as PPD and MLCS, induced higher levels of IL-2 and INF- γ (which regulate the differentiation of Th1 response) in supernatant of HHC and PB compared to MB. Provide that, the Th1 response could lead to more efficient killing of mycobacterium (Fonseca et al., 2017) and IL-2 could enhance the expansion of such cells (Seder et al., 2008), this data reinforce that HHC immune response is more effective in *M. leprae* infection control and hence avoiding the disease development. Our results revealed either that cells from HHC and PB patients secrete higher levels of IL-2 and IFN- γ when stimulated with PPD. Since Bacillus Calmette-Guérin (BCG) has been used as vaccine against leprosy, the high production of these cytokines reinforces the protective immune response that BCG can generate against *M. leprae*.

As previously mentioned, cellular immune response involving CD4⁺ and CD8⁺ T cells is important for controlling infection by intracellular pathogens (Seder et al., 2008). Moreover, recent researches have demonstrated also that vaccine-induced generation of multifunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells provides better protection against intracellular infections (Guha et al., 2013). Our data regarding the secretion of both IL-2 and IFN- γ levels in HHC supernatant, made us to question if these group could present multifunctional T cells expression. Using multiparameter flow cytometry, we observed similarly that ML2028 was recognized by a higher population of antigen-specific multifunctional (double⁺ CD4⁺ T cells) in control and HHC than in LL patients. Since that CD4⁺IL-2⁺TNF- α ⁺ is associated with central memory and CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ and CD4⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ is involved with effector memory generation (Seder et al., 2008), our data suggest thus that the higher expression of multifunctional T cells in HHC can be involved with bacillus controls and therefore present a rational basis to explain the

disease resistant in HHC. In addition, it suggests that ML2028 can provide durable protection by developing memory response. The multifunctional antigen-specific T cells presented also high expression of iMFI $CD4^+IL-2^+$ in HHC and iMFI $CD4^+IFN-\gamma^+$ in controls. Since iMFI calculation incorporates the magnitude, quality and the potency of the response, it reinforces thus that HHC immune response is more effective against *M. leprae* infection. These data highlight the importance of iMFI to determining a total functional response and show that the iMFI can be useful for correlating with protection (Darrah et al., 2007). Interestingly, Kim and colleagues (Kim et al., 2016) suggest that BCG contains many antigens that can augment multifunctional T cell populations. In the current study, our data showed also that PPD antigen was recognized by multifunctional T cells, similar to ML2028. It corroborates our supernatant data and the protective immune response that BCG can generate against *M. leprae* infection.

The role of $CD8^+$ T cell during infection for protection has been also recently investigated (Seder et al., 2008). Furthermore, $CD8^+$ T cells that produce $IFN-\gamma$ and $TNF-\alpha$ have enhanced cytolytic activity and the IL-2 secretion promotes cell expansion, it could enhance $CD8^+$ T cell memory function in chronic infectious diseases as HIV (Omosa-Manyonyi et al., 2015) and Leishmaniosis (Darrah et al., 2007; Guha et al., 2013). We have also found that ML2028 stimulus expressed antigen-specific multifunctional ($IFN-\gamma^+IL-2^+TNF-a^+$) $CD8^+$ T cells in control and HHC. Based on these trends, we reported that $CD8^+$ T cells from HHC individuals with better control of infection have an increased frequency of multifunctional cells compared with those patients with leprosy. Altogether, this indicate that multifunctional $CD8^+$ T cells can be involved also with *M. leprae* control in HHC group.

We observed also that the antigen-stimulus do not presented high levels of IL-10 in patients and controls. IL-10 is an important cytokine associated with Treg response and some authors have reinforced the role of IL-10 to equilibrium between inflammatory and anti-inflammatory responses, as observed in other infectious diseases, such as mucosal *Leishmaniasis* (Nascimento et al., 2015; Singh et al., 2012; Stober et al., 2005). Therefore, ML2028 stimulus, as PPD and MLCS, were not associated with strong anti-inflammatory responses. Alternatively, we identified IL-17A levels more elevated in HHC than in MB patients. In this regard, IL-17A may attract neutrophils to mediate defenses against different pathogens (Akdis et al., 2011; Escamilla-Tilch et al., 2014; Lee et al., 2010) and activates other immune mechanisms that help to control intracellular pathogens. Th17 responses can be associated also with a protective effect during *M. leprae* infection. Altogether, these data suggest that the multifunctional antigen-specific T cells do not express higher levels of IL-10 and hence they are not associated with anti-inflammatory responses.

In summary, this is the first study that demonstrated the expression of multifunction T cells in leprosy patients and HHC, stimulated with crude and a recombinant antigen of *M. leprae*. Taken together, our data reported the higher frequency of triple⁺ and double⁺ CD4⁺ and CD8⁺ T cells in HHC by antigen-specific. We observed also that ML2028, PPD and MLCS antigens were associated with Th1 response in HHC, but do not presented high levels of IL-10. Therefore, these findings highlight that HHC express high multifunctional antigen-specific T cells and has a more effective immune response against *M. leprae* infection.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment

We would like to thank the residents and dermatologists of Dermatology Clinic-HU/UFS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Funding

Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC)/SE/FUNTEC/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Grants: CNPq n°12/2009, Process n° 019.203.02712/2009-8 (ARJ). ARJ and RPA are CNPq investigators. MCTI/CNPQ/Universal 14/2014, Process: 454848/2014-5 (ARJ).

References

- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 701–721. doi:10.1016/j.jaci.2010.11.050
- Attia, E.A.S., Abdallah, M., El-Khateeb, E., Saad, A.A., Lotfi, R.A., Abdallah, M., El-Shennawy, D., 2014. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ T-reg cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch. Dermatol. Res.* 306, 793–801. doi:10.1007/s00403-014-1486-2
- Balaram, P., Kien, P.K., Ismail, A., 2009. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 177–185. doi:10.1016/j.ijmm.2008.08.004
- Cole, S.T., Eglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., Barrell, B.G., 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007–1011. doi:10.1038/35059006
- Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., Roederer, M., Seder, R.A., 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection

- against *Leishmania major*. *Nat Med* 13, 843–850. doi:nm1592
[pii]r10.1038/nm1592
- de Oliveira, D.T., Bezerra, M.M., de Almeida, J.A.P., Duthie, M., Reed, S., de Jesus, A.R., 2012. Neurological disability in leprosy: Incidence and gender association in Sergipe, Brazil. *Geospat. Health* 6. doi:10.4081/gh.2012.130
- Dupnik, K.M., Bair, T.B., Maia, A.O., Amorim, F.M., Costa, M.R., Keesen, T.S.L., Valverde, J.G., Queiroz, M.D.C.A.P., Medeiros, L.L., De Lucena, N.L., Wilson, M.E., Nobre, M.L., Johnson, W.D., Jeronimo, S.M.B., 2015. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. *J. Infect. Dis.* 211, 1658–1676. doi:10.1093/infdis/jiu612
- Duthie, M.S., Coler, R.N., Laurance, J.D., Sampaio, L.H., Oliveira, R.M., Sousa, A.L.M., Stefani, M.M.A., Maeda, Y., Matsuoka, M., Makino, M., Reed, S.G., 2014. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLASE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect. Immun.* 82, 3979–3985. doi:10.1128/IAI.02145-14
- Duthie, M.S., Gillis, T.P., Reed, S.G., 2011. Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine. *Hum. Vaccin.* 7, 1172–83. doi:10.4161/hv.7.11.16848
- Duthie, M.S., Goto, W., Ireton, G.C., Reece, S.T., Sampaio, L.H., Grassi, A.B., Sousa, A.L.M., Martelli, C.M.T., Stefani, M.M.A., Reed, S.G., 2008. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1659–1665. doi:10.1128/CVI.00234-08
- Duthie, M.S., Hay, M.N., Morales, C.Z., Carter, L., Mohamath, R., Ito, L., Oyafuso, L.K.M., Manini, M.I.P., Balagon, M. V., Tan, E. V., Saunderson, P.R., Reed, S.G., Carter, D., 2010. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 298–

303. doi:10.1128/CVI.00400-09

Duthie, M.S., Orcullo, F.M., Abbelana, J., Maghanoy, A., Balagon, M.F., 2016.

Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3267–3275.

doi:10.1007/s00253-016-7328-8

Duthie, M.S., Reece, S.T., Lahiri, R., Goto, W., Raman, V.S., Kaplan, J., Ireton, G.C.,

Bertholet, S., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Reed, S.G., 2007. Antigen-specific cellular and humoral responses are induced by intradermal *Mycobacterium leprae* infection of the mouse ear. *Infect. Immun.* 75, 5290–5297. doi:10.1128/IAI.00564-07

Duthie, M.S., Saunderson, P., Reed, S.G., 2012. The potential for vaccination in leprosy

elimination: New tools for targeted interventions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 190–196. doi:10.1590/S0074-02762012000900027

Escamilla-Tilch, M., Estrada-Garcia, I., Granados, J., Arenas-Guzman, R., Ramos-

Payan, R., Perez-Suarez, T.G., Salazar, M.I., Perez-Lucas, R.L., Estrada-Parra, S., Torres-Carrillo, N.M., 2014. Lack of Association of the Polymorphisms IL-17A (-197G/A) and IL-17F (+7488A/G) with Multibacillary Leprosy in Mexican Patients. *Int. J. Genomics* 2014, 920491. doi:10.1155/2014/920491

Fonseca, A.B. de L., Simon, M. do V., Cazzaniga, R.A., de Moura, T.R., de Almeida,

R.P., Duthie, M.S., Reed, S.G., de Jesus, A.R., 2017. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy.

Infect. Dis. Poverty 6, 5. doi:10.1186/s40249-016-0229-3

Guha, R., Gupta, D., Rastogi, R., Vikram, R., Krishnamurthy, G., Bimal, S., Roy, S.,

Mukhopadhyay, A., 2013. Vaccination with leishmania hemoglobin receptor-encoding DNA protects against visceral leishmaniasis. *Sci. Transl. Med.* 5,

202ra121. doi:10.1126/scitranslmed.3006406

- Kim, W.S., Jong-Seok, K., Cha, S. Bin, Kim, H., Kee, K.W., Kim, S.J., Han, S.J., Choi, S.Y., Sang-Nae, C., Jong-Hwan, P., Shin, S.J., 2016. Mycobacterium tuberculosis Rv3628 drives Th1-type T cell immunity via TLR2-mediated activation of dendritic cells and displays vaccine potential against the hyper-virulent Beijing K strain. *Oncotarget* 7. doi:10.18632/oncotarget.8771
- Kohli, S., Singh, Y., Sowpati, D.T., Ehtesham, N.Z., Dobrindt, U., Hacker, J., Hasnain, S.E., 2015. Human mesenchymal stem cells: New sojourn of bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 322–326. doi:10.1016/j.ijmm.2015.01.001
- Lee, D.J., Li, H., Ochoa, M.T., Tanaka, M., Carbone, R.J., Damoiseaux, R., Burdick, A., Sarno, E.N., Rea, T.H., Modlin, R.L., 2010. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J. Infect. Dis.* 201, 558–569. doi:10.1086/650318
- Leung-Theung-Long, S., Gouanvic, M., Coupet, C.A., Ray, A., Tupin, E., Silvestre, N., Marchand, J.B., Schmitt, D., Hoffmann, C., Klein, M., Seegren, P., Huaman, M.C., Cristillo, A.D., Inchauspé, G., 2015. A novel MVA-based multiphasic vaccine for prevention or treatment of tuberculosis induces broad and multifunctional cell-mediated immunity in mice and primates. *PLoS One* 10, 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0143552
- Lichtner, M., Mascia, C., Sauzullo, I., Mengoni, F., Vita, S., Marocco, R., Belvisi, V., Russo, G., Vullo, V., Mastroianni, C.M., 2015. Multifunctional analysis of CD4⁺ T-cell response as immune-based model for tuberculosis detection. *J. Immunol. Res.* 2015. doi:10.1155/2015/217287
- Macedo, A.B.B., Sánchez-Arcila, J.C., Schubach, A.O., Mendonça, S.C.F., Marins-Dos-Santos, A., De Fatima Madeira, M., Gagini, T., Pimentel, M.I.F., De Luca,

- P.M., 2012. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 505–513. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04536.x
- Nascimento, M.S.L., Carregaro, V., Lima-Júnior, D.S., Costa, D.L., Ryffel, B., Duthie, M.S., De Jesus, A., De Almeida, R.P., Da Silva, J.S., 2015. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection. *J. Infect. Dis.* 211, 1015–1026. doi:10.1093/infdis/jiu531
- Omosa-Manyonyi, G., Mpendo, J., Ruzagira, E., Kilembe, W., Chomba, E., Roman, F., Bourguignon, P., Koutsoukos, M., Collard, A., Voss, G., Laufer, D., Stevens, G., Hayes, P., Clark, L., Cormier, E., Dally, L., Barin, B., Ackland, J., Syvertsen, K., Zachariah, D., Anas, K., Sayeed, E., Lombardo, A., Gilmour, J., Cox, J., Fast, P., Priddy, F., 2015. A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of the safety and immunogenicity of an adjuvanted HIV-1 Gag-Pol-Nef fusion protein and adenovirus 35 Gag-RT-Int-Nef vaccine in healthy HIV-uninfected African adults. *PLoS One* 10. doi:10.1371/journal.pone.0125954
- Palermo, M.L., Pagliari, C., Trindade, M.A.B., Yamashitafuji, T.M., Duarte, A.J.S., Cacere, C.R., Benard, G., 2012. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 878–883. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0088
- Raman, V.S., O'Donnell, J., Bajor, H.R., Goto, W., Lahiri, R., Gillis, T.P., Reed, S.G., Duthie, M.S., 2009. Vaccination with the ML0276 antigen reduces local inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. *Infect. Immun.* 77, 5623–5630. doi:10.1128/IAI.00508-09
- Rubio Reyes, P., Parlane, N.A., Wedlock, D.N., Rehm, B.H.A., 2016. Immunogenicity of antigens from *Mycobacterium tuberculosis* self-assembled as particulate

- vaccines. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 624–632. doi:10.1016/j.ijmm.2016.10.002
- Saini, C., Siddiqui, A., Ramesh, V., Nath, I., 2016. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3⁺ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, 1–21. doi:10.1371/journal.pntd.0004592
- Seder, R. a, Darrah, P. a, Roederer, M., 2008. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 247–258. doi:10.1038/nri2274
- Simon, M., Scherlock, J., Duthie, M.S., Ribeiro De Jesus, A., 2011. Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy. *Drug Dev. Res.* 72, 509–527. doi:10.1002/ddr.20457
- Singh, O.P., Stober, C.B., Singh, A.K., Blackwell, J.M., Sundar, S., 2012. Cytokine Responses to Novel Antigens in an Indian Population Living in an Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6. doi:10.1371/journal.pntd.0001874
- Stober, C.B., Lange, U.G., Roberts, M.T.M., Alcamí, A., Blackwell, J.M., 2005. IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine *Leishmania* major Infection. *J. Immunol.* 175, 2517–2524. doi:10.4049/jimmunol.175.4.2517
- Talker, S.C., Koinig, H.C., Stadler, M., Graage, R., Klingler, E., Ladinig, A., Mair, K.H., Hammer, S.E., Weissenböck, H., Dürrwald, R., Ritzmann, M., Saalmüller, A., Gerner, W., 2015. Magnitude and kinetics of multifunctional CD4⁺ and CD8^β + T cells in pigs infected with swine influenza A virus. *Vet. Res.* 46–52. doi:10.1186/s13567-015-0182-3

Table 1. Demographic and clinical characteristics of PB and MB patients and household contacts (HHC).

Variables		PB (n=39)	MB (n=17)	HHC (n=31)	<i>p</i> value
Age	Range (years)	11-84	10-77	25-79	
	Mean $\pm$ SD	46.87 $\pm$ 17.81	40.59 $\pm$ 18.76	48.89 $\pm$ 10.81	*0.19
Gender (male)	n (%)	11 (28.2%)	10 (58.8%)	11 (35.5%)	***0.02
Lesion number	Range	*0-15	2-20	NA	*<0.0001
	Mean $\pm$ SD	2.13 $\pm$ 2.66	10.24 $\pm$ 4.69	NA	
Leprosy reaction	n (%)	12 (30.77%)	11 (64.7%)	NA	***0.01
Physical disability	Grade 1 n (%)	19 (48.7%)	08 (47.1%)	NA	***0.28
	Grade 2 n (%)	03 (7.7%)	03 (17.6%)	NA	***0.26

SD: Standard Deviation; NA: Not applicable. *Mann-Whitney test; ** Fisher exact test

Table 2. Cytokines released in whole blood assay using different antigens. Blood was collected from MB, PB and HHC and directly stimulated with antigen for 24 hours. IL-2, INF- γ , IL-10 and IL-17A levels in the plasma were measured by Luminex.

	Group	MLCS	PPD	ML2028
IFN-γ mean $\pm$ SD pg/ml (min – max)	HHC	11.3 $\pm$ 15.8^a (2.3 – 57.8)	223.4 $\pm$ 610 (2 – 3329)^a	87.6 $\pm$ 298.9^a (0.66 – 1406)
	PB	24.9 $\pm$ 33.6^a (1.4 – 104.4)	384 $\pm$ 1024 (0 – 4408)^a	31.5 $\pm$ 85.1^a (0.8 – 355.9)
	MB	2.5 $\pm$ 1.6 (1.6 – 6.2)	3.7 $\pm$ 2.7 (0 – 8.8)	2.9 $\pm$ 4.0 (0 – 16.7)
IL-2 mean $\pm$ SD pg/ml (min – max)	HHC	31.5 $\pm$ 35.2^a (4 – 125.5)	187.1 $\pm$ 206.3^a (0 – 743.3)	18.6 $\pm$ 16.1^a (2.16 – 61.7)
	PB	50.4 $\pm$ 74.9^a (4 – 252.9)	1248 $\pm$ 4315^a (0 – 19867)	132.2 $\pm$ 504.7^a (0 – 2852)
	MB	3.2 $\pm$ 4.2 (0 – 12.7)	15.1 $\pm$ 21.2 (1.2 – 85.1)	14.2 $\pm$ 40.3 (0 – 170.5)
IL-10 mean $\pm$ SD pg/ml (min – max)	HHC	11.8 $\pm$ 7.3 (3.1 – 24.9)	703.7 $\pm$ 3589 (1 – 20000)	29.4 $\pm$ 137.8 (0 – 771.9)
	PB	20.3 $\pm$ 23.2 (1.2 – 70.6)	1455 $\pm$ 4928 (0 – 23634)	28.4 $\pm$ 117.1 (0 – 692.5)
	MB	13.1 $\pm$ 7.1 (4.4 – 26.4)	1083 $\pm$ 4465 (0.5 – 18973)	65.1 $\pm$ 245.7 (0 – 1048)
IL-17A mean $\pm$ SD pg/ml (min – max)	HHC	2.9 $\pm$ 0.9 (1 – 4.1)	30.1 $\pm$ 129.2^a (1 – 684.1)	2.2 $\pm$ 1.8 (0 – 10.1)
	PB	2.5 $\pm$ 0.7 (2 – 4.2)	144 $\pm$ 332.2^a (2 – 1244)	9.5 $\pm$ 39.8 (0 – 241.5)
	MB	2.2 $\pm$ 1.4 (0 – 4)	2.5 $\pm$ 1.5 (0.4 – 6)	1.8 $\pm$ 1.5 (0 – 5.8)

^a = p value $\leq$ 0.01 versus MB

Figures

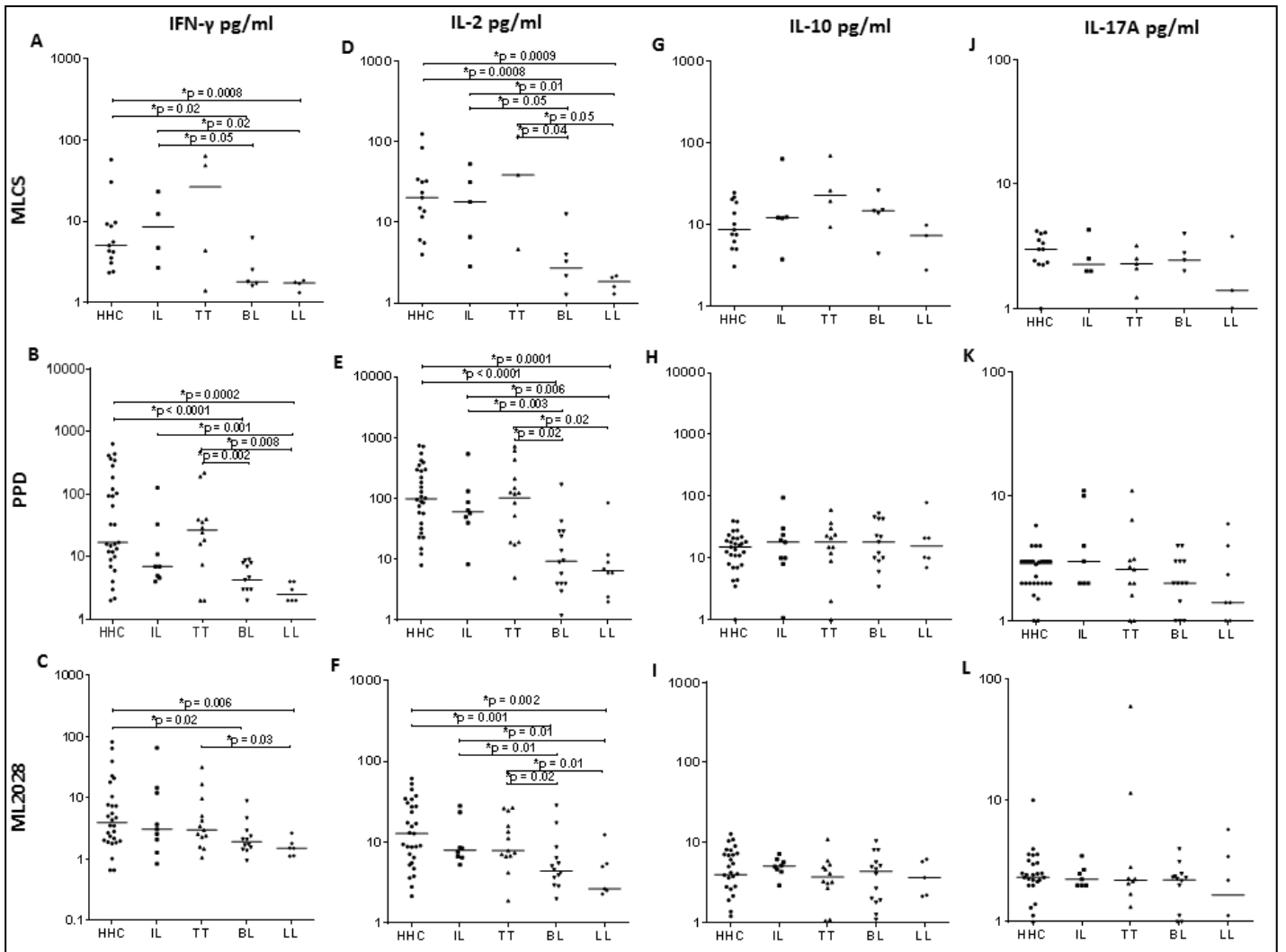


Figure 1. Cytokines released in total blood-stimulated supernatants of Indeterminate (IL), Tuberculoid (TT), Borderline (BL) and Lepromatous (LL) leprosy patients and HHC. IL-2, INF- γ , IL-10 and IL-17A levels were measured in heparinized total blood supernatants of leprosy patients classified according to Ridley Jopling and HHC, stimulated with recombinant antigen (ML2028) and crude antigens of *M. tuberculosis* (PPD) and *M. leprae* (MLCS). Cytokine concentrations were collected and determined by Luminex.

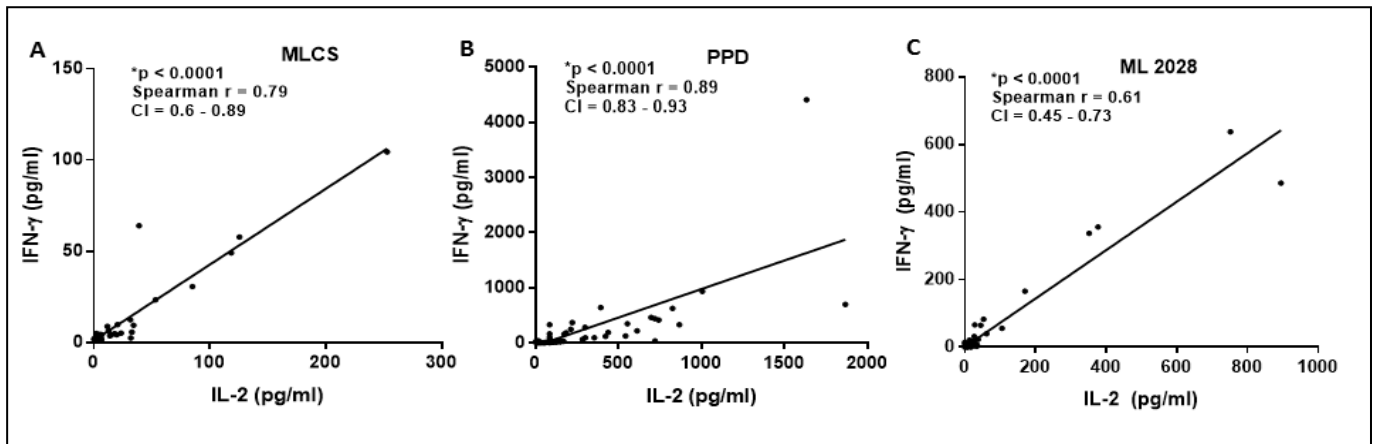


Figure 2. Correlation among supernatant cytokines. Cytokine concentrations from PB (n = 23) and MB n = 28) leprosy patients and HHC (n = 23) samples stimulated with MLCS (A), PPD (B) and ML2028 (C) were analyzed by Luminex Technique and correlation between the cytokines (IFN- γ and IL-2) values were determined by Spearman test. CI = Confidence Interval. *Asterisks indicate statistically significant correlations, at a p value < 0.05 .

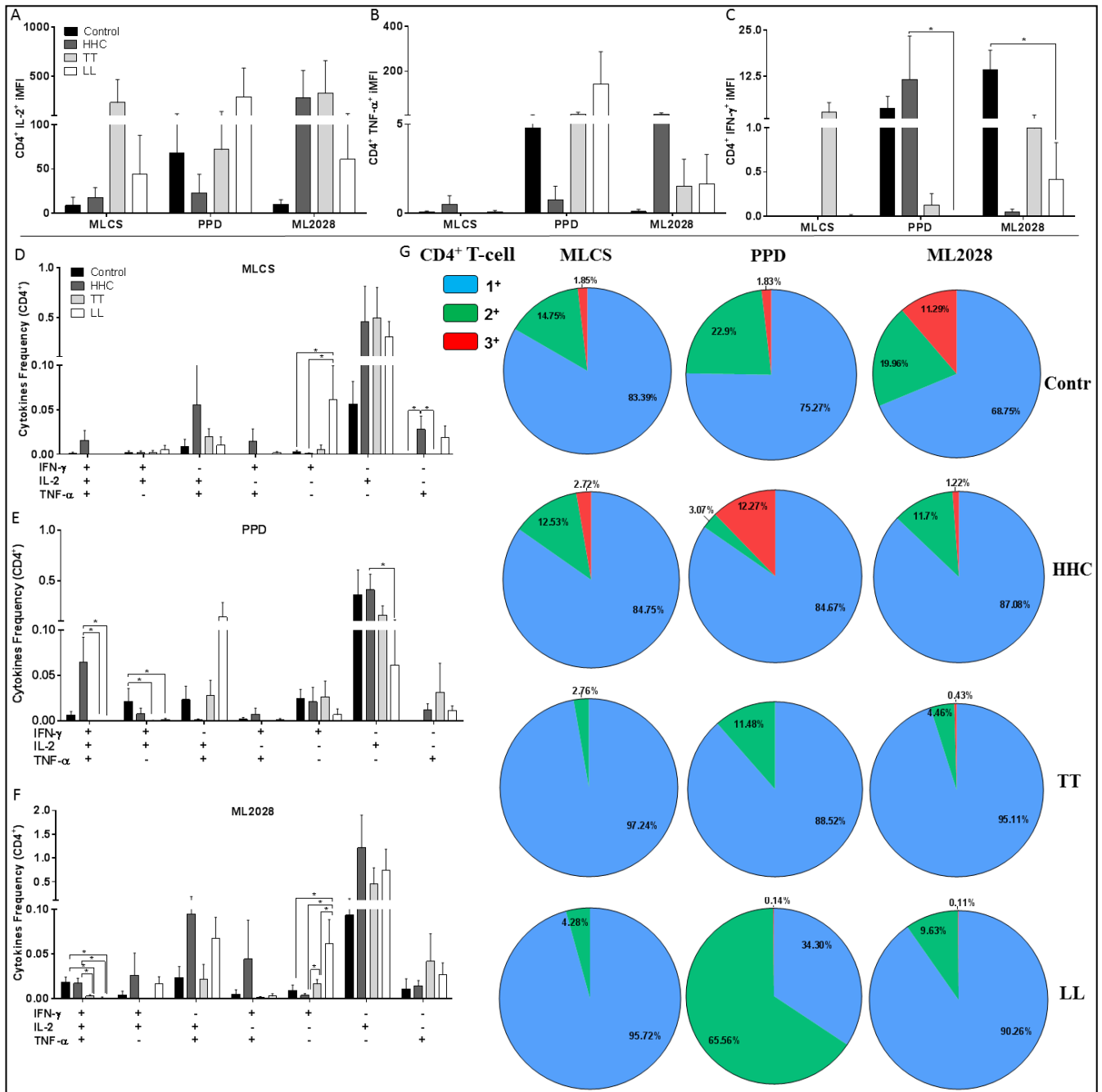


Figure 3. Frequency of multifunction CD4⁺T cells expression stimulated with crude (MLCS and PPD) and recombinant antigen ML2028 by flow cytometry. The iMFI of CD4⁺IL-2⁺ (A), CD4⁺TNF-α⁺ (B) and IFN-γ⁺ (C). The frequency of cells expressing each of the seven possible combinations of IFN-γ⁺, IL-2⁺ or TNF-α⁺ in PBMC of Contr (control), HHC, TT and LL patients, stimulated with D) MLCS, E) PPD and F) ML2028.

G) The fraction of the total response comprising cells expressing all three cytokines (3^+), any two cytokines (2^+) or any one cytokine (1^+). Statistical analyzes determined by Mann-Whitney and T test. *Asterisks indicate statistically significant differences between groups at a p value < 0.05 .

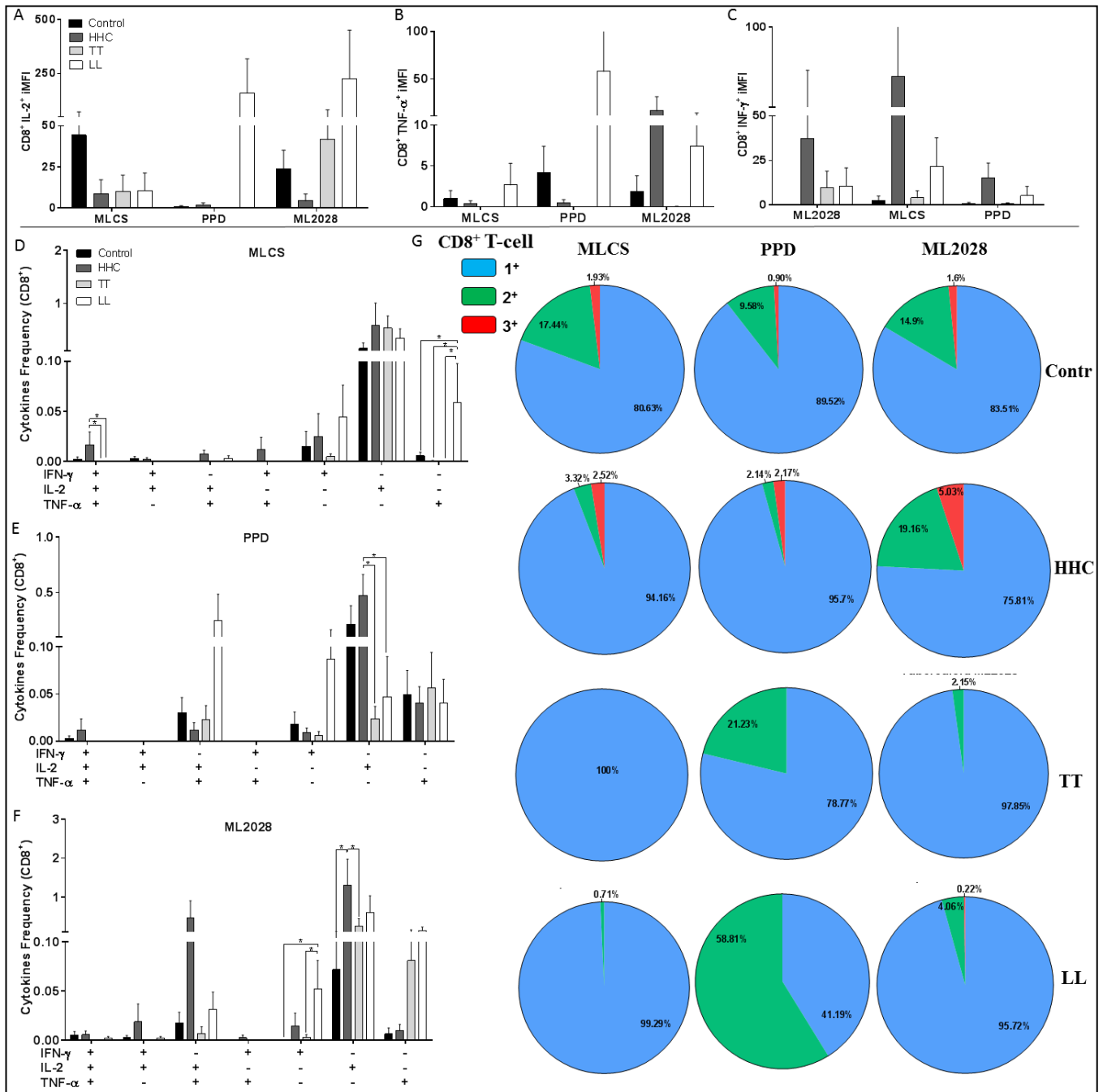
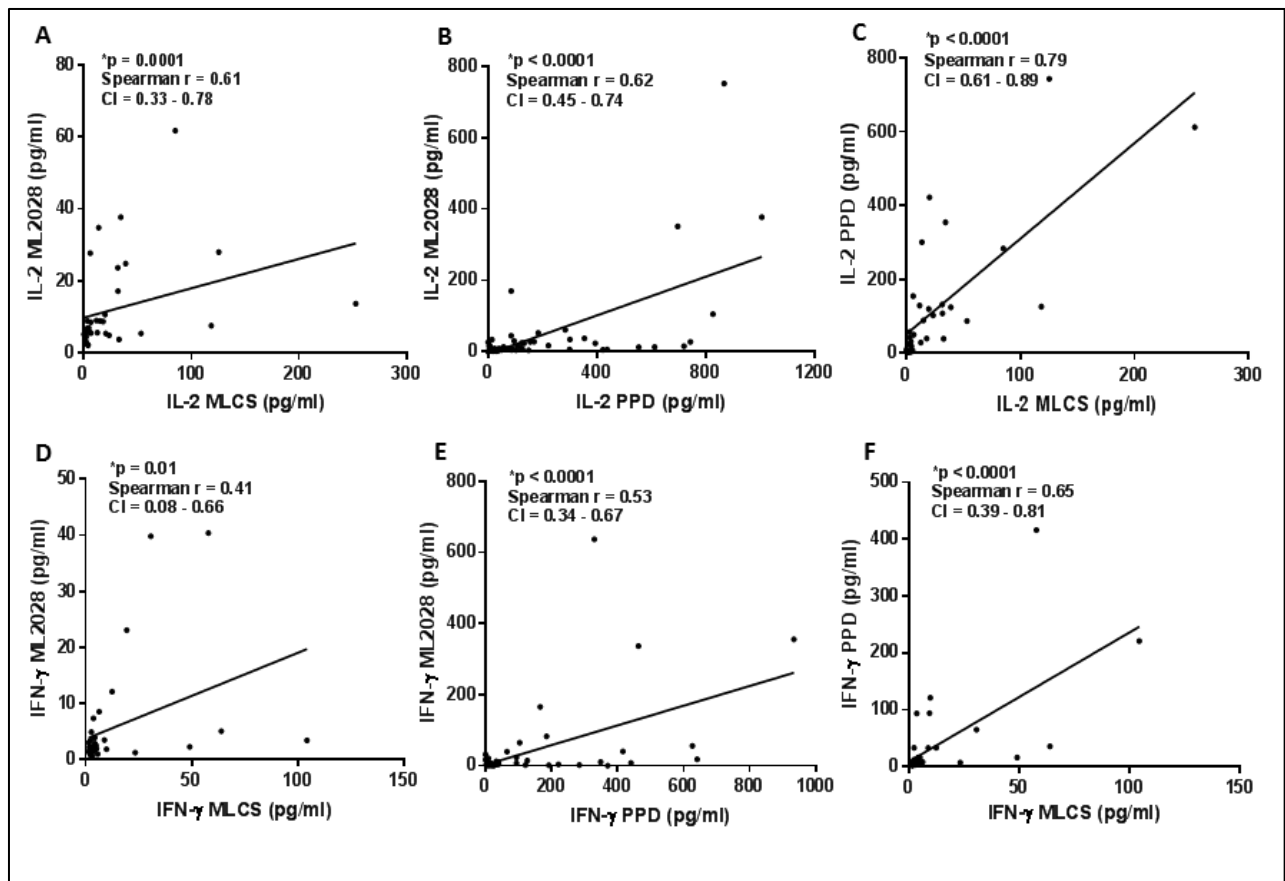


Figure 4. Frequency of multifunction CD8⁺T cells expression stimulated with crude (MLCS and PPD) and recombinant antigen ML2028 by flow cytometry. The iMFI of CD8⁺IL-2⁺ (A), CD8⁺TNF-α⁺ (B) and IFN-γ⁺ (C). The frequency of cells expressing each of the seven possible combinations of IFN-γ⁺, IL-2⁺ or TNF-α⁺ in PBMC of Contr (control), HHC, TT and LL patients, stimulated with D) MLCS, E) PPD and F) ML2028.

G) The fraction of the total response comprising cells expressing all three cytokines (3^+), any two cytokines (2^+) or any one cytokine (1^+). Statistical analyzes determined by Mann-Whitney and T test. *Asterisks indicate statistically significant differences between groups at a p value < 0.05 .



Supplementary Figure 1. Correlation among supernatant cytokines. Cytokine concentrations from PB (n = 23) and MB (n = 28) leprosy patients and HHC (n = 23) samples stimulated with MLCS, PPD and ML2028 were analyzed by Luminex Technique and correlation between the cytokines (IFN- γ and IL-2) values were determined by Spearman test. CI = Confidence Interval. *Asterisks indicate statistically significant correlations, at a *p* value < 0.05.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o papel das células Th1 e Th17 na apresentação clínica da hanseníase. A análise microscópica das lesões, assim como de PBMC, revelou que pacientes com HT apresentaram maior número de células $CD4^+IL-17^+$ do que pacientes com HV. As dosagens de citocinas no soro indicaram também que as concentrações séricas de IL-17A estão elevadas em pacientes PB e sugerem que as células Th17 estão associadas com o desenvolvimento desta forma clínica. Contudo, não observamos diferenças nos níveis séricos de IL-17A entre os pacientes MB LR⁻ e MB LR⁺, sugerindo que as células Th17 não estão envolvidas na resposta inflamatória geral observada durante os episódios reacionais.

Diversos estudos vêm reportando a ação de células das respostas Th1, Th2 e Treg na evolução clínica da hanseníase [13,18,21–23,33]. O papel protetor de células Th17 já foi reportado em outras infecções intracelulares [56–59], em concordância com os dados deste trabalho. Um estudo realizado por Saini e colaboradores [27] também descreveu que a resposta Th17 está associada com as formas PB de Hanseníase. No entanto, os autores reportaram o envolvimento das células Th17 nas reações hansênicas do tipo 1 e 2 [21], enquanto nossos dados sustentam a associação da IL-17A com as apresentações PB, mas não com a resposta inflamatória em episódios reacionais.

A citocina IL-1 β regula a polarização de células Th17 e a sua interação com a IL-21 e a IL-23 amplifica a resposta imune Th17 [25,58]. No presente estudo, observamos níveis elevados de IL-1 β em pacientes PB. A IL-1 β participa da resposta imune em muitas doenças devido a sua capacidade de potencializar as respostas inflamatórias. Além disso,

estudos mostraram que os camundongos *knockout* para IL-1 β apresentaram susceptibilidade aumentada à infecção por *Shigella*, *Salmonella*, *C. albicans* e *S. aureus* e morreram poucos dias após a infecção [59]. Nossos dados indicam que IL-1 β e IL-17A estão associadas com a apresentação clínica PB da hanseníase, sugerindo que estas citocinas podem contribuir para o controle da infecção por *M. leprae*.

Os dados de nosso estudo corroboram também a associação das citocinas IFN- γ e IL-12p70 (que regulam a diferenciação da resposta Th1) [25] com as formas PB da hanseníase e mostram que há uma correlação entre IL-17A, IFN- γ e IL-12p70. Estes dados corroboram o argumento de que as respostas Th1 e Th17 interagem para ajudar a controlar a proliferação e disseminação de *M. leprae* durante a infecção.

No entanto, é importante destacar que os pacientes MB RH⁺, apresentaram maiores níveis de IFN- γ que outros grupos (MB RH⁻, PB e controles contactantes). Além disso, os doentes com HV, que apresentaram concentrações séricas de IFN- γ superiores a 50 pg/ml, tiveram maior probabilidade de evoluir com episódios reacionais ou grau de incapacidade física devido a lesões neurológicas (80% e 60%, respectivamente). Considerando que esses pacientes apresentaram maiores percentuais de linfócitos CD4⁺IFN- γ ⁺ e CD8⁺IFN- γ ⁺, esses dados sugerem que pacientes que respondem com altos níveis de IFN- γ , desenvolvem resposta inflamatória exacerbada e evoluem com as formas clínicas mais agressivas de hanseníase. Isto reforça a extrema importância do equilíbrio entre as respostas pró- e anti-inflamatórias na doença, semelhantes às observações em outras infecções causadas por patógenos intracelulares, a exemplo da leishmaniose mucosa [52,53,60]. É importante ressaltar que não observamos diferenças nos níveis de IL-17A entre MB RH⁺ e MB RH⁻, sugerindo que as células Th17 não contribuem para os

episódios inflamatórios observados nas reações hansênicas.

O desenvolvimento de células Th17 está sob ação do fator de transcrição ROR γ t [25,26] e os linfócitos de indivíduos deficientes em ROR γ - e ROR γ T- apresentam maior suscetibilidade à infecção por *Candida albicans* e *Mycobacterium* [61]. Okada e colaboradores [61] descreveram uma mutação bi-alelica no gene RORC que causa falhas funcionais nas isoformas ROR γ e ROR γ T. Esses indivíduos apresentam deficiência de produção de IL-17 e também uma redução da produção de IFN- γ em resposta a antígenos de *Mycobacterium*. Assim, esses autores sugerem que a citocina IL-17 é importante para respostas protetoras contra *C. albicans* e o IFN- γ está envolvido com a proteção sistêmica contra *Mycobacterium*. Eles afirmam que falhas na resposta por IFN- γ aumenta a susceptibilidade à micobactérias, no entanto, nossos resultados demonstram que não só a resposta Th1 (produção de IFN- γ) é crucial na proteção contra *M. leprae*, mas que a resposta Th17 (produção de IL-17A) também está envolvida. O papel da IL-17A pode não estar exclusivamente limitado a subconjuntos de células T auxiliares, haja vista que IL-17A também foi identificada em células T CD8⁺, células T $\gamma\delta$, células NK e neutrófilos [24,55]. Além do mais, a IL-17A recruta neutrófilos que atuam na defesa contra diferentes agentes patogênicos [55,62] e tem sido associado com outros mecanismos imunes que ajudam a controlar doenças infecciosas por agentes intracelulares, a exemplo da leishmaniose visceral [56] e da tuberculose [57].

Estudos recentes, particularmente aqueles que vem avaliando a eficácia de vacinas, relataram a função das células T multifuncionais na proteção de diversas doenças infecciosas e crônicas como o HIV [50], leishmanioses [37,40] e tuberculose [41,42].

Estes estudos reforçam o papel das células T multifuncionais na geração de memória central e efetora e sugerem que alguns antígenos podem ser promissores para o desenvolvimento de vacinas. No entanto, este é o primeiro estudo que analisou a expressão de células T multifuncionais em pacientes com hanseníase e controles contactantes estimulados com antígenos brutos e recombinante de *M. leprae*.

Neste estudo, através da avaliação da resposta imune de pacientes com hanseníase e controles contactantes estimulados com antígenos brutos e recombinante (MLCS, PPD e ML2028), nós demonstramos maior expressão de células T multifuncionais em controles contactantes do que em pacientes com hanseníase. As células T CD4⁺ multifuncionais geralmente podem permanecer como células T de memória ou efetoras, ou podem entrar em processo de apoptose logo após a ativação [35]. Portanto, essas habilidades têm algumas implicações clínicas importantes e nossos dados sugerem que essas células podem estar envolvidas na proteção contra infecção por *M. leprae* e controlam o desenvolvimento da hanseníase nestes controles contactantes.

Nós observamos que o estímulo de PBMC com o antígeno recombinante de *M. leprae* (ML2028), assim como com PPD e MLCS, induziu níveis mais elevados de IL-2 e INF- γ (que regulam a diferenciação da resposta Th1) no sobrenadante de controles contactantes e pacientes PB, em comparação com MB. É sabido que a resposta Th1 é um padrão de resposta imune mais eficaz na eliminação de micobactérias [2] e que a IL-2 tem a capacidade de aumentar a expansão dessas células [25]. Em conjunto, estes dados reforçam o argumento de que a resposta imunitária em controles contactantes é deveras mais eficaz no controle da infecção por *M. leprae* e, conseqüentemente, evita o desenvolvimento da doença.

Nossos resultados revelaram também que as células de controles contactantes e pacientes PB secretaram níveis mais elevados de IL-2 e IFN- γ quando estimulados com PPD. Uma vez que o BCG tem sido utilizado por anos como vacina contra a hanseníase, a alta produção destas citocinas reforça a resposta imunológica protetora que o BCG pode gerar contra *M. leprae*.

Como mencionado anteriormente, a resposta imunitária celular envolvendo células T CD4⁺ e CD8⁺ é importante para o controle da infecção por patógenos intracelulares [25]. Além disso, pesquisas recentes demonstraram também que a geração de células T CD4⁺ e CD8⁺ multifuncionais, induzidas por candidatos a vacina, proporciona melhor proteção contra infecções intracelulares [35,38]. Os dados referentes aos níveis de ambos IL-2 e IFN- γ secretados no sobrenadante de controles contactantes e pacientes PB, nos levaram a questionar se esses grupos poderiam apresentar também expressão de células T multifuncionais. Usando técnicas multiparamétricas por citometria de fluxo, observamos, de forma semelhante aos dados no sobrenadante, que ML2028 foi reconhecido por uma população maior de células T multifuncionais (células T CD4⁺ duplo⁺) em controles contactantes do que em pacientes com HV. Uma vez que as subpopulações de células CD4⁺TNF- α ⁺IL-2⁺ está associado com a geração de memória central e que CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ e CD4⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ estão envolvidas com a geração de memória efetora [35], nossos dados sugerem, portanto, que a maior expressão de células T multifuncionais em contactantes pode estar envolvida com o controle da replicação do bacilo e, portanto, apresenta uma base racional para explicar a resistência ao desenvolvimento da doença neste grupo.

Além disso, os dados mostraram também que ML2028 pode fornecer proteção durável induzindo uma resposta de memória. Controles contactantes apresentaram também respostas antígeno-específicas com elevada expressão de células T multifuncionais (iMFI $CD4^+IL-2^+$). Uma vez que, o cálculo do iMFI incorpora a magnitude, a qualidade e a potência da resposta imune, esses dados reforçam, assim, que a resposta imune elaborada por controles contactantes é mais eficaz contra a infecção por *M. leprae*. Esses dados destacam a importância do iMFI para determinar uma resposta funcional total e mostram que o iMFI pode ser útil para se correlacionar com a proteção [35,38]. Neste contexto, Kim e colaboradores [51] sugerem que o BCG contém grupamento de diversos antígenos que podem elicitar populações de células T multifuncionais. No presente estudo, os nossos dados mostraram também que o estímulo com PPD induziu maior expressão de células T multifuncionais em controles contactantes, semelhante ao estímulo por ML2028. Isso corrobora os dados observados no sobrenadante e o papel da resposta imunológica protetora que o BCG pode gerar durante a infecção por *M. leprae*.

O papel protetor das células T $CD8^+$ durante algumas infecção também vem sendo recente e amplamente investigado [35]. Além disso, as células T $CD8^+$ que produzem IFN- γ e TNF- α apresentam atividade citolítica mais intensa e a secreção de IL-2 promove a expansão celular. Essas características ativam a função de memória das células T $CD8^+$ principalmente em doenças infecciosas crônicas como HIV [50] e leishmanioses [37,38]. Nós observamos também que o estímulo com ML2028 promoveu a expressão de células T $CD8^+$ multifuncionais tripla⁺ ($CD8^+IFN-\gamma^+IL-2^+TNF-a^+$) em controles contactantes, em comparação com pacientes HT e HV. Em conjunto, esses dados indicam que as células T $CD8^+$ multifuncionais parecem estar envolvidas também

no controle da infecção por *M. leprae* no grupo dos contactantes.

Além disso, observamos que o estímulo com antígenos recombinantes não induziu níveis elevados de IL-10 em ambos pacientes e controles. A IL-10 é uma citocina importante associada à resposta T regulatória e alguns autores vêm reforçando o seu papel no equilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias, como é observado em outras doenças infecciosas, a exemplo da leishmaniose mucosa [52,53]. Embasado nisso, o estímulo com ML2028, assim como o uso de PPD ou MLCS, não foi associado com fortes respostas anti-inflamatórias nos grupos avaliados. Alternativamente, identificamos níveis elevados de IL-17A em controles do que em pacientes com HV. Sabe-se que a IL-17A participa do recrutamento de neutrófilos para mediar as defesas contra diferentes patógenos [24,32]. Ela é responsável também por ativar outros mecanismos imunes que ajudam no controle de agentes intracelulares. A resposta Th17 pode estar associada também com um efeito protetor durante a infecção por *M. leprae*. Em conjunto, estes dados sugerem que as células T multifuncionais antígeno-específicas não expressam níveis mais elevados de IL-10 e, portanto, não estão associadas a respostas anti-inflamatórias.

Diante disso, podemos concluir que, a IL-12p70 e o IFN- γ (citocinas do perfil Th1) foram associados com a forma PB de hanseníase. Demonstramos também [através da resposta imune em lesão (resposta local), soro (resposta sistêmica), PBMC por citometria de fluxo (células produtoras de citocinas espontaneamente) e sobrenadante estimulado com PPD]] a associação entre células Th17 com as formas clínicas PB da hanseníase. Em conjunto, os dados desse estudo indicam que as células Th17 estão associadas a uma resposta inflamatória eficaz que promove a forma PB na hanseníase,

mas não está associada à inflamação que ocorre durante os episódios reacionais em pacientes MB. Isto sugere, portanto, que as células Th17 são protetoras contra a infecção por *M. leprae*. Além disso, este é o primeiro estudo que demonstrou a expressão de células T multifuncionais em pacientes com hanseníase e controles contactantes, estimuladas com antígenos recombinantes de *M. leprae*. Sumariamente, os nossos dados relataram a maior frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ tripla⁺ e dupla⁺ em controles contactantes estimulados com antígenos específicos. Observamos também que os antígenos ML2028, PPD e MLCS estavam associados com a resposta Th1 em controles, entretanto não apresentaram níveis elevados de IL-10. Deste modo, estes resultados demonstram que controles contactantes expressam maior frequência de células T multifuncionais antígeno-específicas e que apresentam, portanto, uma resposta imune mais eficaz no controle da infecção por *M. leprae*.

Embora a hanseníase apresente uma evolução clínica crônica e lenta, e o tratamento com a poliquimioterapia disponível atualmente seja eficaz, cerca da metade dos pacientes evoluem clinicamente com quadros de episódios reacionais e há aqueles que ainda referem algum grau de incapacidade física [1,2,7,11]. Assim, é fundamental a busca de moléculas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas ou imunoterapia para melhorar a resposta imune dos pacientes ao *M. leprae* e/ou reduzir a resposta inflamatória associada aos episódios reacionais ou causadores de neurites e sequelas neurológicas.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

- ✓ Citocinas do perfil Th1 (IL-12p70 e IFN- γ) foram associadas com as formas clínicas paucibacilares de hanseníase.
- ✓ Pacientes com níveis mais elevados de IFN- γ apresentaram maior ocorrência de episódios reacionais na hanseníase.
- ✓ Células Th17 foram associadas com as formas clínicas paucibacilares da hanseníase, entretanto não com os episódios inflamatórios das reações hansênicas.
- ✓ Este foi o primeiro estudo que demonstrou a expressão de células T multifuncionais (CD4⁺ e CD8⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺TNF- α ⁺) em pacientes com hanseníase e controles contactantes, estimuladas com antígenos brutos e recombinante de *M. leprae*.
- ✓ Os controles contactantes expressaram maior frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ triplas⁺ e duplas⁺ quando estimuladas com ML2028, MLCS e PPD.

- ✓ Observou-se também que os antígenos ML2028, MLCS e PPD foram associados com a indução de resposta Th1 no sobrenadante de controles contactantes e pacientes paucibacilares, mas não apresentaram níveis elevados de IL-10.

- ✓ Os controles contactantes expressam maior frequência de células T multifuncionais específicas para antígenos brutos e recombinante e, sendo estes altamente expostos à infecção, esses resultados nos sugere que estes apresentem uma resposta imunológica mais eficaz contra a infecção por *M. leprae*.

PERSPECTIVAS

9. PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar a expressão de células T multifuncionais e células multifuncionais Th17 nos pacientes com Hanseníase e nos controles estimulados com antígenos recombinantes.
- ✓ Identificar, utilizando marcadores específicos para células de memória (CCR7 e/ou CD45R), se o estímulo com esses antígenos induz maior produção dessas células, visando o desenvolvimento e o uso desses antígenos na imunoprevenção e/ou imunoterapia na hanseníase.
- ✓ Avaliar a expressão dessas células de memória, em pacientes curados, buscando avaliar se há naturalmente a geração de células de memória após a doença, protegendo os pacientes de recidiva da doença.
- ✓ Comparar as respostas imunes aos antígenos entre pacientes com e sem reações hansênicas e com e sem grau de incapacidade física. Estes dados são fundamentais para avaliar se os antígenos que são promissores para o desenvolvimento de vacinas não estão associados a reações e a lesões neurológicas nos pacientes.
- ✓ Avaliar o papel de antígenos recombinantes com ferramentas de diagnóstico da hanseníase e/ou das complicações clínicas da doença.

- ✓ Realizar estudos de imunoprevenção com os antígenos recombinantes em modelos murinos.

REFERÊNCIAS

1. Simon M, Scherlock J, Duthie MS, Ribeiro De Jesus A. Clinical, immunological, and genetic aspects in leprosy. *Drug Dev Res.* **2011**; 72(6):509–527.
2. Fonseca AB de L, Simon M do V, Cazzaniga RA, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty* [Internet]. *Infectious Diseases of Poverty*; **2017**; 6(1):5. Available from: <http://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-016-0229-3>
3. Freitas LRS, Duarte EC, Garcia LP, et al. Trends of main indicators of leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001–2012. *BMC Infect Dis* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; **2016**; 16(1):472. Available from: <http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1798-2>
4. Santos SD, Penna GO, Costa M da CN, Natividade MS, Teixeira MG. Leprosy in children and adolescents under 15 years old in an urban centre in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **2016**; 111(6):359–364.
5. Santos AD dos, Lima ACR, Santos MB, et al. Spatial analysis for the identification of risk areas for schistosomiasis mansoni in the state of Sergipe, Brazil, 2005-2014. *Rev Soc Bras Med Trop.* **2016**; 49(5):608–615.
6. Vieira GDD, Aragoso I, Carvalho RMB, Sousa CM De. Hanseníase em Rondônia: incidência e características dos casos notificados, 2001 a 2012. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. **2014**; 23(2):269–275. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742014000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=en
7. Oliveira DT de, Bezerra MM, Almeida JAP de, Duthie M, Reed S, Jesus AR de.

- Neurological disability in leprosy: Incidence and gender association in Sergipe, Brazil. *Geospat Health*. **2012**; 6(3 SUPPL.).
8. Brito AL, Monteiro LD, Ramos Junior AN, Heukelbach J, Alencar CH. Tendência temporal da hanseníase em uma capital do Nordeste do Brasil: epidemiologia e análise por pontos de inflexão, 2001 a 2012. *Rev Bras Epidemiol* [Internet]. **2016**; 19(1):194–204. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2016000100194&lng=pt&nrm=iso&tlng=en
 9. Santos DS Dos, Duppre NC, Sales AM, Nery JADC, 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.
 10. Duthie MS, Gillis TP, Reed SG. Advances and hurdles on the way toward a leprosy vaccine. *Hum Vaccin* [Internet]. **2011**; 7(11):1172–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3323495&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
 11. Duthie MS, Saunderson P, Reed SG. The potential for vaccination in leprosy elimination: New tools for targeted interventions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **2012**; 107(SUPPL.1):190–196.
 12. Ridley DS JW. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [Internet]. **1966**; 34(3):255–273. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348338>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765279>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X14002296>
<http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1502-9>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pi>

13. Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients--searching for the perfect solution. *Lepr Rev.* **2007**; 78(4):317–320.
14. Vital RT, Illarramendi X, Antunes SLG, et al. Isolated median neuropathy as the first symptom of leprosy. *Muscle and Nerve.* **2013**; 48(2):179–184.
15. Khadge S, Banu S, Bobosha K, et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; **2015**; 15:477. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4625471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Paula Vaz Cardoso L, Dias R, Freitas A, et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. *BMC Infect Dis* [Internet]. **2013**; 13(1):497. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/497>
17. Duthie MS, Balagon MF. Combination chemoprophylaxis and immunoprophylaxis in reducing the incidence of leprosy. *Risk Manag Healthc Policy.* **2016**; 9(July):43–53.
18. Duthie MS, Favila M, Hofmeyer KA, et al. Strategic evaluation of vaccine candidate antigens for the prevention of Visceral Leishmaniasis. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; **2016**; 34(25):2779–2786. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.067>
19. Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol.* **2010**; 17(2):298–303.
20. Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, et al. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. *J Infect Dis.* **2015**; 211(10):1658–1676.

21. Saini C, Siddiqui A, Ramesh V, Nath I. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3⁺ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. *PLoS Negl Trop Dis*. **2016**; 10(4):1–21.
22. Duthie MS, Orcullo FM, Abbelana J, Maghanoy A, Balagon MF. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. *Appl Microbiol Biotechnol*. **2016**; 100(7):3267–3275.
23. Palermo ML, Pagliari C, Trindade MAB, et al. Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy. *Am J Trop Med Hyg*. **2012**; 86(5):878–883.
24. Sadhu S, Khaitan BK, Joshi B, Sengupta U, Nautiyal AK, Mitra DK. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. **2016**; 10(1):1–11.
25. Akdis M, Burgler S, Cramer R, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. **2011**; 127(3):701–721.
26. Burgler S, Ouaked N, Bassin C, et al. Differentiation and functional analysis of human TH17 cells. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; **2009**; 123(3):588–595.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.12.017>
27. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4⁺ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. **2013**; 7(7).
28. Sampaio LH, Sousa ALM, Barcelos MC, Reed SG, Stefani MMA, Duthie MS. Evaluation of various cytokines elicited during antigen-specific recall as potential risk indicators for the differential development of leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. **2012**; 31(7):1443–1451.

29. Duthie MS, Coler RN, Laurance JD, et al. Protection against *Mycobacterium leprae* infection by the ID83/GLASE and ID93/GLA-SE vaccines developed for tuberculosis. *Infect Immun*. **2014**; 82(9):3979–3985.
30. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. **2007**; 14(11):1400–1408.
31. Sampaio LH, Stefani MM, Oliveira RM, et al. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC Infect Dis* [Internet]. BioMed Central Ltd; **2011**; 11(1):26. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/26>
32. Spencer JS, Kim HJ, Wheat WH, et al. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. **2011**; 18(2):260–267.
33. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. *Clin Vaccine Immunol*. **2008**; 15(11):1659–1665.
34. Raman VS, O'Donnell J, Bailor HR, et al. Vaccination with the ML0276 antigen reduces local inflammation but not bacterial burden during experimental *Mycobacterium leprae* infection. *Infect Immun*. **2009**; 77(12):5623–5630.
35. Seder R a, Darrah P a, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* [Internet]. **2008**; 8(4):247–258. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18323851>
<http://www.nature.com/nri/journal/v8/n4/pdf/nri2274.pdf>
36. Talker SC, Koinig HC, Stadler M, et al. Magnitude and kinetics of

- multifunctional CD4 + and CD8 β + T cells in pigs infected with swine influenza A virus. *Vet Res* [Internet]. ???; **2015**; :46–52. Available from: ???
37. Guha R, Gupta D, Rastogi R, et al. Vaccination with leishmania hemoglobin receptor-encoding DNA protects against visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med* [Internet]. **2013**; 5(202):202ra121. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24027025>
 38. Darrah PA, Patel DT, Luca PM De, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med* [Internet]. **2007**; 13(7):843–850. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17558415
<http://www.nature.com/nm/journal/v13/n7/pdf/nm1592.pdf>
 39. Wimmers F, Aarntzen EHJG, Duiveman-Deboer T, et al. Long-lasting multifunctional CD8 C T cell responses in end-stage melanoma patients can be induced by dendritic cell vaccination. *Oncoimmunology* [Internet]. Taylor & Francis; **2016**; 5(1):e1067745. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1067745>
 40. Macedo ABB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, et al. Multifunctional CD4 +T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. **2012**; 167(3):505–513.
 41. Lichtner M, Mascia C, Sauzullo I, et al. Multifunctional analysis of CD4⁺ T-cell response as immune-based model for tuberculosis detection. *J Immunol Res*. Hindawi Publishing Corporation; **2015**; 2015.
 42. Leung-Theung-Long S, Gouanvic M, Coupet CA, et al. A novel MVA-based multiphasic vaccine for prevention or treatment of tuberculosis induces broad and

- multifunctional cell-mediated immunity in mice and primates. *PLoS One*. **2015**; 10(11):1–19.
43. Escamilla-Tilch M, Estrada-Garcia I, Granados J, et al. Lack of Association of the Polymorphisms IL-17A (-197G/A) and IL-17F (+7488A/G) with Multibacillary Leprosy in Mexican Patients. *Int J Genomics*. **2014**; 2014(Ll):920491.
 44. Attia EAS, Abdallah M, El-Khateeb E, et al. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ T-reg cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res*. **2014**; 306(9):793–801.
 45. Kohli S, Singh Y, Sowpati DT, et al. Human mesenchymal stem cells: New sojourn of bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol [Internet]*. Elsevier GmbH.; **2015**; 305(3):322–326. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.01.001>
 46. Balaram P, Kien PK, Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int J Med Microbiol*. **2009**; 299(3):177–185.
 47. Rubio Reyes P, Parlane NA, Wedlock DN, Rehm BHA. Immunogenicity of antigens from Mycobacterium tuberculosis self-assembled as particulate vaccines. *Int J Med Microbiol [Internet]*. Elsevier GmbH.; **2016**; 306(8):624–632. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.10.002>
 48. Cole ST, Eglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature [Internet]*. **2001**; 409:1007–1011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/35059006>
 49. Duthie MS, Reece ST, Lahiri R, et al. Antigen-specific cellular and humoral responses are induced by intradermal Mycobacterium leprae infection of the

- mouse ear. *Infect Immun.* **2007**; 75(11):5290–5297.
50. Omosa-Manyonyi G, Mpendo J, Ruzagira E, et al. A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of the safety and immunogenicity of an adjuvanted HIV-1 Gag-Pol-Nef fusion protein and adenovirus 35 Gag-RT-Int-Nef vaccine in healthy HIV-uninfected African adults. *PLoS One.* **2015**; 10(5).
51. Kim WS, Jong-Seok K, Cha S Bin, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3628 drives Th1-type T cell immunity via TLR2-mediated activation of dendritic cells and displays vaccine potential against the hyper-virulent Beijing K strain. *Oncotarget.* **2016**; 7(18).
52. Singh OP, Stober CB, Singh AK, Blackwell JM, Sundar S. Cytokine Responses to Novel Antigens in an Indian Population Living in an Area Endemic for Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* **2012**; 6(10).
53. Stober CB, Lange UG, Roberts MTM, Alcamí A, Blackwell JM. IL-10 from Regulatory T Cells Determines Vaccine Efficacy in Murine *Leishmania major* Infection. *J Immunol* [Internet]. **2005**; 175(4):2517–2524. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/175/4/2517.full>
54. Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection. *J Infect Dis.* **2015**; 211(6):1015–1026.
55. Lee DJ, Li H, Ochoa MT, et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis.* **2010**; 201(4):558–569.
56. Pitta MGR, Romano A, Cabantous S, et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. *J Clin Invest.* **2009**; 119(8):2379–2387.
57. Torrado E, Cooper AM. NIH Public Access. **2011**; 21(6):455–462.

58. Schmidt RL, Lenz LL. Distinct Licensing of IL-18 and IL-1?? Secretion in Response to NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS One*. **2012**; 7(9):1–9.
59. Netea MG, Simon A, Veerdonk F Van De, Kullberg BJ, Meer JWM Van Der, Joosten LAB. IL-1?? processing in host defense: Beyond the inflammasomes. *PLoS Pathog*. **2010**; 6(2).
60. Jayakumar A, Castilho TM, Park E, Goldsmith-Pestana K, Blackwell JM, McMahon-Pratt D. TLR1/2 activation during Heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T cell responses providing protection against *Leishmania* (Viannia). *PLoS Negl Trop Dis*. **2011**; 5(6).
61. Brown CE, Badie B, Barish ME, et al. HHS Public Access. **2016**; 21(18):4062–4072.
62. Bellemore SM, Nikoopour E, Schwartz J a, Krougly O, Lee-Chan E, Singh B. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Clin Exp Immunol* [Internet]. **2015**; 182(3):261–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26250153>

APÊNDICE

A) ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE O DOUTORADO

1. Clinical and Epidemiological Indicators and Spatial Analysis of Leprosy Cases in Patients Under 15 Years Old in Endemic Area, Northeast Brazil

Márcio Bezerra Santos, Allan Dantas dos Santos, Marco Aurélio de Oliveira Goes, José Antônio Alves Barreto, Íkaro Daniel Carvalho Barreto, José Rodrigo Santos Silva, Daniela Teles de Oliveira, Karina C. G. Machado de Araujo, Malcolm S. Duthie, Amélia Ribeiro de Jesus.

* O artigo está em processo final de revisão para submissão no European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.

2. Hormones as biomarkers to predict leprosy reactions and physical disability

Daniela Teles de Oliveira; **Márcio Bezerra Santos**; Rodrigo Anselmo Cazzaniga; Alex Ricardo Ferreira; Jonnia Maria Sherlock Araujo; Lenise Franco Albuquerque; Tiziane Cotta Machado; Viviane Correia Campo; Manuel Hermínio Aguiar Oliveira; Roberto Salvatore; Malcolm S. Duthie; Steven G. Reed and Amelia Ribeiro de Jesus.

*O artigo está em processo final de elaboração.

3. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis

Ricardo Louzada Silva; **Márcio Bezerra Santos**; Priscila Lima dos Santos Almeida; Thayse Barros; Lucas Souza Magalhães; Rodrigo Anselmo Cazzaniga; Patrícia Marques de Souza; Nívea F. Luz; Jaqueline França-Costa; Valéria Borges; Djalma Moura Júnior; Michael Lipscomb; Malcolm S. Duthie; Steven G. Reed; Roque Pacheco de Almeida; Amélia Ribeiro de Jesus.

*Artigo publicado na revista PLOS Neglected Tropical Diseases (PNTD-D-16-01123R1).

Published: March 29, 2017

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005486>

4. Epidemiological aspects and spatial analysis of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in North-eastern Brazil

Roseane Nunes de S. Campos; **Márcio Bezerra Santos**; Luana Celina S. Cunha; Lucas Souza Magalhães; Jullyana L. S. Moraes; Danille M. S. Ramalho; Simas S. Lima; José Antônio Pacheco de Almeida; Michael W. Lipscomb; Amélia Ribeiro de Jesus; Roque Pacheco de Almeida.

*Artigo submetido e aceito pela revista Geospatial Health (paper #503), conforme documento abaixo.

De: Robert Bergquist <editor@geospatialhealth.net>

Enviado: segunda-feira, 2 de janeiro de 2017 10:38

Para: Mrs Roseane Nunes de Santana Campos

Cc: Lucia Zoppi

Assunto: [GH] Geospatial Health [paper #503] - Editor Decision - Acceptance

Dear Dr. Nunes de Santana Campos,

I am pleased to inform you that your paper entitled "Epidemiological aspects and spatial analysis of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in north-eastern Brazil" has been accepted for publication in Geospatial Health.

Thank you for your latest revision. Have made a few minor edits and sent the paper for final copy-editing to make it compliant with the journal's guidelines. You will have the opportunity of approving or discussing any change made by our copy-editor before publication.

The corresponding author is required to download, complete and sign the "Copyright and Licence" form, which is available at http://www.pagepressjournals.org/public/License_Agreement.pdf.

Each author should be sent by e-mail to: Ms Lucia Zoppi at lucia.zoppi@pagepress.org

Please note that these signed documents are needed before proceeding to publication.

With kind regards,

Robert Bergquist
Geospatial Health
editor@geospatialhealth.net

Geospatial Health
<http://www.geospatialhealth.net>

[Licence to publish - PAGEPress Publications](#)

www.pagepressjournals.org

5. Spatial analysis of viral hepatitis and schistosomiasis mansoni coinfection in an endemic area in Northeastern Brazil.

Márcio Bezerra Santos; Allan Dantas dos Santos; Patrícia Pereira da Silva; Aline Silva Barreto; Erlon Oliveira dos Santos; Alex Vianey Callado França; Constança Simões Barbosa; Karina Conceição Gomes Machado de Araújo.

*Artigo submetido e aceito pela revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine (RSBMT-2016-0411.R3), conforme documento abaixo.

Decision Letter (RSBMT-2016-0411.R3)

From: dalmo@rsbmt.uftm.edu.br
To: Marcio.Santos@idri.org, allanufs@hotmail.com
Marcio.Santos@idri.org, allanufs@hotmail.com, patriciaa.enf@gmail.com,
CC: alinesilvabarreto@gmail.com, erlon.medtropical@hotmail.com,
avcfranca@ufs.br, cbarbosa@cpqam.fiocruz.br, kkkaraujo2006@yahoo.com.br
Subject: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine - Decision on Manuscript ID RSBMT-2016-0411.R3
Body: 01-Feb-2017

Dear Prof. Santos:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Spatial analysis of viral hepatitis and schistosomiasis mansoni coinfection in an endemic area in Northeastern Brazil." in its current form for publication in the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Dalmo Correia
Editor-in-Chief, Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine
dalmo@rsbmt.uftm.edu.br

Date Sent: 01-Feb-2017

6. Evaluation of the correlation between three non-invasive methods (Apri, FIB-4 and Elastography) for diagnosis of liver fibrosis in patients with viral hepatitis and schistosomiasis mansoni

Marco Antonio de Jesus Nascimento; Gilmar Palomares Filho; Marcel Lima Andrade; André Augusto de Vasconcelos Ouro Reis; Kennia M. Rocha Baiao; Tereza Virgínia Silva Bezerra do Nascimento; **Márcio Bezerra Santos**; Maurício Soares Pacheco.

*Artigo submetido na revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical / Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine (RSBMT-2016-0516). O artigo foi revisado e está aguardando o parecer final dos revisores.

7. Análise espacial e características epidemiológicas dos casos de esquistossomose mansônica no município de Simão Dias, Nordeste do Brasil

Allan Dantas dos Santos, **Márcio Bezerra Santos**, Priscilia Gardênia Rodrigues dos Santos, Aline Silva Barreto, Karina Conceição Gomes Machado de Araújo

*Artigo publicado na Revista de Patologia Tropical.

Rev Patol Trop Vol. 45 (1): 99-114. jan.-mar. 2016

doi: 10.5216/rpt.v45i1.39978.

8. Spatial analysis and epidemiological characteristics of cases of leprosy in an endemic area

Allan Dantas dos Santos, **Márcio Bezerra Santos**, Aline Silva Barreto, Denis da Silva Carvalho, José Antonio Barreto Alves, Karina Conceição Gomes Machado de Araújo

*Artigo publicado no Journal of Nursing.

J Nurs UFPE on line., Recife, 10(Suppl. 5):4188-97, Nov., 2016

doi: 10.5205/reuol.9881-87554-1-EDSM1011201604

9. Spatial analysis for the identification of risk areas for schistosomiasis mansoni in the state of Sergipe, Brazil, 2005-2014

Allan Dantas dos Santos, Ana Caroline Rodrigues Lima, **Márcio Bezerra Santos**, José Antônio Barreto Alves, Marco Aurélio de Oliveira Góes, Marco Antônio Prado Nunes, Sidney Lourdes César Souza Sá and Karina Conceição Gomes Machado de Araújo.

*Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine.

Rev Soc Bras Med Trop 49(5):608-615, September-October, 2016

doi:10.1590/0037-8682-0137-2016

10. Implementation extent (ie) analysis of a schistosomiasis control program (scp) in an endemic town in Sergipe, Brazil

Allan Dantas dos Santos; Sabrina de Freitas Melo Oliveira; **Márcio Bezerra Santos**; Karina Conceição Gomes Machado de Araújo

*Artigo publicado na Revista Iberoamericana de Educación y Investigación en Enfermería

Rev Ibe Edu Inv Enferm 2015; 5(4):40-49.

Disponível em: <http://www.enfermeria21.com/revistas/aladefe/articulo/183/>

11. Diarrhea incidence and intestinal infections among rotavirus vaccinated infants from a poor area in Brazil: a spatial analysis.

Claudimary Bispo Santos, Karina Conceição GM Araújo, Anne Jardim-Botelho, **Márcio Bezerra Santos**, Alda Rodrigues, Silvio Santana Dolabella and Ricardo Queiroz Gurge

*Artigo publicado na BMC Public Health.

Santos et al. BMC Public Health 2014, 14:399

doi: 10.1186/1471-2458-14-399

ANEXOS

A) Questionário Investigativo

QUESTIONÁRIO		
Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase		
1. Nº Estudo: _____ - _____		
3. Classificação: ☐ ÍNDICE (1) ☐ CONTROLE ÍNDICE (2) ☐ PARENTE do CASO (3)	2. Família de Relação _____	
IDENTIFICAÇÃO		
4. Se PARENTE : Relação com caso índice:	☐ Pai/Mãe (1) ☐ Irmãos (2) ☐ Filho(a) (3) ☐ Avós (4) ☐ Primos (5) ☐ Sobrinho(a) (6) ☐ Tio(a) (7) ☐ Cônjuge (8) ☐ Não se aplica (99)	
5. Data de Nascimento _____ / _____ / _____ (dd/mm/aaaa)	6. Idade: _____ anos	7. Sexo: ☐ F (1) ☐ M (2)
8. Raça: ☐ branca(1) ☐ negra(2) ☐ parda(3) ☐ indígena(4)		
9. Escolaridade: ☐ Analfabeto (1) ☐ Ensino fundamental (completo/incompleto) (2) ☐ Ensino médio (completo/incompleto) (3) ☐ Ensino superior (completo/incompleto) (4)		
10. Ocupação:	11. ☐ Urbana (1) ☐ Rural (2)	
12. Endereço:	13. Telefone:	
14. Cidade:	15. Estado:	
FATORES AMBIENTAIS		
16. Já trabalhou como caçador ou acompanhou-os?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)	
17. Caso a resposta seja afirmativa , por quanto tempo (aproximado)?	_____ meses ☐ NS (3) ☐ NA(99)	
18. Que tipo de animal caçou?	_____ ou ☐ NA(99) [Se 16 for (2)]	
19. Tem luz elétrica na casa?	☐ Sim (1) ☐ Não (2)	
20. Tem água encanada?	☐ Sim (1) ☐ Não (2)	
21. Tem rede de esgoto?	☐ Sim (1) ☐ Não (2)	
22. Etilismo?	☐ Sim (1) ☐ Não (2)	
23. Caso a resposta seja afirmativa, tempo total?	_____ meses ou ☐ NA(99) [Se 22 for (2)]	
24. . Caso a resposta seja afirmativa, descreva a quantidade (ml) /semana _____, tipo de bebida _____		
25. Ex-Etilista?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ou ☐ NA(99)	
26. Caso a resposta seja afirmativa, há quanto tempo parou?	_____ meses ou ☐ NA(99) [Se 24 for (2)]	
27. Há quanto tempo mora na mesma casa que o [caso índice]?	_____ meses ou ☐ NA(99)	
28. Há mais alguém [além do caso índice] com Hanseníase na família?	☐ Sim (1) ☐ Não (2)	
29. Caso a resposta seja afirmativa , quantos parentes?	_____ parentes ou ☐ NA(99) [Se 27 for (2)]	
30. Caso a resposta seja afirmativa , qual o grau de parentesco?	☐ Pai/Mãe (1) ☐ Irmãos (2) ☐ Filho (a) (3) ☐ Avô (ô) (4) ☐ Primo (a) (5) ☐ Tio (a) (7) ☐ Sobrinho(a) (6) ☐ Cônjuge (8) ☐ Outro (10) ☐ NA (99) [Se 27 for (2)]	
31. Esta(as) pessoa(as) RESIDEM na mesma casa que você?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NA(99) ☐ Reside na mesma casa, mas não é parente (4)	
32. Você já recebeu BCG?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3)	
33. Você já recebeu a segunda dose da BCG?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3)	

34. Algum dos seus parentes recebeu a 2ª dose da vacina BCG?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3)
35. Caso a resposta acima seja afirmativa , quais familiares?	☐ Pai/Mãe (1) ☐ Irmãos (2) ☐ Filho(a) (3) ☐ Avós (4) ☐ Primos (5) ☐ Sobrinho(a) (6) ☐ Tio(7) ☐ Cônjuge(8) ☐ NA(99) ☐ Outro(10)
HEREDOGRAMA	

HISTÓRIA DA DOENÇA PREGRESSA	
36. Já teve lesão cutânea da Hanseníase anteriormente? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 44 .	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
37. Caso a resposta seja afirmativa , qual foi a data de início? ____ / ____ (mm/aaaa)	OU a idade de início? ____ anos ☐ NA(99)
38. Caso a resposta seja afirmativa , apresentou quantas lesões?	____ lesões cutâneas ☐ NA(99)
39. Tem até hoje cicatrizes cutâneas características de Hanseníase?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
40. Você recebeu tratamento para a Hanseníase?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
41. Caso a resposta seja afirmativa , você completou o tratamento?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
42. Quanto tempo durou o seu tratamento?	____ meses ☐ NA(99)
43. Desenvolveu algum tipo de Reação?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
44. Caso a resposta seja afirmativa , quando desenvolveu (em relação ao tratamento)?	☐ Antes(1) ☐ Durante(2) ☐ Depois(3) ☐ NA(99)

HISTÓRIA DA DOENÇA ATUAL	
45. Observa-se lesão cutânea ativa?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
46. Caso a resposta seja afirmativa , apresenta quantas lesões?	____ lesões ou ☐ NS(3*) ☐ NA(99)
47. Caso a resposta seja afirmativa , há quanto tempo apresenta essas lesão(ões)?	____ (meses) ou ☐ NS(3*) ☐ NA(99)
48. Você está tratando a Hanseníase ativa? Caso sim responder a questão 77	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NA(99)
49. Houve confirmação da Hanseníase por biópsia?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
50. Qual o nome do Hospital/UBS que recebe atendimento?	____ ou ☐ NS (3) ☐ NA(99)
51. Qual a Forma Clínica?	☐ HI (1) ☐ HT (2) ☐ HDT (3) ☐ HD (4) ☐ HDV (5) ☐ HV(6) ☐ Neural (7) ☐ NA(99)
52. Qual o esquema terapêutico ou drogas utilizadas?	☐ PQT/PB (1) ☐ PQT/MB (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)

53. Tem a marca da vacina BCG?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
54. Apresenta sangramento ou formação de crostas nasais?	☐ Sim (1) ☐ Não (2) ☐ NS (3) ☐ NA(99)
55. Grau de incapacidade avaliado no exame neurológico:	☐ Grau Zero (1) ☐ Grau 1 (2) ☐ Grau 2 (3) ☐ Grau 3 (4) ☐ NA(99)

INFORMAÇÃO ADICIONAL

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS - <u>ASMA</u>	
56. Alguma vez na vida, você teve sibilos (chiado no peito)? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 59 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
57. Nos últimos 12 (doze) meses, você teve sibilos (chiado no peito)? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 59 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
58. Nos últimos 12 (doze) meses, quantas crises de sibilos você teve?	☐ Nenhuma(1) ☐ 1 a 3 crises(2) ☐ 4 a 12 crises (4) ☐ + de 12 (5) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
59. Nos últimos 12 meses, com que frequência você teve seu sono perturbado por chiado no peito?	☐ Nunca acordou com chiado (1) ☐ Menos de 1 noite por semana (2) ☐ 1 ou mais noites por semana (4) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
60. Nos últimos 12 meses seu chiado foi tão forte a ponto de impedir que você conseguisse dizer mais de duas palavras entre cada respiração?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
61. Alguma vez na vida você teve asma?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
62. Nos últimos 12 meses você teve chiado no peito após exercícios físicos?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
63. Nos últimos 12 meses você teve tosse seca à noite, sem estar gripado ou com infecção respiratória?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS – <u>RINITE</u> (13 A 14 anos)	
OBS: Todas as perguntas são sobre problemas que ocorreram quando você não estava gripado ou resfriado!	
64. Alguma vez na vida você teve problema com espirros ou coriza (corrimento nasal), quando não estava resfriado ou gripado? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 67 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
65. Nos últimos 12 meses você teve algum problema com espirros, coriza (corrimento nasal) ou obstrução nasal quando não estava gripado ou resfriado? Se a resposta for NÃO , passe para a questão 67 .	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
66. Nos últimos 12 meses esse problema nasal foi acompanhado de lacrimejamento ou coceira nos olhos?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
67. Nos últimos 12 meses, quantas vezes suas atividades diárias foram atrapalhadas por esse problema nasal?	☐ Nada(1) ☐ Um pouco(2) ☐ Moderado(4) ☐ Muito (5) ☐ NS(3) ☐ NA(99)
68. Alguma vez na vida você teve rinite alérgica?	☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)

DETECÇÃO DE DOENÇAS ALÉRGICAS – DERMATITE ATÓPICA

69. Alguma vez na vida você teve manchas com coceira na pele, que apareciam e desapareciam por pelo menos 6 meses? Se a resposta for não , passe para a questão 73 .		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
70. Nos últimos 12 meses você teve essas manchas na pele (eczema)? Se a resposta for não , passe para a questão 73 .		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
71. Alguma vez essas manchas com coceira afetaram algum dos seguintes locais: dobras dos cotovelos, atrás dos joelhos, na frente dos tornozelos, abaixo das nádegas ou em volta do pescoço, orelhas ou olhos?		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
72. Alguma vez essas manchas com coceira (eczema) desapareceram completamente nos últimos 12 meses?		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
73. Nos últimos 12 meses, quantas vezes, aproximadamente, você ficou acordado à noite por causa de coceira na pele?		☐ Nunca nos últimos 12 meses (1) ☐ Menos de 1 noite por semana (2) ☐ 1 ou mais noites por semana (4) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
74. Alguma vez você teve eczema?		☐ Sim(1) ☐ Não(2) ☐ NS(3) ☐ NA(99)	
EXAMES COMPLEMENTARES			
75. Baciloscopia	☐ Positiva(1) ☐ Negativa(2) ☐ NA(99)		
76. Biópsia (descrever)			
77. Parasitológico de Fezes:	1º Exame	2º Exame	3º Exame
78. Há quantos meses trata a Hanseníase ativa?		_____ (meses)	
79. É Tabagista? Se a resposta for sim responda a questão seguinte		☐ Sim(1) ☐ Não(2)	
80. Quantos cigarros diários?		_____	

DADOS DA ENTREVISTA

DATA:	____ / ____ / ____ (dd/mm/aaa)
ENTREVISTADOR:	

B) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Maiores de 18 anos)

Consentimento Informado para o Estudo da Resposta Imune

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

NOME DO PACIENTE: _____

Registro.HU: _____ **Nº:** ____ - ____

Investigador Principal: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

Convite e Objetivo:

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm Hanseníase. Este estudo incluirá 90 pessoas com esta doença que apresentam formas diferentes de feridas na pele. Além das informações deste documento você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado(a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da Hanseníase.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela bactéria que causa esta doença. Para isto estudaremos o seu sangue e uma parte do exame de biópsia de sua ferida na pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão, teste intradérmico e exame de secreção de sua orelha, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença, você doará 40ml de sangue (mais ou menos 3 colheres de sopa) para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material poderá ser utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a bactéria que causa a doença. Caso o

diagnóstico de Hanseníase não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo é de 5 anos, a contar do primeiro dia de tratamento, caso você tenha Hanseníase. Periodicamente, você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de novo tratamento, que também lhe será fornecido gratuitamente.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas (Comitê de ética do Hospital Universitário) Você e qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica.

Análises de riscos e benefícios: A retirada de seu sangue e de um pedaço da ferida são feitos se você tiver ferida, ainda antes do tratamento, para confirmar o diagnóstico da doença. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele. Como anestesia local é utilizada, a retirada de um pedaço da ferida não é acompanhada de dor. O tratamento que você receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará como benefício um acompanhamento clínico mais freqüente. Um médico lhe visitará em sua casa para examinar também sua família. Você deve retornar às consultas médicas regularmente de acordo com marcação de seu cartão do Ambulatório do HU

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: A Hanseníase é relacionada a reação do seu organismo contra a bactéria que causa a doença e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle os sintomas e também formas de prevenir a doença.

Custos: Você não terá custos com o tratamento. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79)3237-7353: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus Dr. Emerson Ferreira da Costa ou Dr. Roque Almeida. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (79) 3218-1805.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Assinatura do participante

Data

Hora

Assinatura do pesquisador

Data

Hora

Assinatura da testemunha (apenas analfabetos)

Data

Hora

C) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Menores de 18 anos)

Consentimento Informado para o Estudo da Resposta Imune

Nome do Projeto: Estudo Imunológico e Genético na Hanseníase

NOME DO PACIENTE: _____
Registro.HU: _____ Nº: ____ - ____

Investigador Principal: Amelia Ribeiro de Jesus, médica, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú,-Brazil., Tel: (79)3218-1805.

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo científico para determinar as razões porque pessoas desenvolvem Hanseníase. Nós perguntaremos a você sobre a sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de duas colheres de sopa) de seu braço usando uma seringa e agulha descartáveis para realizar alguns exames que ajudarão a explicar a doença. Nós também iremos fazer um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Nós também vamos precisar remover um pequeno pedaço da pele ou do nariz para confirmar se você tem a doença. Isso será feito por um médico no hospital, com anestesia local para evitar dor. Nós esperamos através deste estudo esclarecer mais sobre a doença, entendê-la e assim poderemos preveni-la no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Assinatura ou impressão do paciente

Data

Hora

Assinatura ou impressão do responsável

Data

Hora

Testemunha

Data

Hora

Pesquisador

Data

Hora
