



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

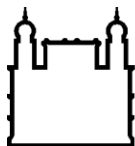
**Envolvimento dos receptores P2X7 e A2a na
patogênese causada pelo *Mycobacterium leprae***

Antonio Marcos Rodrigues Pereira

Dissertação apresentada ao
Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientadoras: Dra. Marcia de Berrêdo Pinho Moreira
Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO
2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Envolvimento dos receptores P2X7 e A2a na patogênese causada pelo *Mycobacterium leprae*

Autor: Antonio Marcos Rodrigues Pereira

**ORIENTADOR: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani
Dra. Marcia de berredo Pinho Moreira**

Aprovada em: _____ / _____ / _____

EXAMINADORES:

**Dr. Vinicius de Frias Carvalho - Instituto Oswaldo Cruz – Presidente -
Dra. Luciana Silva Rodrigues – Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Dr. Luiz Eduardo Baggio Savio – Universidade Federal do Rio de Janeiro**

SUPLENTES:

**Dra. Paula Campello Costa Lopes – Universidade Federal Fluminense
Dra. Andrea Henrique Pons - Instituto Oswaldo Cruz**

Rio de Janeiro, 11 de Outubro de 2019

Rodrigues Pereira, Antonio Marcos .

Envolvimento dos receptores P2X7 e A2a na patogênese da Hanseníase causada pelo *Mycobacterium leprae* / Antonio Marcos Rodrigues Pereira. - Rio de Janeiro, 2019.
122 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Marcia Berrêdo Pinho Moreira.

Co-orientadora: Maria Cristina Vidal Pessolani.

Bibliografia: f. 98-123

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Sinalização Purinérgica. 4. Receptor P2X7. 5. Receptor A2a . I. Título.

*Dedico a dissertação à todas
as pessoas que nasceram
em condições desfavoráveis
e batalham arduamente em
busca de seus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer aos meus pais por todos os ensinamentos e exemplos que me passaram durante esses 26 anos. Ressaltar que essa conquista só foi possível por conta de todos os esforços que fizeram por mim. Eu os tenho como espelho, pois são pessoas que mostraram durante toda a vida o verdadeiro significado do termo resiliência. Saibam que eu não tenho palavras pra expressar o tamanho do orgulho e amor que tenho por vocês. Pai, você é o homem da minha vida. Mãe, a sua força tornou-me mais forte. *You'll Never Walk Alone.*

Ao Agostinho Avelino Fernandes Freitas (*in memoriam*). A alguns anos atrás, antes de iniciar a faculdade, Agostinho foi responsável por permitir que minha família almejasse dias mais prósperos. Sr Agostinho possuía a humildade necessária para transmitir amor sem almejar retorno. Minha trajetória científica só foi possível por intermédio deste homem. Sua trajetória conosco foi suficiente para entendermos ainda mais que a vida não faz sentido, se não for para ajudar ao próximo. Levo comigo seus ensinamentos e a mais pura gratidão, MUITO OBRIGADO. *You'll Never Walk Alone.*

À Alana da Silva Rodrigues Pereira por sempre me propor todos os motivos necessários para evoluir. Agradeço ao universo por todos os dias ter você comigo. Essa conquista não é minha, é nossa. *You'll Never Walk Alone.*

À Bruna da Silva por me propor muitos momentos de reflexão e superação. Sem você esse resultado não seria possível. Obrigado por tudo. *You'll Never Walk Alone.*

À minha orientadora Dra Maria Cristina Vidal Pessolani. Sou eternamente grato por todos os comentários da Dra Cristina que instruíram-me a ser um profissional mais crítico. Dra Cristina, seus comentários no final do meu seminário discente ficaram eternizados. Obrigado por tudo. *You'll Never Walk Alone.*

À minha orientadora Dra Marcia de Berrêdo Pinho Moreira. Sua metodologia de ensino foi muito importante na minha formação acadêmica durante esses anos, sou eternamente grato por todos os conselhos, por permitir o meu espaço dentro do projeto, incentivando sempre a propor novas ideias. Você foi determinante pro meu desenvolvimento dentro do mundo científico. Obrigado por tudo. *You'll Never Walk Alone.*

Ao Silvio Carlos Santos Russo por tantos momentos reflexivos, pela amizade, pelos abraços, pelos

sorrisos, pelo computador e por todo amor. Hoje a saudade é grande, e anseio pelo nosso reencontro. Obrigado por tudo. *You'll Never Walk Alone.*

À equipe de limpeza do prédio da Hanseníase: Edimilson (Fogão), Andreia, Lúcia (Tia), Siglaine, assim como, para toda a equipe que presta esse serviço dentro da Fiocruz. *You'll Never Walk Alone.*

Ao Carlos Eduardo Rodrigues Pereira por me fornecer as ferramentas necessárias para poder estudar para a seleção do mestrado. *You'll Never Walk Alone.*

À toda equipe do LAMICEL pelos momentos de auxílio encontrados em qualquer dificuldade, pelas conversas científicas e não científicas. Saibam que neste laboratório encontra-se a melhor equipe pra trabalhar da Fiocruz. Em especial, agradecer também à Luisa Guitierres e Talyta Soares por me ajudarem nas rotinas do laboratório, assim como, em todos os outros momentos. *You'll Never Walk Alone.*

Ao Plínio Marcos Santos Freire por ser responsável pelos momentos mais divertidos vividos dentro e fora da Fiocruz. Nossa amizade se deu por conta da nossa identificação, o que resultou numa aproximação mais afetiva durante esses anos. Você é um amigo que a Fiocruz me proporcionou e pretendo levar por toda a vida. *You'll Never Walk Alone.*

Ao Fabrício da Motta e Thyago Leal. Sem a participação de vocês esses dados não seriam gerados, pois tiveram um papel essencial na coleta do material dos indivíduos colaboradores. *You'll Never Walk Alone.*

À Dona Ana. Sua ajuda foi determinante para minimizar os riscos na volta pra casa durante os horários inoportunos após longas horas de trabalho. *You'll Never Walk Alone.*

Ao Liverpool Football Club e seus atletas por me propiciarem momentos de êxtase que jamais serão esquecidos. Agradecer em especial ao Steven Gerrard por dedicar sua carreira profissional quase exclusivamente ao clube. Steven foi um atleta exemplar e sua despedida será eternamente um marco para o futebol. Agradecer também ao Jürgen Klopp por reascender o Liverpool dentro do continente europeu. Klopp foi responsável por vibrar cada molécula no cérebro dos atletas no milagre de Anfield sobre o Barcelona F.C. Agradecer a todos os atletas responsáveis pela conquista do título da UEFA Champions League 2018/2019 que mostraram que não existe resulta desfavorável quando seu objetivo é a vitória. À toda família dos Reds, *You'll Never Walk Alone.*

“When you walk through a storm
Hold your head up high
And don't be afraid of the dark
At the end of the storm
There's a golden sky
You'll never walk alone.”

Gerry & The Pacemakers

Sumário

1.	Introdução	1
1.1	Hanseníase	1
1.1.1	Aspectos Históricos	1
1.1.2	Aspectos Epidemiológicos	2
1.1.3	Aspectos Clínicos – sintomas e classificação	5
1.1.4	Classificação das formas clínicas da hanseníase.....	7
1.1.5	Transmissão, diagnóstico e tratamento	8
1.2	<i>Mycobacterium leprae</i>	11
1.2.1	Características do agente etiológico da hanseníase	11
1.2.2	Informações genômicas e metabolismo de purinas.....	14
1.3	Interação do <i>Mycobacterium leprae</i> com a célula hospedeira	17
1.3.1	<i>Mycobacterium leprae</i> e monócitos.....	17
1.3.2	Aspectos moleculares.....	20
1.3.3	Aspectos fisiológicos.....	21
1.4	Modulação do metabolismo lipídico mediada pela infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> 23	
1.5	Sinalização purinérgica	24
1.5.1	Componentes moleculares.....	24
1.5.2	Panexina 1:uma via de secreção de ATP	26
1.5.3	Ectoenzimas CD39, CD73 e ADA – Importância biológica	28
1.5.4	Receptores purinérgicos P2 – considerações gerais.....	31
1.5.5	ATP e Receptor P2X7	32
1.5.6	Receptores purinérgicos P1.....	33
1.5.7	Adenosina e o envolvimento do receptor de adenosina A2 na modulação do sistema imune	34
1.5.8	Sinalização purinérgica e metabolismo lipídico	36
1.5.9	Sinalização purinérgica e infecções bacterianas	37
1.6	Hipótese	39
2	Objetivo geral.....	40
2.1	Objetivos específicos.....	40
3	Metodologia	39
3.1	Micobactérias.....	39
3.2	Cultivo e manutenção de células da linhagem THP-1	40
3.3	Obtenção de monócitos derivados de células mononucleares de sangue periférico....	40

3.4	Detecção e quantificação de corpúsculos lipídicos por microscopia de fluorescência ...	41
3.5	Avaliação da expressão do receptor A2a nos monócitos humanos derivados de PBMC por microscopia de fluorescência	41
3.6	Ensaio de atividade Ecto-NTPDásica:.....	42
3.7	Avaliação da modulação de componentes da via de sinalização purinérgica por <i>Western Blot</i>	42
3.8	Quantificação de citocinas em sobrenadantes de cultura de células:.....	43
3.9	Análise da expressão de componentes da via de sinalização purinérgica por Citometria de Fluxo	44
3.10	Quantificação do efluxo de colesterol	44
3.11	Obtenção e diferenciação dos macrófagos murinos P2X7 ^{-/-} e A2a ^{-/-} derivados de medula	45
3.12	Dosagem de nucleosídeos no sobrenadante de cultura de monócitos de PBMC por LC-MS/MS.....	45
3.13	Análise <i>in silico</i> da expressão de genes do sistema purinérgico.....	47
3.14	Análise estatística	47
4	Resultados.....	48
4.1	Análise do efeito da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> na hidrólise do ATP extracelular em monócitos humanos derivados de PBMC	48
4.2	Análise do efeito da infecção com <i>Mycobacterium leprae</i> na expressão da ectoenzima CD39, em monócitos humanos derivados de PBMC.....	50
4.3	Análise do efeito da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> na expressão da proteína Panexina 1 e do receptor P2X7 em monócitos humanos	51
4.4	Análise do envolvimento do receptor P2X7 na produção da citocina IL-1 β e no metabolismo lipídico da célula infectada pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	53
4.5	Efeito da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> na expressão da enzima CD73 e do receptor de Adenosina A2a.....	60
4.6	Análise da participação da ADO e do receptor A2a na produção das citocinas IL-10, IL8, IL-1 β e da quimiocina MCP1.....	62
4.7	Análise da participação da ADO e do receptor A2a na modulação do acúmulo de corpúsculos lipídicos induzidos pelo <i>Mycobacterium leprae</i> em monócitos humanos.....	64
4.8	Análise do efeito da adenosina no efluxo de colesterol macrófagos THP1 infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	68
4.9	Análise da expressão de ADA nas células infectadas pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	69
4.10	Análise do efeito do <i>Mycobacterium leprae</i> no perfil de nucleosídeos presentes no sobrenadantes de cultura de monócitos de PBMC após 48horas de infecção	70
4.11	Análise <i>in silico</i> da expressão de genes do sistema purinérgico comparando indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase do polo multibacilar e paucibacilar através da reanálise de dados públicos de microarranjo	72
5	Discussão	79

6	Conclusões.....	93
7	Considerações Finais.....	95
8	Referências.....	96

Lista de Abreviaturas

A1/*ADORA1*- Receptor de Adenosina do tipo A1

A2a/*ADORA2A*- Receptor de Adenosina do tipo A2a

A2b/*ADORA2B*- Receptor de Adenosina do tipo A2b

A3/*ADORA3*- Receptor de Adenosina do tipo A3

ADA - Adenosina deaminase

ADO - Adenosina

ADP - Adenosina difosfato

ADK – Adenosina Kinase

AMP - Adenosina monofosfato

AMPC - 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

ATP - Adenosina trifosfato

BAAR - Bacilo Álcool-Ácido

BB – Forma *borderline-borderline*

folP1 - Dihydropteroate synthase 1

gyrA - DNA gyrase subunit A

IL – Interleucina

IFN- γ - Interferon gamma

INO - Inosina

LAM – Lipoarabinomanana

LL - Forma lepromatoso-lepromatoso

Toll-Like2 – Receptor do tipo Toll 2

LM – Lipomanana

Toll-Like6 – Receptor do tipo Toll 6

BL - Forma *borderline*-lepromatoso

BMDM – Macrofago derivado de medula óssea (do inglês *Bone Marrow-Derived Macrophage*)

BSA - Albumina do soro bovino (do inglês *Bovine Serum Albumin*)

BT - Forma *borderline*-tuberculoide

CD39 - *Cluster* de Diferenciação 39

CD73 - *Cluster* de Diferenciação 73

CL - Corpúsculos Lipídicos

CREB - Elemento de resposta a AMPc (do inglês *Cyclic AMP response element-binding*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - Ensaio imuno-enzimático

ENH - Eritema nodoso hansênico

ENTPD-1 - Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase-1

NT5'E- ecto-5'-nucleotidase

UDP - Uracila difosfato

NGS - Soro normal de cabra (do inglês *Normal Goat Serum*)

XDH – Xantina desidrogenase

NFkB - Fator de transcrição nuclear kappa B

OMS/WHO - Organização Mundial da saúde (do inglês *World Health Organization*)

Panx1 – Panexina 1

PPAR γ – Proteína ativada por proliferador de peroxissoma gama

Pb - Pares de base

PBS - Tampão fosfato salino

PDIM- Dimicocerato de fitiocerol

PFA – Paraformaldeído

PGE2 - Prostaglandina E2

PGL - Glicolípido fenólico (do inglês *Phenolic Glicolipid*)

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína kinase A

PNP – Fosforilase de nucleosídeo purina

PQT – Poliquimioterapia

PRRs - Receptores de reconhecimento padrão

RIPA - Ensaio de Radioimunoprecipitação

rpoB - DNA-directed RNA polymerase subunit beta.

TNF – Fator de necrose tumoral

(do inglês *Tumor necrosis factor α*)

RR – Reação reversa

SLC29A1 - Solute Carrier Family 29 Member 1

ENT-1 – Transportador equilibrativo de nucleosídeo

MB – Multibacilar

TT- tuberculóide-tuberculide

SFB - Soro fetal bovino

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

Th1 – Linfócito T helper 1

Th2 - Linfócito T helper 2

TIMPs - Inibidores teciduais de metaloproteinases

Lista de Figuras

Figura 1-1: Dispersão mundial da hanseníase com as migrações humanas.....	2
Figura 1-2: Mapa da detecção de novos casos de hanseníase no ano de 2018.	3
Figura 1-3: Imagens representativas de lesões dermatológicas em pacientes com hanseníase	5
Figura 1-4:Lesão neurológica característica de hanseníase na mão e no pescoço.....	6
Figura 1-5: Representação esquemática do espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley & Jopling.....	6
Figura 1-6 Mapa dos países que foram detectados cepas de <i>Mycobacterium leprae</i> resistente à rifampicina.....	10
Figura 1-7 Imagem do coxim plantar de camundongos atímicos infectado com <i>M.leprae</i>	12
Figura 1-8 Lesões disseminadas ocasionadas pela infecção do <i>Mycobacterium leprae</i> em tatus e humanos.	13
Figura 1-9 Representação esquemática dos diferentes componentes da sinalização purinérgica	24
Figura 1-10 Vias de secreção de ATP para o meio extracelular.....	25
Figura 1-11 Representação esquemática dos três membros da família pannexina.....	25
Figura 1-12 Formação de ácido úrico a partir da hidrólise de adenosina	28
Figura 1-13 Representação esquemática da classificação dos receptores de adenosina e suas respectivas vias de sinalização simplificadas.	32
Figura 1-14 Representação esquemática das vias de sinalização ativadas por agonista específico do receptor A2a	33
Figura 4-1 A infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> aumenta a hidrólise do ATPe em monócitos humanos.	49
Figura 4-2 Efeito da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> na expressão da enzima CD39 em monócitos humanos	50
Figura 4-3 <i>Mycobacterium leprae</i> parece regular positivamente a expressão de pannexin 1 em monócitos humanos	52

Figura 4-4 Infecção por <i>Mycobacterium leprae</i> regula negativamente a expressão do receptor P2X7 em monócitos humanos.	53
Figura 4-5 A adição de ATP extracelular parece aumentar a produção de IL-1 β em monócitos humanos infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	54
Figura 4-6 Ativação do receptor P2X7 parece reduzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos em células infectadas por <i>Mycobacterium leprae</i>	55
Figura 4-7 BzATP parece reduzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos em células infectadas por <i>Mycobacterium leprae</i>	57
Figura 4-8 Ausência de P2X7 aumenta o acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	58
Figura 4-9 Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute para P2X7 tem um aumento do acúmulo de corpúsculos lipídicos amplificado pela infecção com <i>Mycobacterium leprae</i>	59
Figura 4-10 Efeito da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> na expressão da enzima ecto 5'nucleotidase (CD73) em monócitos humanos.....	60
Figura 4-11 A infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> aumenta a expressão do receptor de adenosina A2A em monócitos humanos.	61
Figura 4-12 Receptor A2A parece aumentar a produção da quimicina MCP1 em monócitos humanos infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	63
Figura 4-13 Receptor A2A modula a produção de citocinas em monócitos humanos infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	64
Figura 4-14 A ecto-enzima CD73 modula a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	65
Figura 4-15 Ativação do receptor A2a reduz o acúmulo de corpúsculos lipídicos em monócitos infectados com <i>Mycobacterium leprae</i>	67
Figura 4-16 Participação de Adenosina na modulação do efluxo de colesterol promovido pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	68
Figura 4-17 Efeito da infecção pelo <i>Mycobacterium leprae</i> na expressão da enzima adenosina desaminase, ADA, em monócitos humanos	69
Figura 4-18 Aumento da expressão de ADA em monócitos humanos infectados pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	70
Figura 4-19 Cromatograma de íons extraídos (CL-EMAR) para padronização de moléculas do metabolismo de purinas.	71

Figura 4-20 A infecção com <i>Mycobacterium leprae</i> parece diminuir a formação de nucleosídeos extracelulares.	72
Figura 4-21 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes <i>ENTPD1</i> , <i>PANX1</i> e <i>P2X7</i> entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.	73
Figura 4-22 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes <i>NTE5</i> , <i>ADK</i> e <i>ADA</i> entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.	75
Figura 4-23 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes <i>ADORA2A</i> e <i>ADORA2B</i> entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.	76
Figura 4-24 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes <i>ADORA1</i> e <i>ADORA3</i> entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.	77
Figura 4-25 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes <i>PNP</i> , <i>XDH</i> e <i>SLC29A1</i> entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.	78
Figura 5-1 Esquema representativo da modulação do sistema purinérgico pelo <i>Mycobacterium leprae</i> em monócitos humanos infectados	92

Lista de Tabelas

Tabela 1.1: Quadro de prevalência da hanseníase no território brasileiro entre os anos de 1990-2017..... 3

Tabela 1.2: Quadro de distribuição do número de casos de hanseníase no território brasileiro por 100.000 habitantes. Adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde 2017 4

Tabela 1.3: Características demográficas dos indivíduos saudáveis incluídos neste estudo.....48

Resumo

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório com tropismo por macrófagos e células de Schwann, é uma doença infecciosa que acomete a pele e os nervos periféricos e pode acarretar danos irreversíveis se não tratada. O Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial entre os países com maior número de casos doença, o que torna essa enfermidade um importante problema de saúde pública. ATP e adenosina (ADO) extracelulares, assim como um conjunto de ecto-enzimas e receptores constituem os principais mediadores do sistema purinérgico. Este sistema vem sendo amplamente descrito regulando respostas imunes em diferentes modelos de doenças, inclusive infecciosas como a tuberculose. Entretanto, nada foi estudado até os dias atuais sobre o papel deste complexo sistema com relação a patogênese da hanseníase. Assim, o presente estudo buscou avaliar a participação deste sistema na interação de monócitos humanos com o *M. leprae*. Nossos dados, obtidos a partir de experimentos *in vitro*, usando as técnicas de citometria de fluxo e *western blotting* mostram que o *M. leprae* aumenta a expressão das ecto-enzimas CD39 e CD73 e adenosina desaminase (ADA) que hidrolisam ATP/ADP em AMP, AMP em ADO e ADO em inosina (INO) respectivamente, após 24h de infecção, entretanto, após 48h de infecção a expressão de CD73 e ADA parecem ser diminuídas frente a infecção. Estes dados sugerem que a regulação dos níveis extracelulares destes mediadores purinérgicos parece ser relevante na interação monócito-*M. leprae*. A infecção também aumentou a expressão de panexina 1, uma proteína envolvida na secreção de ATP, mas diminui a expressão do receptor P2X7, que ativa uma resposta pró-inflamatória, e aumenta a expressão do receptor A2A, um potencial receptor anti-inflamatório. Estes dados em conjunto suportam a hipótese de que a infecção deve estar reduzindo os níveis extracelulares de ATP, em contrapartida, deve aumentar os níveis de ADO/INO no meio extracelular após 24h, entretanto, após 48h, os níveis de ADO/INO estariam reduzidos. Dados de LC-MS/MS mostram que a infecção após 48h reduz os níveis de INO e de seus metabólitos, hipoxantina, xantina e ácido úrico, quando comparada às células não infectadas, sugerindo que a produção de ácido úrico não seria benéfica para o estabelecimento da infecção. Observamos, ainda por ensaios de ELISA usando agonistas e antagonistas do receptor A2a, que este parece regular positivamente a produção de IL-10 e IL-1beta e da quimiocina MCP1, entretanto, sua ativação reduz a produção de IL8. A produção de IL-1beta também foi aumentada com o tratamento com ATP. *M. leprae* subverte o metabolismo lipídico do hospedeiro em seu benefício e a literatura mostra que o receptor P2X7 e receptor A2a estão envolvidos na homeostase lipídica. Analisamos, portanto, o envolvimento destes dois receptores na modulação de corpúsculos lipídicos (CLs) induzidos pelo *M. leprae* nos monócitos infectados usando microscopia de fluorescência. Os resultados mostram que a ativação tanto de A2a quanto de P2X7 reduz a formação destas organelas lipídicas. Por fim, nossas análises *in silico* de dados públicos de microarranjo (Belone *et al.*, 2015) onde comparamos amostras de pele de indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e pacientes multibacilares mostraram que os pacientes com hanseníase possuem uma expressão aumentada dos genes que codificam as proteínas Panexina 1, CD39, ADA, A2a, A3 e P2x7 e uma redução nos genes A1, A2b, ADK (adenosina quinase), envolvida na formação de AMP a partir da ADO e XDH, que codifica xantina oxidase, uma enzima essencial na formação de ácido úrico. Foi observada também uma expressão gênica diferencial, entre os pacientes PB e MB, do gene que codifica uma purina nucleosídeo fosforilase (*PNP*), que converte INO em hipoxantina e do gene *slc29a1* que codifica a proteína ENT-1, um transportador de ADO/INO. Deste modo, observamos que a infecção pelo *M. leprae* é capaz de modular a expressão de componentes essenciais da via de sinalização purinérgica, trazendo uma novas perspectivas no estudo da hanseníase e potenciais pontos de controle dos mecanismos moleculares envolvidos na interação entre a célula hospedeira e *M. leprae* abrindo possíveis estratégias terapêuticas complementares para esta doença.

Abstract

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular bacillus with tropism for macrophages and Schwann cells, is an infectious disease that targets skin and peripheral nerves and can carry irreversible damage. Globally, Brazil ranks second among the countries with the highest number of disease cases, making this disease a major public health problem. Extracellular ATP and adenosine (ADO), as well as a set of ecto-enzymes and receptors constitute the main mediators of the purinergic system. This system is widely described as a regulator of the immune response in different pathologies, including infectious diseases such as tuberculosis. In the meantime, no studies on the role of this complex system related to leprosy pathogenesis have been described so far. Thus, the present study, sought to assess the participation of this system in *M. leprae* -human monocytes interaction. Our data, obtained from in vitro experiments, using Flow cytometry and western blotting techniques showed that *M. leprae* increases the expression of the ecto-enzymes CD39 and CD73 and adenosine deaminase (ADA) that hydrolyse ATP / ADP into AMP, AMP into ADO and ADO into inosine (INO) respectively, after 24h of infection, meanwhile, 48h post-infection the expression of CD73 and ADA seemed to be reduced. These results suggest that two extracellular levels of purinergic mediators seem to be relevant to the monocyte-*M. leprae* interaction. In addition, infection also increased the expression of panexin 1, a protein involved in ATP secretion, but decreased P2X7 receptor level, which is known to activate a pro-inflammatory response and increase the A2A receptor, a potential anti-inflammatory receptor. These data together support the hypothesis that infection is reducing extracellular ATP levels, in contrast, it is increasing ADO / INO levels in the extracellular environment after 24h, however, after 48h, ADO / INO levels would be reduced. LC-MS/MS data show that infection after 48h reduces the levels of INO and its metabolites, hypoxanthine, xanthine, and uric acid when compared to uninfected cells, suggesting that uric acid production would not be beneficial for establishment of the infection. We also observed by ELISA assays using A2a receptor agonists and antagonists that it appears to positively regulate IL-10 and IL-1beta and chemokine MCP1 production, however, their activation reduces IL8 production. ATP treatment also increased IL-1beta production. *M. leprae* subverts the host lipid metabolism to its benefit and the literature shows that the P2X7 receptor and A2a receptor are involved in lipid homeostasis. Therefore, we analyzed the involvement of these two receptors in the modulation of *M. leprae*-induced lipid corpuscles (CLs) in infected monocytes using fluorescence microscopy. The results show that activation of both A2a and P2X7 reduces the formation of these lipid organelles. Finally, our in silico analysis of public microarray data (Belone et al., 2015) where we compared skin samples from healthy individuals, paucibacillary leprosy patients, and multibacillary patients showed that leprosy patients have increased expression of the coding genes for Panexin 1, CD39, ADA, A2a, A3 and P2x7 and a reduction in A1, A2b, ADK (adenosine kinase) genes, involved in the formation of AMP from ADO and XDH, which encodes xanthine oxidase, an essential enzyme in formation of uric acid. Differential gene expression was also observed between patients PB and MB for the gene encoding a purine nucleoside phosphorylase (PNP) that converts INO to hypoxanthine and the *slc29a1* gene encoding the ENT-1 protein, an ADO / INO transporter. Thus, we observed that *M. leprae* infection is able to modulate the expression of essential components of the purinergic signaling pathway, bringing new perspectives in the study of leprosy and potential control points of molecular mechanisms involved in the interaction between host cell and *M. leprae* leading to possible complementary therapeutic strategies for this disease

1. Introdução

1.1 Hanseníase

1.1.1 Aspectos Históricos

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*. Essa doença apresenta um perfil de evolução crônica, onde as células preferencialmente acometidas pelo patógeno são as células de Schwann dos nervos periféricos e os macrófagos da pele (Kaufmann *et al.*, 1989).

Existem relatos dessa doença em diferentes documentos da história antiga, datados entre 4.000 a.C - 476 (Trautman, 1984). Descrita desde os tempos bíblicos como *lepra*, acredita-se que a hanseníase seja uma das doenças mais antigas a afetarem a humanidade. Nos tempos bíblicos essa doença era associada à impureza de espírito, vista como uma maldição e um castigo divino. Em 2012, um estudo realizado por Bhat e Prakash foi capaz de detectar amostras de DNA de *M. leprae* em uma múmia que viveu entre os anos 1-50 d.C na antiga Jerusalém. Esse resultado exalta a dificuldade de controlar a disseminação desta doença, visto que esta, se perpetua até os dias atuais.

O surgimento da hanseníase ainda não foi totalmente esclarecido, porém, diversos autores sugerem que a doença tenha se originado no leste africano, de onde dispersou-se para os demais continentes por meio das migrações humanas (Figura 1.1) (Trautman., 1984; Eidt., 2004; Pinhasi *et al.*, 2005). No continente americano, o surgimento da hanseníase teve início com a entrada dos europeus e a frota de navios negreiros entre os séculos XVI e XVII. A chegada da doença no território nacional se deu por conta dos colonizadores portugueses, e os escravos africanos tiveram um papel determinante na disseminação da doença (Opromolla *et al.*, 1981 e 2000; Monteiro *et al.*, 1987). Após a disseminação da doença no Brasil, foram registrados os primeiros casos de hanseníase na cidade do Rio de Janeiro no ano de 1600 (Yamanouchi *et al.*, 1993).

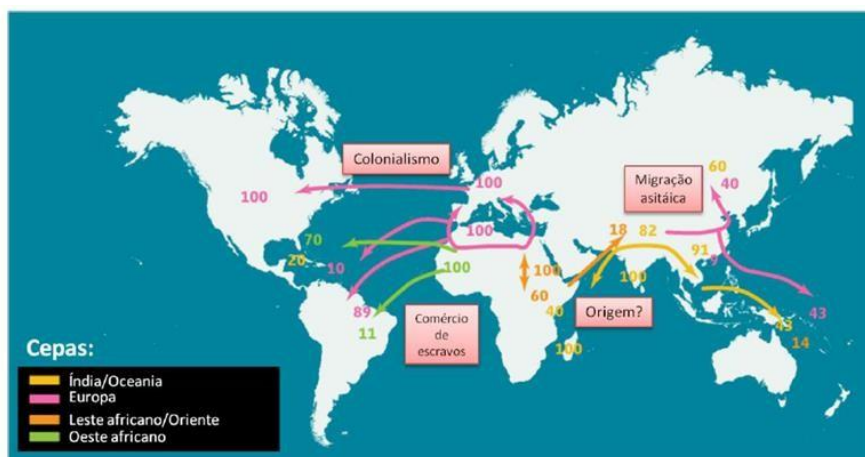


Figura 1-1: Dispersão mundial da hanseníase com as migrações humanas.

Mapa ilustrando a migração da humanidade e a dispersão da doença. As setas indicam os vetores de dispersão que correlacionam com as direções dos eventos de migrações humanas baseadas em estudos antropológicos. Fonte Adaptado de Pinhasi *et al.*, 2005.

Conforme a literatura ressalta, o termo *lepra* foi originado a partir de traduções bíblicas do hebraico para o grego, baseado na palavra *tsaraath* que significa condições desfigurantes da pele (revisto por Trautman., 1984). Além disso, a palavra *lepra* também foi utilizada para designar doenças escamosas na pele, como psoríase por exemplo (Opromolla., 1981).

No Brasil, em 1976 o termo *lepra* foi substituído por *hanseníase*, em referência ao médico bacteriologista e dermatologista norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, conhecido pela identificação do *Mycobacterium leprae* como agente causador da hanseníase em 1873 (Hansen, 1874). A implementação do termo hanseníase foi motivada com o propósito de amenizar o estigma social sofrido pelos pacientes, amplamente chamados “*leprosos*”. Entretanto, somente em 1995, com a alteração na Legislação brasileira é implementada a lei de número 1.010/95, e o termo *lepra* passa a ser estritamente proibido em todo território nacional (Brasil, 1995,p.1).

1.1.2 Aspectos Epidemiológicos

Dados publicados pela Organização mundial da saúde (OMS) revelaram as taxas de detecção de novos casos de hanseníase pelo mundo no ano de 2018 (Figura 1.2). Dentro de um total de 208.619 novos casos, 30 957 se concentram no continente americano, sendo 92,5% detectados somente no território brasileiro, o que equivale a 26.875 novos casos apenas no ano de 2017. Esses

dados posicionam o Brasil em segundo lugar no ranking entre os países com as maiores taxas de novos casos, perdendo somente para a Índia que alcançou o valor de 126.124 novos casos (WHO., 2019).

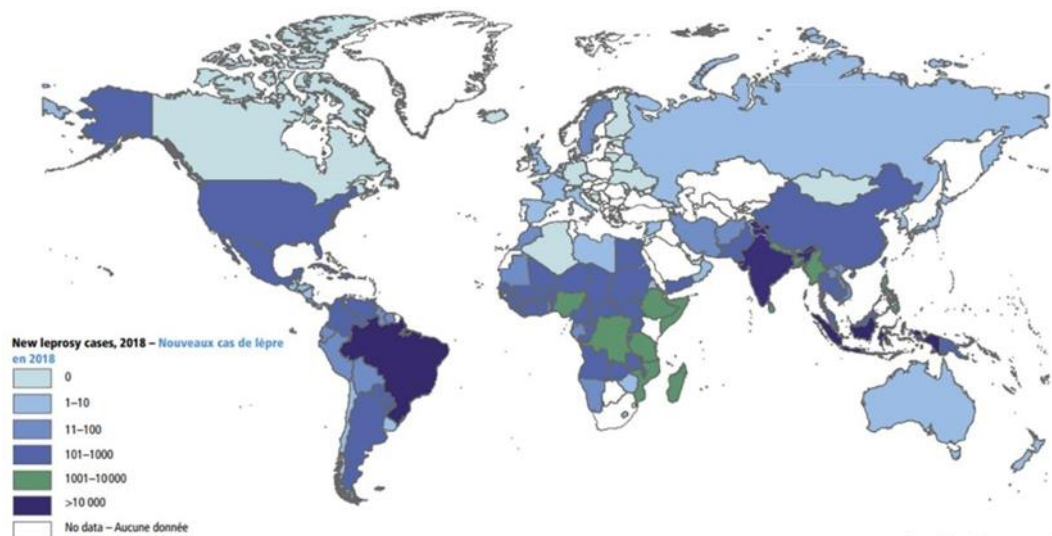


Figura 1-2: Mapa da detecção de novos casos de hanseníase no ano de 2018.

Organização Mundial da Saúde (OMS 2019). O mapa representa a taxa de novos casos a cada 100.000 mil habitantes. Representado em roxo estão os países com as maiores taxas: Índia - 120.334, Brasil - 28.660, Indonésia - 17.017.

O trabalho conjunto no combate a hanseníase no Brasil teve resultado e, as altas taxas de prevalência apresentaram uma considerável diminuição nos últimos 27 anos, no entanto, desde 2014 essa taxa se mantém e observa-se uma certa elevação no ano de 2017 (Tabela 1.1).

Tabela 1.1: Tabela de prevalência da hanseníase no território brasileiro entre os anos de 1990-2017.

Ano		Prevalência			
1990	19,54	2001	3,99	2012	1,51
1991	17,18	2002	4,33	2013	1,42
1992	15,42	2003	4,52	2014	1,27
1993	13,16	2004	1,71	2015	1,01
1994	10,48	2005	1,48	2016	1,10
1995	8,85	2006	1,41	2017	1,35
1996	6,72	2007	2,11	<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="width: 10px; height: 10px; background-color: #0070C0; margin-right: 5px;"></div> Ano </div> <div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center; margin-top: 10px;"> <div style="width: 10px; height: 10px; background-color: #A9A9A9; margin-right: 5px;"></div> Prevalência de hanseníase por 100.000 habitantes </div>	
1997	5,55	2008	2,06		
1998	4,93	2009	1,99		
1999	4,94	2010	1,56		
2000	4,71	2011	1,54		

Pesquisa realizada pela Secretaria de Vigilância em Saúde (2017). Em cinza a prevalência de hanseníase por 100.000 habitantes, em azul os anos referentes aos dados de prevalência. Adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde 2017.

De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde, os casos de hanseníase no Brasil estão distribuídos por todo território nacional, com uma concentração acentuada nas regiões norte, nordeste e centro-oeste (Tabela 1.2). No caso do Rio de Janeiro, os dados epidemiológicos registraram uma queda na detecção de novos casos até o ano de 2016, entretanto, nos anos de 2017 e meados de 2018 foi registrado um aumento na taxa de novos casos com alto grau de incapacidade física dos pacientes (Governo do Estado, Rio com saúde., 2019).

Tabela 1.2: Quadro de distribuição do número de casos de hanseníase no território brasileiro por 100.000 habitantes. Adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde 2017

Região Norte	Taxa de detecção geral / 100.000 Habitantes	Região Nordeste	Taxa de detecção geral / 100.000 Habitantes	Região Sudeste	Taxa de detecção geral / 100.000 Habitantes	Região Sul	Taxa de detecção geral / 100.000 Habitantes	Região Centro Oeste	Taxa de detecção geral / 100.000 Habitantes
Estados	34,26	Estados	23,42	Estados	5,31	Estados	3,75	Estados	37,27
Rondônia	38,16	Maranhão	53,91	Minas Gerais	5,99	Paraná	7,13	Mato Grosso do Sul	28,74
Acre	18,23	Piauí	33,04	Espírito Santo	16,56	Santa Catarina	2,49	Mato Grosso	88,9
Amazonas	14,83	Ceará	22,24	Rio de Janeiro	7,18	Rio Grande do Sul	1,17	Goiás	28,24
Roaraima	20,53	Rio Grande do Norte	7,89	São Paulo	3,3			Distrito Federal	7,4
Pará	40,39	Paraíba	14,66						
Amapá	15,95	Pernambuco	25,9						
Tocantins	69,13	Alagoas	10,79						
		Sergipe	17,59						
		Bahia	16,18						

Esta doença ainda aflige uma parte expressiva da população brasileira, principalmente, os brasileiros que vivem sob condições de extrema pobreza. Os indivíduos acometidos, se não tratados de forma adequada, podem desenvolver danos irreparáveis, o que pode resultar em deformidades físicas (Chen *et al* 2000; Nery *et al.*, 2009; Zhang *et al* 2009). Isso agrava ainda mais a possibilidade deste indivíduo de ingressar no mercado de trabalho, o que acaba dificultando ainda mais as condições do indivíduo na luta contra a miséria e pobreza.

1.1.3 Aspectos Clínicos – sintomas e classificação

A hanseníase, como mencionado anteriormente, é uma doença infecciosa de evolução crônica que pode afetar indivíduos de ambos os sexos em diferentes faixas etárias. Esta enfermidade possui um longo período de incubação, variando entre dois e dez anos, podendo não apresentar quaisquer

sinais clínicos no indivíduo. Esta característica agrava a situação, pois nesse período o paciente pode contribuir diretamente para a disseminação da doença (Noordeen *et al.*, 1994).

O indivíduo que desenvolve a doença pode apresentar diferentes sintomas dermatológicos e neurológicos que necessitam de uma análise adequada para o diagnóstico correto. Caso a doença não seja rapidamente diagnosticada e tratada da forma eficaz, as alterações nervosas podem evoluir e causar deformidades físicas (Chen *et al* 2000; Nery *et al.*, 2009;Zhang *et al* 2009).

Os sinais dermatológicos da hanseníase podem manifestar-se através de manchas e/ou lesões de pele que primeiramente podem apresentar pouca ou nenhuma sensibilidade. Essas lesões podem surgir em qualquer região do corpo do paciente, incluindo mucosa nasal e cavidade oral (Ridley e Jopling., 1966). As lesões com formato bem delimitado, em forma de nódulo, podem surgir na fase inicial dos sintomas, assim como, podem aparecer antes, durante ou depois do início do tratamento como exemplificado na figura 1.3.

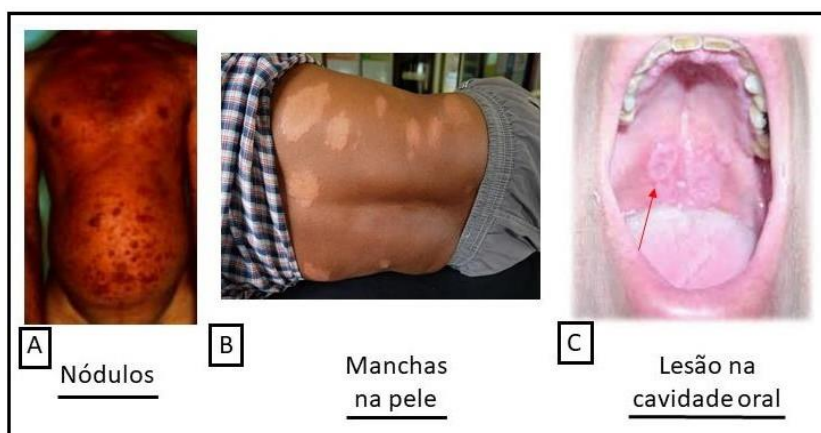


Figura 1-3: Imagens representativas de lesões dermatológicas em pacientes com hanseníase.

(A) lesão dermatológica em formato de nódulos. (B) manchas na pele com alterações de sensibilidade. (C) lesão na cavidade oral. Fonte, imagens do livro - Hanseníase: Avanços e desafios. 2014.

Além dos sinais dermatológicos, os pacientes com hanseníase também podem apresentar sintomas neurológicos devido às lesões dos nervos periféricos. Essas lesões podem ser ocasionadas pela reação inflamatória desencadeada pelo organismo, ou pela ação direta do bacilo (revisto por Scollard *et al.*, 2015). As lesões nervosas podem resultar no espessamento dos nervos periféricos, assim como a perda de sensibilidade nesses nervos

acometidos pelo bacilo. Algumas regiões podem ser mais afetadas, como as áreas dos pés e mãos (Figura 1.4). Porém, alguns músculos podem perder a capacidade de contração devido a lesão no nervo, o que acarreta o comprometimento da transmissão do impulso elétrico para o restante do membro.

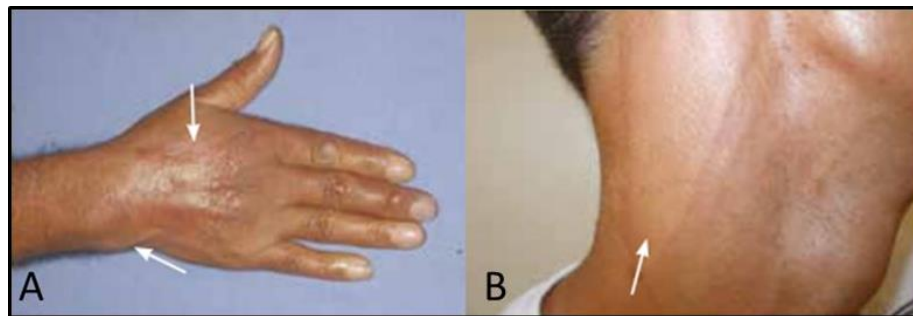


Figura 1-4:Lesão neurológica característica de hanseníase na mão e no pescoço. Imagem representativa de lesões neurológicas que podem se manifestar em pacientes com hanseníase (A) na mão e (B) no pescoço. Fonte, Ministério da saúde: Imagem do site: portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseníase-WEB.pdf. Página 21.

1.1.4 Classificação das formas clínicas da hanseníase

Os indivíduos infectados pelo *M. leprae* podem apresentar diferentes manifestações clínicas e histopatológicas, o que permite serem classificados dentro de um espectro de formas clínicas, onde encontram-se duas formas polares e imunologicamente distintas. Entre as formas polares existem diferentes formas intermediárias graduais. Estas formas clínicas estão diretamente associadas com a resposta imunológica que o hospedeiro desenvolve no estabelecimento da doença (Figura 1.5) (Ridley e Jopling., 1966).

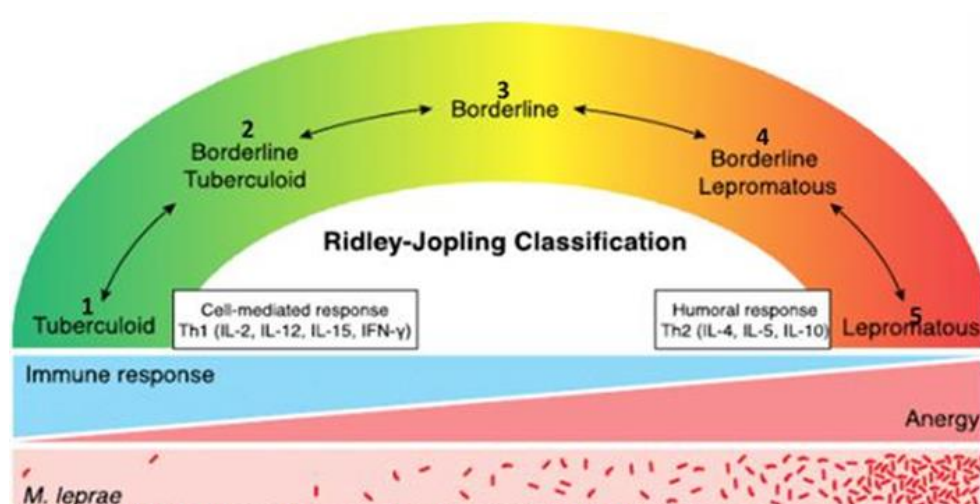


Figura 1-5: Representação esquemática do espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley & Jopling.

Os números descrevem a forma clínica do paciente conforme a resposta imune apresentada contra o bacilo. (1) Tuberculóide (TT), 2 Boderline Tuberculóide (BT), 3 Borderline (BB), 4 (Boderline Lepromatoso (BL), 5 Lepromaoso (LL). Adaptado de Park *et al.*, 2016.

A resposta imunológica que o hospedeiro apresenta ao ser infectado é determinante para o desenvolvimento da sua forma clínica. Assim, os indivíduos que desenvolvem a forma clínica mais branda da doença possuem como características a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12 e interferon-gama (IFN- γ) (revisto em Scollard *et al.*, 2006). Estes pacientes apresentam poucas lesões granulomatosas, contendo poucos ou nenhum bacilo e são classificados como a forma polar Tuberculóide (TT). Em contrapartida, os pacientes que desenvolvem a forma clínica mais severa da doença, a forma Lepromatosa (LL), possuem uma elevada carga bacilar, com isso, desenvolvem diversas lesões disseminadas pelo corpo, os macrófagos da pele apresentam um perfil com elevado acúmulo de lipídeos, além de apresentar uma alta produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 (revisto em Misch *et al.*, 2010). Entre os polos da doença, existem as formas clínicas intermediárias que são classificadas como Borderline-Tuberculóide (BT), *Borderline-Borderline* (BB) ou *Borderline-Lepromatosa* (BL) (Ridley e Jopling., 1966) (Figura 1.5).

Para fins de tratamento, foi elaborada pela OMS (WHO, 1998) uma forma de classificação mais simplificada. Deste modo, os pacientes que apresentam até cinco lesões de pele com baciloscopia negativa, o que inclui as formas clínicas TT e BT, são classificados como paucibacilares (PB). No outro extremo, os pacientes com mais de seis lesões de pele com baciloscopia positiva são classificados como multibacilares (MB), o que abrange também as formas clínicas BB, BL e LL (revisto em Misch *et al.*, 2010).

1.1.5 Transmissão, diagnóstico e tratamento

A transmissão da hanseníase ainda não foi totalmente esclarecida, porém, acredita-se que ocorra através das vias aéreas superiores por meio de um contato prolongado de indivíduos sadios com pacientes multibacilares não tratados (Patrocínio *et al.*, 2005; Job *et al.*, 2008).

Com o intuito de averiguar a participação do trato respiratório superior na via de fluxo do bacilo, investigou-se a presença de DNA do *M. leprae* no trato respiratório de diferentes pacientes. Neste estudo foi detectada a presença de DNA do bacilo na mucosa bucal dos pacientes PB, enquanto foi detectado uma frequência maior de DNA do bacilo na mucosa nasal dos pacientes MB (Martinez *et al.*, 2010). Além disso, Carlos e colaboradores (2013) descreveram a capacidade do *Mycobacterium leprae* em interagir com as células epiteliais nasais, logo, esses dados reforçam que o trato respiratório superior pode ser um ambiente de fluxo do bacilo e, pode ser uma possível rota de transmissão. Deste modo, em caso de suspeita de hanseníase, uma imediata avaliação do quadro clínico do indivíduo é extremamente necessária pois as pessoas que residem no mesmo local do paciente possuem um risco elevado de contrair a doença (Hatta *et al.*, 1995).

Para o desenvolvimento da hanseníase já foram levantadas algumas evidências que apontam diversos fatores como determinantes para o adoecimento do indivíduo. Dentro desses fatores podemos citar a resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo, fatores socioeconômicos e também o perfil genético (revisto por Fernando & Britton, 2006; revisto por Cardoso *et al.*, 2011; Mira *et al.*, 2004). Um estudo publicado em 2010 aponta que 95% da população mundial é capaz de eliminar o *M. leprae* de forma eficaz, sendo assim, apenas uma pequena parte da população é susceptível ao bacilo e adoece após a infecção. (Lázaro *et al.*, 2010).

O diagnóstico da hanseníase é realizado por meio de exames clínicos e laboratoriais. Em regiões mais desfavorecidas de recursos laboratoriais, o diagnóstico é efetuado pelos exames clínicos dos nervos e da pele, juntamente com o auxílio de questionários. As manchas na pele com sinais de perda de sensibilidade, assim como as lesões cutâneas e os espessamentos dos nervos periféricos são normalmente os sinais clínicos investigados (Alves *et al.*, 2014). A análise histopatológica e a baciloscopia são os exames laboratoriais utilizados para auxiliar no diagnóstico da doença. A baciloscopia é a técnica comumente utilizada, onde é feita a coloração da amostra pelo método de Ziehl-Neelsen (Alves *et al.*, 2014).

Outras técnicas laboratoriais também podem ser utilizadas para auxiliar no diagnóstico correto da hanseníase. Ao passo em que o indivíduo entra em

contato com o bacilo, anticorpos específicos são produzidos, e estes podem ser detectados em ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Moléculas presentes na parede celular do patógeno que conferem virulência à bactéria, como o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), podem ser reconhecidas pelo organismo, e os anticorpos específicos produzidos podem ser detectados no soro dos indivíduos, e a detecção destes anticorpos é capaz de esclarecer se houve um contato prévio com o patógeno (Klatsewr., 1994). O teste de ELISA também pode monitorar os contatos dos pacientes que residem no mesmo local, observando a exposição ao bacilo e/ou o tratamento da doença (revisto por Moura *et al.*, 2008). Além do teste imunológico, testes moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) também podem ser utilizados para detectar o material genético do bacilo, assim como verificar a viabilidade do mesmo. (Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2011).

Novas metodologias vêm sendo estudadas para investigar a presença do bacilo em pacientes com suspeita de hanseníase e, assim, propor novos métodos de diagnóstico. Recentemente Lima e colaboradores investigaram a eficácia de uma metodologia em detectar lipídeos específicos do *M. leprae* em lesões de pele de pacientes. Nesse estudo foi colocado uma placa de sílica nas lesões dos pacientes e esta placa foi capaz de adsorver quaisquer lipídeos presentes na pele. Ao processar a amostra o equipamento foi capaz de inferir se havia lipídeos do bacilo na lesão. Esta nova metodologia parece promissora e agilizará o processo de diagnóstico dos pacientes acometidos pelo *Mycobacterium leprae* (Lima *et al.*, 2015).

O tratamento atual implementado pela OMS que se baseia no uso da poliquimioterapia (PQT) é seguido e recomendado pelo Ministério da saúde para o tratamento de qualquer paciente no território brasileiro. Essa abordagem consiste no uso dos antibióticos rifampicina, dapsona e clofazimina que são receitados conforme o quadro clínico do paciente, variando o tratamento entre seis meses (pacientes PB) ou um ano (pacientes MB). O diagnóstico precoce e o tratamento imediato são determinantes no controle da hanseníase, pois diminuem a possibilidade de danos permanentes nos nervos periféricos dos pacientes, assim como, interrompe a transmissão da doença (Gallo *et al.*, 1995). Desta forma, o tempo de incubação da doença é um fator agravante para os sintomas clínicos, assim como para a disseminação da doença.

Conforme em qualquer tratamento com antibióticos, os antimicrobianos podem se tornar ineficientes conforme o uso indiscriminado ou indevido. Sabe-se que mutações em diferentes genes podem resultar numa adaptação do patógeno ao uso dos antibióticos, tornando-o resistente ao tratamento. Além disso, já se sabe quais as possíveis mutações que podem conferir resistência aos antibióticos utilizados no tratamento da hanseníase, onde se destacam as mutações no gene *folP1* (resistência à dapsona), assim como mutações no gene *rpoB* (resistência à rifampicina) e mutações no gene *gyrA* (resistência às fluoroquinolonas). No trabalho publicado por da Silva Rocha e colaboradores (2011), os autores obtiveram amostras de biópsias de pele de 145 pacientes que finalizaram o tratamento e, posteriormente, desenvolveram hanseníase novamente. O autor isolou o material genético do *Mycobacterium leprae* presente na lesão e observou que dentre o total, 92 casos tiveram amplificação para algum gene de resistência, onde amplificou-se 57 casos para *folP1*, 57 casos para *rpoB* e 77 casos para *gyrA*. Além disso, o trabalho também destaca a presença de dois indivíduos que estavam infectados com cepas multirresistentes, com mutações nos três genes anteriormente citados. Além do mais, os casos de mutações de resistência no genoma *Mycobacterium leprae* não se limita no território brasileiro, pois atualmente já identificaram cepas resistentes em diferentes países do mundo (Cambau *et al.*, 2018) (Figura 1.6), o que reafirma a necessidade de investigar novos fármacos para auxiliar no atual tratamento da doença.

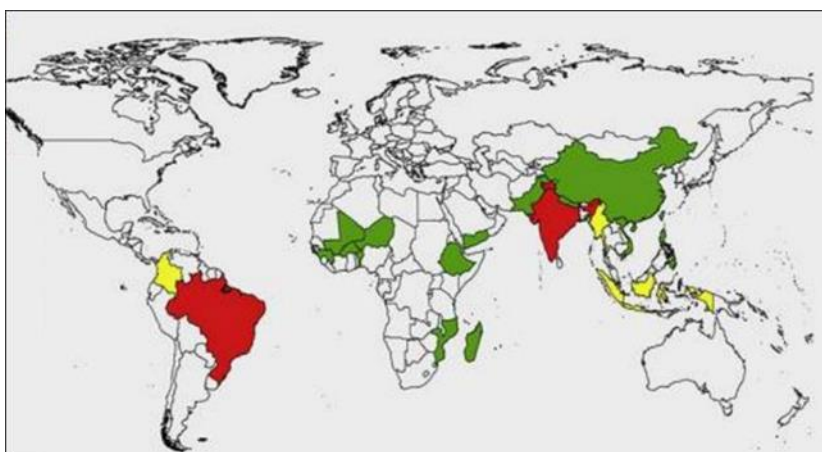


Figura 1-6 Mapa dos países onde foram detectadas cepas de *Mycobacterium leprae* resistente à rifampicina

Neste mapa encontram-se 19 países que juntos reportaram um total 1932 casos de hanseníase. Deste total, foram detectados 154 casos com cepas resistentes à rifampicina. Em vermelho destacam-se os países (Brasil, Índia e Paquistão) com uma taxa >10 de casos de cepas resistentes. Em amarelo destacam-se os países (Filipinas, Colômbia, Malásia, Miamar, Vietnam) com uma taxa entre 3-10 de casos de cepas resistentes e em verde destacam-se os países(Benin,

Nigeria, Mali, Burkina Faso, Guine, Madagascar, Moçambique, Eitiópia, China, Mali, Moçambique, Nepal) com uma taxa < 3 casos de cepas resistentes. Adaptado de Cambau *et al* 2018.

1.2 *Mycobacterium leprae*

1.2.1 Características do agente etiológico da hanseníase

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo com característica gram-positiva que possui um metabolismo respiratório microaerófilo, e seu nicho de replicação é predominantemente as células de Schwann dos nervos periféricos e macrófagos da pele (Kaufmann *et al*, 1989). É um bacilo imóvel, não esporulado, não-encapsulado pertencente ao filo dos actinomicetos (BRIEGER *et al.*, 1959) apresenta forma de bastonetes que podem estar isolados ou agrupados. Este microrganismo possui um crescimento lento com um tempo de replicação de aproximadamente 13 dias (revisto por Scollard *et al.*, 2006). Assim como em outras micobactérias, o *M. leprae* possui uma alta quantidade de lipídeos estruturais em sua parede celular, o que confere uma característica álcool-ácidoresistente (BAAR). Este patógeno cresce em temperaturas abaixo da fisiológica, variando entre 30-33°C, isso justifica sua predileção por áreas superficiais do corpo (Truman & Krahenbuhl, 2001; Shepard.,1965).

De forma geral, a parede celular das micobactérias é capaz de fornecer proteção a esses microrganismos, muitas vezes, impedindo a ação de fármacos com ação microbicida. A região mais interna da parede do *M. leprae* é constituída de uma camada de peptidoglicanos associada covalentemente à porção de arabinogalactanas. Os ácidos micólicos estão ligados às extremidades da arabinogalactanana, assim, formando a região interna da parede celular deste microrganismo. Outro importante componente da parede celular micobacteriana é a lipoarabinomanana, LAM, que encontra-se ligado covalentemente a camada de peptidoglicana e apresenta propriedades imunorreguladoras. Quanto a região mais externa desta parede celular, os dois lipídeos principais são fittiocerol dimicocerosato (PDIM), e o PGL-1, que contém um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e específico para o *Mycobacterium leprae* (revisto por Spencer e Brennan., 2011). Atualmente, sabe-se que a molécula de PGL-1 não é expressa somente pelo patógeno da hanseníase, Nair e colaboradores identificaram a presença desta molécula no envelope do

Mycobacterium lepromatosis, um patógeno que apresenta uma elevada semelhança ao *Mycobacterium leprae*, como seu próprio genoma e os sintomas desenvolvidos no paciente (Han *et al.*, 2008 ; Han., *et al* 2009).

O patógeno da hanseníase não se reproduz em meios axênicos, essa característica é consequência de sua evolução reducional e, embora em alguns protocolos *in vitro* tenham sido observados alguns sinais de atividade metabólica, o bacilo mantém seu metabolismo ativo apenas por alguns dias. Esta limitação dificulta os avanços do conhecimento que envolvem a infecção pelo bacilo. Alguns testes de estabelecimento da infecção foram efetuados, porém não fora bem-sucedido em diferentes modelos de animais testados (Johnstone, 1987). Contudo, Charles Shepard em 1960 demonstrou pela primeira vez que a inoculação do *Mycobacterium leprae* em coxim plantar de camundongos imunocompetentes BALB/c (Figura 1.7) era capaz de manter sua taxa de viabilidade e, além do mais, possuía capacidade de multiplicação (Shepard *et al.*,1960). Esta técnica de inoculação conhecida como técnica de Shepard, foi um marco na pesquisa do *Mycobacterium leprae*, propiciando avanços significativos no estudo da hanseníase, especialmente na área terapêutica e de resistência a antibióticos (Shepard *et al.*,1960; Rees *et al.*,1971),no entanto, a quantidade de bacilo que este modelo oferece ainda é bem limitada. Logo, se faz necessário a implementação de outras formas de cultivo.



Figura 1-7 Imagem do coxim plantar de camundongos atímicos infectado com *M.leprae*
Imagem ilustrativa do coxim plantar de camundongos atímicos inoculados com de *Mycobacterium leprae*.Fonte:Scollard *et al* 2006.

Além do modelo de Shepard, o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcintus*) também foi descrito como um possível modelo de cultivo *in vivo* do *Mycobacterium leprae*. (Kirchheimer *et al.*, 1972). O tatu é um animal susceptível à

doença (Kirchheimer & Storrs, 1971) e possui a temperatura corpórea baixa (Storrs, 1971) (33-35° C) o que favorece o crescimento do *Mycobacterium leprae*. Assim como em humanos, os animais também desenvolvem múltiplas lesões, de forma disseminada por todo o corpo (Figura 1.8) (Sharma *et al.* 2013). Atualmente, o tatu é considerado um reservatório natural deste bacilo e, a literatura aponta dados alarmantes de uma possível zoonose transmitida por esses animais (da Silva *et al.*, 2018). Logo, o tatu também pode ser utilizado para o cultivo *in vivo* deste bacilo, porém, por ser um animal atipicamente utilizado em ensaios de laboratório, dificulta o estabelecimento de uma colônia de tatus para o avanço dos estudos da doença.



Figura 1-8 Lesões disseminadas ocasionadas pela infecção do *Mycobacterium leprae* em tatus e humanos.

(A) imagem ilustrativa das lesões desenvolvidas (A) em tatus (B) nos pés de indivíduos Adaptado de :Sharma *et al* 2013.

Em 1975, Prabhakaran e colaboradores aplicaram a técnica de Shepard em uma linhagem de camundongo atímicos (nude mouse ou nu/nu), isto é, que não são capazes de produzir células T. Estes animais são altamente susceptíveis à infecção, o que permite uma elevada taxa de replicação do bacilo, fornecendo alta quantidades de bacilos viáveis. Deste modo, esta linhagem de camundongo também tem sido implementada como meio de cultivo *in vivo* do bacilo (Prabhakaran *et al.*, 1975 ; Lancaster *et al.*, 1983).

1.2.2 Informações genômicas e metabolismo de purinas

Ao longo de sua evolução, o *Mycobacterium leprae* sofreu uma redução do genoma, preservando um conjunto mínimo de genes essenciais para um estilo de vida intracelular obrigatório, deixando este bacilo com características

muito específicas, que impedem seu crescimento em meios axênicos (Cole *et al.*,1998). Este fenômeno chamado por alguns autores de especialização, é observado em muitos patógenos que se tornaram intracelulares obrigatórios após terem sido ambientais, e está associado a perda de genes importantes de algumas vias biossintéticas essenciais, que garantiam sua sobrevivência como microorganismos ambientais (Kassen.,2002 ; Casadevall., 2008; Ravigne *et al.*, 2009 Hereford., 2009). Dentre o repertório genômico necessário para a vida ambiental estão as vias de síntese de purinas e pirimidinas, síntese de proteínas e as vias de reparo do DNA (Gil *et al.*, 2004). Em um estudo de comparação genômica, o autor pode observar que o material genético do *Mycobacterium leprae* é composto por apenas 1614 genes codificantes e 1133 pseudogenes. Em contrapartida, ao analisar o perfil genético do *M. tuberculosis* observou-se um perfil capaz de codificar aproximadamente 3993 genes, tendo presente somente 6 pseudogenes (Cole *et al.*,1998). Assim, o processo evolutivo no *M. leprae* é responsável por torna-lo um patógeno altamente dependente do microambiente da célula hospedeira.

Dentre as vias metabólicas subvertidas pelo bacilo, o metabolismo lipídico da célula hospedeira tem sido mostrado um dos mecanismos mais relevantes no estabelecimento da infecção. Dados do nosso grupo mostram que a infecção pelo *M. leprae* é capaz de aumentar a captação de colesterol exógeno na célula hospedeira , assim como também é capaz de modular positivamente a síntese desta molécula (Mattos *et al.*,2014). Ao investigar a participação do colesterol na infecção pelo *M. leprae* , foi observado pelo nosso grupo que a inibição da síntese deste esteróide foi capaz de diminuir a viabilidade intracelular do bacilo (Mattos *et al* 2010; Mattos *et al*, 2012). Além disto, já é sabido que o genoma de *M. leprae* possui apenas 2 genes capazes de codificar lipases, enzimas responsáveis por degradar lipídeos derivados do hospedeiro, entretanto, o *Mycobacterium. tuberculosis* possui 22 genes para produção de lipases e este é um mecanismo comumente utilizado por micobactérias para gerar energia a partir de lipídeos do hospedeiro (Cole *et al.*, 2001).

Em relação às vias anabólicas observa-se uma maior preservação, mas não completa, principalmente de sistemas enzimáticos, para síntese de aminoácidos, nucleosídeos de purinas e pirimidinas e nucleotídeos (Andersson *et al.*, 1999). Com relação especificamente ao metabolismo de

purinas e pirimidinas, de uma maneira geral, estes compostos são fundamentais para a síntese de ácidos nucleicos (Hartman e Buchanan .,1959). Além disso, subprodutos da via das purinas são componentes essenciais do metabolismo energético e da síntese de proteínas (Boss e Erbe .,1982). Os níveis celulares de purinas também afetam a regulação de muitos outros genes. Antes da conclusão do perfil gênico do *Mycobacterium leprae* , foi observado que os macrófagos infectados captavam muito mais nucleosídeos de purina e pirimidina. Neste trabalho eles mostraram que o *Mycobacterium leprae* captava 10-14 vezes mais adenosina marcada radioativamente quando estava no interior de macrófagos do que em meio axênico (Harshan, *et al.* 1990). Em 1987 Wheeler em um estudo comparativo com diferentes espécies de micobactérias mostrou que *Mycobacterium leprae* falhava em sintetizar purinas e que ele necessitava de um suprimento de purinas em seu ambiente. Neste trabalho ,foi relatado que os nucleotídeos, que podem ser a principal fonte do anel de purina no ambiente intracelular, não eram absorvidos diretamente por *Mycobacterium leprae* sendo levantada a hipótese de que estes nucleotídeos deveriam ser hidrolisados em nucleosídeos e depois captados (WHEELER, 1987).

Portanto, a presença de componentes na biossíntese de purina presentes no genoma do bacilo, pode não ser consistente com a conclusão de que o *Mycobacterium leprae* depende exclusivamente do hospedeiro como fonte para o anel de purina. No entanto, o comprometimento regulatório e os baixos níveis da expressão gênica podem explicar a auxotrofia de nucleosídeos de purina observada pelo *Mycobacterium leprae* (WHEELER, 1987a, 1987b e 1989).

Dados de genômica comparativa mostram que o *Mycobacterium leprae* conservou genes da biossíntese *de novo* e da via de salvamento de purinas, dentre estes genes pode-se citar três genes que codificam para uma IMP desidrogenase, *guaB1*, *guaB2* e *guaB3*, que converte IMP em xantina monofosfato (XMP) (Dawes e Mizrahi., 2001). A importância desta enzima tem sido relatada na literatura que vem apontando esta enzima como alvo para o desenvolvimento de drogas contra *M. tuberculosis* (Singh *et al.*, 2017).

Com relação a via de salvamento acredita-se por exemplo, que os genes *pnp* e *apt*, que codificam um purina dinucleosídeo fosforilase e uma fosforibosiltransferase respectivamente, envolvidos na conversão de adenosina

em adenosina monofosfato (AMP) podem não ser funcionais em *Mycobacterium leprae*, no entanto, o gene *adk* que codifica para uma adenosina quinase que também está envolvida na formação de AMP é funcional em *Mycobacterium leprae* (Wheeler.,1987). Recentemente, foi mostrado para *Mycobacterium tuberculosis* que cordicepina, um fitoterápico da medicina chinesa, é capaz de afetar a viabilidade tanto do *Mycobacterium bovis* quanto do *Mycobacterium tuberculosis* devido a inibição da enzima ADK do bacilo (Huang *et al.*, 2019). Além destes genes, o *Mycobacterium leprae* conservou os genes *add*, *hpt* e *purH* que codificam uma adenosina deaminase, uma hipoxantina fosforibosil transferase e uma inosina monofosfato (IMP) sintetase sugerindo que os nucleosídeos de adenosina, inosina e hipoxantina são importantes para este bacilo (Dawes e Mizrahi., 2001).

1.3 Interação do *Mycobacterium leprae* com a célula hospedeira

1.3.1 *Mycobacterium leprae* e monócitos

Os monócitos são células heterogêneas que circulam na corrente sanguínea e fazem parte de um crítico componente do sistema imune que auxilia no desenvolvimento do processo inflamatório (Kratofil *et al.*, 2017). Estas células atualmente são classificadas em diferentes populações. E, em humanos são classificadas com base na expressão de uma molécula presente no receptor de lipopolissacarídeo (LPS), conhecido como CD14 (Passlick *et al* 1989). De forma conjunta, a expressão do receptor de imunoglobulina FcγRIII (CD16) também é utilizado para distinguir a população dos monócitos humanos, o que permite a formação da subpopulação clássica (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediária (CD14⁺CD16⁺), e não clássica (CD14⁺ CD16⁺⁺) (Passlick *et al* 1989). Nas populações supracitadas, diferentes características podem ser observadas como, tamanho celular, moléculas de adesão, receptores depuradores ou *scavengers*, imunoglobulinas e quimiocinas (Gordon *et al* 2005). Estas populações podem desencadear diferentes funções no processo inflamatório e são essenciais no processo de reparo no dano tecidual e/ou na manutenção do *killing* de patógenos invasores (Gordon *et al* 2005).

Alguns patógenos são capazes de recrutar e subverter a resposta de monócitos circulantes e, essa característica pode contribuir para o estabelecimento da infecção. A infecção por *Listeria monocytogenes* em

humanos é normalmente seguida de uma elevada bacteremia, o que conseqüentemente pode resultar em meningite (*Berche.,1995; Marco et al.,1992*). Em modelos de infecção sistêmica em camundongos, o patógeno foi encontrado predominantemente nos monócitos circulantes (*Sunderkotter et al.,2004; Drevets.,1999*). Após a infecção, os monócitos são recrutados para o parênquima cerebral e, assim, o patógeno pode alcançar o sistema nervoso central (*Drevets et al., 2004*). Assim como descreve o autor, o patógeno utiliza o monócito como *cavalo de troia* para invadir o tecido cerebral do hospedeiro (*Serbina et al., 2008*).

Além disso, em diversos trabalhos têm-se focado em esclarecer a participação dos monócitos no desenvolvimento da tuberculose. Em modelo animal de infecção por aerossol, foi observado uma elevada infiltração de células dendríticas, macrófagos, monócitos e granulócitos no espaço broncoalveolar (*Gonzalez-Juarrero et al., 2013*). Devido a função destas células, foi observado que a diminuição no percentual dos monócitos circulantes pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de tuberculose em pacientes com HIV (*Naranbhai et al., 2014*).

Os monócitos são capazes de auxiliar no processo de destruição dos patógenos utilizando diferentes mecanismos, como a produção de espécies intermediárias de nitrogênio e oxigênio (*Fang., 2004*), assim como, a produção de citocinas inflamatórias (*Serbina et al.,2008*). Dados da literatura indicam que a vacinação com *Bacillus Calmette-Guérin (BCG)* é capaz de induzir alterações no fenótipo dos monócitos circulantes, o que resulta numa elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, com característica de fenótipo microbicida de macrófago.

Atualmente, o estudo da hanseníase e dos mecanismos de interação patógenos hospedeiro tem fornecido informações de grande relevância com relação ao papel imunorregulador de moléculas imunes inatas que podem afetar a homeostase e contribuir para a patogênese desta doença. Diversos são os estudos que elucidaram determinantes da imunidade do hospedeiro e da patogênese da hanseníase utilizando como modelo de leucócitos do sangue periférico e fragmentos de lesões obtidas por biópsias de pacientes com doença ativa. No entanto, os eventos imunes que caracterizam a interação precoce entre *Mycobacterium leprae* e leucócitos de indivíduos sadios são bem

menos compreendidos.

Dados da literatura mostram que polimorfismo em TLR1 está associado a uma produção alterada de citocinas por monócitos de sangue periférico infectados com *Mycobacterium leprae* e também, à proteção contra Reação Reversa (Santana *et al.*, 2017). Em 2006, Bochud e colaboradores viram que *Mycobacterium leprae* regula negativamente a produção de IL-1 β e IL-6 mediada por TLR4 em monócitos (Bochud *et al.*, 2009). Além disso, um estudo com monócitos de indivíduos sadios mostrou que a infecção com *Mycobacterium leprae* isoladamente ou seguida do estímulo com BCG, induziu a liberação de citocinas/quimiocinas associadas à regulação negativa da inflamação (Sinsimer *et al.*, 2010). Neste trabalho foi mostrado que *Mycobacterium leprae* desempenha um papel ativo no controle da liberação de citocinas a partir de monócitos, fornecendo sinais reguladores positivos e negativos através de múltiplas vias de sinalização envolvendo PI3K, NF- κ B e caspase-1 (Sinsimer *et al.*, 2010). Além destes dados já foi investigado por estudos *in vitro* também a capacidade de *Mycobacterium leprae* de interferir na diferenciação de monócitos para um perfil M1 induzida pela exposição ao IFN- γ e perfil M2 induzida pela exposição a IL4 / IL13 (Dorothy *et al.*, 2016).

Em 2014, foi mostrado também que *Mycobacterium leprae* aumenta a expressão da proteína IRGM (*Immunity-related GTPase family M protein*) em monócitos e macrófagos infectados, mas não afetou a expressão desta proteína em células T CD4+ (Yang, *et al.*, 2014). Esta proteína é considerada um forte mediador inflamatório que pode afetar vias de sinalização ativadas por TLRs. Este trabalho sugeriu um envolvimento próximo do IRGM na infecção por *Mycobacterium leprae* e indicou um potencial mecanismo de defesa da infecção pelo bacilo (Yang, *et al.*, 2014). No ano seguinte, Schenk e colaboradores mostraram que a ativação de monócitos via NOD2 induz preferencialmente a diferenciação em células dendríticas mediada por IL-32. Neste trabalho, ligantes de TLR, NLR e *Mycobacterium leprae* induziram IL-32 que foi capaz de induzir a diferenciação em células dendríticas de monócitos de indivíduos saudáveis ou de pacientes tuberculóides (Schenk *et al.*, 2012).

O estudo da interação do *Mycobacterium leprae* com monócitos de indivíduos saudáveis pode esclarecer os mecanismos moleculares que o bacilo possa estar utilizando para manter-se viável no microambiente vascular. Sabe-

se que o paciente com a forma lepromatosa da hanseníase apresenta uma elevada bacteremia, e na corrente sanguínea encontra-se a grande parte da população de monócitos, portanto, os monócitos podem por ventura atuar como “cavalo de Tróia” utilizado pelo patógeno para ocasionar as lesões disseminadas encontradas nos pacientes com hanseníase.

1.3.2 Aspectos moleculares

A evolução reducional sofrida pelo *Mycobacterium leprae* é claramente um fenômeno que o tornou dependente da célula hospedeira, com isso, este patógeno necessitou desenvolver mecanismos para subverter o microambiente intracelular a seu favor (Cole *et al.*, 2008), entretanto, para que isto aconteça, torna-se essencial a interação e entrada do bacilo na célula hospedeira.

O *Mycobacterium leprae* é reconhecido por receptores do complemento, em particular CR3, que auxilia na fagocitose dos bacilos por macrófagos, e que o PGL-I é uma molécula importante neste processo (Schlesinger e Horwitz 1991). Além deste receptor, outros receptores fazem parte do reconhecimento do *Mycobacterium leprae*, como os receptores *toll-like* (TLRs) que reconhecem padrões moleculares associados ao patógenos (PAMPS). Estes receptores são expressos em diversos tipos celulares como monócitos/macrófagos, células dendríticas e células de Schwann, tipos celulares que fazem parte do nicho do *Mycobacterium leprae*. Os TLRs fazem parte de um importante mecanismo molecular de reconhecimento de patógenos, o que inclui patógenos micobacterianos (Mortaz *et al.*, 2015). Krutzik e colaboradores em 2003 mostraram que TLRs desempenham um papel na inflamação granulomatosa da hanseníase, e que os heterodímeros TLR2-TLR1 são importantes mediadores da ativação celular desencadeada pelo *Mycobacterium leprae*. Este mesmo grupo mostrou através de análise do genoma de *Mycobacterium leprae*, que este teria cerca de 31 lipoproteínas que poderiam servir como DAMPS para os heterodímeros TLR2-TLR1 (Krutzik *et al.*, 2003).

Além destes receptores, Mattos e colaboradores em 2010 mostraram que o heterodímero TLR2/TLR6 estão envolvidos na patogênese da hanseníase através do reconhecimento do *Mycobacterium leprae* pelo macrófago, regulando parcialmente a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) e a produção de

eicosanoide (Mattos *et al.*, 2010). Em células de Schwann, no entanto, foi mostrado principalmente o envolvimento de TLR6 na formação destas organelas, neste trabalho foi visto que a sinalização dependente de TLR6 é importante na interação entre *Mycobacterium leprae*-célula de Schwann, favorecendo a fagocitose e subsequente sinalização para indução da biogênese dos CLs (Mattos *et al* 2011).

Em 2016, foi mostrado por Polycarpou e colaboradores que o *Mycobacterium leprae* é capaz de ativar a expressão e sinalização de TLR4 em macrófagos por uma via dependente da vacinação prévia com BCG (bacilo de Calmette-Guerin), cepa vacinal contra a tuberculose (Polycarpou *et al.*, 2016). Outro trabalho que mostra a relação do *Mycobacterium leprae* com TLR4 foi recentemente publicado. Neste trabalho foi mostrado que o PGL -I seletivamente compromete a sinalização de TLR4 dependente de TRIF, uma proteína adaptadora que contém o domínio TIR induzida por interferon-beta (IFN- β). Os dados deste trabalho tentam explicar como o *Mycobacterium leprae* via PGL-I subverte as respostas bactericidas e inflamatórias dos macrófagos hospedeiros. Além disso, eles identificaram o TRIF como um ponto crítico no interação entre CR3 e TLR4 (OLDENBURG *et al.*, 2018).

1.3.3 Aspectos fisiológicos

A partir da interação com hospedeiro, que pode envolver ou não os receptores mencionados acima, o *Mycobacterium leprae* pode modular diferentes processos celulares e vias metabólicas na célula hospedeira com o objetivo de sobreviver e estabelecer a infecção.

Um mecanismo descrito que é capaz de regular diferentes eventos celulares, o que inclui a homeostase do organismo e a eliminação de patógenos invasores é a morte celular programada (Thompson., 1995). O envolvimento da apoptose como mecanismo de controle da infecção pelo *Mycobacterium leprae* foi reforçada por estudos *in vitro* que demonstraram que a clofazimina, um composto utilizado no tratamento da hanseníase desde os anos 60, tem a capacidade de induzir apoptose em macrófagos (Fukutomi *et al.*, 2011). Outro dado que reforça o papel da apoptose como mecanismo bactericida foi mostrado quando se observou que células de lesão de pele de pacientes LL apresentavam

expressão aumentada da proteína anti-apoptótica Beclina-2, sugerindo que a diminuição da morte celular poderia contribuir para a manutenção da infecção (Brito *et al.*, 2010).

Outro processo celular também modulado na infecção pelo *Mycobacterium leprae* é a autofagia (Silva *et al.*, 2017), um mecanismo molecular através do qual organelas e proteínas são degradadas e recicladas pelo sistema lisossomal. Em 2017, Ma e colaboradores publicaram um trabalho onde eles mostraram que a indução da autofagia pelo *Mycobacterium leprae* poderia ser um fator que poderia estar favorecendo a persistência do bacilo pois, macrófagos infectados acabavam por promover uma resposta anti-inflamatória via a produção de IL-10 por células T, que poderia resultar em um *feedback* negativo levando a sobrevivência do bacilo (Ma *et al.*, 2018), entretanto, recentemente foi mostrado que os macrófagos de pacientes LL possuem a sua via autofágica inibida e que este efeito foi revertido com a adição de Interferon gama (IFN- γ) (Silva *et al.*, 2017). Portanto, estes e outros trabalhos apontam a autofagia como um importante mecanismo inato associado à imunopatogenia da hanseníase.

A modulação do metabolismo da célula hospedeira é essencial para o estabelecimento da infecção. Medeiros e colaboradores (2016) descreveram que o *Mycobacterium leprae* aumenta a captação de glicose e, concomitantemente aumenta a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, elevando os níveis da via das pentoses em células de Schwann. Além disto, foi observado que o *Mycobacterium leprae* diminuiu o potencial de membrana mitocondrial destas células. Estes resultados mostraram pela primeira vez que a infecção modula o metabolismo de glicose do hospedeiro e aumenta a geração de poder redutor, que pode estar sendo direcionado para síntese de lipídeos, o que beneficiaria o *Mycobacterium leprae*, pois este bacilo se faz dependente do metabolismo lipídico do hospedeiro como será descrito no capítulo a seguir.

1.4 Modulação do metabolismo lipídico mediada pela infecção pelo *Mycobacterium leprae*

A modulação do metabolismo lipídico é um desfecho realizado por diversos patógenos e, esse fenômeno pode ser realizado com o intuito de recrutar moléculas

que possam ser utilizadas como fontes de carbono pelo bacilo (Jain *et al.*, 2007), assim como, fatores que possam auxiliar na liberação de mediadores imunomodulatórios que auxiliam no estabelecimento da infecção (Ehrt & Schnappinger., 2007). Uma característica marcante da hanseníase observada por Virchow em 1863 foi a presença de macrófagos espumosos (Virchow *et al* 1863). Os macrófagos presentes nas lesões de pele dos indivíduos acometidos pelo bacilo apresentam um microambiente enriquecido de lipídeos e, posteriormente, essa característica foi corroborada pelos dados publicados pelo nosso grupo (Mattos *et al* 2010).

Com o objetivo de investigar as características do conteúdo lipídico da célula infectada pelo bacilo observou-se que estas estruturas se tratavam de corpúsculos lipídicos (CLs). Os CLs são organelas ricas em colesterol e sabe-se que essas estruturas são essenciais para manter a viabilidade do *Mycobacterium leprae* (Mattos *et al* 2010; Mattos *et al*, 2012). A presença dos CLs, tanto nas biópsias de pele, quanto nas biópsias de nervo dos pacientes multibacilares, reforçam o impacto destas estruturas no agravamento da hanseníase (Mattos *et al.*,2014). O impacto que essas organelas têm sobre o bacilo permite torná-las alvos de estudos para averiguar a eficácia de fármacos sobre a viabilidade do bacilo. Deste modo, Lobato e colaboradores (Lobato *et al.*, 2014) infectaram camundongos nude e posteriormente os trataram com rifampicina e, no outro grupo, os animais infectados foram tratados com rifampicina juntamente com estatinas, fármacos capazes de inibir a biossíntese de colesterol através do bloqueio da ação enzimática da HMG-CoA redutase. Neste estudo o autor observou que o grupo tratado com os antibióticos juntamente com as estatinas tiveram uma eficácia maior no tratamento quando comparado com o grupo que foi administrado somente com antibióticos. Logo, este trabalho sustenta a hipótese que outros fármacos com efeito semelhante ao das estatinas possam ser utilizados para auxiliar no tratamento tradicional da hanseníase, o que poderia refletir na redução do tempo de tratamento da doença, permitindo uma nova perspectiva aos indivíduos acometidos pelo patógeno.

O acúmulo de CLs nos macrófagos infectados pelo *Mycobacterium leprae* podem ser resultados de diferentes mecanismos acionados pelo patógeno. Com o intuito de induzir o acúmulo de CLs, o patógeno pode potencializar a captação exógena de colesterol, assim como, induzir um aumento na síntese *de novo* de colesterol da célula infectada (Mattos *et al.*, 2011). Além disso, nosso grupo observou

que a indução destas organelas nos macrófagos é independente da viabilidade do bacilo (Mattos *et al.*, 2010). Outro mecanismo envolvido na indução de CLs nos macrófagos infectados é a participação dos receptores TLR através de uma sinalização parácrina. O meio condicionado de macrófagos infectados foi suficiente para induzir o aumento de CLs em macrófagos não infectados e, este mecanismo mostrou-se dependente dos receptores TLR2 e TLR6 (Mattos *et al.*, 2010).

1.5 Sinalização purinérgica

1.5.1 Componentes moleculares

O sistema purinérgico é um sistema de comunicação celular complexo que foi inicialmente proposto por Burnstock na década de 70, quando percebeu em seus estudos que a molécula de adenosina 5' trifosfato (ATP) possuía outras funções, que não somente fornecer energia à célula (Burnstock *et al.*, 1970). Em 1976, Burnstock descreveu os receptores purinérgicos pela primeira vez, e dois anos depois, foi proposta a base para distinguir duas famílias de purinoceptores, identificando os receptores P1 e P2, para adenosina (ADO) e nucleotídeos difosfatados e trifosfatados, respectivamente (Burnstock, 1978). Trabalhos posteriores ampliaram o conhecimento sobre os receptores P1 (Londos *et al.*, 1980; Van Calker *et al.*, 1979) e em 1985, foi proposta uma base farmacológica para distinguir dois subtipos de receptores P2 (P2X e P2Y) (Burnstock e Kennedy, 1985). No início dos anos 90, os receptores P1 foram clonados e caracterizados em quatro subtipos, reconhecidos como A1, A2a, A2b e A3 (como revisto por Fredholm *et al.*, 2001)

Os receptores purinérgicos e seus ligantes desempenham uma larga contribuição dentro deste sistema de sinalização, no entanto, outros componentes do sistema purinérgico também são essenciais no desempenho deste complexo sistema de sinalização, em particular o ATP e ADO. Além destas moléculas, os mecanismos de secreção de ATP e as ectoenzimas também são importantes integrantes deste sistema, onde são capazes de regular os níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos.

Com relação as ectoenzimas pode-se destacar o papel da CD39, CD73 e adenosina deaminase (ADA). A CD39 é um ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (ENTPDases), essa ectoenzima é responsável por hidrolisar o ATP extracelular em

ADP, e conseqüentemente o ADP em 5'adenosina monofosfato (5'AMP) (Yegutkin *et al.*, 2008). O nucleotídeo 5'AMP formado no meio extracelular pode ser hidrolisado à ADO através da ação da ecto5'-nucleotidase, descrita também como CD73 (Misumi *et al.* 1990). Outra ectoenzima que atua regulando os níveis extracelulares de ADO, é a ADA. Esta enzima converte ADO em Inosina (INO) (Yegutkin *et al.*, 2008). Importante ressaltar que estes nucleosídeos podem ainda ser recapturados por transportadores equilibrativos (ENTs) ou concentrativos (CNTs) de nucleosídeos.

O sistema purinérgico participa de vários eventos fisiológicos como vasodilatação, dor, diferenciação celular, migração, resposta imune, inflamação, neurotransmissão e apoptose (Schulze-Lohoff *et al.*, 1998; Burnstock., 2005; Mortensen *et al.*, 2009; Riteau *et al.*, 2012) Portanto, alterações na expressão e função de diferentes componentes desta via podem resultar em condições patológicas como, aterosclerose, artrite reumatóide, inflamação intestinal, câncer e doenças infecciosas (Burnstock & Dale., 2015; Morandini *et al.*, 2014; Burnstock., 2017). A figura 1.9 mostra uma representação esquemática dos diferentes componentes deste sistema de sinalização referidos acima.

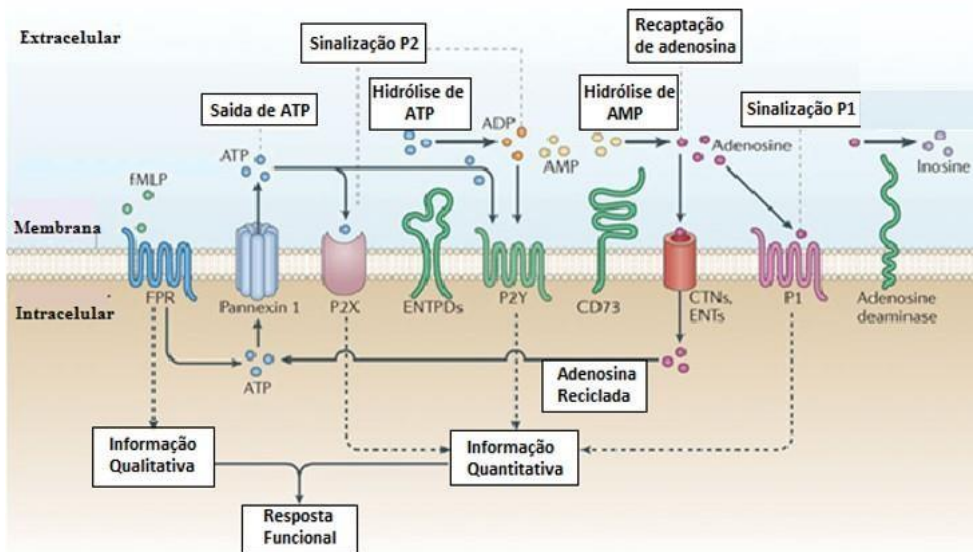


Figura 1-9 Representação esquemática dos diferentes componentes da sinalização purinérgica
 Desenho esquemático dos elementos da via de sinalização purinérgica. ATP liberado no meio extracelular por canais de panexina 1 promove ativação dos receptores P2 (P2X e P2Y). Ectonucleotidases CD39 e CD73 hidrolisam ATP gerando adenosina capaz de interagir com os receptores da família P1 e/ou ser internalizada através dos Transportadores Equilibrativos de Nucleosídeos (ENTs). Esta adenosina é então convertida pela enzima Adenosina deaminase, em inosina. (Adaptado JUNGER, 2011).

1.5.2 Panexina 1 uma via de secreção de ATP

Como mencionado acima, mecanismos de secreção de ATP estão interligados com a sinalização purinérgica. A liberação de ATP para o ambiente extracelular pode

ocorrer como consequência de danos a membrana plasmática, associados ou não a morte celular, como necrose, por mecanismos independentes mediados por exocitose vesicular, por transportadores cassete de ligação a ATP (transportadores ABC), ou por mecanismos dependentes de canal, estes últimos incluindo o próprio receptor purinérgico P2X7 e hemicanais de panexinas (Panx) ou conexinas (Conx) (Figura 1.9) (Lazarowski, 2012; Elliott *et al.*, 2009; Chekeni, *et al.*, 2010).

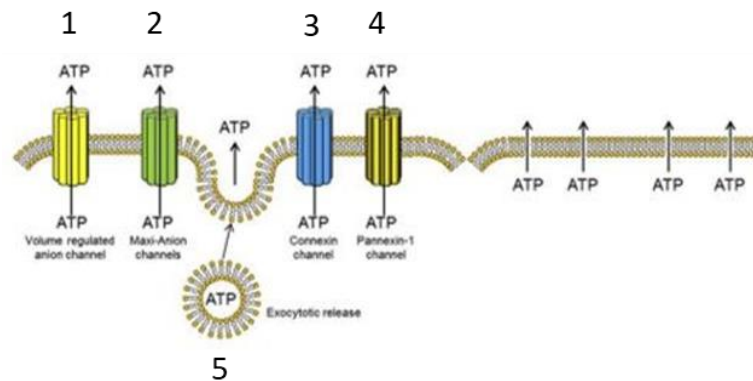


Figura 1-10 Vias de secreção de ATP para o meio extracelular

ATP pode ser liberado de forma passiva por lise membranar, e morte celular (apoptose e necrose). Ou por um processo ativo que envolve canais aniônicos regulados por volume (1), canais maxi-aniônicos (2), canais conexina (3) ou canais panexina (4). Além disso, a liberação por exocitose vesicular também já foi descrita (5).

As panexinas são proteínas pertencentes à uma família de glicoproteínas transmembranares, que podem estar interligadas a junções *gap*, auxiliando na comunicação intercelular ou, permanecer como hemicanais, formando poros na membrana plasmática, transportando pequenas moléculas como íons e o ATP de uma célula para outra, ou mesmo para o espaço extracelular. As panexinas são divididas em Panx-1, Panx-2 e Panx-3 (Figura 1.10) e são expressas em diferentes tipos celulares, incluindo células imunes (Woehrle *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015)

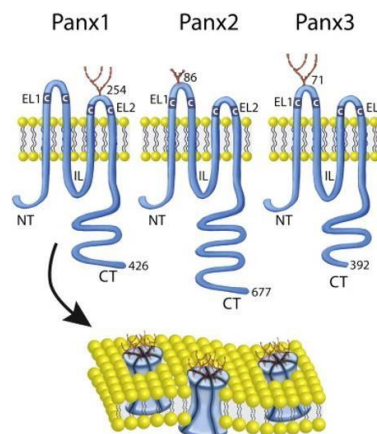


Figura 1-11 Representação esquemática dos três membros da família pannexina.

Panx1, Panx2 e Panx3 Todas proteínas integrais N-glicosiladas. Panx1 se oligomeriza em um hexâmero para formar canais de membrana única na superfície celular de muitos mamíferoscélulas. EL1, EL2 (*Extracelular loop* 1 e 2), IL (*Intracelular loop*), CT (terminal carboxi) e NT (terminal amino). Adaptado de PENUELA *et al.*, 2013

A secreção de ATP pode ser um fenômeno que a célula hospedeira utiliza para sinalizar a presença de patógenos invasores e/ou para controlar a proliferação dos patógenos intracelulares (Akkaya *et al.*, 2009; Alvarez *et al.*, 2014). Além disso, foi mostrado que o ATP também é capaz de auxiliar na eliminação de micobacterias, como *Mycobacterium bovis*-BCG e *Mycobacterium tuberculosis*, o que ressalta a capacidade desta molécula em alterar a infectividade e a progressão da doença (Lammas *et al.*, 1997; Fairbairn *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2008). Sabe-se que a panx1 juntamente com o receptor P2X7 disparam a ativação do inflamassoma com aumento da produção de IL-1 β e IL-18 (Carta *et al.* 2008). Porém nada ainda foi investigado sobre os mecanismos que envolvem a interação de hemicanais e a secreção de ATP na infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Como são proteínas que participam no killing de patógenos, estudar o envolvimento da panx1 na célula infectada pelo patógeno da hanseníase pode abrir perspectivas de um novo entendimento da interação patógeno/hospedeiro.

1.5.3 Ectoenzimas CD39, CD73 e ADA – Importância biológica

A função imunomoduladora de CD39 e CD73 tem sido extensivamente estudada em células Treg (Deaglio *et al.*, 2007; Borsellino *et al.*, 2007; Alam *et al.*, 2009). Estudos com camundongos mostram que as células Treg expressam CD39 e CD73 e geram adenosina para suprimir as respostas imunes (Deaglio *et al.*, 2007). As ectoenzimas podem regular o tráfico de leucócitos (Salmi *et al.*, 2005) e a CD39, por exemplo, é considerada uma molécula chave no controle do acúmulo de neutrófilos em condições de hipóxia (Eltzschig *et al.*, 2003). Esta enzima está associada diretamente com a regulação dos níveis extracelulares de ATP no sangue e está presente em diferentes tipos de células do sistema imune, como células B, *natural killer*, células dendríticas (CD) monócitos/macrófagos e desempenha um papel essencial no recrutamento e ativação de neutrófilos, CD e macrófagos, além disso auxilia na polarização de células T (Mizumoto *et al.*, 2002).

O ATP e a sinalização purinérgica também podem afetar a funcionalidade dos monócitos, pois atua como fator quimiotático para estas células, além de ativar a via de sinalização de NF- κ B favorecendo a polarização em macrófagos M1. Apesar de estar descrita em diversos tipos celulares ela é predominantemente expressa por monócitos/macrófagos e desempenha um

papel fundamental na autolimitação do processo de ativação. Estudo com modelo de sepse mostra que a ausência desta enzima resultou na incapacidade dessas células de fazer a transição para um sistema regulatório levando à uma produção contínua de citocinas inflamatórias (Cohen *et al*/2013).

A importância biológica da ectoenzima CD73 está diretamente associada a formação de ADO cujo papel na regulação da inflamação local é bem documentado. De fato, camundongos deficientes em CD73 exibem vários defeitos na imunorregulação após diversos desafios inflamatórios sendo estes, mais propensos a sepse (Hasko *et al.*, 2011), doença inflamatória intestinal induzida por dextrano sulfato de sódio (Bynoe *et al*/2012), lesão pulmonar (Hasko *et al* 1996), isquemia tecidual e hipóxia (Petrovic-Djergovic *et al.*, 2012; Synnestvedt *et al.*, 2002). Por outro lado, a deleção ou inibição de CD73 vem sendo proposto como potencial terapêutico em câncer (Salmi e Jalkanen., 2012 ; Yegutkin *et al.*, 2011), esclerose múltipla (Mills *et al.*, 2008) e infecção crônica por *Toxoplasma gondii* (Mahamed *et al.*, 2012). Em 2015, Petit-Jentreau e colaboradores mostraram em camundongos deficientes de CD73 infectados com *Mycobacterium tuberculosis* um aumento no recrutamento de neutrófilos para o pulmão sugerindo um papel anti-micobacteriano para esta enzima (Petit-Jentreau., 2015). Portanto, definir o papel dessa enzima pleiotrópica na inflamação e imunidade pode oferecer alvos terapêuticos promissores.

Outra enzima relevante neste contexto é a ADA, uma enzima que regula os níveis de ADO tanto extracelular quanto intracelular. A importância desta enzima tem sido evidenciada em estudos de doenças pulmonares. Apesar do papel central da ADO nas respostas inflamatórias inatas, os níveis cronicamente aumentados deste nucleosídeo podem ser prejudiciais (Chunn *et al.*, 2001), por exemplo, foi observado que os níveis de ADO são aumentados nos pulmões dos asmáticos, e que este aumento se correlaciona com o grau de insulto inflamatório, sugerindo um papel da ADO na asma ou mesmo na doença pulmonar obstrutiva crônica (Abu Hussein *et al.*, 2014). Além disso, camundongos deficientes em ADA desenvolvem sinais de lesão pulmonar crônica em associação com níveis elevados de adenosina pulmonar e morrem poucas semanas após o nascimento por problemas respiratórios graves (Zhou *et al.*, 2009), e estudos recentes sugerem que a atenuação da sinalização de adenosina pode reverter os fenótipos pulmonares graves em camundongos com

deficiência de ADA, sugerindo que a elevação crônica da adenosina pode afetar as vias de sinalização que medeiam aspectos da doença pulmonar crônica (Chunn *et al.*, 2001).

Dados da literatura mostram que a concentração de ADA é alta em soro de pacientes com tuberculose pleural (Lin *et al.*, 2012) sendo esta enzima um potencial biomarcador útil para tuberculose. Como mencionado acima, a deficiência de CD73 aumenta o recrutamento de neutrófilos para o pulmão de camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, entretanto, neste trabalho foi evidenciado que o recrutamento de neutrófilos foi transitório e ocorreu 21 dias pós-infecção (Jentreau *et al.*, 2015), uma explicação para este achado é que a ADO, via ADA, está sendo convertida em INO durante a fase crônica da doença, limitando o efeito da CD73.

Portanto, ajustes nos níveis extracelulares de ATP e ADO é uma estratégia desencadeada pela célula hospedeira para manter o controle da homeostase celular e, esse evento pode ser regulado de diferentes formas.

Uma consideração relevante ainda dentro deste tópico, é o possível destino da INO formada por ação da ADA. Sabe-se que transportadores equilibrativos e concentrativos de nucleosídeos podem transportar tanto ADO quanto INO, contribuindo para regulação dos níveis destes nucleosídeos. No entanto, a INO pode ser convertida à ácido úrico conforme mostrado na figura 1.11. por ação sequencial de duas enzimas, a PNP e XDH, uma purina nucleosídeo fosforilase e uma xantina oxidase respectivamente.

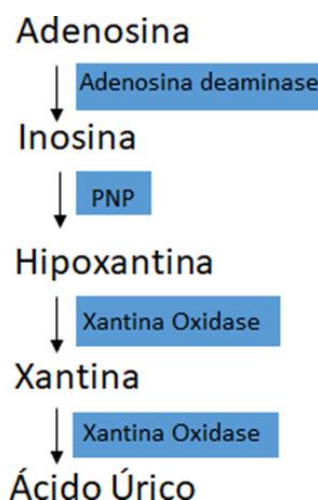


Figura 1-12 Formação de ácido úrico a partir da hidrólise de adenosina

Adenosina sofre uma desaminação via enzima adenosina deaminase (ADA) formando Inosina esta por sua vez é convertida à hipoxantina por ação de uma purina nucleosídeo fosforilase (PNP) que é então oxidada à xantina e ácido úrico por ação da Xantina Oxidase.

Esta reação tem uma relevância biológica pois o ácido úrico tem sido associado à diversas condições patológicas como obesidade, síndrome metabólica, disfunção endotelial, doença cardiovascular (Liese *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2000; Anker *et al.*, 2003). Foi sugerido que o aumento dos níveis séricos de ácido úrico representa uma resposta adaptativa desenvolvida pelo organismo contra os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo excessivo, o que caracteriza doenças cardiovasculares, metabólicas e vasculares (Ames *et al.*, 1981; Hancock *et al.*, 2002) Por outro lado, estudos celulares demonstraram que a ácido úrico também pode exercer efeitos oxidantes, dependendo de seu microambiente químico (Glantzounis *et al.*, 2005).

A xantina oxidase é considerada como uma importante estratégia de defesa do hospedeiro contra patógenos entéricos há décadas (Crane *et al.*, 2013). Em um estudo recente, no entanto, foi visto que a XO pode ter efeitos deletérios mas também benéficos no contexto de infecção por *Escherichia coli* *Shiga-toxigênica* (STEC) (Crane *et al.*, 2013) Além dos efeitos relacionados ao estresse oxidativo, dados da literatura mostram que o ácido úrico pode potencializar a liberação de redes extracelulares de DNA (Schorn *et al.*, 2012), e que o próprio ácido úrico fica preso nas redes de DNA (Schorn *et al.*, 2012). Além disso cristais de ácido úrico parecem ser capazes de formar ligações cruzadas entre diferentes cadeias lineares de DNA (Crane *et al.*, 2016). Portanto, o estudo desta via e destes metabólitos complementam e ampliam as informações e a importância biológica das ectoenzimas e do sistema purinérgico.

1.5.4 Receptores purinérgicos P2 – considerações gerais

Fazem parte do sistema purinérgico a família de receptores do tipo P2. Essa família de receptores é dividida em receptores metabotrópicos (P2Y) e receptores ionotrópicos (P2X). Os receptores classificados como pertencentes à família P2Y também são subclassificados (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) e podem ser ativados por moléculas como uridina 5' trifosfato (UTP), ATP e ADP e UDP (Burnstock *et al.*, 1978; Abbracchio *et al.*, 2006). Conforme estes receptores são ativados, diferentes respostas podem ser desencadeadas como regulação da morte celular no hipocampo, modulação da liberação de neurotransmissores e modulação de canais íons voltagem dependente. Além disso, a

ativação destes receptores também podem modular a ativação da fosfolipase C, amplamente envolvida nos ajustes de cálcio intracelular (Guzman & Gerevich., 2016 ;Abbracchio *et al.*, 2006., Fukami., 2010).

Os receptores ionotrópicos da família P2X (P2X1-P2X7) (Fukami., 2010) são classificados por reconhecerem a molécula de ATP extracelular e ao serem ativados são capazes de modular fenômenos como a permeabilização na membrana celular permitindo o fluxo de íons como Na⁺, Ca²⁺, K⁺ (Surprenant & North,2009), agregação de plaquetária (Gachet.,*et al.*, 2006), ativação de macrófagos (Wewers *et al.*, 2009), apoptose (Kawano *et al.*, 2012) e integração neuronal-gliã (Burnstock., 2013).

1.5.5 ATP e Receptor P2X7

A molécula de ATP e o receptor P2X7 são protagonistas que desempenham um papel primordial no desfecho do sistema purinérgico. Este sistema está distribuído por diferentes tecidos do corpo humano e vem sendo relacionado com diferentes fenômenos como envelhecimento, desenvolvimento de aterosclerose, artrite reumatóide, inflamação intestinal, câncer e doenças infecciosas (Burnstock & Dale., 2015; Morandini *et al.*, 2014; Burnstock., 2017).

Uma molécula chave para a ativação do sistema purinérgico é o ATP. Esta molécula no espaço intracelular é armazenada em concentrações elevadas (entre 5 - 10 mmol/l), e diversas reações celulares, transformações metabólicas e eventos de sinalização estão acoplados à hidrólise deste nucleotídeo (Roy *et al.*, 2016). No espaço extracelular essa molécula também apresenta um papel essencial no mecanismo que tange a comunicação celular, porém, devido à presença de diferentes ectonucleotidasas essa molécula é rapidamente hidrolisada, gerando outros mediadores do sistema purinérgico, como ADO por exemplo (Roy *et al* 2016). Além disso, essa rápida hidrólise do ATPe resulta na ativação de uma multiplicidade de subtipos de receptores, que são capazes de regular diferentes processos fisiológicos como proliferação, diferenciação e morte celular (Burnstock.,2012). Por outro lado, o excesso de ATP no meio extracelular apresenta um perfil citotóxico para diferentes tipos celulares (Cree e Andreotti ., 1997), sendo capaz de ativar dois mecanismos distintos de morte celular (Zheng *et al* 1991). Assim, manter o equilíbrio nos níveis de ATP é uma característica pontual para regular a homeostase da célula.

Ao passo em que o ATP alcança o espaço extracelular, diferentes receptores podem reconhecê-lo. No entanto, a ativação do receptor P2x7 ocorre por meio de uma

elevada quantidade de ATPe, isso devido a sua baixa sensibilidade (Surprenant *et al* 1996). A ativação deste receptor é capaz de induzir a formação de poros não seletivos, o que pode resultar na desestabilização nos níveis iônicos da célula (Coutinho-Silva e Persechini, 1997) além disso, a ativação do receptor P2X7 possui uma característica exclusiva. A ativação do P2X7 com altas concentrações permite a modificação estrutural do receptor, possibilitando a passagem de grandes moléculas, como YO-PRO1 (Salas *et al.*, 2013). Além disso, é sabido que a ativação prolongada deste receptor (4-12 minutos) com agonista específico é capaz de induzir uma internalização deste receptor, dessensibilizando-o (Khadra *et al.*, 2013). Conforme a célula reconhece algum DAMP/PAMP, inicia-se a secreção de ATP e esse fenômeno é capaz de ativar o receptor P2X7, dando início ao processo pró-inflamatório, através da produção de IL-1 β , IL-18 e IL-6 (Mortaz *et al* 2012 ; Chen *et al.*, 2012; Shieh *et al* 2014). A expressão deste receptor encontra-se em diferentes células do sistema imune (Lenertz *et al.*, 2013; Jacob *et al.*, 2013; Idzko *et al* 2014), no entanto, a ativação deste receptor tem sido amplamente discutida por representar fenômenos que possam ou não ser benéficos para a célula hospedeira (Savio *et al* 2018).

1.5.6 Receptores purinérgicos P1

Os receptores classificados como P1 são receptores metabotrópicos e são caracterizados por reconhecerem a Adenosina (ADO) extracelular. Estes receptores são divididos em 4 subunidades: A1, A2a, A2b e A3 (Ralevic & Burnstock *et al.*, 1998, Linden *et al.*, 2011). Essa classificação foi definida a partir do perfil de ativação da enzima adenilato ciclase, onde a ativação dos receptores A1 e A3 foram capazes de inibir a produção de adenosina 5' monofosfato cíclico (AMPC), estando assim acoplados à proteína G inibitória (Gi). Já os receptores A2a e A2b possuem um perfil oposto, ativando a adenilato ciclase, o que resulta no aumento de AMPC., estando acoplados à proteína G estimulatória (Gs) (Van Calker *et al.*, 1979; Londos *et al.*, 1980) (Figura 1.13). Além do mais, os receptores de ADO também podem responder através da ligação de uma ou mais proteínas G, como proteína Gq ou proteína Go (Linden *et al.*, 1999; Fredholm *et al.*, 2001; Schulte & Fredholm 2003).

Os receptores de ADO possuem um amplo impacto sobre o sistema nervoso central e os receptores A1 e A2a apresentam um impacto maior nos eventos que ocorrem dentro deste sistema (Fredholm *et al.*, 2005). Esses

receptores estão estritamente associados com diferentes sinapses, o que inclui o sistema gabaérgico, colinérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico (Rombo *et al.* 2015; Pandolfo *et al.* 2013, Okada *et al.* 1999; Barraco *et al.* 1995). O receptor A2b possui características diferentes de ativação e vem sendo associado em eventos metabólicos como a liberação de insulina, que permite regular os níveis de glicose no sistema nervoso periférico (Johnston-Cox *et al.*, 2012), assim como também foi associado com o aumento do metabolismo de glicogênio em astrócitos (Allaman *et al.*, 2003). Por fim, o receptor de ADO A3 vem sendo apontado como alvo para o tratamento de enfermidades como câncer (Fishman *et al.* 2009), isquemia do miocárdio (Wan *et al.*, 2009) e artrite reumatóide (Silverman *et al.*, 2008).

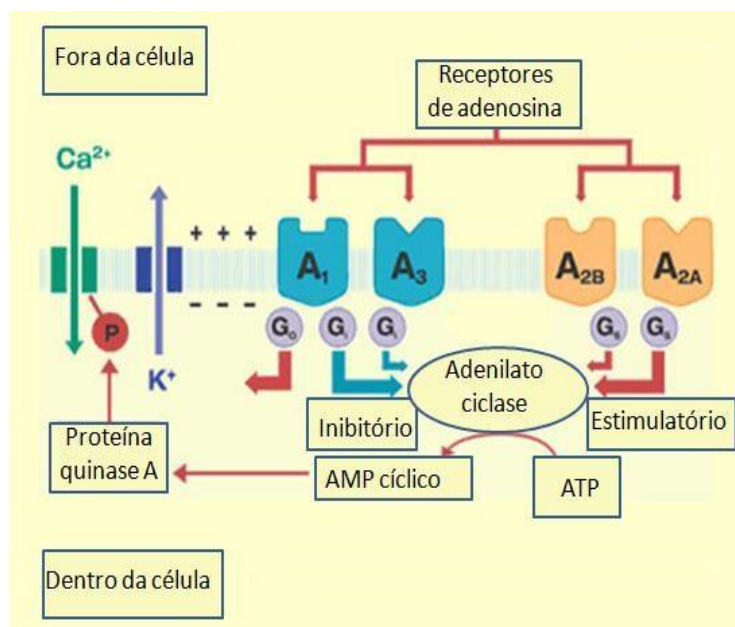


Figura 1-13 Representação esquemática da classificação dos receptores de adenosina e suas respectivas vias de sinalização simplificadas.

A ativação dos receptores de adenosina pode inibir (A1/A3) ou estimular (A2a/A2b) a produção de adenilato ciclase e isso ativa a via de AMP cíclico, consequentemente fosforilando proteínas alvo e, permitindo o influxo de cálcio. Adaptado de HAM & EVANS., 2012.

1.5.7 Adenosina e o envolvimento do receptor de adenosina A2 na modulação do sistema imune

A adenosina vem sendo relacionada com a modulação da resposta imune e, esse perfil também é visto em doenças infecciosas, onde essa regulação está também associada com a regulação da resposta e diferenciação dos macrófagos (Hasko *et al.* 2007; Sipka *et al.* 2007; Koscsó *et al.*, 2012; Ryzhov *et al.*, 2008). Sabe-se que os macrófagos são caracterizados dentro de um amplo

espectro e essas células podem ser classificadas como microbicidas (ativação clássica M1), ou com um perfil mais fagocítico (ativação alternativa M2). A participação de ADO, vem sendo envolvida em fenômenos imunomodulatórios, onde a ADO é capaz de induzir um fenótipo de macrófago M2 via regulação da produção de IL-4 e IL-13 (Barczyk *et al.*, 2010).

Dentre os receptores de ADO, o receptor A2a está amplamente imerso no processo inflamatório. A ativação deste receptor permite desencadear diferentes mecanismos intracelulares como a inibição da produção de TNF- α e IL-12 (Hasko *et al.*, 2000). A figura 1.14 mostra esquematicamente diferentes vias de sinalização ativadas por este receptor. A ativação desta via induz também a ativação de MAPK, envolvida com a resposta imune (Morello *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 1997; Bshesh *et al.*, 2007) através da ativação de fatores transcricionais regula a transcrição de diferentes genes caracterizados como anti-inflamatórios (Haskó *et al.*, 2013).

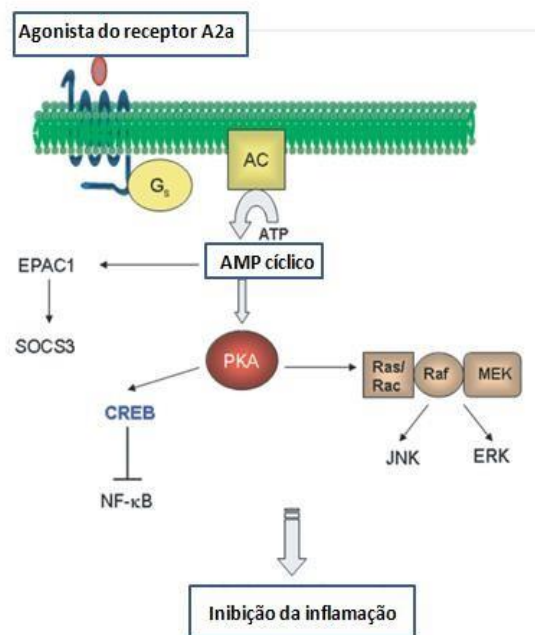


Figura 1-14 Representação esquemática das vias de sinalização ativadas por agonista específico do receptor A2a.

Além disso, outros autores descrevem que esse receptor também pode estar associado com uma resposta pró-inflamatória, sendo capaz de recrutar os neutrófilos através da liberação de IL-6 (Cohen *et al.*, 2005; McLoughlin *et al.*, 2003). De forma interessante, o acúmulo de ADO também pôde iniciar um quadro de inflamação e fibrose nos camundongos nocaute para ADA (Chunn *et*

al., 2001). Logo, a literatura ressalta que esse receptor desempenha amplamente um perfil anti-inflamatório, porém, sua ativação também é capaz de resultar numa resposta com um perfil oposto, onde o contexto de ativação terá um papel primordial para desencadear em alguma das respostas. Assim, entender o envolvimento deste receptor no contexto de infecção pelo *Mycobacterium leprae* foi um dos objetivos do trabalho.

1.5.8 Sinalização purinérgica e metabolismo lipídico

Entre as características dos receptores purinérgicos, a modulação do metabolismo lipídico mediada pela ação destes receptores pode ser um fenômeno abordado. A literatura traz dados onde o autor associa a ativação do receptor A2b com a regulação da adipogênese. Isso ocorre devido ao aumento nos níveis de AMPc intracelular, o que por sua vez, estaria inibindo a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, levando-os ao acúmulo de lipídeos (Eisenstein *et al.*, 2014). Além disso, foi observado que os camundongos com deficiência no receptor P2Y13 possuem uma deficiência na captação de colesterol HDL, essa carência poderia estar favorecendo o desenvolvimento de aterosclerose. (Pons *et al.*, 2013).

A ausência do receptor P2x7 foi diretamente associada com o desenvolvimento de obesidade. Neste trabalho o autor esclarece que a deficiência neste receptor leva a um acúmulo anormal de lipídeos em diferentes tecidos do corpo do animal (Sun *et al.*, 2012). Este receptor também foi associado com a modulação da produção de fosfolipases (Humphreys *et al.*, 1996). Kusner e colaboradores observaram que ativação do P2x7 é capaz de eliminar o *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos infectados através da produção de fosfolipases D (Kusner *et al.*, 2001).

Nos últimos anos a literatura trouxe alguns trabalhos ressaltando o envolvimento do receptor A2a com o metabolismo lipídico. Durante esse período foi observado que a ativação deste receptor impede a formação de macrófagos espumosos através do efluxo de colesterol mediado pela proteína ABCA1. Este desfecho poderia auxiliar no combate a doenças como a aterosclerose (Wang *et al.*, 2006; Bingham *et al.*, 2010), assim com, poderia ser investigado em outras doenças das quais são solucionadas com a diminuição do conteúdo lipídico na

célula acometida, como a hanseníase por exemplo.

1.5.9 Sinalização purinérgica e infecções bacterianas

Atualmente é sabido que os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares são capazes de modular diversos mecanismos celulares através dos receptores purinérgicos, como a resposta imune e o desenvolvimento da inflamação (Bours *et al.*,2006). Estas moléculas atuam como potentes mensageiros extracelulares que podem atuar no recrutamento de leucócitos para o sítio de infecção (Idzko *et al.*,2002;Mei *et al.*,2010), assim como, estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , via ativação do inflamossoma (Ferrari *et al.*,2006). Além disso, no meio extracelular, o ATP pode modular a resposta imune frente diferentes bactérias e protozoários inibindo a progressão da infecção (Coutinho-Silva *et al.*,2012).

Além disso, estudos sobre o impacto desses receptores sobre a viabilidade dos patógenos já foram realizados e foi visto uma associação do receptor P2X7 na diminuição da viabilidade do *Mycobacterium tuberculosis* (Fairbairn *et al.*,2001). Neste trabalho o autor evidencia que a ativação deste receptor induz a fusão do fagolisossomo, com isso, permitindo a eliminação do patógeno.

Do mesmo modo, outro trabalho envolvendo o receptor P2X7 e o *Mycobacterium tuberculosis* evidenciou que os pacientes com tuberculose envolvidos no estudo, apresentavam um polimorfismo no gene codificante para o receptor P2x7, o que reforça o envolvimento deste receptor no controle da infecção por *Myconbacterium tuberculosis*. Outro trabalho publicado na literatura sugere que a ativação deste receptor abrange um evidente potencial de tratamento para os pacientes com tuberculose (Santos *et al.*, 2013). Deste modo, como a literatura sustenta a hipótese que ativação deste receptor é uma estratégia interessante para resolver diferentes infecções (Coutinho-Silva *et al.*, 2009), se faz necessário investigar o envolvimento deste receptor no contexto de infecção pelo *Mycobacterium leprae*, ressaltando ainda que nada na literatura foi investigado acerca disso e, nosso grupo está amplamente comprometido em desvendar os mecanismos envolvidos no envolvimento do receptor P2X7 na célula acometida pelo bacilo.

Estudos sobre a relação da sinalização purinérgica com os processos infecciosos mostraram que o ATP também é capaz de auxiliar na eliminação de micobactérias, como *M. bovis*-BCG e *M. tuberculosis* (Lammas *et al.*, 1997; Fairbairn *et al.*, 2001; Biswas *et al.*, 2008). Além disso, o ATP também pode ativar o receptor P2X7, que por sua vez, inibe a formação do complexo fagolisossomo eliminando a infecção (Vergne *et al.*, 2005). Deste modo, estes trabalhos ressaltam que o sistema purinérgico está diretamente relacionado com o controle das infecções bacterianas.

Como já mencionado no texto, o reconhecimento de PAMPs permite uma maior secreção de ATP. Esse perfil pode ser uma estratégia utilizada pela célula hospedeira com o intuito de ativar receptores purinérgicos, no entanto, esse mecanismo também pode ser subvertido pelos patógenos, a fim de gerar outros mediadores, como a ADO por exemplo. A ADO possui um papel central na modulação da resposta imune e, diversos trabalhos ressaltam que a ativação do receptor A2a é capaz de induzir uma resposta anti-inflamatória, como a produção de IL-10 em macrófagos infectados por *Escherichia coli* (Csóka *et al.*, 2014). Outro trabalho investigou o papel do receptor A2a na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, onde o mesmo foi capaz de evidenciar que os macrófagos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* possuíam um fenótipo de macrófago M2 e, essa característica está diretamente envolvida com o receptor A2a (Dubois-Colas *et al.*, 2014). Além disso, neste trabalho o autor identificou que a infecção também foi capaz de modular positivamente os níveis de expressão gênica e proteica do receptor A2a, reforçando a participação deste receptor no controle do microambiente da célula hospedeira. Esses dados permitem inferir que o receptor A2a apresenta um papel ativo no estabelecimento da infecção por *Mycobacterium tuberculosis*, deixando em aberto que este receptor também pode estar favorecendo o estabelecimento de outras micobactérias, o que reforça a necessidade de investigar o envolvimento deste receptor como o patógeno da hanseníase.

1.6 Hipótese

Baseado em dados da literatura sobre o envolvimento do sistema purinérgico em doenças infecciosas e na modulação da resposta imune e, de dados disponíveis sobre mecanismos moleculares e via metabólicas do hospedeiro, que são moduladas e subvertidas pelo *Mycobacterium leprae*, somada a informações sobre mecanismos imunes disparados pelo bacilo e pelo hospedeiro, em resposta a interação do patógeno com o hospedeiro, estabelecemos a hipótese que deu início a este projeto. Considerando que os principais mediadores do sistema purinérgico são o ATP, uma molécula pró-inflamatória, e a ADO, uma molécula potencialmente anti-inflamatória que têm efeitos antagônicos, e são regulados por ectoenzimas como CD39, CD73 e ADA. Nós acreditamos que a infecção pelo *Mycobacterium leprae* modularia positivamente as enzimas CD39 e CD73, diminuindo os níveis de ATP extracelular enquanto aumentaria os níveis de ADO. O alvo deste projeto foi o receptor para ATP, P2X7, e o receptor de ADO, A2a. Em nossa hipótese, acreditamos que a infecção irá favorecer a resposta em direção ao receptor de ADO, disparando um mecanismo anti-inflamatório, pró-infecção e negativamente regulando a via microbicida disparada pelo receptor P2X7. Esperamos com este trabalho, aumentar o entendimento sobre os mecanismos moleculares e de sinalização envolvidos na interação do *Mycobacterium leprae* com o hospedeiro, integrar os dados existentes na literatura a fim de compreender melhor a patogênese da hanseníase, e fornecer pontos de controle da infecção, que possam subsidiar futuramente, estratégias terapêuticas complementares ao tratamento atual.

2 Objetivo geral

Investigar o papel da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na modulação do sistema purinérgico em monócitos humanos primários humanos.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o envolvimento da infecção com *Mycobacterium leprae* na modulação da expressão das ectoenzimas CD39, CD73 e adenosina deaminase;
- Avaliar a participação do *Mycobacterium leprae* na hidrólise de ATP extracelular;
- Investigar se a infecção pelo *M. leprae* afeta a expressão da proteína panexina 1 e dos receptores P2X7 e A2a;
- Estudar o envolvimento dos receptores P2X7 e A2a na formação de corpúsculos lipídicos induzidos pelo *Mycobacterium leprae*;
- Avaliar se o receptor A2a é capaz de modular a produção de citocinas induzidas ou não pela infecção pelo *Mycobacterium leprae*.
- Analisar o perfil de expressão de genes relacionados ao sistema purinérgico através de uma abordagem *in silico* de reanálise de dados públicos de microarranjo comparando indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.

3 Metodologia

3.1 Micobactérias

A cepa de *Mycobacterium leprae* (Thai-53) vivo utilizada nesse estudo, cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), foi proveniente do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (nu/nu). Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, as patas foram colhidas e enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular (FIOCRUZ, RJ) para purificação. De modo estéril, as patas foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI-1640 (LGC biotecnologia, SP). A suspensão de bacilos foi tratada com hidróxido de sódio 0,1 M, posteriormente ressuspensa em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, SP) suplementado com 50 µg/mL e ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e incubadas a 33° C por 3h. Os bacilos foram quantificados por contagem direta em microscópio óptico conforme descrito por Shepard e McRae (1968). Neste método, retira-se uma pequena alíquota para preparação de esfregaços em lâmina de vidro (Fisherbrand, Pittsburg, PA, EUA) e coloração pelo método de Kynion fazendo diluições de 10 e 100 vezes ou sem diluição do material. Este foi fixado com formol-leite em vapor de formaldeído e calor. Os bacilos foram corados pelo método de Kynion (Shepard e McRae, 1968) utilizando fucsina básica por 5 min e lavados com água corrente. As lâminas foram, então, lavadas com solução álcool-ácida e, em seguida, com água novamente para a retirada de excesso do corante. Finalmente, os esfregaços foram corados com azul de metileno por 3 min e lavados com água. A contagem do número de bacilos foi realizada em microscópio óptico com lente de imersão de 1000X Axiobserver Z1 (Carl Zeiss Inc. Thornwood, NY, EUA). A viabilidade dos bacilos foi estimada, após a purificação, utilizando o kit Live/Dead (Invitrogen, Rockville, MD, EUA) seguindo protocolo de acordo com as especificações do fabricante. Para os ensaios com *Mycobacterium leprae* morto, as bactérias foram letalmente

irradiadas utilizando feixe de elétrons, procedimento padrão utilizado para irradiação de materiais por empresa especializada (Acelétron, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.2 Cultivo e manutenção de células da linhagem THP-1

As células foram mantidas por 24 horas na presença de 50 ng/mL de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB por 24 horas, posteriormente o meio das células foi removido e as culturas foram lavadas duas vezes com PBS para a retirada do PMA. Em seguida, as células voltaram para a estufa. foram mantidas por mais 24 horas com o intuito de estabilizar seu metabolismo. Por fim, a diferenciação em macrófagos foi confirmada após a visualização das culturas em microscopia óptica.

3.3 Obtenção de monócitos derivados de células mononucleares de sangue periférico

Amostras de sangue periférico de doadores saudáveis foram coletadas em tubos heparinizados e, então, processadas para obtenção das células mononucleares de sangue periféricos (PBMCs). O sangue coletado foi diluído numa proporção 1:1 em solução salina tamponada (PBS) e centrifugado a 913 xg sobre gradiente de densidade Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences; Piscataway, NJ, EUA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. O anel contendo as PBMCs, que se encontra na interface Ficoll-Paque/plasma, foi coletado, lavado com PBS e centrifugado a 329 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de PBS gelado, havendo, então, uma nova centrifugação a 514 xg por 10 minutos a 4°C. Esse processo foi repetido e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de meio AIM-V (GIBCO; CA, USA). A quantificação de células viáveis foi feita pelo método de exclusão do azul de Trypan (corante vital). Posteriormente, as células foram plaqueadas e, foram mantidas em estufa com atmosfera 5% de CO₂ durante 2 horas para a aderência dos monócitos. Após as 2 horas, as células foram lavadas com PBS 1X e estimuladas /infectadas. O processamento do sangue dos indivíduos incluídos

neste estudo foi realizado em câmara de fluxo laminar respeitando as normas de precauções para manipulação de material biológico.

3.4 Detecção e quantificação de corpúsculos lipídicos por microscopia de fluorescência

As células foram recobertas com propilenoglicol 100% por 5 minutos após a remoção deste, foi adicionado Oil Red O (Sigma-Aldrich) (0,5% em propilenoglicol) durante 7 minutos, passado este tempo o ORO foi retirado e acrescentou se propilenoglicol 85% por 3 minutos, posteriormente as lamínulas foram lavadas com água destilada. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia utilizando-se resina sintética (EntellanR, Merck). O núcleo celular foi marcado com 4', 6- diamino- 2- fenilindol (DAPI). Os CLs foram visualizados em vermelho e o núcleo marcado em azul empregando o microscópio de fluorescência Axio Observer Z1 (Carl Zeiss) usando o programa AxioVision Rel. 4.8. A quantificação dos CLs foi feita usando o software ImageJ (Díaz Acosta *et al.*,2018) junto com um Macro desenhado a para quantificação simultânea de múltiplas imagens obtidas usando o canal vermelho do microscópio de fluorescência. O índice de “área de CLs /célula” foi calculado dividindo-se o valor de área de corpúsculos obtido pelo programa pelo número de células presentes no campo analisado. Analisamos 250 células para cada condição analisada e foi feita uma média dos valores de área de CLs /célula. Todos os experimentos foram feitos com pelos menos 3 replicatas biológicas e 2 replicatas técnicas.

3.5 Avaliação da expressão do receptor A2a nos monócitos humanos derivados de PBMC por microscopia de fluorescência

Culturas de monócitos humanos foram obtidas e mantidas conforme descrito previamente. A expressão do receptor A2ar foi avaliado através da técnica de imunofluorescência. Para isto, as culturas monócitos foram estabelecidas sobre lamínulas de vidro sobrepostas aos poços da placa de cultivo, foram infectadas ou não com o *M. leprae* (MOI 10:1) e então após 48 horas foram fixadas com paraformaldeído a 4%. As células então foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-A2a na concentração de 1:200 por cerca de 16-18 horas. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS 1x e então foram

mantidas no anticorpo secundário conjugados a um fluoróforo por 1 hora na concentração de 1:300. Por fim, as lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência na objetiva de 40x com óleo e quantificadas através do programa Image j (Díaz Acosta *et al.*,2018), medindo em cada foto a área da fluorescência / número de células de cada imagem considerando 300 células por condição.

3.6 Ensaios de atividade Ecto-NTPDásica:

Monócitos humanos foram obtidos e plaqueados em placa de 24 poços para medir a atividade ecto-ATPase, através da quantidade de fosfato inorgânico (Pi) gerado durante a hidrólise do ATP extracelular. Monócitos foram infectados com *Mycobacterium leprae* vivo e morto nas MOIs de 5:1 e 50:1 por 24h. Após este tempo o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados com PBS 1x e foi adicionado 0,5mL de RPMI 1640 sem soro com 50 µM [γ 32P] ATP por 30 min a 25 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de carvão gelado a 25% em HCl 1,0 M. Os tubos foram então centrifugados a 1.500 xg durante 10 min a 4 °C. Alíquotas (0,5 mL) dos sobrenadantes contendo o 32Pi liberado (fosfato inorgânico) foram transferidos para frascos de cintilação contendo 9,0 mL de fluido de cintilação (2,0 g de PPO em 1 litro de tolueno). A medida de radioatividade foi realizada em um contador de cintilação líquida Tri-Carb B2810 TR (PerkinElmer, Waltham, EUA). A atividade ATPásica foi calculada subtraindo a hidrólise não específica do ATP medida na ausência de células. O valor da atividade específica (em CPM) foi utilizada para obter os valores de atividade enzimática em pmol Pi /número de células /min. A representação dos dados foi feita em atividade relativa. Todos estes ensaios foram feitos em colaboração com o Dr. José Roberto Meyer Fernandes na UFRJ, que apresenta licença para trabalhar com material radioativo.

3.7 Avaliação da modulação de componentes da via de sinalização purinérgica por *Western Blot*

Para avaliar a expressão de proteínas de culturas de células com os diferentes estímulos, as células foram obtidas e mantidas nas condições de cultivo citadas anteriormente e plaqueadas em placas de 24 poços numa confluência de 2×10^5 células/poço, sendo infectadas ou não com *M. leprae* na MOI de 10:1. Após 48 horas de infecção as células foram lisadas com solução de lise “tampão RIPA”

(50mM TRIS pH= 7,5; 1% Novidet p40; 0,25% Deoxicolato de sódio; 0,1% de SDS) gelado, complementado com inibidores de proteases (Roche, USA). As proteínas foram dosadas pelo método BCA (Thermo Scientific, USA). Foram utilizadas 20µg de proteína, e essas amostras foram diluídas em tampão de amostra e foram fervidas por cinco minutos (Tampão de amostra 4x pH6.8:Tris HCl 156.25mM, glicerol 25%, beta mercaptoetanol 12.5%, SDS 5%). As amostras foram aplicadas num gel de poliacrilamida 12% pela técnica de eletroforese por aproximadamente 2 horas. A transferência foi realizada com a mesma voltagem e amperagem da eletroforese por aproximadamente 1h e 30 minutos. Após a corrida as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com Amido Black, para verificar a eficácia da transferência. Posteriormente a membrana foi bloqueada com 5% de leite em TBS- tween 20 (TBS-T) por duas horas. Após o bloqueio foi feita a incubação com anticorpo primário diluído em 5% de leite/TBS-T *overnight*. A concentração do anticorpo primário foi 1:500 (Panexina 1, ADA, P2X7, ABCG1) e 1:1000 (GAPDH), conforme indicado pelo fabricante. A membrana foi lavada 6 vezes durante 5 minutos, sendo três com TBS-T 1X e outras três com TBS 1X. O anticorpo secundário conjugado a peroxidase (HRP) e diluído em 5% de BSA em TBS-T, com concentração de 1:10.000. A membrana é submetida novamente a lavagens, e a reação é revelada por quimioluminescencia usando o kit “ECL” (Amersham Biosciences, UK) seguindo as normas do fabricante.

3.8 Quantificação de citocinas em sobrenadantes de cultura de células:

Os sobrenadantes dos experimentos realizados foram recolhidos, aliquotados e congelados. Posteriormente, esse material foi devidamente descongelado e adicionados nas placas de 96 poços com o intuito de avaliar a produção de citocinas produzidas na célula hospedeira. As citocinas IL-8, IL-10 e IL-1β foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kits específicos, conforme as instruções dos fabricantes (DuoSet /R&D Systems).

3.9 Análise da expressão de componentes da via de sinalização purinérgica por Citometria de Fluxo

As células foram plaqueadas e infectadas ou não como descrito previamente. Em seguida as células foram coletas utilizando uma solução com EDTA 5mM, 1% de SFB e PBS1X. O bloqueio foi realizado com soro AB humano inativado por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados anticorpos monoclonais anti-A2a, P2X7, Panexina 1, CD39, CD73 e ADA. Em seguida as células foram lavadas com PBS1X por 5 minutos e marcadas com anticorpo secundário conjugado com fluorocromo alexa 488 ou somente PhycoerythrinCyanin (PE) (Os anticorpos anti-CD39 e CD73 eram conjugados com PE) como controle de ligação inespecífica. As células foram fixadas em 1% de PFA e analisadas utilizando o citometro BD Accuri™ C6 Plus (BD- Biosciences, EUA).

3.10 Quantificação do efluxo de colesterol

Para mensurar a participação da adenosina no efluxo de colesterol modulado pelo *M. leprae*, monócitos da linhagem THP-1 (acute monocytic leukemia human TIB-202) cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram diferenciados em macrófagos, 24 horas antes do início do experimento com a adição de 50 ng/mL de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich). Em seguida, as células foram incubadas com 2 µCi/mL de [H 3] colesterol em meio RPMI contendo 5% de SFB por 48 horas a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, as células foram pré-estimuladas ou não com Adenosina (100 µM) durante 1 hora e em seguida infectadas ou não com *M. leprae* vivo (MOI 10:1) em meio RPMI1640 na ausência de SFB, por um período de 24 horas. Ao término desta incubação, os sobrenadantes foram descartados e as células receberam um novo meio RPMI 1640 contendo 2% de albumina bovina, seguida de uma nova incubação. Transcorridas 18 horas, os sobrenadantes foram removidos, e as células incubadas por mais 6 horas com meio RPMI 1640 na presença ou ausência de 50 µg/mL de HDL (lipoproteína de alta densidade, purificada a partir da gel filtração de plasma humano em duas colunas "Superose 6HR" (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK), dispostas em sequência em HPLC. Finalizada a incubação, o sobrenadante foi coletado, e em paralelo, as células foram lisadas com tampão de lise RIPA. A contagem

individual da radioatividade dos sobrenadantes e lisados celulares foram realizados em cintilador Beckman LS 600 (Beckman Coulter, Pasadena, CA) em tubos contendo coquetel de contagem de cintilação Optima Gold Plus (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) e expressa em DPM (Disintegrations Per Minute).

3.11 Obtenção e diferenciação dos macrófagos murinos P2X7^{-/-} e A2a^{-/-} derivados de medula

Os camundongos C57 Black 6 (P2x7 KO) e Balb/c (A2a KO) foram eutanaziados e tiveram seus ossos das patas traseiras removidos (fêmures e tíbias), as epífises foram cortadas e as medulas ósseas removidas por lavagem com meio de cultura BMM (Bone Marrow Macrophage): 60% RPMI 1640 (GIBCO), 20% de soro fetal bovino (SFB- GIBCO), 18% de sobrenadante de célula L929 (rico em M-CSF, Macrophage Colony Stimulation Factor), 1% de L-glutamina (GIBCO) e 1% de Penicilina/Estroptomicina (P/S) (HyClone). Após o flush dos ossos, a solução obtida foi homogeneizada e plaqueada 1 ml de solução homogênea de células + 10 ml de meio BMM por placa de petri. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Após 3 dias de cultivo, as placas receberam adição de 10 mL de meio BMM. Após mais 3 dias de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os macrófagos já diferenciados foram removidos das placas por lavagem com PBS 1x gelado, contados e plaqueados. Foram utilizados 2 x10⁵ macrófagos por poço em placas de 24 poços.

3.12 Dosagem de nucleosídeos no sobrenadante de cultura de monócitos de PBMC por LC-MS/MS

Foram utilizados 70 µL de amostras, onde as mesmas foram centrifugadas a 9000 rpm por 10 min para retirada de partículas celulares e o sobrenadante transferido para microtubos de 2 mL. Foram adicionados 429 µL de metanol e o tubo agitado por 15s em agitador do tipo vortex. Posteriormente, a separação de fases foi induzida pela adição de 557 µL de MTBE e água + 444 µL de meio de cultura, obtendo-se volume final de extração de 1500 µL. Após homogeneização por 15s, a amostra foi incubada por 15 min a 4°C e em seguida centrifugada (5000g, 15 min, 18°C). A fração aquosa contendo os compostos polares foi

transferida para novos microtubos de 1,5 mL e evaporadas em fluxo de nitrogênio em banho maria a 40°C e armazenadas em freezer -20°C. Para a análise por CL-EMAR, foram adicionados 40 µL de H₂O: ACN (acetonitrila) 7:3 (v/v) para reconstituição as amostras juntamente com 10 µL do padrão interno teofilina (200 ng/mL). Para a quantificação das amostras foram preparadas curvas analíticas em solução 7:3 água:acetonitrila, contendo 200 ng/ml de padrão interno e os padrões de inosina, adenosina e hipoxantina nas concentrações de 10, 50, 100, 250, 750, 1000 e 5000 ng/mL; e 750, 1000, 5000, 7500, 10000, 15000 e 20000 ng/mL para a quantificação do ácido úrico e xantina. Os compostos ATP, ADP e AMP não foram selecionados para análise quantitativa pois em análise prévia dos extratos eles não foram detectados nas amostras. Os íons de interesse foram monitorados utilizando experimento de monitoramento de reação paralelo (PRM) no modo negativo de ionização e selecionados os seguintes parâmetros: resolução MS² 35.000, AGC 1x10⁵, máxima IT 80 ms, MSX contagem 1, janela de isolamento $m/z= 1.2$, energia de colisão 10-50 eV, com uma tolerância de desvio de massa de 5 ppm. Simultaneamente, foi realizada análise por Full MS-SIM no modo negativo utilizando resolução 17.500, AGC 1x10⁵, máxima IT 200 ms, janela de isolamento $m/z= 120-1000$. As seguintes transições foram utilizadas como íon diagnóstico de quantificação: AMP [M-H]⁻= 346.05581->78.95773; ADP [M-H]⁻= 426.02214-> 134.04610; ATP [M-H]⁻= 505.98847-> 158.92436; inosina [M-H]⁻= 267.07349-> 135.03009; adenosina [M-H]⁻= 266.08948-> 134.04610; hipoxantina [M-H]⁻= 135.03123 -> 92.02409; ácido úrico [M-H]⁻=167.02106-> 124.01385; xantina [M-H]⁻=151.02615 -> 108.01890; teofilina [M-H]⁻=179.05745 -> 164.03290. As análises foram realizadas utilizando sistema de cromatografia líquida Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 UHPLC acoplado ao Espectrômetro de Massas híbrido Quadrupolo-Orbitrao modelo QExactive Plus usando ionização por electrospray (ESI) e, as análises das curvas analíticas e quantificação das amostras foram realizadas no programa TraceFinder (Thermo Fisher Scientific).

3.13 Análise *in silico* da expressão de genes do sistema purinérgico

Para esta análise foram recuperados os dados brutos de microarranjo dos estudos de Belone e colaboradores de 2015 (Belone Ade *et al.*,2015). Belone e colaboradores fizeram uma avaliação abrangente do mRNA humano de lesões cutâneas de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase usando microarranjos de chips de DNA. Belone utilizou sessenta e seis amostras de lesões de pele subdivididas em (10TT, 10BT, 10BB, 10BL, 4LL, 4R1 e 10R2) e nove biópsias de pele de indivíduos saudáveis que foram utilizadas como controle. As idades variaram de 06 a 83 anos, 48 foram do sexo masculino e 29 mulheres. Para nosso estudo os dados foram recuperados do banco de dados *Gene Expression Omnibus*, sob o acesso GSE74481. Os arquivos brutos foram importados para o ambiente R, v. 3.4.1. As bibliotecas utilizadas para a importação e normalização dos dados brutos foram Biobase v. 2.36.2, limma v. 3.32.6 e affy 1.54.0. Os valores de intensidade brutos foram corrigidos e normalizados pelos métodos “Robust multichip average” e quantil, respectivamente. Os dados normalizados e em escala logarítmica de base 2 foram utilizados na construção dos gráficos de dispersão (ggplot2 v. 3.0.0). Agrupamos em nossas análises os indivíduos TT e BT como paucibacilares (PB) e BL e LL como multibacilares (MB) um total de 20PB e 14MB respectivamente. Os genes analisados foram *ADORA1*, *ADORA2A*, *ADORA2B*, *ADORA3*, *P2X7*, *ENTD1* (CD39), *NT5E* (CD73), *PANX1*, *SCL29A1* (ENT1) e *XDH*.

3.14 Análise estatística

Os resultados foram representados como média +E.P.M. (Erro padrão ou desvio padrão da média) e avaliados estatisticamente pelo teste “t student” para comparação entre duas variáveis. Os valores foram considerados significativos quando o valor de “p” foi igual ou inferior a 0,05 ($p =$ ou $<0,05$). Além disso, os testes *One-way analysis of variance* (ANOVA) seguido do teste Bonferroni foram aplicados em dados que apresentassem três ou mais variáveis. Valores de $p < 0,05$ e foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Análise do efeito da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na hidrólise do ATP extracelular em monócitos humanos derivados de PBMC

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi coletado o sangue de diversos voluntários saudáveis para a purificação das células necessárias para a obtenção dos ensaios. A coleta foi realizada por um profissional experiente da nossa equipe e os indivíduos tiveram 50 mL de sangue coletado. A tabela a seguir mostra as informações demográficas dos indivíduos que participaram deste estudo.

Tabela 1.3: Características demográficas dos indivíduos saudáveis incluídos neste estudo.

Grupo	Amostra	Ensaio	Indivíduos	Homem	Mulher	Idade (média)	Idade (mínima e máxima)
Indivíduos saudáveis	Monócitos derivados de PBMC	Citometria	10	5	5	25	21-40
		Elisa	5	4	1	34,8	25-46
		Hidrólise de ATP	3	2	1	23,3	21-29
		Produção de corpúsculos lipídicos	8	5	3	31,5	24-46
		Western Blot	4	4	-	26,5	24-31
		Imuno Fluorescência	4	3	1	31,2	24-46

Considerando o efeito pró-inflamatório do ATP extracelular em diversas patologias e doenças infecciosas (revisto por Adinolfi *et al.*, 2017), resolvemos iniciar nossos estudos analisando o papel da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na hidrólise de ATP extracelular em monócitos humanos derivados de PBMC. Para isto, os monócitos obtidos foram infectados ou estimulados com *Mycobacterium leprae* (vivo ou morto) nas MOIs 5:1, 10:1 e 50:1 por 24 horas. A atividade enzimática foi avaliada por ensaios radioativos com ATP γ 32 no qual

o fosfato inorgânico (Pi) liberado foi medido por cintilação líquida, conforme descrito na metodologia.

O resultado apresentado na figura 4.1.A mostra que tanto o *Mycobacterium leprae* vivo quanto morto foram capazes de aumentar a hidrólise de ATP extracelular, entretanto, o bacilo vivo parece ser um pouco mais eficiente quando comparado com o morto, apesar da diferença não ter se mostrado estatisticamente significativa. Observamos também que a MOI de 5:1 já se mostrou eficiente em induzir a hidrólise deste nucleotídeo. Apesar deste dado, definimos a MOI de 10:1 em todos os ensaios de infecção.

O lipopolissacarídeo (LPS) é descrito na literatura com a função de aumentar a hidrólise do ATPe, por induzir um aumento na expressão e atividade da enzima CD39 (Okuda *et al.*, 2012), portanto, analisamos também em nosso modelo experimental, o efeito do LPS na hidrólise de ATPe como um controle positivo. A figura 4.1.B mostra que o LPS foi capaz de aumentar a hidrólise de ATPe, fortalecendo a hipótese de que o aumento da hidrólise deste nucleotídeo induzido pela infecção, seja mediado pela ação da enzima CD39, entretanto, estudos com inibidores serão necessários para validar nossa hipótese. Com o objetivo de avaliar se o aumento da hidrólise de ATPe estava relacionado diretamente ao fenômeno de fagocitose, monócitos foram estimulados com esferas de poliestireno em diferentes MOIs. Nosso resultado mostra que estas partículas não tiveram um efeito sobre a hidrólise extracelular do ATP, mostrando que este efeito não está associado simplesmente ao fenômeno de fagocitose (Figura 4.1C).

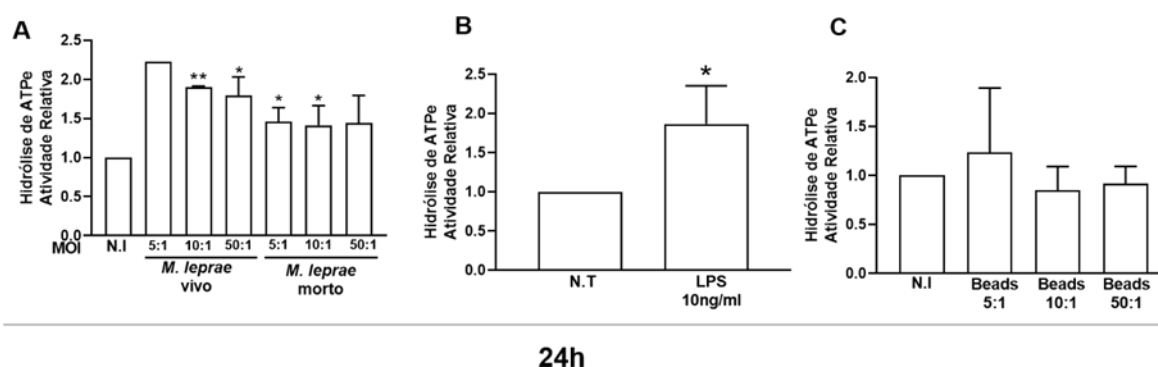


Figura 4-1 A infecção pelo *Mycobacterium leprae* aumenta a hidrólise do ATPe em monócitos humanos.

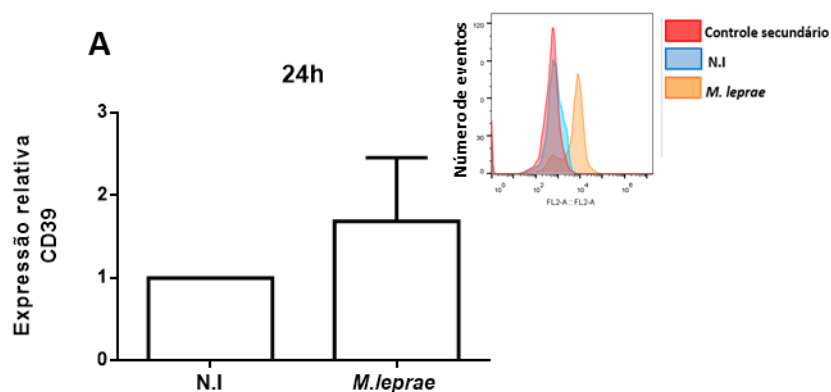
Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço), e foi verificada a influência da viabilidade bacteriana e multiplicidade de infecção (MOIs – 5:1, 10:1 e 50:1), na hidrólise de $[\gamma\text{-}^{32}\text{ATP}]$ nas células infectadas com *Mycobacterium leprae* vivo ou tratados com *Mycobacterium leprae* morto (A), ou

tratadas com LPS como controle positivo (10ng/mL) (B), ou estimuladas com *beads* de poliestireno na MOI 5:1, 10:1 e 50:1 (C). Em todos os ensaios, a infecção ou os estímulos foram mantidos por 24 horas. A atividade ATPásica foi medida através da hidrólise γ 32ATP e da quantidade de formação fosfato inorgânico (Pi) gerado durante a hidrólise do ATP extracelular e, a mensurada através da quantidade de formação fosfato inorgânico (Pi) gerado durante a hidrólise em 30 minutos. A diferenças entre os grupos foi avaliada através de *Student* paramétrico Teste t, (média \pm DP) * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ (N=3) em comparação com a condição N.I.

4.2 Análise do efeito da infecção com *Mycobacterium leprae* na expressão da ectoenzima CD39, em monócitos humanos derivados de PBMC

O resultado acima suporta a nossa hipótese de que o *Mycobacterium leprae* está aumentando a hidrólise de ATPe, este efeito pode contribuir para uma menor ativação de receptores purinérgicos do tipo P2, por exemplo, o receptor P2X7, que poderia desencadear um efeito bactericida.

Considerando o resultado anterior e a característica inflamatória do ATP, a próxima pergunta deste projeto foi: será que a infecção pelo *Mycobacterium leprae* poderia afetar a expressão da ectoenzima (CD39) responsável por regular os níveis extracelulares de ATP? Para responder esta pergunta, foram feitos ensaios de citometria de fluxo e os resultados sugerem que a infecção com o *Mycobacterium leprae* foi capaz de aumentar a expressão de CD39, tanto 24 quanto 48 horas (Figura 4.2 A-B). Os *insets* mostram histogramas representativos de cada condição analisada, e nestes, observamos um deslocamento dos picos em laranja que correspondem as células infectadas, corroborando com os dados de expressão relativa.



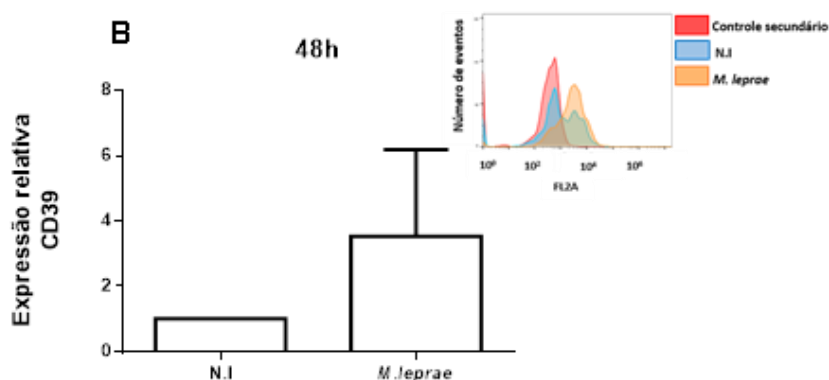


Figura 4-2 Efeito da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na expressão da enzima CD39 em monócitos humanos.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço) e o nível de expressão de CD-39 foi determinado por Citometria de Fluxo nas células infectadas ou não com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1). (A,B) Gráficos representativos mostram a leitura da fluorescência do anticorpo específico (CD-39) conjugado ao fluorocromo PE (FL-2) representados no Histograma como: não infectada (N.I – Azul) e Infectada (*M. leprae* – Laranja). Os dados são representados como expressão relativa após atribuir os valores da condição não infectada (N.I) como 1 e os valores da condição infectada (*M. leprae*) variarem de acordo com seu controle experimental. Foram realizados 3 experimentos independentes no tempo de 24 horas (N3) e 2 experimentos independentes (N2) no tempo de 48 horas e a significância no valor de “p” ($p < 0.05$) entre as condições N.I e *M. leprae* foi avaliada e não foi detectada diferença significativa utilizando o teste *Student* paramétrico Teste t.

4.3 Análise do efeito da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na expressão da proteína Panexina 1 e do receptor P2X7 em monócitos humanos

Ao passo em que a célula hospedeira reconhece um PAMP e/ou um DAMP é desencadeado a secreção de ATP (Tanaka *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014). A molécula de ATP no espaço extracelular pode ser um mecanismo utilizado pela célula para ativar mecanismos de controle da infecção (Vylkova *et al.*, 2007). E, dados da literatura apontam que hemicanais de panexina 1 podem estar envolvidos na secreção de ATP em células infectadas (revisto por Eugenin., 2014). Deste modo, decidimos analisar se a infecção pelo *Mycobacterium leprae* afetaria a expressão desta proteína em monócitos nos tempos de 6, 24 e 48 horas.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo não se mostraram muito conclusivos devido ao número reduzido de replicatas biológicas, entretanto, os dados obtidos sugerem um aumento na expressão de panexina 1 (Figura 4.3 A-B). Os dados mostram que a expressão de panexina 1 parece aumentar nas células infectadas com 24 horas e, seus níveis de expressão se mantêm estáveis

no tempo de 48 horas de infecção. O baixo rendimento celular deste experimento fez que utilizássemos o tempo de 48 horas para a condição controle. Além disso, obtivemos outro dado por análise de *Western blot* que corrobora com os dados de citometria de fluxo, mostrando que após 48 horas de infecção a expressão de panexina 1 parece permanecer aumentada quando comparada a condição não infectada (Figura 4.3C).

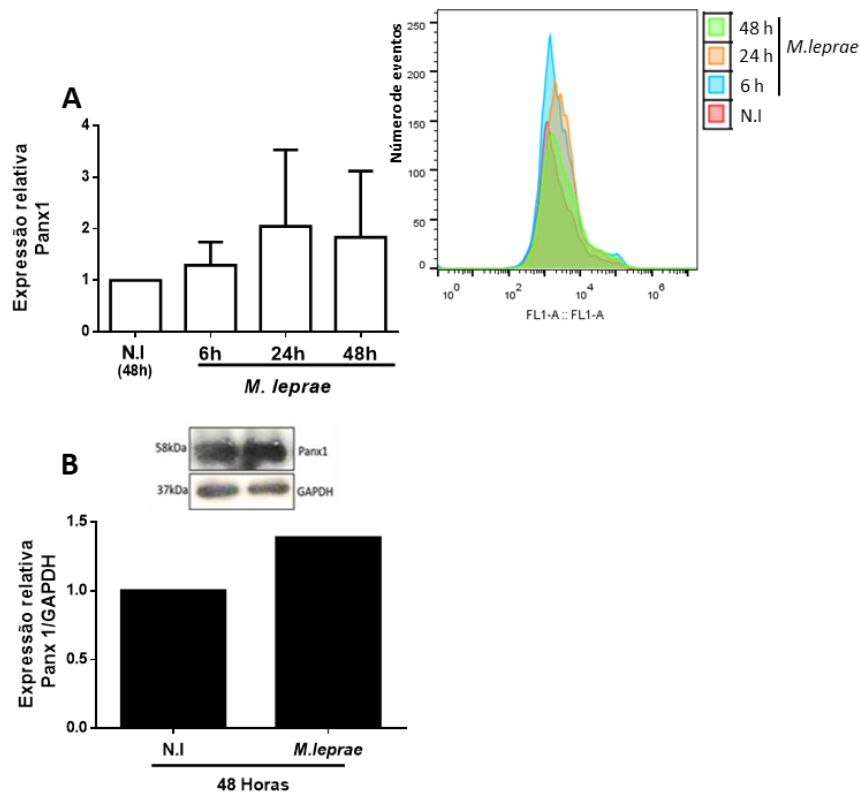


Figura 4-3 *Mycobacterium leprae* parece regular positivamente a expressão de Panexina 1 em monócitos humanos.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço) e o nível de expressão de panexina 1 foi determinado por Citometria de Fluxo nas células infectadas ou não com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1) por diferentes tempos. (A) Gráfico representativo mostra a expressão relativa de Panexina 1, onde foi normalizado a condição não infectada (N.I) com o valor arbitrário de 1, e a condição infectada (*M. leprae*) variando de acordo com seu controle experimental. No histograma é representado a condição N.I como roxa, *M. leprae* 6 horas azul claro, *M. leprae* 24 horas vermelho e *M. leprae* 48 horas laranja. (B) Imagem representativa da expressão da Panexina 1 analisada por *Western blot* usando amostras de lisado de leucócitos totais, com marcação específica do anticorpo anti-Panx1 (1:500) como normalizador foi usado o anticorpo policlonal anti-GAPDH (1:1000) e o gráfico representando a análise densitométrica mostrando um regulamento positivo na expressão de panxina 1 nos monócitos infectados. Os dados em A são médias \pm desvio padrão de dois experimentos independentes (N=2) e em B representam um experimento (n=1)

A molécula de ATP no espaço extracelular pode ser reconhecida por diferentes receptores, o que inclui o receptor P2X7. Assim, visto que existe a

possibilidade de um aumento na secreção de ATP pelo monócito infectado com o patógeno, o passo seguinte desta parte do trabalho foi avaliar se a infecção pelo bacilo seria capaz de modular os níveis de expressão do receptor P2X7. Os dados obtidos por ensaios de citometria de fluxo (Figura 4.4 A) nos permitem observar que a infecção com *Mycobacterium leprae* reduz a expressão de P2X7 nos tempos de 24 horas (pico azul do histograma) e 48 horas (pico laranja do histograma) quando comparada a condição não infectada (vermelho). O resultado observado no tempo de 48 horas pode ser comprovado por análise de *Western blot* (Figura 4.4 B), onde mostramos que a infecção diminui a expressão de P2X7.

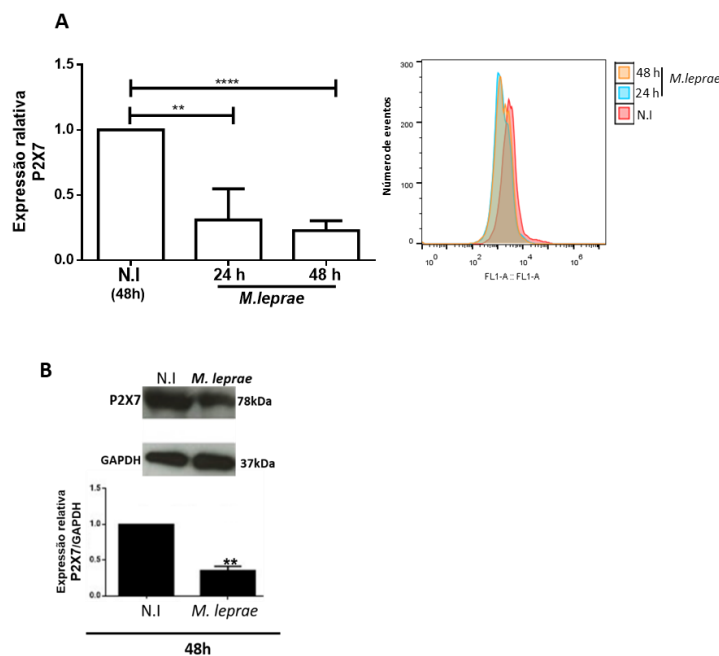


Figura 4-4 Infecção por *Mycobacterium leprae* regula negativamente a expressão do receptor P2X7 em monócitos humanos.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço) e o nível de expressão de P2X7 foi determinada por Citometria de Fluxo nas células infectadas ou não *Mycobacterium leprae* vivo (10:1) em diferentes tempos.(A). Gráfico representativo mostra a expressão relativa do P2X7 normalizada de acordo com a condição não infectada (N.I) padronizando o valor de partida como 1, e a condição infectada (*M.leprae*) variando conforme seu controle experimental. No histograma é representado a condição N.I como vermelha, *M.leprae* 24 horas azul e *M.leprae* 48 horas laranja. (B) Imagem representativa da expressão da P2X7 analisada por *Western blot* usando amostras de lisado de leucócitos totais, com marcação específica do anticorpo anti-P2X7 (1:500) como normalizador foi usado o anticorpo policlonal anti-GAPDH (1:1000) e o gráfico representando a análise densitométrica mostrando um regulamento negativo na expressão de P2X7 nos leucócitos totais infectados. Os dados em A são médias \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes (N=4) e em B representam um experimento (n=3). Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) comparando as condições não infectadas (N.I) com as condições infectadas (*Mycobacterium leprae* 24 h e 48 h).

4.4 Análise do envolvimento do receptor P2X7 na produção da citocina IL-1 β e no metabolismo lipídico da célula infectada pelo *Mycobacterium leprae*

Considerando o papel do receptor P2X7 na produção da citocina IL-1 β via ativação da plataforma do inflamassomo NLRP3 descrito na literatura (revisado por Adinolfi *et al.*, 2017), fomos avaliar se a adição de ATP ao meio extracelular poderia modular a produção desta citocina por monócitos infectados ou não infectados. Em função da larga variação nos níveis de IL-1 β entre as células dos indivíduos doares, optamos por fazer um gráfico mostrando a produção relativa desta citocina. Estes resultados são referentes a dois indivíduos, dos quais tiveram o sangue coletado e purificado, onde a produção de IL-1 β fora analisada nos tempos de 24 horas e 48 horas pós-infecção. Os resultados ainda que preliminares mostram que a adição de ATP parece ser capaz de induzir um aumento na produção de IL-1 β , principalmente nas células infectadas, o que sugere um possível envolvimento do receptor P2X7 neste fenômeno (Figura 4.5 A-B), entretanto, mais estudos são necessários para investigar melhor este efeito.

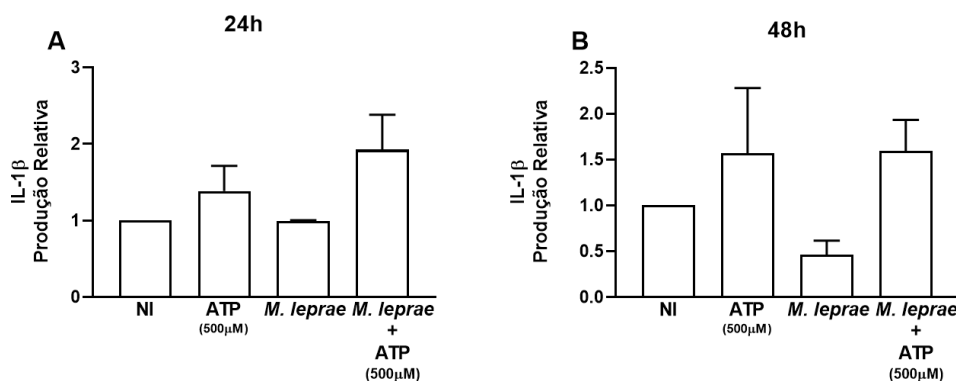


Figura 4-5 A adição de ATP extracelular parece aumentar a produção de IL1- β em monócitos humanos infectados com *Mycobacterium leprae*.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço), onde foram infectados com *Mycobacterium leprae* (10:1) vivo ou não com adição ou não de ATP (500 μ M). As células permaneceram em estufa com 5% de CO₂ em 33°C com 10% de SFB e após 48 horas foi recolhido o sobrenadante e a citocina IL-1 β foi dosada pela técnica de ELISA. Este gráfico representa os dados em "Produção Relativa" por conta das bruscas diferenças entre as produções de IL-1 β secretadas pelos monócitos dos diferentes indivíduos. (N=2)

O metabolismo lipídico é um fenômeno que está relacionado com o receptor P2X7. Este receptor tem se mostrado amplamente envolvido no acúmulo de lipídios, assim como no desenvolvimento de obesidade em camundongos deficientes para este receptor (Sun *et al.*, 2012). O acúmulo de lipídios é um fenômeno que é amplificado pela infecção com o *Mycobacterium leprae* e, como mencionado anteriormente, os CLs induzidos pelo bacilo estão

diretamente envolvidos na sobrevivência do patógeno (Mattos *et al.*, 2010). Assim, outro objetivo investigado neste trabalho foi avaliar o envolvimento deste receptor no acúmulo de CLs nas células infectadas pelo *Mycobacterium leprae*. Para iniciar estas análises fomos avaliar se a adição de ATP, BzATP e do antagonista de P2X7 não específico, BBG, poderiam exercer algum efeito sobre o acúmulo de CLs induzidos pelo *Mycobacterium leprae* em monócitos humanos. Os resultados mostrados na figura 4.6 e quantificados no gráfico abaixo, mostram que o *Mycobacterium leprae* parece induzir o acúmulo destas organelas e que a presença do ATP parece diminuir o acúmulo destes CLs.

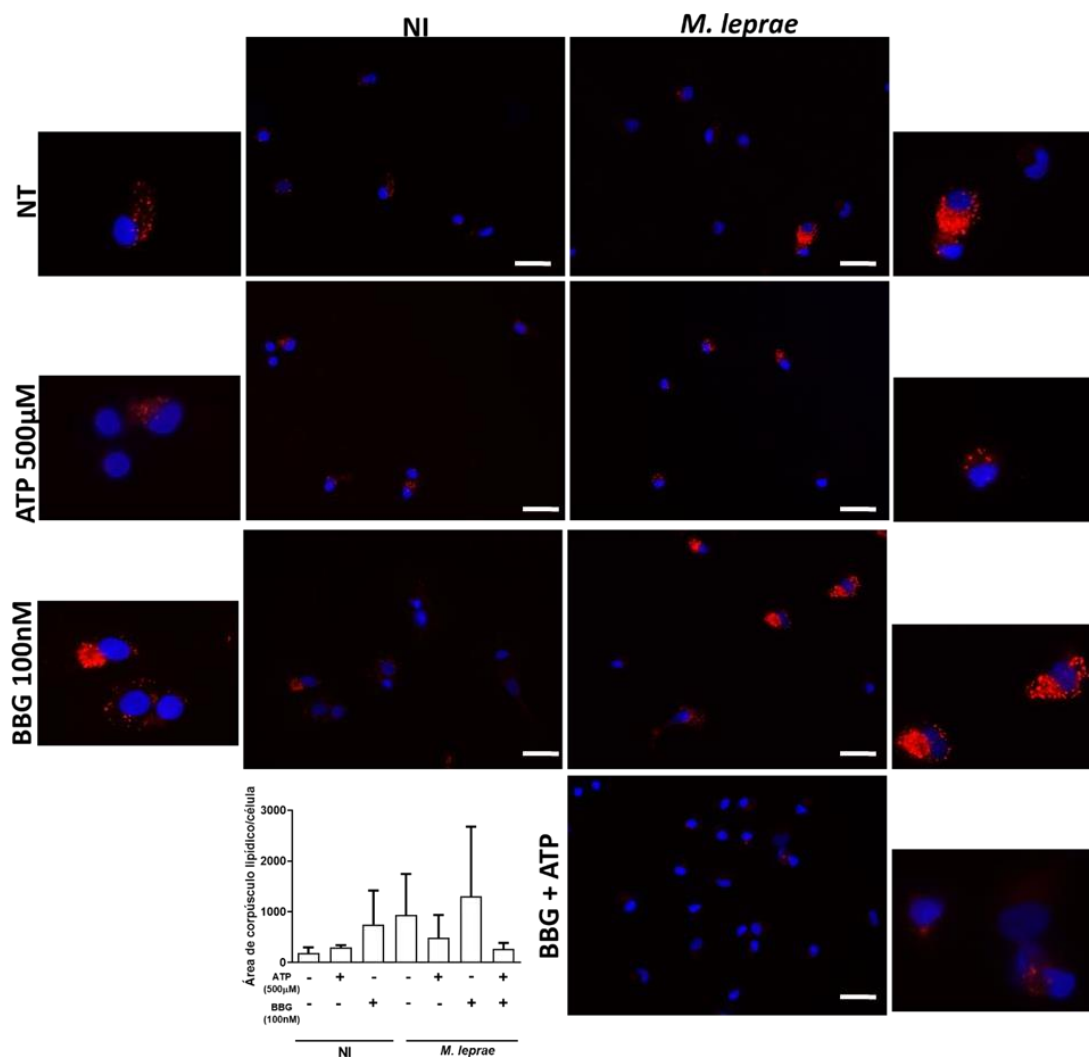


Figura 4-6 Ativação do receptor P2X7 parece reduzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos em células infectadas por *Mycobacterium leprae*.

Imagens representativas de microscopia de fluorescência mostrando a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos derivados de PBMC, 2×10^5 /poço, tratadas ou não com 500µM de ATP e/ou 100 nM de BBG, infectadas com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1) ou não. A adição de ATP foi feita junto com a infecção e, o tratamento com BBG foi feito 1 hora antes da infecção. O experimento foi mantido por 24h de infecção, onde as células foram mantidas em estufa 5% de CO₂ à 33°C com 2% de SFB. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados com ampliação de 40x e a quantificação destas organelas foi

expressa em gráficos de barras como número de CL / célula. Os CLs foram observados como organelas citoplasmáticas vermelhas após marcação com *Oil Red O*, e o núcleo foi evidenciado em azul DAPI. A quantificação das organelas foi feita usando o *software Image J*. (N=2).As escalas nas imagens são referentes a 20 µm.

Observamos também que adição do BBG parece aumentar o acúmulo de CLs, tanto na célula não infectada quanto na condição infectada, entretanto, a adição de BBG na concentração de 100nM não foi capaz de reverter o efeito inibitório do ATP.

Resultados semelhantes foram obtidos usando o análogo mais potente que o ATP, um composto denominado como BzATP. Como pode-se observar, o BzATP parece induzir uma diminuição no acúmulo de CLs, e como observado no experimento anterior, o BBG novamente apresentou um perfil que sugere um aumento na formação destas organelas. De forma similar ao fenômeno já observado, a adição de BBG parece que não foi capaz de reverter o efeito do agonista BzATP (Figura 4.7). Apesar deste experimento ser referente a apenas uma replicata biológica, este dado caminha com o fenômeno observado na figura anterior utilizando o ATP.

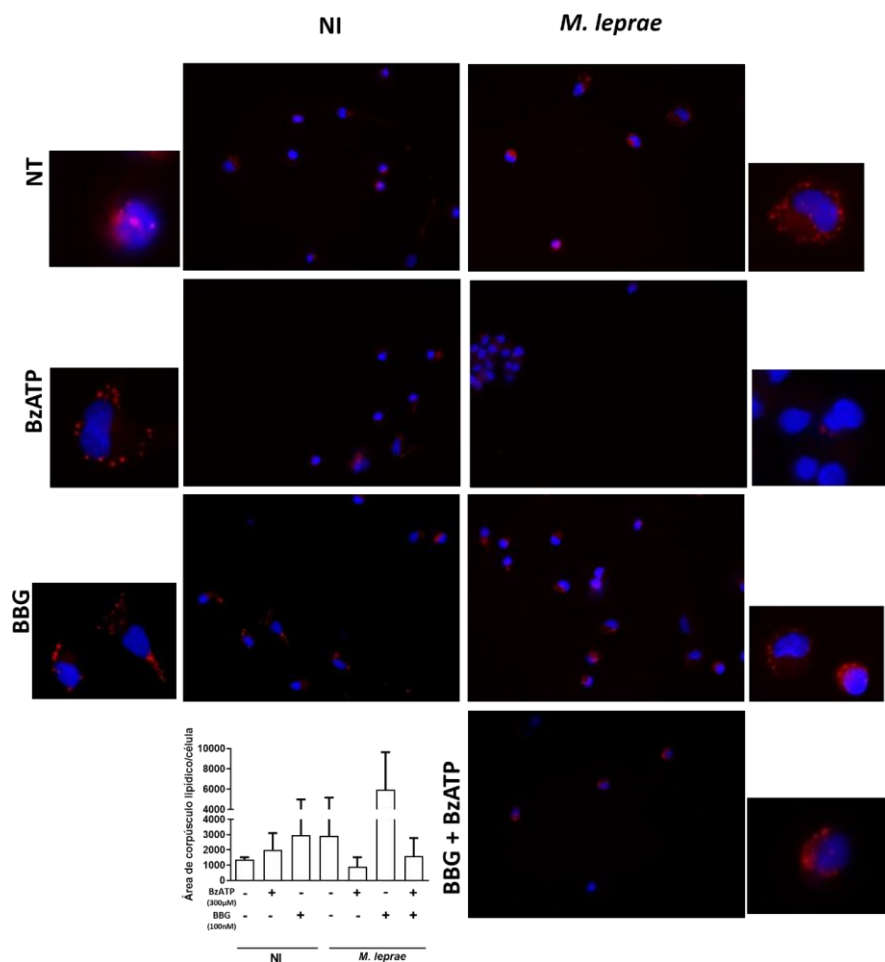


Figura 4-7 BzATP parece reduzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos em células infectadas por *Mycobacterium leprae*.

Imagens representativas de microscopia de fluorescência mostrando a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos derivados de PBMC, 2×10^5 /poço, tratadas ou não com $300 \mu\text{M}$ de BzATP e/ou 100 nM de BBG (antagonista P2x7 específico) infectados com *Mycobacterium leprae* vivo ou não. A adição de BzATP foi feita junto com a infecção e, o tratamento com BBG foi feito 1 hora antes da infecção. O experimento foi mantido por 24h, onde as células foram mantidas em estufa 5% de CO_2 à 33°C com 2% de SFB. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados com ampliação de 40x e a quantificação destas organelas foi expressa em gráficos de barras como área de CL / célula. Os CLs foram observados como organelas citoplasmáticas vermelhas após marcação com *Oil Red O*, e o núcleo foi evidenciado em azul DAPI. A quantificação das organelas foi feita usando o *software Image J*. (N=2). As barras nas imagens são referentes a $20 \mu\text{m}$.

Para reforçar a hipótese do envolvimento do receptor P2X7 na modulação dos CLs induzidos pelo *Mycobacterium leprae*, foram realizados experimentos com camundongos C57BL/6J nocaute para P2X7. Nestes ensaios macrófagos peritoneais foram isolados e infectados com *Mycobacterium leprae*, após 48h de infecção, os corpúsculos foram corados com ORO e analisados por microscopia de fluorescência. Os resultados mostram que a ausência deste receptor aumenta o acúmulo de CLs nas células não infectadas, no entanto, este efeito foi ainda mais evidente nas células infectadas com *M. leprae* (Figura 4. 8).

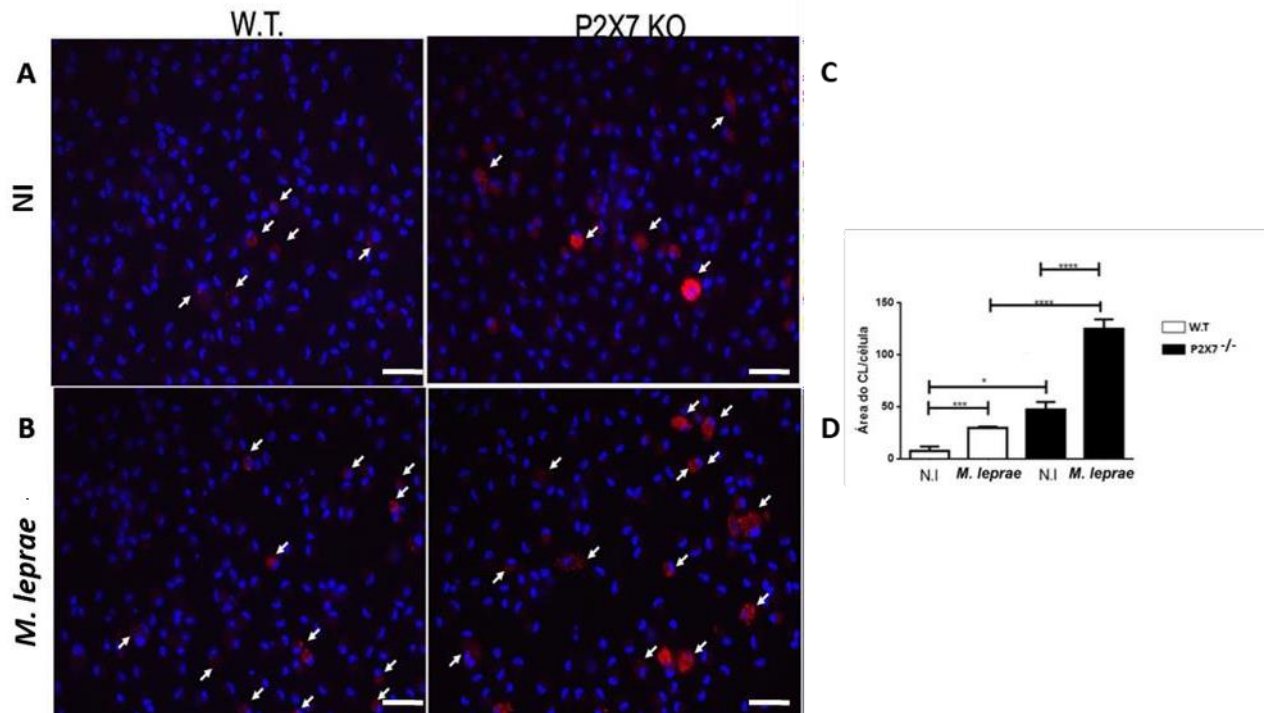


Figura 4-8 Ausência de P2X7 aumenta o acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com *Mycobacterium leprae*.

Os macrófagos peritoneais de camundongo Wild Type ou P2x7 K.O foram infectados ou não com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1) durante 48 horas (barra branca ou preta), e as células foram mantidas em estufa 5% de CO₂ à 33°C com 2% de SFB.(A) Macrófagos peritoneais de camundongos W.T não infectados, (B) macrófagos peritoneais de camundongos W.T infectados, (C) Macrófagos peritoneais de camundongos P2x7 KO não infectados e (D) macrófagos peritoneais de camundongos P2X7 KO infectados. As gotículas lipídicas foram visualizadas por microscopia de fluorescência como inclusões pontuadas citoplasmáticas vermelhas após coloração com Oil Red O ressaltadas com as setas nas imagens, e a quantificação destas organelas foi expressa em gráficos de barras como área de CL / célula. Os núcleos foram marcados com DAPI. Ampliação 40x. A diferenças entre os grupos foi avaliada através de Student paramétrico Teste t com **p ≤ 0.005 e * p ≤0.005. (n=3). As escalas nas imagens são referentes a 20 µm.

Novas análises foram iniciadas para reafirmar este envolvimento e, os ensaios com macrófagos derivados de medula óssea desses camundongos apresentam o mesmo perfil (Figura 4. 9).

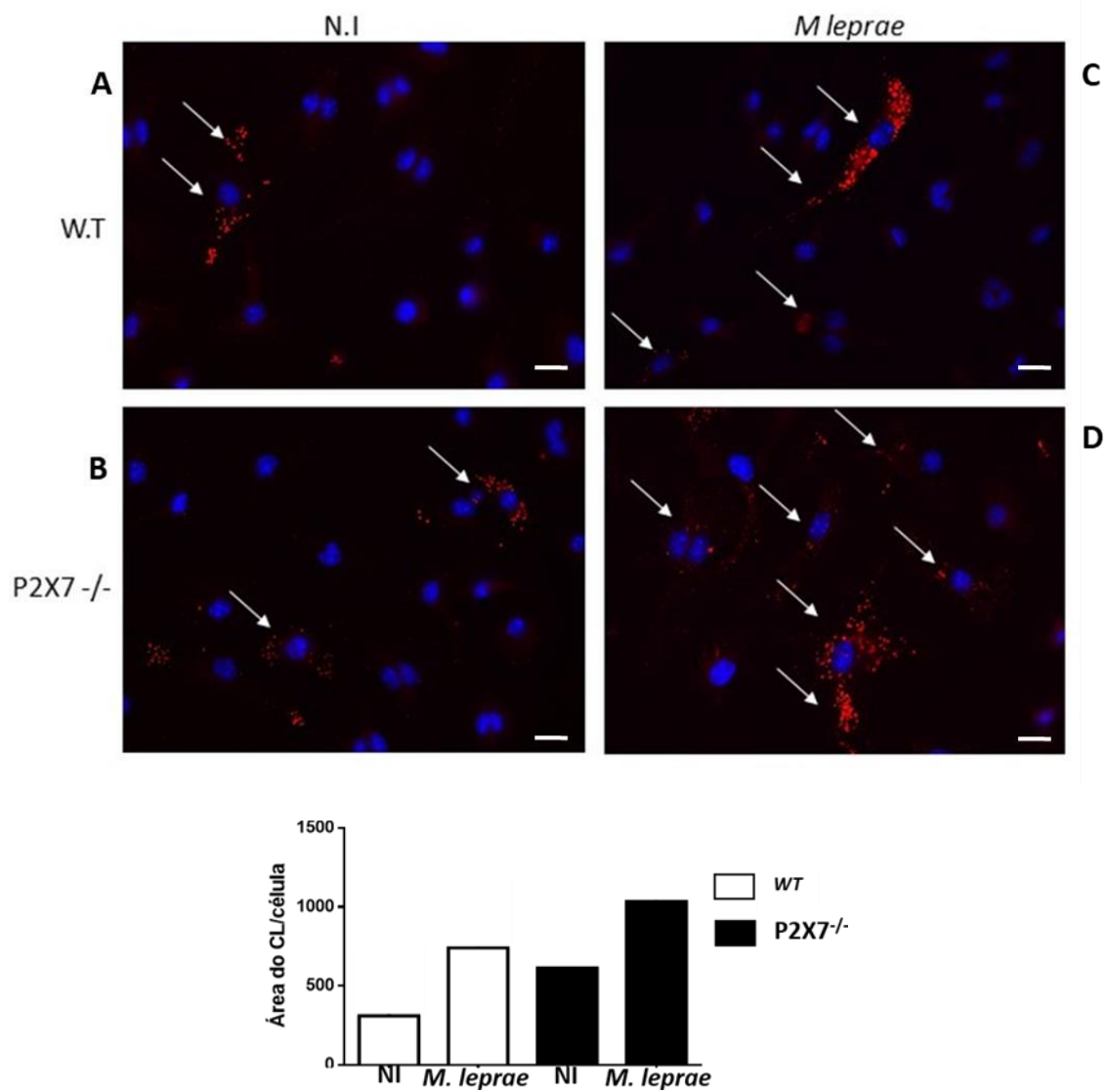


Figura 4-9 Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos nocaute para P2X7 parece ter o aumento no acúmulo de corpúsculos lipídicos amplificado pela infecção com *Mycobacterium leprae*.

Os macrófagos de medula óssea de camundongo Wild Tipe ou P2x7 K.O foram infectados ou não com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1) durante 48 horas (barra branca ou preta), as células foram mantidas em estufa 5% de CO₂ à 33°C com 2% de SFB. (A) Macrófagos derivados de medula de camundongos W.T não infectados, (C) macrófagos derivados de medula de camundongos W.T infectados, (B) macrófagos derivados de medula de camundongos P2x7 KO não infectados e (D) macrófagos derivados de medula de camundongo P2x7 KO infectados. As gotículas lipídicas foram visualizadas por microscopia de fluorescência observados como inclusões pontuadas citoplasmáticas vermelhas após coloração com Oil Red O ressaltadas com as setas nas imagens, e a quantificação destas organelas foi expressa em gráficos de barras como área de CL / célula. Os núcleos foram marcados com DAPI (N=1). As barras nas imagens são referentes a 20 µm.

Portanto, os efeitos da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na redução da expressão deste receptor, assim como no aumento da hidrólise extracelular do ATP, podem estar contribuindo para a manutenção dos CLs induzidos pelo *Mycobacterium leprae*.

4.5 Efeito da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na expressão da enzima CD73 e do receptor de Adenosina A2a

O aumento da hidrólise de ATP por ação da enzima CD39 tem como produto final, o nucleotídeo 5'AMP, substrato da enzima CD73, portanto, em paralelo analisamos o efeito da infecção na expressão da enzima CD73. O primeiro resultado sugere que a infecção com *Mycobacterium leprae* regule positivamente a expressão de CD73 no tempo de 24 horas pós-infecção (Figura 4. A). No entanto, a infecção parece modular negativamente a expressão da enzima quando analisada no tempo de 48 horas ao ser comparada com a condição não infectada (Figura 4. B). Os histogramas apresentados corroboram com os respectivos dados de expressão relativa.

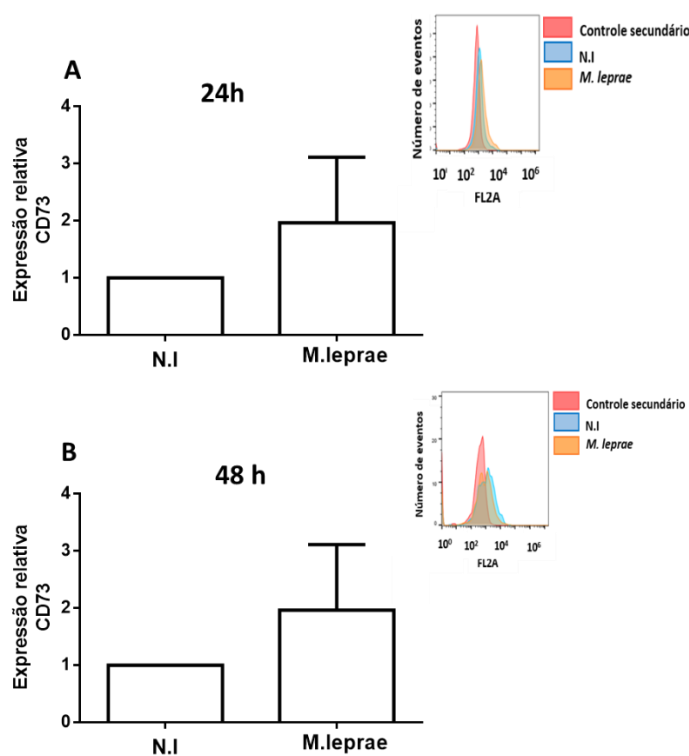


Figura 4-10 Efeito da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na expressão da enzima ecto 5' nucleotidase (CD73) em monócitos humanos.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço) e o nível de expressão de CD-73 foi determinado por Citometria de Fluxo nas células infectadas ou não com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1). (A,B) Gráficos representativos mostram a leitura da fluorescência do anticorpo específico (CD-73) conjugado ao fluorocromo PE (FL-2) representados no Histograma como: não infectada (N.I – Azul) e Infectada (*M. leprae* – Laranja). Os dados são representados como expressão relativa após atribuir os valores da condição não infectada (N.I) como 1 e os valores da condição infectada (*M. leprae*) variarem de acordo com seu controle experimental. Foram realizados 3 experimentos independentes no tempo de 24 horas (N3) e 2 experimentos independentes (N2) no tempo de 48 horas e

a significância no valor de “p” ($p < 0.05$) entre as condições N.I e *M. leprae* foi avaliada e não foi detectada diferença significativa utilizando o teste *Student* paramétrico Teste t.

A ADO é uma molécula moduladora da resposta imune inata via ativação de seus receptores. A ativação do receptor de ADO, A2a, está associada a uma potencial mas não exclusiva resposta anti-inflamatória. Deste modo, o passo seguinte do trabalho foi investigar o perfil de expressão do receptor A2a nos monócitos infectados pelo *Mycobacterium leprae*. Para isto, ensaio de imunofluorescência e citometria de fluxo foram realizados em tempos distintos de infecção. Os dados obtidos por citometria de fluxo apontam que a infecção pelo bacilo foi capaz de aumentar a expressão do receptor A2a nos monócitos infectados por 24 horas (Figura 4.11 A-B). Resultado similar foi observado por imunofluorescência, após 48 horas de infecção (Figura 4.11 C). Observamos uma maior abundância da marcação pontual do receptor (verde) nas células infectadas quando comparada a célula não infectada. A análise deste dado está representada no gráfico ao lado.

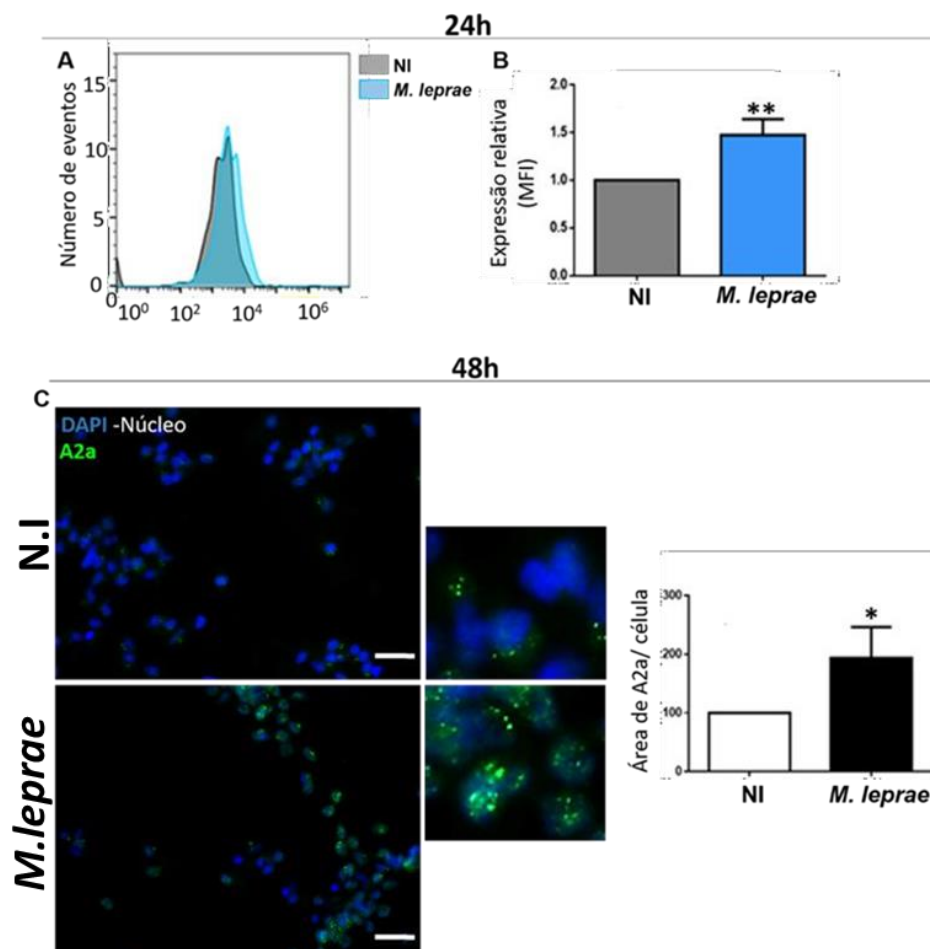


Figura 4-11 A infecção pelo *Mycobacterium leprae* aumenta a expressão do receptor de adenosina A2A em monócitos humanos.

Os monócitos humanos foram infectados (histogramas azuis ou barra preta) ou não (histograma cinza ou barra branca) com *M. leprae* (MOI 10: 1) durante 24 horas (citometria de Fluxo) e 48 horas (microscopia de fluorescência). (A) Histogramas representativos da análise de citometria de fluxo para a expressão A2A utilizando anticorpo específico (1:300) conjugado com alexa 488 (verde) 1:300 e (B) A intensidade média de fluorescência (MFI) obtida por citometria de fluxo foi utilizada para representar o nível de expressão relativo de A2A. (C) Imagens representativas de quatro experimentos independentes onde DAPI marca o núcleo celular, A2a marca o reconhecimento específico pelo receptor em verde, juntamente com a quantificação da expressão do receptor A2a através do software *Imagej*. A diferenças entre os grupos foi avaliada através de *Student* paramétrico Teste t comparando as condições N.I e *M. leprae*. * $p < 0.05$ (N=4). As barras nas imagens são referentes a 20 μm .

4.6 Análise da participação da ADO e do receptor A2a na produção das citocinas IL-10, IL8, IL-1 β e da quimiocina MCP1.

Como mencionado anteriormente, a ADO é um mediador da resposta imune e a ativação do receptor A2a está associada a modulação de citocinas como IL10 e IL6, dentre outras. Além disto, alguns trabalhos mostram que a ativação de A2a modula a produção da quimiocina proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1). Nesta parte do trabalho fomos investigar o envolvimento do receptor A2a na modulação das citocinas IL10 e IL-1 β , assim como da quimiocina MCP-1 e IL-8 nas células infectadas. Para isto usamos como agonista não seletivo, a ADO e como agonista seletivo, o composto CGS21680. Neste estudo foi utilizado como antagonista seletivo para o receptor A2a o composto ZM241385.

Os dados de produção de MCP-1, são referentes aos monócitos de dois indivíduos (N=2) (Figura 4.12 A) e mostram que a infecção parece aumentar a produção de MCP1, após 48h, entretanto, não observamos nenhum efeito do antagonista ZM241385 (Figura 4.12 A). No entanto, ao adicionarmos ADO e CGS21680, observamos um perfil que sugere um aumento na produção de MCP1 tanto nas células controle, quanto nas células infectadas. Além disso, observamos ainda, que a adição de ZM241385, aboliu o efeito da adição de CGS21680 sobre a produção desta quimiocina (Figura 4.12 B). Estes dados ainda se encontram em fase preliminar, portanto, outros experimentos ainda precisarão ser feitos para provar a hipótese de que a ativação de A2a participa da formação da quimiocina MCP-1.

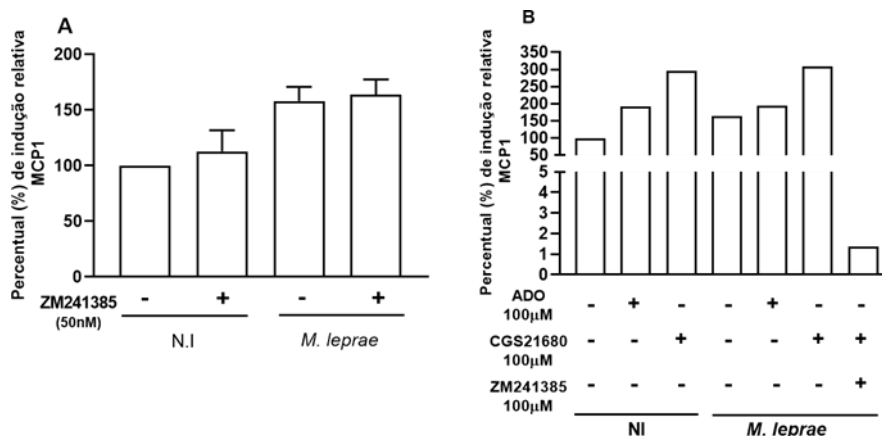


Figura 4-12 Receptor A2A parece aumentar a produção da quimicina MCP1 em monócitos humanos infectados com *Mycobacterium leprae*.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço), onde foram infectados com *Mycobacterium leprae* (10:1) vivo ou não com adição ou não de ADO (100µM), CGS21680 (100µM) e ZM.241385 (50nM). As células permaneceram em estufa com 5% de CO₂ em 33°C com 10% de SFB e após 48 horas foi recolhido o sobrenadante e a quimiocina MCP-1 foi dosada pela técnica de ELISA. (A - N=2 e B - N1)

Além da quimiocina MCP-1, avaliamos também o efeito da adição do antagonista ZM24385 na produção de IL-10. Os resultados, também são referentes a dois indivíduos (N=2) e mostram que a adição do agonista *per se*, desencadeia uma possível diminuição na produção de IL10 induzida pelo *Mycobacterium leprae* (Figura 4.13. A).

O efeito da adição de ADO e CGS21680 também foi avaliado sobre a produção de IL-8 e IL-1β. Observamos que a infecção aumenta a produção de IL-8 e que a adição de ambos agonistas reverte este efeito (Figura 4.13 B). Outro dado interessante observado foi o efeito da ADO e do CGS21860 sobre a produção de IL-1β. Nós observamos, que a infecção não modula a produção desta citocina, mas a adição destes compostos elevou a formação desta citocina apenas nos monócitos infectados (Figura 4.13 C), entretanto, estes resultados ainda não estão fechados, logo, mais experimentos serão necessários para identificar o perfil de produção desta citocina.

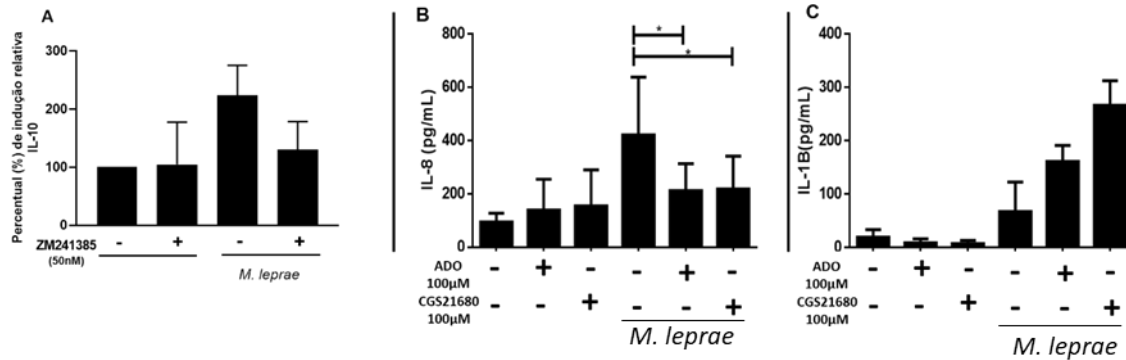


Figura 4-13 Receptor A2A modula a produção de citocinas em monócitos humanos infectados com *Mycobacterium leprae*.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço), onde foram infectados com *Mycobacterium leprae* (10:1) vivo ou não com adição ou não de ADO (100μM), CGS21680 (100μM) e ZM.241385 (50nM). As células permaneceram em estufa com 5% de CO₂ em 33°C com 10% de SFB e após 48 horas foi recolhido o sobrenadante e a quantificação de IL-10 (N=2), IL-8 (N=3) e IL-1β foram dosada pela técnica de ELISA. Os dados refletem a média + SE de três ensaios independentes, ou dois ensaios independentes. A diferenças entre os grupos foi avaliada através de *Student* paramétrico Teste t e, os asteriscos indicam diferenças significativas, (* = p <0,05) entre as condições não infectadas ou infectadas / tratadas.

4.7 Análise da participação da ADO e do receptor A2a na modulação do acúmulo de corpúsculos lipídicos induzidos pelo *Mycobacterium leprae* em monócitos humanos

Dados da literatura mostram que adenosina e seus receptores estão envolvidos na homeostase lipídica. Sabendo da importância do metabolismo lipídico para o *Mycobacterium leprae*, nosso próximo passo foi investigar o envolvimento de alguns componentes da via purinérgica na modulação do acúmulo de CLs induzidos pelo bacilo.

Considerando que a infecção modula a expressão da enzima CD73 e esta está envolvida na formação de ADO a partir de 5'AMP, iniciamos este estudo adicionando ao meio de cultura 5'AMP na presença ou não do inibidor específico da enzima CD73, AMPCP, em seguida as células foram infectadas com o *Mycobacterium leprae* por 48 horas e, os CLs foram marcados com *Oil Red O* (ORO). O resultado obtido mostra que o *Mycobacterium leprae* foi capaz de aumentar os CLs quando comparada a condição não infectada e que a adição de 5'AMP reverteu este efeito. A adição do antagonista *per se* não induziu um

aumento destas organelas, no entanto, a adição deste composto reverteu o efeito do nucleotídeo 5'AMP nas células infectadas (Figura 4.14).

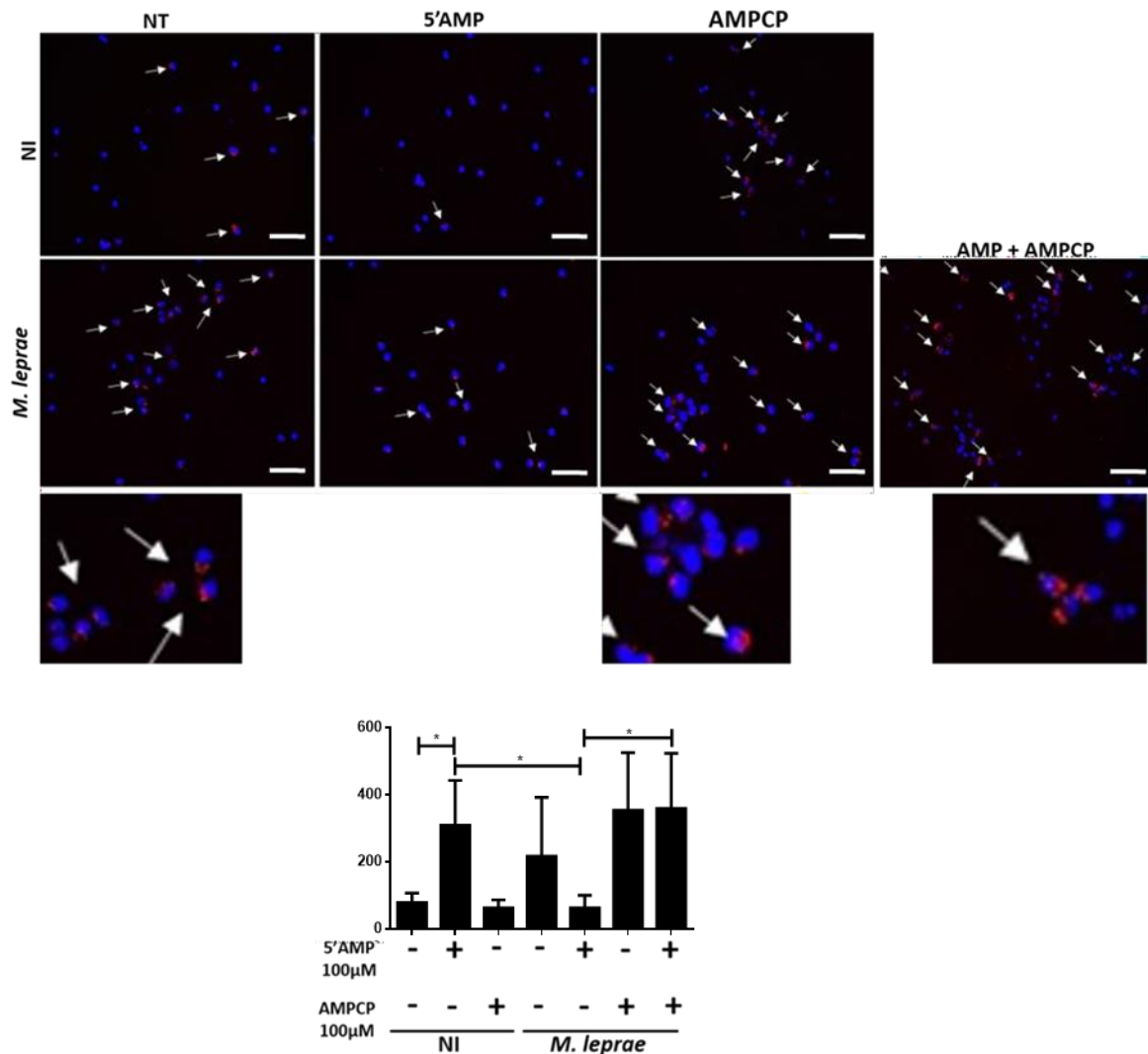


Figura 4-14 A ecto-enzima CD73 regula a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos infectados com *Mycobacterium leprae*.

Imagens representativas de microscopia de fluorescência mostrando a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos derivados de PBMC, 2×10^5 /poço, tratadas ou não com 100µM de 5'AMP e/ou 100 µM de AMPCP (antagonista CD-73 específico) infectados com *Mycobacterium leprae* vivo ou não. A adição de 5'AMP foi feita 30 minutos antes da infecção e, o tratamento com AMPCP foi feito 1 hora antes da infecção. O experimento foi mantido por 48h, onde as células foram mantidas em estufa 5% de CO₂ à 33°C com 2% de SFB. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados com ampliação de 40x e a quantificação destas organelas foi expressa em gráficos de barras como área de CL / célula. Os CLs foram observados como organelas citoplasmáticas vermelhas após marcação com *Oil Red O*, e o núcleo foi evidenciado em azul DAPI. As setas ressaltam a localização dos CL presentes nas imagens. A quantificação das organelas foi feita usando o *software Image J*. Valores são apresentados em \pm SD de experimentos independentes de árvore. * P <0,05 versus controle ou contra célula infectada tratada ou não (N=3). As escalas nas imagens são referentes a 20 µm.

A ação enzimática da CD73 leva a formação de ADO no meio extracelular a partir da hidrólise 5'AMP. Vimos que a adição de 5'AMP reduz os níveis dos

CLs, efeito este revertido pelo inibidor seletivo da enzima. Este resultado sugere que a ADO pode estar mediando este efeito, via seus receptores. Nessa etapa do trabalho o intuito foi avaliar a participação do receptor A2a na formação dos CLs da célula infectada. Para realizarmos esse ensaio foi adicionado ou não ADO, ou o agonista específico do receptor A2a, CGS21680 e/ou antagonista deste receptor, ZM241385. As células foram infectadas e após 48 horas de incubação, a formação de CLs foi analisada por microscopia de fluorescência. O resultado deste experimento mostrou que a adição de ADO foi capaz de diminuir a formação dos CLs nas células infectadas (Figura 4.15). Além disso, de forma específica, foi possível observar que a ativação do receptor A2a com o agonista seletivo, CGS21680, foi capaz de diminuir a formação destas organelas nas células infectadas e a adição do antagonista seletivo, ZM241385, restaurou os níveis de CLs (Figura 4.15).

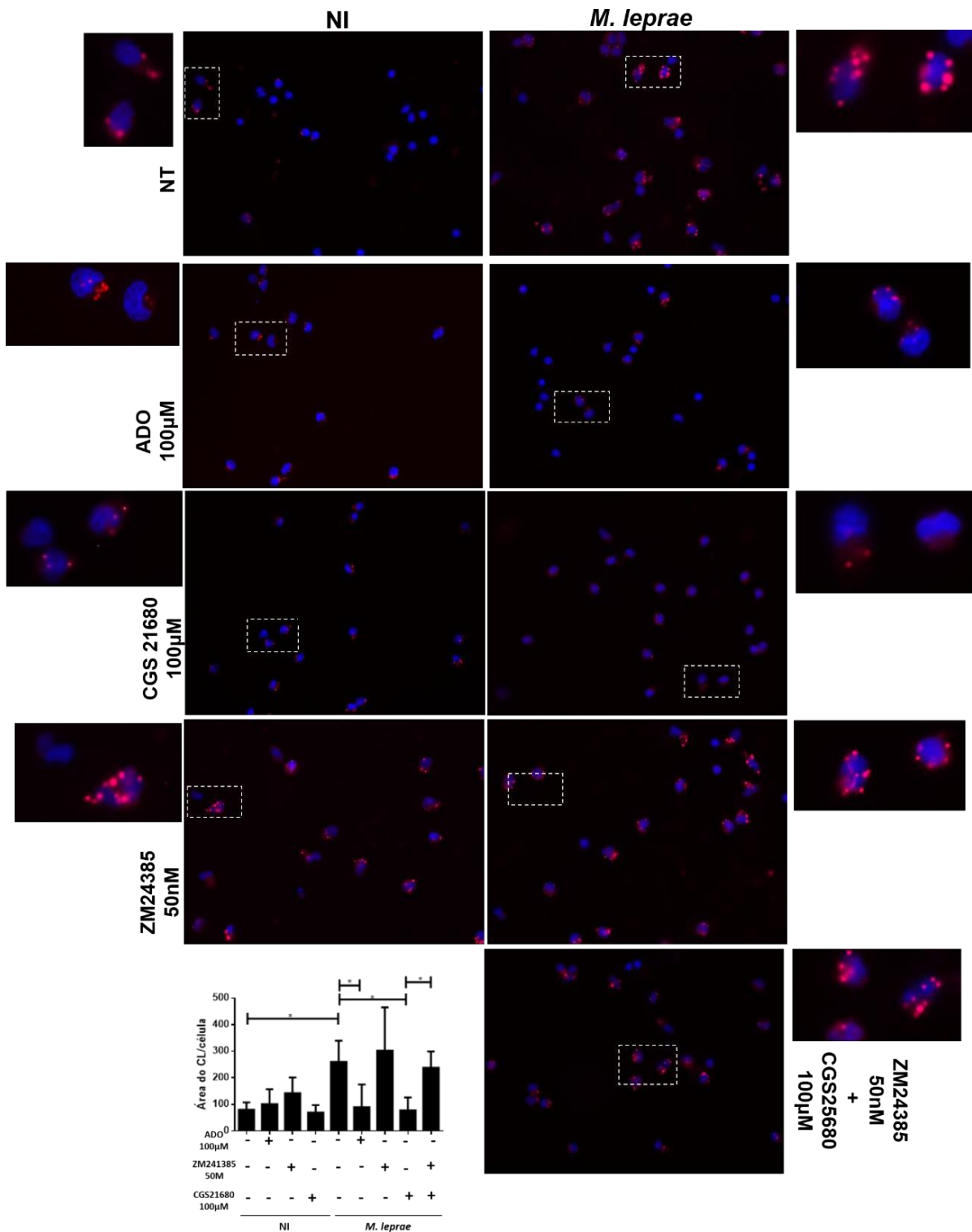


Figura 4-15 Ativação do receptor A2a reduz o acúmulo de corpúsculos lipídicos em monócitos infectados com *Mycobacterium leprae*.

Imagens representativas de microscopia de fluorescência mostrando a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos derivados de PBMC, 2×10^5 /poço, tratadas ou não com $100 \mu\text{M}$ de ADO ou $100 \mu\text{M}$ de CGS21680 e/ou 50 nM ZM241385 (antagonista A2a específico) infectados com *Mycobacterium leprae* vivo ou não infectado. A adição de ADO e CGS21680 foi feita 30 minutos antes da infecção e, o tratamento com ZM241385 foi feito 1 hora antes da infecção. O experimento foi mantido por 48h, onde as células foram mantidas em estufa 5% de CO_2 à 33°C com 2% de SFB. Os corpúsculos lipídicos foram visualizados com ampliação de 40x e a quantificação destas organelas foi expressa em gráficos de barras como área de CL / célula. Os CLs foram observados como organelas citoplasmáticas vermelhas após marcação com *Oil Red O*, e o núcleo foi evidenciado em azul (DAPI). A quantificação das organelas foi feita usando o *software Image J*. Valores são apresentados em \pm SD de experimentos independentes.

* $P < 0,05$ versus controle ou contra célula infectada tratada ou não ($N=3$).

4.8 Análise do efeito da adenosina no efluxo de colesterol em macrófagos THP1 infectados com *Mycobacterium leprae*

Como foi visto, que a ativação do receptor A2a diminui a formação de CLs e, como já mencionado no texto, o receptor A2a ativa o efluxo de colesterol através do aumento dos transportadores reversos de colesterol, ABCA1 e ABCG1. Fomos analisar se a ADO poderia afetar o efluxo de colesterol. Para isso as células foram incubadas com colesterol radioativo, tratadas com ADO e então infectadas. O resultado obtido sugere um aumento no efluxo de colesterol nas células infectadas tratadas com ADO quando comparadas com as células infectadas e não tratadas (Figura 4.16).

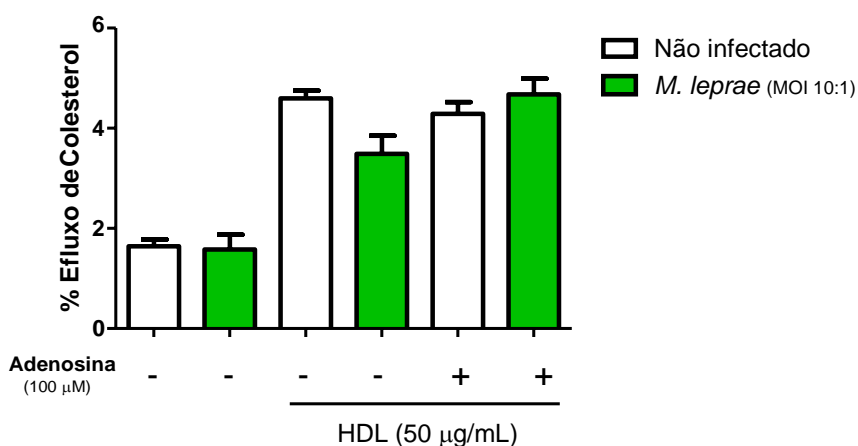


Figura 4-16 Participação de Adenosina na modulação do efluxo de colesterol promovido pelo *Mycobacterium leprae*.

Monócitos THP-1 diferenciadas em macrófagos com 50 ng/mL de PMA e em seguida as células foram incubadas com 2 µCi/mL de [H 3]colesterol em meio RPMI contendo 5% de SFB por 48 horas a 37°C e atmosfera a 5% de CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado, e as células foram pré-estimuladas ou não com Adenosina (100 µM) durante 1 hora e em seguida infectadas ou não com *Mycobacterium leprae* vivo (MOI 10:1) em meio RPMI1640 na ausência de SFB, por um período de 24 horas e submetidos ao efluxo funcional de colesterol na presença de HDL a 50 µg/mL. A porcentagem (%) de efluxo de colesterol refere-se a contagem individual da radioatividade do sobrenadante celular/ (sobrenadante + lisado celular). Resultados referentes a um experimento realizado em duplicata.(n=1)

4.9 Análise da expressão de ADA nas células infectadas pelo *Mycobacterium leprae*

Além destas ectoenzimas, a ADA também pode ser encontrada com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo responsável por diminuir os níveis de ADO, resultando no aumento na formação de Inosina (INO). Como foi visto neste trabalho, a infecção foi capaz de aumentar a expressão do receptor A2a, que quando ativado resulta na diminuição na produção dos CLs, já descrito ser um evento desfavorável ao bacilo. Deste modo, investigar a participação da infecção na modulação da expressão de ADA poderia ajudar a explicar o que estaria acontecendo com os níveis de ADO no meio extracelular da célula infectada. Desta forma, fomos analisar o perfil de expressão de ADA nos monócitos infectados pelo patógeno. Nossos dados mostram que enzima ADA exibe um perfil semelhante ao da enzima CD73, isto é, um possível aumento na expressão de ADA após 24 horas de infecção, mas um perfil de diminuição após 48 horas de infecção (Figura 4.17 A-B).

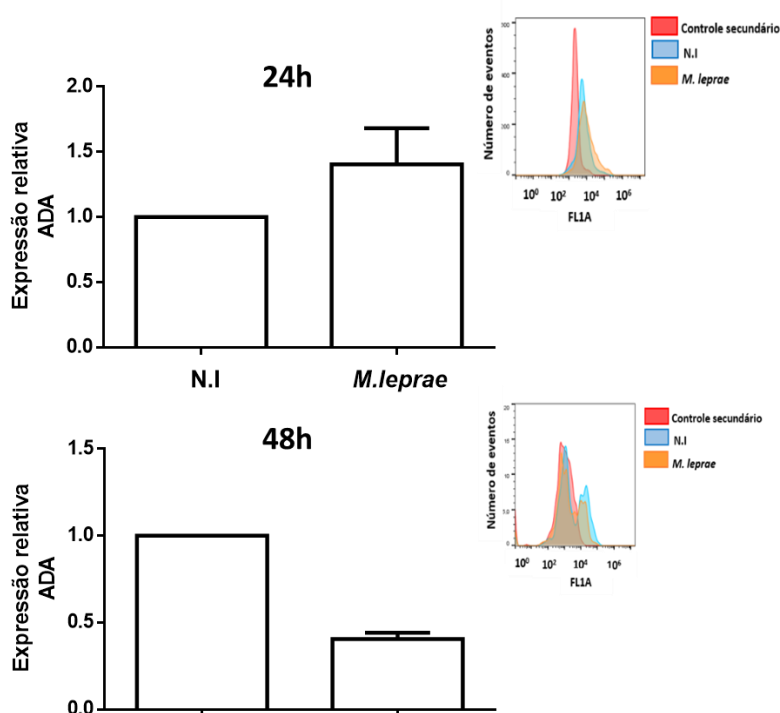


Figura 4-17 Efeito da infecção pelo *Mycobacterium leprae* na expressão da enzima adenosina desaminase, ADA, em monócitos humanos.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço) e o nível de expressão de ADA foi determinado por Citometria de Fluxo nas células infectadas com *Mycobacterium leprae* vivo (10:1) ou não infectadas. (A,B) Gráficos representativos mostram a leitura da fluorescência do anticorpo específico anti-ADA na condição de 24 horas representados no Histograma como: (A) não infectada (N.I – Azul) e Infectada (*M. leprae* – Laranja). Os Histogramas representativos no tempo de 48 horas (B) é

representada como não infectada (N.I – Azul) e infectada (M. leprae – Laranja). A Intensidade de fluorescência média (MIF) representa os valores obtidos através da citometria. Os valores são médias \pm SEM de 3 experimentos independentes no tempo de 24 horas (N=3) e 2 experimentos independentes no tempo de 48 horas (N=2). A significância no valor de “p” ($p < 0.05$) entre as condições N.I e M. leprae dos experimentos foi avaliada e não foi detectada diferença significativa utilizando o teste *Student* paramétrico Teste t.

No entanto, observamos por *western blot* após 48 horas de infecção um aumento na expressão da enzima ADA no lisado total de monócitos infectados, quando comparado com a célula não infectada (Figura 4.18 A-B).

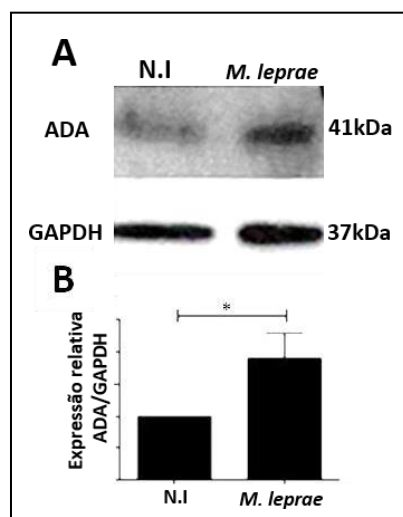


Figura 4-18 Aumento da expressão de ADA em monócitos humanos infectados pelo *Mycobacterium leprae*.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço), posteriormente, infectados durante 48 horas ou não. Em seguida foram lisados e o extrato proteico total foi utilizado para a detecção do perfil de expressão de ADA através da técnica de *Western blot*. (A) Imagem das bandas específicas evidenciadas por quimioluminescência. (B) Gráfico representativo de 3 experimentos independentes representando a densitometria da marcação de ADA/ GAPDH. Foram utilizados anticorpos primários ADA (1:250) e anticorpos secundários na concentração de 1:10.000 conjugado com HRP. A diferenças entre os grupos foi avaliada através de *Student* paramétrico Teste t * $p < 0.05$ (N=3).

4.10 Análise do efeito do *Mycobacterium leprae* no perfil de nucleosídeos presentes no sobrenadantes de cultura de monócitos de PBMC após 48 horas de infecção.

Para realizar essa parte do projeto o nosso grupo iniciou uma colaboração com o Professor Dr. Rafael Garrett da Costa e a Dra. Marina Amaral Alves, ambos do LADETEC/UFRJ. Nosso objetivo foi avaliar se *Mycobacterium leprae* estaria modulando os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos no sobrenadante dos monócitos infectados e se este efeito poderia ser relacionado com a modulação da expressão das enzimas analisadas previamente, então, os

sobrenadantes de cultura de monócitos infectados e não infectados foram coletados e o material foi analisado por espectrometria de massas para a detecção de diferentes moléculas como Hipoxantina (A), Xantina (B), Ácido Úrico (C), Adenosina (D), Inosina (E), AMP(F), ADP (G) e ATP (H). A figura a seguir mostra os picos de padronização das respectivas moléculas investigadas neste estudo (Figura 4.19).

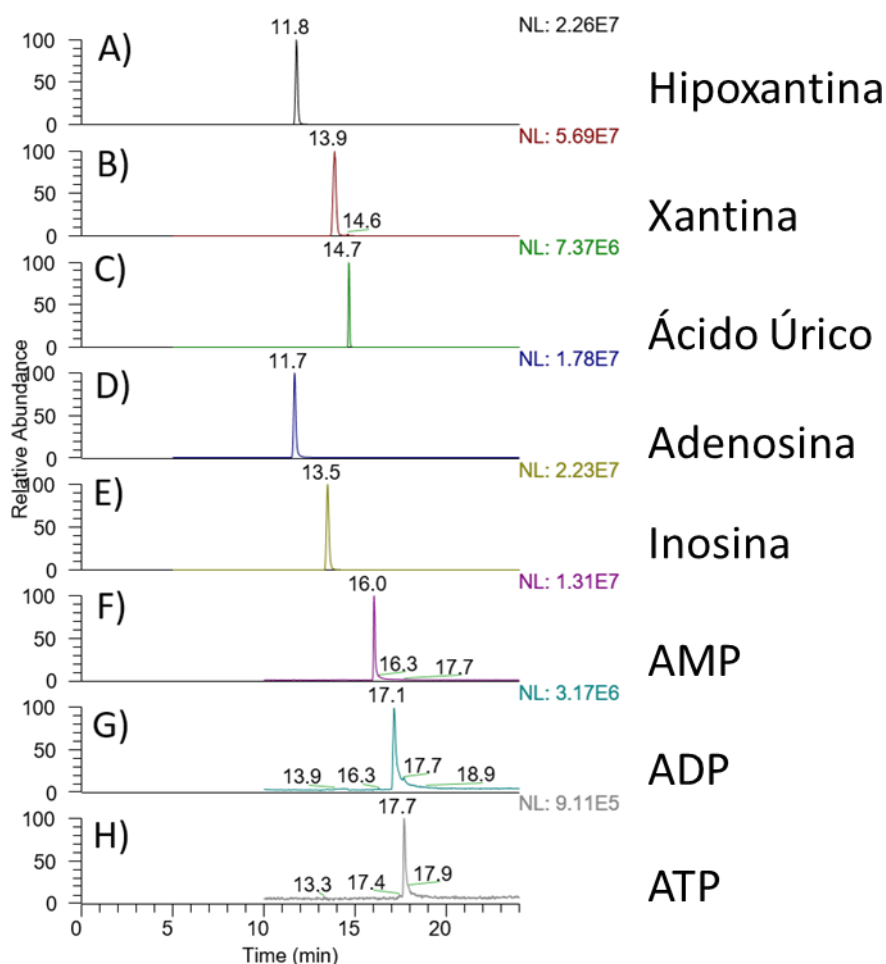


Figura 4-19 Cromatograma de íons extraídos (CL-EMAR) para padronização de moléculas do metabolismo de purinas.

Esta dosagem foi realizada para padronizar os picos característicos das moléculas investigadas no estudo como Hipoxantina (A), Xantina (B), Ácido Úrico (C), Adenosina (D), Inosina (E), AMP(F), ADP (G) e ATP (H). Os padrões dos compostos foram solubilizados em 7:3 água:ACN na concentração de 10 µg/mL.

Após a padronização da técnica e o teste com os compostos padrões. Foi feita a análise do sobrenadante de cultura dos monócitos infectados e não infectados por 48 horas. O resultado mostra uma redução dos níveis extracelulares de inosina (INO), hipoxantina (HPX), xantina e ácido úrico no sobrenadante de cultura da célula infectada (Figura 4.20). Neste tempo de 48 horas, não foi possível detectar a presença de ATP e adenosina no sobrenadante

em ambas condições de estudo, provavelmente por conta da instabilidade destas moléculas no tempo prologado de 48 horas, o que reforça a necessidade de utilizar períodos de infecção mais curtos.

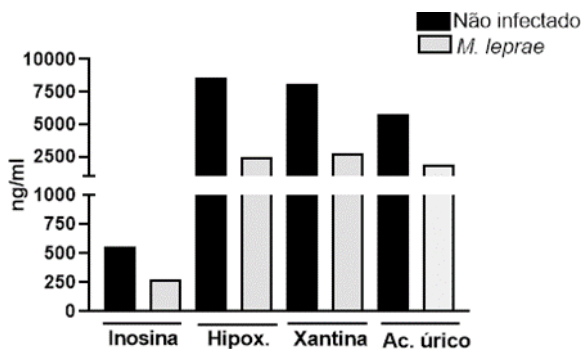


Figura 4-20 A infecção com *Mycobacterium leprae* parece diminuir a formação de nucleosídeos extracelulares.

Os monócitos de sangue periférico foram purificados e plaqueados (2×10^5 /poço), posteriormente, infectados durante 48 horas ou não. O sobrenadante foi recolhido e os níveis de detecção dos nucleosídeos foi observado através do método de extração do tipo Matyash modificado para estudo de metabolômica, sendo mantidas as proporções (MTBE/methanol/water, 2.6/2.0/2.4, v/v/v)². (N=1).

4.11 Análise *in silico* da expressão de genes do sistema purinérgico comparando indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase do polo multibacilar e paucibacilar através da reanálise de dados públicos de microarranjo

Estudos de expressão gênica em larga escala são ferramentas extremamente valiosas que auxiliam na identificação de moléculas, vias metabólicas e mecanismos de sinalização, que podem estar sendo modulados frente uma infecção ou mesmo um quadro patológico (revisado por Mboowa *et al.*, 2018). Estes dados através de uma abordagem ampla ajudam, por exemplo, na compreensão de mecanismos moleculares de patogênese. Belone e colaboradores em 2015 utilizando a técnica de microarranjo de chips de DNA, analisaram sessenta e seis amostras de lesões de pele subdivididas em :10TT, 10BT, 10BB, 10BL, 4LL, 4R1, 10R2 e nove fragmentos de pele de indivíduos saudáveis, que foram utilizados como controle, e observou o perfil de expressão gênica destes indivíduos, portanto, em paralelo, decidimos verificar se a expressão de alguns genes da via purinérgica poderiam estar sendo modulados de forma diferente durante a patogênese da hanseníase comparando os

mesmos com indivíduos sadios.

Nesta parte do trabalho, recuperamos os dados do banco de dados *Gene Expression Omnibus*, sob o acesso GSE74481 e reanalisamos alguns genes da via purinérgica, conforme descrito na metodologia. Para esta análise agrupamos os indivíduos BT e TT como paucibacilares e BL e LL como multibacilares, totalizando 20PB e 14MB respectivamente. Comparamos o perfil de expressão gênica entre estes grupos e com o grupo de indivíduos sadios que correspondiam a 9 fragmentos de pele.

Os primeiros genes reanalisados foram os genes *ENTPD1* que codifica a enzima CD39, *PANX1*(*panexina 1*), e *P2X7*. Os gráficos representam a expressão normalizada em log₂ para cada indivíduo de acordo com o grupo. A figura 4.20 mostra um aumento de expressão do gene *ENT1* tanto nos indivíduos PB quanto MB quando comparado aos indivíduos controle, entretanto, os indivíduos MB apresentam um perfil ainda maior na expressão deste gene (Figura 4.21 A). Este achado corrobora com os dados de infecção em monócitos, onde é possível sugerir um aumento na expressão da enzima CD39 no tempo de 24 horas.

Para o gene *PANX1*, observamos que pacientes MB apresentam uma maior expressão deste gene em comparação com indivíduos sadios (Figura 4.21B). Estes dados corroboram com nossos dados obtidos *in vitro* apresentados previamente. Entretanto, para o gene *P2X7*, observamos um perfil de expressão contrário aos nossos ensaios. Observamos que indivíduos MB expressam mais o gene *P2X7* tanto em comparação aos indivíduos saudáveis quanto PB (Figura 4.21 C).

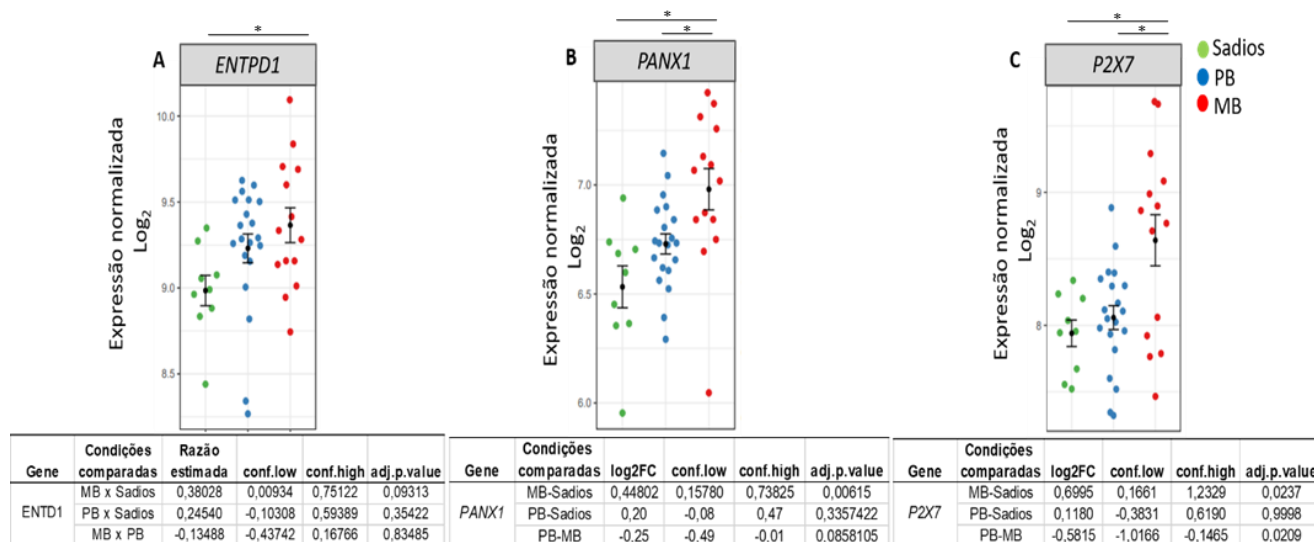


Figura 4-21 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes *ENTPD1*, *PANX1* e *P2X7* entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.

Reanálise de conjunto de dados públicos de Belone *et al.* (2015) DOI: 10.3389 / fgene.2015.00334. Os gráficos representam a expressão normalizada em log2 para cada indivíduo de acordo com o grupo. A esfera preta central representa a média por grupo \pm erro padrão da média (SEM). As colunas mostram: genes de interesse representados com o símbolo oficial de acordo com HGNC/NCBI; log2FC, representa a diferença entre os grupos; condições comparadas: indivíduos saudáveis (esferas verdes), PB- pacientes com hanseníase paucibacilar (esferas azuis) e MB-multibacilar (esferas vermelhas); lower.CL- Intervalo de 95% de confiança inferior e upper.CL - Intervalo de 95% de confiança superior. *ENT1*- Ectonucleotídeo trifosfodrolase (CD39), *PANX1*- Panexina 1 e *P2X7*-receptor purinérgico P2X7. Após a normalização, empregou-se análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey HSD para testar as diferenças entre os grupos de pele sadia (n=9), hanseníase paucibacilar (PB, n=20) e hanseníase multibacilar (MB, n=14). As análises que obtiveram diferença estatística ($P < 0.05$) foram caracterizadas com *.

Seguindo nossas análises, observamos que tanto em indivíduos PB quanto em MB a expressão de ADA encontra-se significativamente aumentada em relação aos indivíduos sadios (Figura 4.22 C-D). Este resultado corrobora com os dados de infecção de monócitos com 24 de infecção e com o achado de que, após 48h de infecção os níveis de ADA total estão aumentados.

Com relação a parte da via purinérgica envolvendo a formação, metabolização da ADO e mecanismos de sinalização disparados por este nucleosídeo via seus receptores, A1, A2a, A2b e A3, observamos que, diferente da nossa hipótese, a infecção não parece modular a expressão do gene *NT5E* que codifica a enzima CD73 (Figura 4.22 A), no entanto, observamos uma redução significativa na expressão do gene *ADK* que codifica a enzima adenosina quinase, uma enzima envolvida na via de salvamento de nucleotídeos, que converte ADO em AMP. A diminuição de *ADK* foi evidenciada nos dois grupos de indivíduos infectados, PB e MB, quando comparados ao grupo sadio (Figura 4.22 B). Observamos também uma diminuição da expressão deste gene quando comparamos MB com PB (Figura 4.22 A-B). Outra enzima de grande relevância no contexto da metabolização da ADO, é ADA. Observamos que o gene *ADA* é mais expresso nos indivíduos infectados quando comparado aos sadios. Estes resultados corroboram com os nossos achados de que a infecção aumenta a expressão de ADA, entretanto, não evidenciamos um efeito na expressão deste gene entre as formas clínicas (Figura 4.21 C).

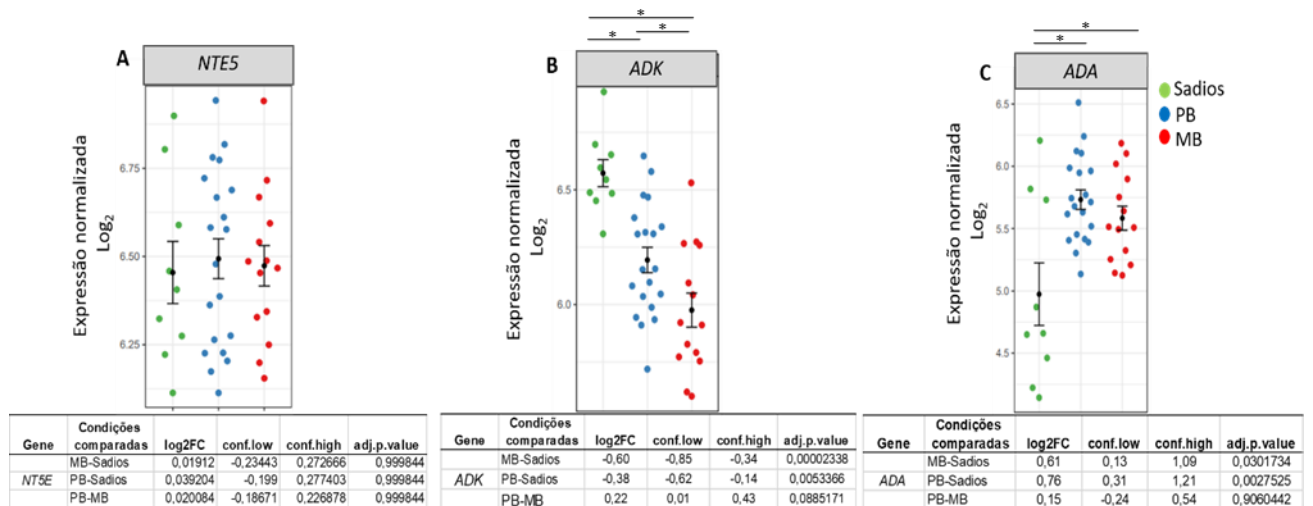


Figura 4-22 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes *NTE5*, *ADK* e *ADA* entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.

Reanálise de conjunto de dados públicos de Belone *et al.* (2015) DOI: 10.3389 / fgene.2015.00334. os gráficos representam a expressão normalizada em log2 para cada indivíduo de acordo com o grupo. A esfera preta central representa a média por grupo \pm erro padrão da média (SEM). As colunas mostram: genes de interesse representados com o símbolo oficial de acordo com HGNC/NCBI; log2FC, representa a diferença entre os grupos; condições comparadas: indivíduos saudáveis (esferas verdes), PB- pacientes com hanseníase paucibacilar (esferas azuis) e MB-multibacilar (esferas vermelhas); lower.CL- Intervalo de 95% de confiança inferior e upper.CL - Intervalo de 95% de confiança superior. *NTE5*- Ecto5' nucleotidase (CD73), *ADK*- Adenosina quinase e *ADA*-adenosina deaminase. Após a normalização, empregou-se análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey HSD para testar as diferenças entre os grupos de pele sadia (n=9), hanseníase paucibacilar (PB, n=20) e hanseníase multibacilar (MB, n=14). As análises que obtiveram diferença estatística ($P < 0.05$) foram caracterizadas com *.

Estes resultados sugerem que a infecção poderia estar modulando os níveis de ADO. Como a ADO age via diferentes receptores, reanalizamos também a expressão dos genes que codificam estes receptores. Os dados da reanálise mostram que a infecção tem efeitos antagônicos com relação aos receptores A2a e A2b, enquanto a infecção aumenta a expressão dos genes *ADORA2A* tanto nos indivíduos PB quanto MB em comparação aos indivíduos saudáveis, o bacilo diminui a expressão do gene *ADORA2B* (Figura 4.23 A-B). Nossos dados de infecção em monócitos primários *in vitro* também mostraram um aumento na expressão do receptor A2a corroborando com os dados gerados da reanálise dos ensaios de Belone e colaboradores.

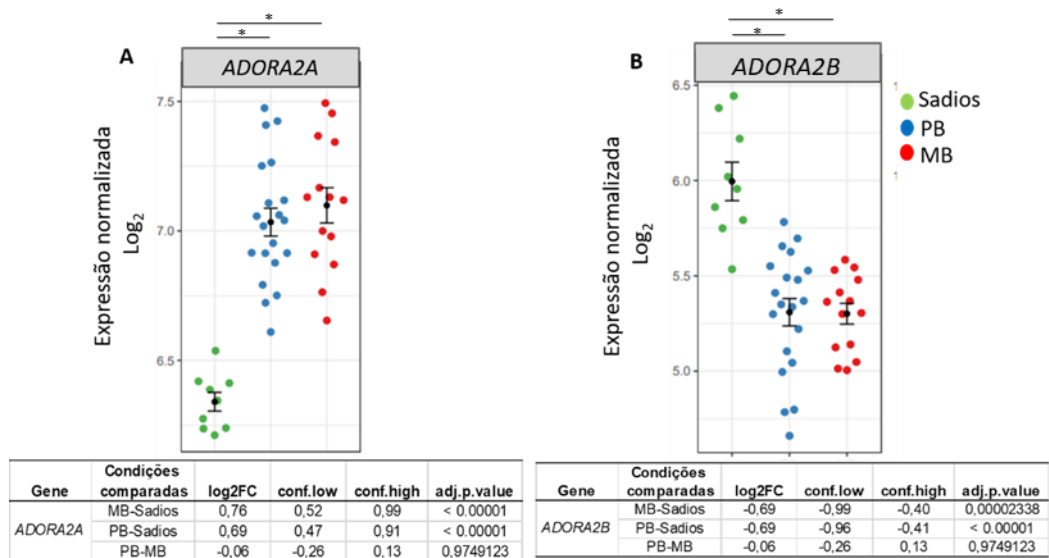


Figura 4-23 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes *ADORA2A* e *ADORA2B* entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.

Reanálise de conjunto de dados públicos de Belone *et al.* (2015) DOI: 10.3389 / fgene.2015.00334. Os gráficos representam a expressão normalizada em log2 para cada indivíduo de acordo com o grupo. A esfera preta central representa a média por grupo \pm erro padrão da média (SEM). As colunas mostram: genes de interesse representados com o símbolo oficial de acordo com HGNC/NCBI; log2FC, representa a diferença entre os grupos; condições comparadas: indivíduos saudáveis (esferas verdes), PB- pacientes com hanseníase paucibacilar (esferas azuis) e MB-multibacila (esferas vermelhas); lower.CL- Intervalo de 95% de confiança inferior e upper.CL - Intervalo de 95% de confiança superior. *ADORA2A* – Receptor A2a, *ADORA2B*- Receptor A2b. Após a normalização, empregou-se análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey HSD para testar as diferenças entre os grupos de pele sadia (n=9), hanseníase paucibacilar (PB, n=20) e hanseníase multibacilar (MB, n=14). As análises que obtiveram diferença estatística ($P < 0.05$) foram caracterizadas com *.

Resultado semelhante foi observado para os genes *ADORA1* e *ADORA3* (Figura 4.24 A-B). Neste caso, a infecção aumenta a expressão do gene *ADORA3* e reduz a expressão de *ADORA1*. Um resultado muito interessante desta reanálise foi observado com relação ao gene *ADORA3*. Este pareceu dentre os receptores de adenosina, o mais expresso em pacientes MB.

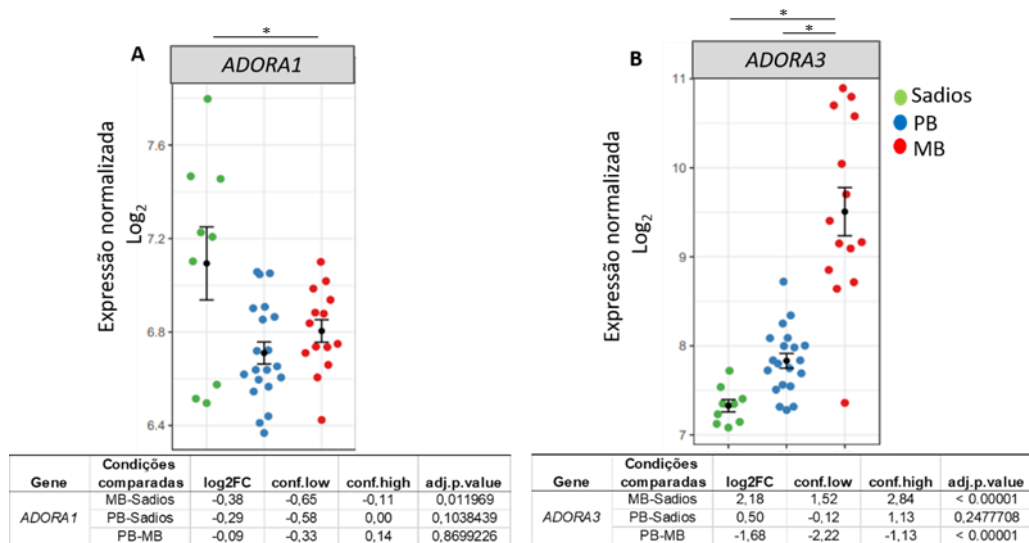


Figura 4-24 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes *ADORA1* e *ADORA3* entre indivíduos saudáveis, pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.

Reanálise de conjunto de dados públicos de Belone *et al.* (2015) DOI: 10.3389 / fgene.2015.00334. Os gráficos representam a expressão normalizada em log2 para cada indivíduo de acordo com o grupo. A esfera preta central representa a média por grupo \pm erro padrão da média (SEM). As colunas mostram: genes de interesse representados com o símbolo oficial de acordo com HGNC/NCBI; log2FC, representa a diferença entre os grupos; condições comparadas: indivíduos saudáveis (esferas verdes), PB- pacientes com hanseníase paucibacilar (esferas azuis) e MB-multibacila (esferas vermelhas); lower.CL- Intervalo de 95% de confiança inferior e upper.CL - Intervalo de 95% de confiança superior. *ADORA1* – Receptor A1, *ADORA3*- Receptor A3. Após a normalização, empregou-se análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey HSD para testar as diferenças entre os grupos de pele sadia (n=9), hanseníase paucibacilar (PB, n=20) e hanseníase multibacilar (MB, n=14). As análises que obtiveram diferença estatística ($P < 0.05$) foram caracterizadas com *.

Reanalizamos, também, a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na produção do ácido úrico, dentre eles, o gene *PNP*, que codifica a enzima purina nucleosídeo fosforilase, que catalisa a formação de hipoxantina a partir de inosina. Outro gene reanalisado foi o gene *XDH*, que codifica a enzima xantina oxidase, que catalisa a formação de ácido úrico a partir de xantina. Os resultados das reanálises dos dados de microarranjo de Belone e colaboradores mostraram que pacientes MB e PB expressam significativamente mais o gene *PNP* quando comparado aos indivíduos saudáveis (Figura 4.25 A).

Com relação ao gene *XDH*, os dados de reanálise mostraram que pacientes MB expressam significativamente menos este gene tanto em relação aos indivíduos saudáveis quanto aos pacientes PB (Figura 4.25 B). Este resultado pode sugerir que pacientes MB produzam menos ácido úrico, o que pode corroborar com nossos dados *in vitro*, que mostram que monócitos infectados aparentemente produzem menos ácido úrico no sobrenadante de cultura.

Por fim incluímos, em nossa reanálise o gene *SLC19A1* que codifica o transportador de nucleosídeo ENT1 envolvido na captação de nucleosídeos como adenosina e inosina. Observamos que este gene está significativamente mais expresso em pacientes MB tanto em relação aos indivíduos saudáveis quanto aos indivíduos PB (Figura 4.25 C).

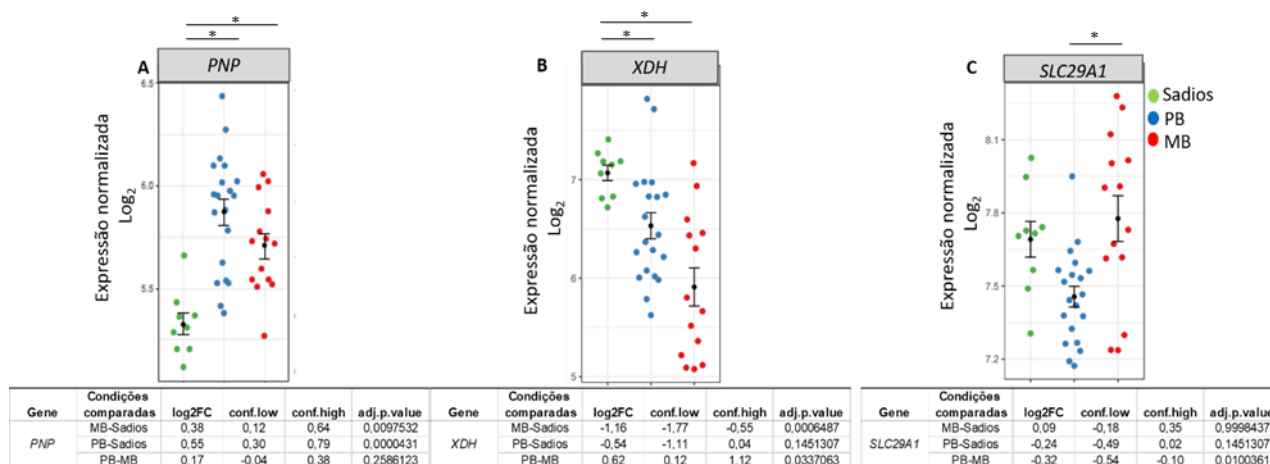


Figura 4-25 Perfis de expressão gênica de biópsias de pele comparando os genes *PNP*, *XDH* E *SLC29A1* entre indivíduos saudáveis, pacientes com Hanseníase paucibacilar e multibacilar.

Reanálise de conjunto de dados públicos de Belone *et al.* (2015) DOI: 10.3389 / fgene.2015.00334. Os gráficos representam a expressão normalizada em log2 para cada indivíduo de acordo com o grupo. A esfera preta central representa a média por grupo \pm erro padrão da média (SEM). As colunas mostram: genes de interesse representados com o símbolo oficial de acordo com HGNC/NCBI; log2FC, representa a diferença entre os grupos; condições comparadas: indivíduos saudáveis (esferas verdes), PB- pacientes com Hanseníase paucibacilar (esferas azuis) e MB-multibacilar (esferas vermelhas); lower.CL- Intervalo de 95% de confiança inferior e upper.CL - Intervalo de 95% de confiança superior. *PNP* – purina nucleosídeo fosforilase, *XDH*- xantina oxidase e *SLC29A1*- transportador de nucleosídeo ENT1. Após a normalização, empregou-se análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey HSD para testar as diferenças entre os grupos de pele sadia (n=9), Hanseníase paucibacilar (PB, n=20) e Hanseníase multibacilar (MB, n=14). As análises que obtiveram diferença estatística ($P < 0.05$) foram caracterizadas com *.

5 Discussão

Durante o desenvolvimento deste estudo diversos entraves surgiram, porém, a escassez de *Mycobacterium leprae* foi o fator determinante para o não avanço com os dados do projeto, o que resultou em diversos dados ainda não concluídos apresentados nesta dissertação. Nosso laboratório mantém uma colaboração com a Dra. Patrícia Sammarco Rosa, do Instituto Lauro de Souza Lima, aonde a própria coordena uma equipe de profissionais responsáveis por manter uma colônia de camundongos *nude*, com o intuito de fomentar a manutenção da obtenção de bacilos para ensaios de infecção *in vitro*. Periódicamente recebemos o material para a purificação e obtenção das bactérias. No entanto, diversos problemas ocorreram na purificação deste material, o que resultou por diversas vezes na presença de contaminantes ao final do procedimento de purificação, o que inviabiliza a utilização das bactérias obtidas. Este problema percorreu por diversos meses consecutivos e, até os dias atuais, ainda não foi totalmente resolvido, o que dificulta o desenvolvimento dos projetos envolvidos.

Os monócitos constituem leucócitos de natureza bastante heterogênea que circulam na corrente sanguínea fazendo parte de um conjunto de células essenciais que ajudam a regular processos inflamatórios (Kratofil et al 2017). Estas células monitoram a homeostase do organismo, e participam do processo de eliminação dos patógenos que conseguem acessar a corrente sanguínea. Até os dias atuais, acredita-se que a transmissão da hanseníase seja através das vias áreas superiores, logo, em algum momento ainda não conhecido, o *Mycobacterium leprae* consegue driblar as barreiras fisiológicas e alcançar o fluxo sanguíneo. Deste modo, os monócitos *naive* podem representar as primeiras células a entrarem em contato com o bacilo quando este atinge a circulação sanguínea. Essa característica faz com que estas células sejam um bom modelo para se estudar os fenômenos moleculares iniciais desencadeados a partir da interação com *Mycobacterium leprae*.

Neste trabalho nos propusemos a estudar a participação do sistema purinérgico na hanseníase, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a patogênese do *Mycobacterium leprae*. Nossos dados mostram que a infecção

modula diferentes componentes deste sistema de sinalização, que por sua vez, são capazes de afetar a resposta imune e o metabolismo lipídico da célula infectada. Além disto, este trabalho pode fornecer maiores informações com relação aos mecanismos moleculares envolvidos nas formas clínicas polares desta doença, além de potenciais pontos de controle da infecção.

O ATP extracelular é considerado juntamente com a ADO os principais mediadores do sistema purinérgico. Atualmente, é sabido que a molécula de ATP possui diferentes funções celulares que vão além do contexto metabólico (Tanaka *et al.*, 2014). Esta molécula é considerada um DAMP, isto é, um padrão molecular associado ao perigo. Dados da literatura mostram, que o processo de secreção do ATP está muitas vezes associado ao reconhecimento celular de PAMPs, padrões moleculares associado ao patógeno, ou mesmo a outros DAMPs, que sinalizam um evento desfavorável ao organismo, como por exemplo, a presença de patógenos ou lesão tecidual (Di Virgilio., 2008).

Alguns trabalhos apontam que ao ser infectada, a célula hospedeira pode liberar ATP através de Panexina 1 (Romanov *et al.*, 2012). Os dados obtidos em nosso trabalho sugerem um aumento de Panexina 1 nos monócitos infectados pelo *Mycobacterium leprae*. Apesar destes dados ainda precisarem ser confirmados com um maior número de indivíduos, é possível que este efeito seja uma resposta da célula hospedeira na tentativa de aumentar a secreção de ATP, com o intuito de sinalizar a presença do patógeno no microambiente celular, o que poderia resultar em uma ativação autócrina, levando a uma sinalização pró-inflamatória, ou mesmo Parácrina, que poderia resultar no recrutamento de células fagocíticas, a fim de auxiliar na eliminação do patógeno.

Os resultados da reanálise de dados públicos de microarranjo de Belone e colaboradores (2015), que compararam fragmentos de pele de indivíduos saudáveis com pacientes de diferentes formas clínicas da hanseníase, mostraram um aumento significativo nos níveis de expressão gênica de *PANX1* em pacientes MB, o que pode corroborar com nossos achados *in vitro*. Estes resultados podem sugerir, que a Panexina 1 possa estar desempenhando algum papel que pode estar beneficiando o estabelecimento da infecção, ou mesmo ativando mecanismos de tolerância à infecção. Além da Panexina 1, outras proteínas podem estar envolvidas no processo de secreção do ATP, como a proteína conexina-43 e o próprio receptor P2X7 (Cotrina *et al.*, 1998; Pellegatti

et al.,2005 ; Praetorius *et al.*,2009). Portanto, novos alvos devem ser analisados para podermos compreender melhor o processo de liberação de ATP na célula infectada pelo *Mycobacterium leprae*, assim como seu papel na hanseníase.

Os níveis de ATP extracelular podem ser regulados por ação da ectoenzima CD39 (Yegutkin *et al.*, 2008). A regulação dos níveis de ATP extracelular afeta diversos processos celulares, sendo capaz de atenuar os danos causados como consequência da infecção bacteriana generalizada, como visto em modelo de sepse em camundongos (Savio *et al.*, 2017). Nosso trabalho mostra que a infecção parece regular positivamente a expressão desta ectoenzima. Este mecanismo pode ser uma estratégia utilizada pelo bacilo para evitar a ativação de mecanismos microbicidas mediado pelo ATP extracelular, como por exemplo, os mecanismos disparados pela ativação do receptor P2X7, que estão associados a ativação do inflamassoma e produção de IL-1 β (revisto por Adinolfi *et al.*, 2017).

Os dados obtidos por reanálise de microarranjo conforme mencionado acima, mostram que a infecção de uma maneira geral, aumenta a expressão de CD39 tanto no polo PB quanto MB. Considerando que pacientes PB apresentam uma resposta imune celular elevada com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, o aumento da expressão do gene *ENTPD1* poderia parecer contraditório. Portanto, estudos de expressão proteica e mesmo de atividade enzimática serão necessários para avaliar de fato a expressão e o papel desta enzima em ambos os polos da doença.

Uma questão importante a se considerar, é o fato de que o aumento da expressão do gene que codifica a enzima CD39, pode não significar necessariamente um aumento da expressão da enzima na membrana e o mesmo de sua atividade enzimática, uma vez que esta enzima é modulada pós-transcricionalmente por palmitoilação e fosforilação (Liao *et al.* 2010 ; Amy *et al.*, 2013).

Dados da literatura mostram que os macrófagos M2 possuem a atividade enzimática de CD39 aumentada, o que pode levar à diminuição nos níveis de ATP extracelular, evitando uma possível resposta pró-inflamatória (Csóka *et al.*, 2012). Além disso, dados da literatura apontam que patógenos são capazes de aumentar a expressão de CD39 e, assim, limitar o processo inflamatório, escapando da resposta imune (Rackowski *et al.*, 2018). Somado a isso, a

literatura aponta que a ausência de CD39 resulta num ambiente rico em ATP extracelular, e que esse perfil pode resultar na produção de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1 β , IL-18, IL-6, e TNF- α (Lévesque et al., 2010; Haskó et al., 2011; Petrovic-Djergovic et al., 2012). Portanto, o perfil de expressão de CD39 observado em nosso trabalho pode ser responsável por regular os níveis de ATP e resultar no controle do processo inflamatório, permitindo um aumento na sobrevivência do bacilo dentro da célula hospedeira.

Além de sofrer hidrólise, o ATP extracelular, pode também ser reconhecido por receptores purinérgicos do tipo P2. Entre os receptores que reconhecem o ATP extracelular pode-se destacar o receptor P2X7. Este receptor como já mencionado acima, além de auxiliar na secreção de ATP para o meio extracelular, medeia uma robusta resposta pró-inflamatória via ativação do inflamassoma NLRP3 e produção da citocina IL-1 β (Mortaz et al., 2001; Soares-Bezerra et al. 2015). A ativação deste receptor também dispara outros mecanismos microbicidas contra diferentes patógenos, como a indução de apoptose e produção de ROS (Bartlett et al., 2013; Soares-Bezerra et al. 2015). Além disso, dados com *Mycobacterium tuberculosis* mostram que este receptor está associado ao aumento da fusão fagolisossomal e morte do bacilo (Fairbairn et al., 2001).

Nossos dados mostram que a infecção pelo patógeno foi capaz de diminuir a expressão do receptor P2X7 em diferentes tempos de infecção. Esta modulação negativa pode ser um recurso utilizado pelo patógeno, com o objetivo de manejar o microambiente da célula hospedeira e persistir com a infecção. No entanto, resultados obtidos da reanálise dos dados publicados de Belone e colaboradores, mostraram que os pacientes do polo MB tiveram uma modulação positiva deste gene. Esse dado é interessante, pois mostra que a complexidade de um tecido e da própria infecção podem alterar o padrão de expressão observado em ensaios *in vitro*. Os pacientes MB convivem anos com uma carga bacilar elevadíssima sem desencadear um quadro de choque por septicemia. O aumento de P2X7 pode sugerir que este receptor possa atuar dentro de um mecanismo de tolerância, sem conseguir de fato eliminar o bacilo mas equilibrando de certa forma essa balança.

Um trabalho recente da literatura mostra que o receptor P2X7 cooperativamente com o receptor P2Y2 promovem o controle da leishmaniose

cutânea, e que este mecanismo envolve Panexina 1 e a produção de leucotrienos (Thorstenberg *et al.*, 2018). Este trabalho nos fez pensar que o receptor P2X7 em conjunto com outros receptores purinérgicos pode estar participando de alguma maneira da patogênese hanseniana

Além do receptor P2Y2, recentemente foi mostrado que o receptor P2X4 e P2X7 em conjunto, aumentam a fagocitose em macrófagos via modulação dos níveis de cálcio intracelular (Zumerle *et al.*, 2019). Recentemente foi apresentado na dissertação de mestrado do aluno Thyago Leal, do laboratório de Hanseníase, através de análises *in silico*, que o gene que codifica o receptor P2X4 está *up-regulado* nos pacientes MB. Nossos dados *in silico* mostram aumento do gene *P2X7*, logo, estes componentes do sistema purinérgico podem estar agindo em conjunto e desempenhando ações relevantes no contexto dos pacientes MB. Outro gene que está elevado nos pacientes MB é o gene *PANX1*, como o receptor P2X7 também pode atuar na secreção de ATP de forma conjunta com Panexina 1, seria possível que o receptor P2X7 em associação com panexina 1, sejam relevantes na hanseníase

Após o reconhecimento de um microrganismo, inicia-se a secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β (revisto por Muñoz-Carrillo *et al.*, 2018). Estas citocinas são capazes de ativar macrófagos a fagocitar os patógenos invasores, assim como, são capazes de induzir um aumento na produção de ROS nessas células (Yang *et al.*, 2007). Nossos dados mostram que a infecção pelo *Mycobacterium leprae* não induz a produção de IL-1 β pelos monócitos, no entanto, a adição de ATP ao meio extracelular parece elevar a produção de IL-1 β nas células infectadas. Estes resultados podem indicar que o receptor P2X7 está ativo, portanto, a diminuição da expressão de P2X7 em associação com aumento da ectoenzima responsável por hidrolisar o ATP, podem estar contribuindo para a manutenção dos baixos níveis desta citocina frente a infecção. Apesar destes dados fazerem sentido, não podemos descartar a participação de outros nucleotídeos, nucleosídeos assim como de outros receptores neste fenômeno, visto que o ATP foi adicionado no início da infecção.

Outra ectoenzima importante na regulação dos nucleotídeos extracelulares é a CD73. A ação desta ectoenzima é responsável por desfosforilar a molécula de AMP, gerando ADO extracelular, uma molécula com

propriedades imunomodulatórias. Dados da literatura ressaltam a importância desta enzima em diferentes contextos como, infecções bacterianas, virais e até no tratamento complementar de pacientes com câncer (Allard *et al.*, 2017). Alam e colaboradores (2014) mostraram em modelo de infecção por *Salmonella spp.* que a ADO tem um importante papel em regular a resposta imune. Além disso, foi observado que camundongos *knockout* para a enzima CD73, exibem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias em comparação com camundongos selvagens. Esse fenômeno resalta a importância desta enzima, visto que sua atividade resulta no aumento dos níveis de ADO extracelulares, podendo desta maneira, favorecer a persistência da infecção bacteriana (Alam *et al.*, 2014). Outros dados apontam que a ADO oriunda da via de hidrólise CD39/CD73 é utilizada pela *Leishmania amazonensis* para manter-se viável dentro dos macrófagos (Bajracharya *et al.*, 2014).

Os dados de reanálise de microarranjo mostraram não haver modulação nos níveis de expressão gênica da enzima CD73 (*NTE5*) nos diferentes polos da doença. Apesar de não haver modulação gênica, é aceitável que mecanismos pós-traducionais possam estar contribuindo para a ação desta ecto-enzima, assim como já foi observado em CD39 (Liao *et al.*, 2010). Este resultado reforça a necessidade de investigar os níveis de atividade desta enzima, pois seu mecanismo de ação pode contribuir diretamente na formação de microambiente rico em ADO.

Incluimos em nossas reanálises de microarranjo o gene que codifica a enzima adenosina quinase, *ADK*, esta enzima é uma fosfotransferase evolutivamente conservada, que converte a ADO em 5'AMP (revisto por Boison *et al.*, 2013). Essa reação enzimática desempenha um papel fundamental no controle dos níveis de ADO. Nossas análises *in silico* mostram que os indivíduos infectados apresentam uma expressão baixa desta enzima em relação aos indivíduos saudáveis. Além disso, vimos também que *ADK* está bem menos expressa em pacientes MB quando comparada aos pacientes PB. Este resultado pode sugerir uma outra via que esteja modulando os níveis de ADO na infecção, que não apenas a CD73. Além disto, este dado abre novas possibilidades de estudo, pois disfunções da *ADK* atualmente estão associadas com várias patologias, incluindo diabetes, epilepsia e câncer (revisto por Boison, 2013).

A ADO no meio extracelular pode ser reconhecida por quatro diferentes

subtipos de receptores, classificados como A1, A2b, A2a e A3 (Ralevic *et al.* 1998). Dados da literatura relatam que monócitos de indivíduos sadios expressam ambos os 4 tipos de receptores (Thiele *et al.*, 2004). E dados da dissertação do aluno Plinio Marcos, mostraram que a infecção de células de Schwann com *Mycobacterium leprae* modula o receptor A2a. Portanto, decidimos iniciar os estudos com relação a participação dos receptores de ADO, focando neste receptor.

O receptor A2a vem sendo associado com resposta imune e com participação ativa na modulação do metabolismo lipídico. Nossos dados mostram que a infecção aumenta a expressão do receptor A2a. Os dados de reanálise de microarranjo de Belone e colaboradores mostram que tanto pacientes PB quanto MB têm um aumento na expressão do gene *ADORA2A* (Belone *et al.*, 2015).

Em 2010, Block e Cronstein (Block e Cronstein., 2010) evidenciaram que IFN- γ inibe a atividade do receptor A2a em células hepáticas, via repressão da atividade adenilato ciclase mediada por STAT1. Este dado pode suportar a hipótese de que nos pacientes PB este receptor pode não estar ativado, mesmo que os níveis de expressão gênica estejam elevados, pois, é sabido que pacientes PB tem elevados níveis de INF- γ circulantes (Oliveira *et al.*, 2014). De maneira contrária, pacientes MB não produzem IFN- γ , e de forma interessante, dados da literatura já mostraram em modelo de camundongo que a ativação de A2a inibe a produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (Lappas *et al.*, 2005). Estes dados podem mostrar possíveis mecanismos moleculares disparados pela resposta imune do hospedeiro ou mesmo pela infecção, que podem regular a atividade deste receptor e, portanto, sua resposta no contexto desta infecção

Em função destes achados, resolvemos analisar o papel deste receptor na produção de algumas citocinas e quimiocina, para isto utilizamos o agonista natural (ADO) e o agonista específico (CGS 21680) , e como forma de inibir a ativação do receptor A2a utilizamos o antagonista específico (ZM24385), focando inicialmente na modulação das citocinas IL-10, IL8, e IL-1 β e da quimiocina MCP-1. A literatura aponta que a ADO pode apresentar papeis antagônicos na produção de citocinas, inclusive induzir um aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8 (Sun *et al.*, 2008; Feoktistov *et al.*,1995).

Sabe-se que a infecção de monócitos com *Mycobacterium leprae* induz a produção da citocina IL-10 (Montoya et al., 2009) uma citocina anti-inflamatória, e que altos níveis desta citocina também são observados em pacientes MB (revisto por Mendonça et al., 2008). Nossos dados sugerem que o uso do antagonista específico do receptor A2a, ZM24385, pode reverter o efeito do *Mycobacterium leprae* sobre a produção desta citocina, sugerindo que este receptor está envolvido na produção de IL-10.

Além da citocina IL-10, dados da literatura ressaltam que a infecção com *Mycobacterium leprae* em monócitos humanos induz a produção de MCP1, sendo essa uma quimiocina responsável por regular a infiltração de monócitos/macrófagos (revisto por Deshmane et al., 2009). Nossos achados mostram, que inibição do receptor A2a com o antagonista seletivo, não reverteu a produção de MCP1, o que pode sugerir que este receptor não está envolvido com a produção desta quimiocina, entretanto, a ativação do receptor A2a com os agonistas parece aumentar a produção desta quimiocina, e o uso do antagonista em associação com o agonista seletivo CGS21680, aponta uma reversão no efeito do agonista. Este resultado é referente a apenas uma replicata biológica e, portanto, precisa ser confirmado. No entanto, é importante ressaltar que esta dosagem foi realizada no tempo de 48 horas de infecção, e como foi observado, nossos dados sugerem que neste tempo de infecção a expressão de CD73 esteja diminuída, talvez o efeito do receptor A2a sobre a produção de MCP1 seja menos sensível, exigindo níveis maiores de ADO. Portanto, ensaios em tempos mais curtos, e um maior número de replicatas biológicas, poderão elucidar o real papel deste receptor na produção desta quimiocina.

No atual trabalho também foi observado uma participação do receptor A2a na produção de IL-1 β nas células infectadas. A infecção não afetou a produção de IL-1 β , entretanto, o uso dos agonistas parece aumentar a produção desta citocina inflamatória. Ouyang e colaboradores observaram que o estímulo com o agonista do receptor A2a (CGS21680) foi capaz de prolongar a ativação do inflamassoma, conseqüentemente, a produção de IL-1 β (Ouyang et al 2013). A dosagem de IL-1 β foi feita após 48h de infecção, período em que observamos uma diminuição da expressão de CD73. Logo, será que neste modelo, a diminuição de CD73 poderia ser um mecanismo importante de regulação dos

níveis de ADO, visto que o aumento excessivo deste nucleosídeo poderia levar a uma resposta pró-inflamatória?. Este resultado pode sugerir que ajustes finos dos níveis de ADO assim como dos mecanismos de sinalização celular são importantes no contexto da infecção pelo *Mycobacterium leprae*.

Observamos anteriormente, que a adição de ATP parece ser capaz de aumentar a produção de IL-1 β . Como este nucleotídeo foi adicionado no início da infecção, e nossos dados sugerem um aumento da expressão de CD39/CD73, não podemos descartar a participação da ADO neste fenômeno, que pode então ativar o receptor A2a e amplificar a produção de IL-1 β .

Outra citocina avaliada foi a IL-8. Os dados mostraram que *Mycobacterium leprae* aumenta a produção desta citocina, entretanto, a adição dos agonistas reverteu este efeito. Dados da literatura mostram em células de Schwann que a infecção com *Mycobacterium leprae* aumenta a produção de IL-8 (Diaz-Acosta *et al.* 2017). Oldenburger e colaboradores mostraram em 2013 o papel anti-inflamatório do AMPcíclico, via EPAC e PKA, diminuindo a produção de IL-8 em modelo de doença pulmonar obstrutiva crônica. Como mencionado na introdução, a ativação do receptor A2a aumenta os níveis de AMPc e ativa PKA e pode também a ativar a via de EPAC (Kreckler *et al.*, 2009; Bingham *et al.*, 2010) logo, estes poderiam ser possíveis mecanismos associados a diminuição desta citocina (Díaz Acosta. *et al.*, 2018).

Com base na literatura sabe-se que diferentes patógenos são capazes de modular o perfil metabólico da célula hospedeira, sendo capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza *et al.*, 2009). Essas organelas lipídicas estão associadas a viabilidade de patógenos, por serem utilizadas como fonte de carbono tanto para produção de energia quanto para síntese de lipídeos (Cardona *et al.*,2000). Sabe-se que *Mycobacterium leprae* induz a formação de CLs ricos em colesterol na célula hospedeira, e que a inibição da síntese deste esteróide reduz a formação destas organelas e diminui a viabilidade intracelular do bacilo (Lobato *et al.*, 2014).

O receptor P2X7 além de induzir uma robusta resposta pró-inflamatória também participa da modulação do metabolismo lipídico. Em 2011 Costa-Junior e colaboradores em uma revisão, descreveram a relação entre o receptor P2X7 e metabolismo lipídico no sistema imune durante a infecção(Costa-Junior *et al.*, 2011). Nesta revisão foi ressaltado o papel deste receptor na regulação de

fosfolipases. Além deste trabalho, Sun e colaboradores em 2012 mostraram que camundongos nocaute para o receptor P2X7 apresentavam um quadro de obesidade quando comparado à animais selvagens (Sun et al 2012).

Resultados prévios do nosso grupo mostraram que o bloqueio do receptor P2X7 com antagonista específico, BBG, foi capaz de aumentar a produção de CLs em células de Schwann infectadas com *Mycobacterium leprae* (dados não mostrados). Nossos dados mostram que a adição deste antagonista também foi capaz de aumentar a formação de CLs nos monócitos infectados, e que a adição de ATP e BzATP, dois agonistas deste receptor, parecem inibir o acúmulo destas organelas lipídicas, entretanto, a adição do BBG na concentração de 50nM não foi capaz de reverter o efeito do ATP. Este dado pode sugerir que concentrações maiores de antagonista precisam ser testadas, e abrem a também a possibilidade de que outros metabólitos derivados da hidrólise do ATP, e outros receptores possam estar envolvidos neste efeito

A participação do receptor P2X7 na modulação da formação de CLs foi comprovada nos ensaios com camundongos nocaute para P2X7, tanto em macrófagos peritoneais quanto em macrófagos derivados de medula óssea. Nestes ensaios mostramos que a ausência do receptor *per se*, já aumenta a formação destas organelas, no entanto, este efeito foi mais pronunciado na célula infectada. Em 2017, Arguin e colaboradores mostraram que a perda da expressão de P2X7, levou a um aumento de glicose e esteatose hepática em modelo de camundongos. Neste trabalho foi mostrado um aumento de colesterol e triglicerídeos no soro destes camundongos. Desta forma, a *down* regulação do receptor P2X7, além de reduzir a formação de IL- β poderia contribuir para a manutenção do acúmulo de CLs, auxiliando no estabelecimento da infecção.

Neste projeto nós avaliamos também o papel da ADO e do receptor A2a na produção de CLs. Dados da literatura já mostraram que a ativação do receptor A2a aumenta o transporte reverso de colesterol, por aumentar a expressão dos transportadores ABCA1 e ABCG1, levando desta maneira a diminuição de células espumosas (Bingham *et al.*, 2010). Um estudo com fibroblastos, mostrou que a ativação do receptor A2a levou à redução do colesterol intracelular e melhora da funcionalidade mitocondrial (Visentin et al., 2013). Além disto, foi relatado por outro grupo, que a ativação do receptor A2a via PKA, fosforila uma lipase hormônio sensível (HSL) envolvida na degradação de

lipídeos como o diacilglicerol (Koupenova & Ravid, 2018).

A decisão de avaliar o papel deste receptor na modulação da formação de CLs, também surgiu em paralelo aos estudos com células de Schwann, neste modelo, vimos que a ativação de A2a diminuía a formação de CLs. Nossos dados mostraram que apesar da infecção sugerir um aumento na expressão de CD73 após 24h, com 48h os níveis de CD73 estão exibindo um perfil oposto. Portanto a próxima pergunta foi, será que a diminuição dos níveis de CD73 poderia estar associada a um possível efeito deste nucleosídeo na formação de CLs, via receptor A2a? Para responder esta pergunta, analisamos inicialmente o papel da enzima CD73 neste processo. Nossos resultados mostram que a adição de AMP diminuiu o acúmulo de CLs induzido pela infecção, e que este efeito foi revertido na presença do antagonista específico, AMPCP. Este efeito pode ser resultado do próprio AMP e/ou da ADO gerada pela hidrólise deste nucleotídeo, visto que dados da literatura já mostraram que AMP extracelular pode se ligar com menor afinidade a receptores de ADO como o receptor A2a (Rittiner et al., 2012). No entanto, todas as condições em que o AMPCP foi adicionado não afetou a formação de CLs, o que pode sugerir, que o AMP que não foi hidrolisado, não está se ligando ao receptor A2a, o que reforça que o efeito do AMP, deve ser da ADO gerada de sua hidrólise, porque a concentração extracelular não é suficiente para ativar este receptor. Portanto, talvez esse efeito seja mediado principalmente pelo receptor A2a, porém, é importante ressaltar que o receptor de ADO, A2b, também já foi associado com a inibição de adipogêneses (Eisenstein et al., 2014) logo, não podemos desconsiderar o possível papel deste receptor neste resultado.

Para comprovar o efeito direto da ADO, adicionamos ao meio os dois agonistas do receptor A2a. O resultado foi muito similar ao observado com a adição de AMP, e foi revertido na presença do antagonista específico deste receptor. Esse resultado confirma o envolvimento deste receptor na diminuição da formação dos CLs, e ressalta a necessidade de se investigar com maior detalhe o impacto da ativação deste receptor sobre a viabilidade da bactéria. Corroborando com os dados acima observamos que a adição de ADO foi capaz de aumentar o efluxo de colesterol em macrófagos infectados, entretanto, este estudo precisa ser melhor investigado.

Nossos dados mostram claramente que apesar da ativação do receptor

A2a diminuir o acúmulo de CLs, a infecção aumenta a expressão deste receptor, o que sugere que sua ação sobre a formação destas organelas está sendo evitada, pois o bacilo induz estas organelas em detrimento dos altos níveis deste receptor. Estes resultados nos fizeram pensar que os níveis de ADO podem estar sendo modulados. Observamos que após 48 horas a infecção parece reduzir a expressão de CD73, além disto, vimos um possível aumento da enzima ADA, que diminui os níveis de ADO, sugerindo que apesar da ADO ter um papel anti-inflamatório, seus níveis extracelulares parecem ser finamente ajustados. Entretanto, para nossa surpresa, após 48 horas a expressão de ADA parece diminuir na superfície da célula, mas continuamos observar um aumento da expressão desta enzima no lisado total da célula infectada, em relação a condição controle, o que pode sugerir que a infecção por algum motivo esteja diminuindo a translocação desta enzima para a superfície. Talvez, exista alguma sinalização interligada entre os mecanismos de regulação da expressão de CD73 e ADA, logo, a medida que a célula diminui a expressão de CD73, é possível que também seja capaz de diminuir os níveis de expressão de ADA, afim de manter os níveis de ADO. Um ponto a se considerar quando falamos da ADA de superfície, é que esta encontra-se ancorada a uma proteína de membrana conhecida como CD26, uma glicoproteína transmembranar multifuncional, que é descrita agir como um receptor e uma enzima proteolítica (Martín *et al.*, 1995). Esta informação é relevante pois a diminuição da expressão de ADA na superfície pode ter uma relação direta com os níveis de CD26.

Dados da literatura mostram que ADA é um marcador de tuberculose pleural (Verma et al., 2008) e que indivíduos com hanseníase apresentam um aumento expressão e a atividade de ADA no soro (Shende et al., 1993; Nigam et al., 2005). Esses dados corroboram com os dados gerados *in silico* que mostram que tanto pacientes PB quanto MB aumentam da expressão gênica de ADA quando comparados aos indivíduos sadios. Esses resultados podem sugerir uma necessidade de regulação dos níveis de ADO e que ADA pode ser importante neste aspecto

. A partir de uma colaboração com o Dr. Rafael Garret do LADETEC/UFRJ conseguimos identificar por espectrometria de massas alguns nucleosídeos como inosina, hipoxantina, xantina e o composto ácido úrico no

sobrenadante de monócitos infectados e não infectados pelo *Mycobacterium leprae*. Para esta análise enviamos amostras de sobrenadante de cultura de dois experimentos independentes, um feito à 2% de soro, e outro à 10% soro, ambos com 48 horas de infecção. O resultado apresentado neste trabalho é referente às amostras cultivadas e infectadas à 10% de soro, no entanto, este resultado foi reproduzido na condição à 2% de soro. Observamos a partir destas análises que não foi possível detectar no sobrenadante das células, neste tempo de infecção, níveis de ATP extracelular, assim como de ADO. Dados similares foram observados também no sobrenadante de células de Schwann infectadas com este bacilo (dados não mostrados). Provavelmente, devido o ATP possuir uma meia vida curta no ambiente extracelular, por ação das ectoenzimas, tempos de infecção mais curtos serão necessários para averiguar o perfil de secreção deste nucleotídeo.

No entanto, a infecção pelo bacilo, no tempo de 48 horas, parece diminuir os níveis de inosina, hipoxantina, xantina e ácido úrico. Como mencionado na introdução, a inosina é um nucleosídeo chave para a formação de ácido úrico que ocorre em duas etapas, a primeira etapa catalisada pela Purina Nucleosídeo Fosforilase que catalisa a fosforólise de inosina em hipoxantina, e a segunda etapa catalisada pela a Xantina oxidase que oxida a molécula de hipoxantina em xantina e está em ácido úrico. Dados da literatura tem demonstrado que o ácido úrico está associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares e metabólicas. Spiga e colaboradores em 2017 mostraram que o ácido úrico está associado a biomarcadores de inflamação sendo capaz de induzir uma resposta inflamatória via ativação de NF-κB em células HepG2, logo, a redução dos níveis de ácido úrico pode exercer um efeito pró-infecção e precisa ser investigado com detalhe.

Os resultados de análise *in silico* mostram que o gene que codifica a enzima xantina oxidase está *down* regulado nos pacientes MB, isto pode indicar que pacientes MB podem apresentar baixos níveis de ácido úrico. O dado *in silico* corrobora com nossos achados de dosagem de nucleosídeos e abrem novas possibilidades estudo.

Outro gene analisado foi o gene *SLC29A1* que codifica um transportador de nucleosídeo *ENT1*, descrito por aumentar a captação de nucleosídeos como Inosina e ADO (revisto por Baldwin *et al.*, 2004). Observamos nos dados de

reanálise de microarranjo, que os pacientes MB possuem um aumento na expressão genica de *SLC29A1*, responsável pela expressão da proteína ENT-1. Este achado mostra que a infecção pode modular os níveis destes transportadores, e que esse fenômeno pode estar a contribuir para a regulação dos níveis de ADO e INO no ambiente extracelular.

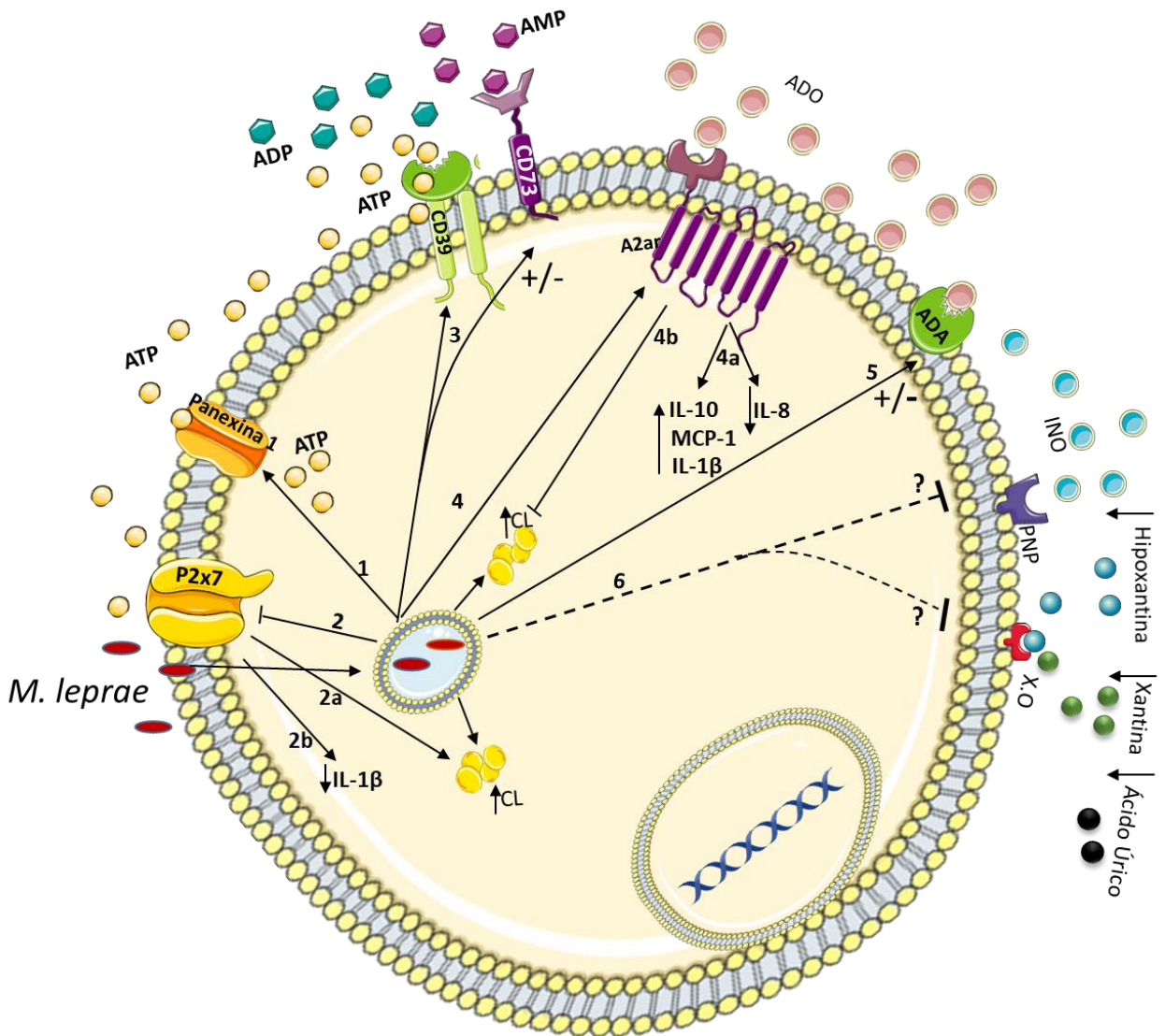


Figura 5-1 Esquema representativo da modulação do sistema purinérgico pelo *Mycobacterium leprae* em monócitos humanos infectados

Mycobacterium leprae ao ser fagocitado por monócitos humanos induz 1) aumento da expressão de panexina 1 levando a de secreção de ATP para o meio extracelular; 2) diminuição da expressão do receptor P2x7 induz um aumento na produção de corpúsculo lipídico (2a) e a diminuição na produção de IL-1β via ATP (2b) ;3) aumento da cascata enzimática que hidrolisa sequencialmente o ATP/ADP à AMP via ectoenzima CD39 e AMP à ADO via a CD73; 4) aumento da expressão do receptor A2a que parece modular positivamente a produção das citocinas de IL10 e IL1-β e da quimiocina MCP1 e negativamente a citocina IL-8 (4a) , e a ativação do receptor A2a aumenta a produção de corpúsculo lipídico (4b) ; 5) aumento inicial da expressão da ADA de superfície, mas posteriormente uma diminuição da expressão desta enzima na superfície da célula, mantendo os níveis intracelulares desta enzima aumentados; 6) diminuição da formação de hipoxantina,xantina e ácido úrico escapando dos efeitos inflamatórios ativado pelo ácido úrico.

6 Conclusões

- A infecção pelo *Mycobacterium leprae* aumenta a hidrólise do ATPe e parece aumentar a expressão da enzima CD39 em monócitos humanos derivados de PBMC.
- A infecção pelo *Mycobacterium leprae* parece aumentar a expressão das ectoenzimas CD73 e ADA em monócitos humanos no tempo de 24 horas, mas parece reduzir após 48 horas de infecção, o que sugere um possível mecanismo de regulação dos níveis extracelulares deste nucleosídeo.
- A infecção pelo *Mycobacterium leprae* parece aumentar a expressão de Panexina 1 e reduz a expressão do receptor P2X7 em monócitos humanos infectados.
- A ativação do receptor P2X7 parece diminuir a formação de corpúsculos lipídicos nos monócitos humanos infectados pelo *Mycobacterium leprae*, assim como parece aumentar a produção de IL-1 β .
- Camundongos P2X7^{-/-} apresentam um acúmulo na formação de corpúsculos lipídicos e esse efeito é potencializado com a infecção pelo *Mycobacterium leprae*.
- O bloqueio do receptor A2a parece reverter o efeito do *Mycobacterium leprae* na produção da citocina IL-10 em monócitos infectados.
- A adição de ADO ao meio extracelular parece modular positivamente a produção da quimiocina MCP1 e das citocinas IL-1 β mas reduz os níveis da citocina IL-8.
- A ativação da ecto-enzima CD73 inibe a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos infectados com *Mycobacterium leprae* e o antagonista específico reverte este efeito.
- A infecção com *Mycobacterium leprae* aumenta a expressão do receptor A2a e sua ativação diminui a formação de corpúsculos lipídicos induzidos pelo bacilo em monócitos humanos
- A infecção com *Mycobacterium leprae* parece diminuir a formação de Inosina, Xantina, Hipoxantina e Ácido úrico em monócitos humanos

derivados de PBMC.

- Análises *in silico* de dados públicos de microarranjo mostram que alguns componentes desta via de sinalização não sofrem alteração ou são modulados positivamente ou negativamente em relação a indivíduos saudáveis e entre pacientes paucibacilares e multibacilares.

7 Considerações Finais

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram pela primeira vez que a infecção pelo *Mycobacterium leprae* é capaz de modular diferentes componentes do sistema purinérgico, colocando esta via dentro do contexto da patogênese da hanseníase. O grupo tem a clareza que o estudo ainda encontra-se em fase inicial, no entanto, o presente trabalho apresenta um potencial prospectivo para o surgimento de novas abordagens que possam esclarecer mecanismos moleculares essenciais no controle da resposta imune durante a interação patógeno-hospedeiro no desenvolvimento da hanseníase.

8 Referências

Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):281–341. doi:10.1124/pr.58.3.3

Abu Hussein N, Ter Riet G, Schoenenberger L, Bridevaux PO, Chhajed PN, Fitting JW, Geiser T, Jochmann A, Joos Zellweger L, Kohler M, Maier S, Miedinger D, Schafroth Török S, Scherr A, Siebeling L, Thurnheer R, Tamm M, Puhan MA, Leuppi JD. The ADO index as a predictor of two-year mortality in general practice-based chronic obstructive pulmonary disease cohorts. *Respiration.* 2014;88(3):208-14. doi: 10.1159/000363770. Epub 2014 Aug 7.

Adams, L. B., Soileau, N. A., Battista, J. R. & Krahenbuhl, J. L. (2000b). Inhibition of metabolism and growth of *Mycobacterium leprae* by gamma irradiation. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 68, 1–10.

Alam M, Kurtz C, Wilson J, et al. A2A adenosine receptor (AR) activation inhibits pro-inflammatory cytokine production by human CD4+ helper T cells and regulates *Helicobacter*-induced gastritis and bacterial persistence. *Mucosal immunology.* 2009;2(3):232-242. doi:10.1038/mi.2009.4.

Alam MS, Kuo JL, Ernst PB, Derr-Castillo V, Pereira M, Gaines D, Costales M, Bigley E, Williams K. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates host inflammatory responses and exacerbates murine salmonellosis. *Sci Rep.* 2014 Mar 27;4:4486. doi: 10.1038/srep04486. PMID: 24670982; PMCID: PMC3967249.

Alam MS, Kurtz CC, Rowlett RM, Reuter BK, Wiznerowicz E, Das S, et al. CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and *Helicobacter felis*-induced gastritis in mice. *J Infect Dis.* 2009;199(4):494–504. doi: 10.1086/596205 ; PubMed Central PMCID: PMC3047419.

Alessandra Piccini, Sonia Carta, Sara Tassi, Denise Lasiglié, Gianluca Fossati, and Anna Rubartelli ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. *PNAS* June 10, 2008 105 (23) 8067-8072; first published June 3.

Allard D, Chrobak P1, Allard B1, Messaoudi N, Stagg J Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. *Immunol Lett.* 2019 Jan;205:31-39. doi: 10.1016/j.imlet.2018.05.001. Epub 2018 May 24.

Alvarez CL, Schachter J, de Sá Pinheiro AA, et al. Regulation of extracellular ATP in human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *PLoS One.* 2014;9(5):e96216. Published 2014 May 23. doi:10.1371/journal.pone.0096216

Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78:6858–6862.

Andrej Benjak, Charlotte Avanzi, Stewart T. Cole, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature Communications* volume 9, Número do artigo: 352 (2018).

Anker SD, Doehner W, Rauchhaus M, et al.. Uric acid and survival in chronic heart failure: validation and application in metabolic, functional, and hemodynamic staging. *Circulation*. 2003; 107:1991–1997.

Aujoulat F, Roger F, Bourdier A, et al. From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic bacterial pathogens. *Genes (Basel)*. 2012;3(2):191–232. Published 2012 Mar 26. doi:10.3390/genes3020191

Amy E. Baek, Yogendra Kanthi, Nadia R. Sutton, Hui Liao, and David J. Pinsky Regulation of ecto-apyrase CD39 (ENTPD1) expression by phosphodiesterase III (PDE3). *The FASEB Journal* 2013 27:11, 4419-4428.

Baldwin SA, Beal PR, Yao SY, King AE, Cass CE, Young JD. The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. Pflugers Arch. 2004 Feb; 447(5):735-43

Block ET, Cronstein BN. Interferon-gamma inhibits adenosine A2A receptor function in hepatic stellate cells by STAT1-mediated repression of adenylyl cyclase. *Int J Interferon Cytokine Mediat Res*. 2010;2010(2):113–126.

Boison D. Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev*. 2013;65(3):906–943. Published 2013 Apr 16. doi:10.1124/pr.112.006361

B. N. Cronstein. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *Journal of Applied Physiology* 1994 76:1, 5-13

BAJRACHARYA, B. Adenosine production via CD39/CD73 pathway promotes *Leishmania amazonensis* survival in macrophages. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014

Barbosa, I. A., Machado, N. G., Skildum, A. J., Scott, P. M., & Oliveira, P. J. (2012). Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: Potential for new therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(1), 238–254. doi:10.1016/j.bbcan.2012.04.005

BARRACO R. A., CLOUGH-HELPMAN C., GOODWIN B. P. AND ANDERSON G. F. (1995) Evidence for presynaptic adenosine A2a receptors associated with norepinephrine release and their desensitization in the rat nucleus tractus solitarius. *J. Neurochem*. 65, 1604–1611.

Bartlett R, Yerbury JJ, Sluyter R. P2X7 receptor activation induces reactive oxygen species formation and cell death in murine EOC13 microglia. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:271813. doi:10.1155/2013/271813.

Bertil B, Fredholm, Jiang-Fan Chen, Rodrigo, A. Cunha, Per Svenningsson, Jean-Marie Vaugeois. Adenosine and Brain Function. *International Review of Neurobiology* Volume 63, 2005, Pages 191-270.

Bingham TC, Fisher EA, Parathath S, Reiss AB, Chan ES, Cronstein BN. A2A adenosine receptor stimulation decreases foam cell formation by enhancing ABCA1-dependent cholesterol efflux. *J Leukoc Biol.* 2010 Apr;87(4):683-90. doi:10.1189/jlb.0709513. Epub 2010 Jan 20

Biswas D, Qureshi OS, Lee W-Y, Croudace JE, Mura M, Lammas DA. ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunology.* 2008;9:35

Bochud, P. Y., D. Sinsimer, A. Aderem, M. R. Siddiqui, P. Saunderson, S. Britton, I. Abraham, A. Tadesse Argaw, M. Janer, T. R. Hawn, and G. Kaplan. 9 May 2009. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* doi:10.1007/s10096-009-0746-0.

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

Boss GR, Erbe RW. Decreased purine synthesis during amino acid starvation of human lymphoblasts. *J Biol Chem.* 1982 Apr 25;257(8):4242-7.

Bou Ghanem EN, Clark S, Roggensack SE, McIver SR, Alcaide P, Haydon PG, Leong JM. Extracellular Adenosine Protects against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection by Regulating Pulmonary Neutrophil Recruitment. *PLoS Pathog.* 2015 Aug; 11(8):e1005126.

Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine-50 - triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;112:358e404

Briken V, Miller JL. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 2008;3(4):415–422. doi:10.2217/17460913.3.4.415

Brito de Souza VN, Nogueira ME, Belone A, de F, Soares CT. Analysis of apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2010) 60:270–4. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00746.x

Bshesh K, Zhao B, Spight D, Biaggioni I, Feokistov I, Denenberg A, Wong HR, Shanley TP. The A2A Receptor mediates an endogenous regulatory pathway of cytokine expression in thp-1 cells. *J Leukoc Biol.* 2002 Nov;72(5):1027-36.

Burnstock G (2013). "Introduction to Purinergic Signalling in the Brain". *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 986: 1–12. doi:10.1007/978-94-007-4719-7_1. ISBN 978-94-007-4718-0. PMID 22879061.

Burnstock G. 1997. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36:1127–1139

Burnstock G. Purinergic Mechanisms and Pain. *Adv Pharmacol*. 2016;75:91-137. doi: 10.1016/bs.apha.2015.09.001. Epub 2015 Nov 4.

Burnstock G, Dale N. Purinergic signalling during development and ageing. *Purinergic Signal*. 2015;11(3):277–305. doi:10.1007/s11302-015-9452-9

Burnstock G, Knight GE, Greig AV. Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar; 132(3 Pt 1):526-46.

Burnstock G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8:661.

Bynoe MS, Waickman A, Mahamed DA, Mueller C, Mills JH, Czopik A. 2012. CD73 is critical for the resolution of murine colonic inflammation. *J Biomed Biotechnol* 2012:260983.

C Londos, D M Cooper, and J Wolff. Subclasses of external adenosine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77(5): 2551–2554.

Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, et al. Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-15. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(12):1305–1310. doi:10.1016/j.cmi.2018.02.022

Campbell, Andrew M. - Chan, Samuel H.P. The voltage dependent anion channel affects mitochondrial cholesterol distribution and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 46622032102007- 2007/10/15/ 0003-9861

Canan Akkaya, Ekaterina Shumilina, Diwakar Bobbala, Verena B. Brand, Hasan Mahmud, Florian Lang, Stephan M. Huber. The Plasmodium falciparum-induced anion channel of human erythrocytes is an ATP-release pathway. *Pflügers Archiv - European Journal of physiology*. March 2009, Volume 457, Issue 5, pp 1035–1047

Cardona PJ, Llatjos R, Gordillo S et al.: Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with Mycobacterium tuberculosis. *Scand. J. Immunol*. 52(2), 156–163 (2000).

Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 2011;6(5): 533-49.

Casadevall A. Evolution of intracellular pathogens. *Annu Rev Microbiol*. 2008;62:19-33.

Cb THOMPSON. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. MAR 1995; 1456-1462.

Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*. 2010;467(7317):863–867. doi:10.1038/nature09413

Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges?. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(4):265–286. doi:10.1038/nrd3955.

Chen ML, Cao H, Chu YX, Cheng LZ, Liang LL, Zhang YQ, Zhao ZQ. Role of P2X7 receptor-mediated IL-18/IL-18R signaling in morphine tolerance: multiple glial-neuronal dialogues in the rat spinal cord. *J Pain*. 2012 Oct;13(10):945-58. doi:10.1016/j.jpain.2012.06.007. Epub 2012 Sep 8.

Chen P, Goldberg DE, Kolb B, Lanser M, Benowitz LI: Inosine induces axonal rewiring and improves behavioral outcome after stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9031-9036.

Chen XS, Li WZ, Jiang C, Ye GY. Leprosy in China: delay in the detection of cases. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94:181–8.

Chen, Y., Bao, Y., Zhang, J., Woehrle, T., Sumi, Y., Ledderose, S., Li, X., Ledderose, C., Junger, W.G., 2015. Inhibition of neutrophils by hypertonic saline involves Pannexin-1, CD39, CD73, and other ectonucleotidases. *Shock* 44 (3), 221e227.

Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, Willett W, Curhan G. Alcohol intake and risk of incident gout in men: a prospective study. *Lancet*. 2004;363(9417):1277–1281. Epub 2004/04/20. 10.1016/s0140-6736(04)16000-5.

Choi HK, Curhan G. Beer, liquor, and wine consumption and serum uric acid level: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum*. 2004;51(6):1023–1029. Epub 2004/12/14. 10.1002/art.20821.

Chunn JL, Young HW, Banerjee SK, Colasurdo GN, Blackburn MR. Adenosine-dependent airway inflammation and hyperresponsiveness in partially adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol*. 2001 Oct 15;167(8):4676-85.

Cohen HB, Briggs KT, Marino JP, Ravid K, Robson SC, Mosser DM. TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. *Blood*. 2013; 122:1935–1945

Cohen SB, Leo BM, Baer GS, Turner MA, Beck G, Diduch DR. An adenosine A2A receptor agonist reduces interleukin-8 expression and glycosaminoglycan loss following septic arthrosis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005 Sep;23(5):1172-8.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 22 de fevereiro de 2001;409(6823):1007–11.

Costa-Junior HM, Marques-da-Silva C, Vieira FS, Monção-Ribeiro LC, Coutinho-Silva R. Lipid metabolism modulation by the P2X7 receptor in the immune system and during the course of infection: new insights into the old view. *Purinergic Signal*. 2011;7(4):381–392. doi:10.1007/s11302-011-9255-6

Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, Liu S, Li J, Azmi-Ghadimi H, Kang J, Naus CC, Nedergaard M (1998) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15735–15740

Coutinho-Silva R, Corrêa G, Sater AA, Ojcius DM. The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. *Purinergic Signal*. 2009 Jun;5(2):197-204. doi: 10.1007/s11302-009-9130-x. Epub 2009 Feb 12

Crane J, Naeher TM, Broome J, Boedeker E. 2013. Role of xanthine oxidase in infection due to enteropathogenic and Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81:1129–1139. doi:10.1128/IAI.01124-12.

Crane J, Naeher TM, Broome J, Boedeker E. 2013. Role of xanthine oxidase in infection due to enteropathogenic and Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81:1129–1139. doi:10.1128/IAI.01124-12.

Crane JK, Broome JE, Lis A. Biological Activities of Uric Acid in Infection Due to Enteropathogenic and Shiga-Toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2016;84(4):976–988. Published 2016 Mar 24. doi:10.1128/IAI.01389-15

Cree IA, Andreotti PE. Measurement of cytotoxicity by ATP-based luminescence assay in primary cell cultures and cell lines. *Toxicol In Vitro*. 1997 Oct;11(5):553-6.

Cristiane M. Cruz, Alessandra Rinna, Henry Jay Forman, Ana L. M. Ventura, Pedro M. Persechini, and David M. Ojcius ATP Activates a Reactive Oxygen Species-dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages *J. Biol. Chem.* 2007 282: 2871-. doi:10.1074/jbc.M608083200

Csóka B, Németh ZH, Virág L, Gergely P, Leibovich SJ, Pacher P, Sun CX, Blackburn MR, Vizi ES, Deitch EA, Haskó G A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to *Escherichia coli*. *Blood*. 2007 Oct 1; 110(7):2685-95.

Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, Gause WC, Leibovich SJ, Haskó G Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J*. 2012 Jan; 26(1):376-86.

da Silva Rocha A, Cunha Md, Diniz LM, et al. Drug and multidrug resistance among *Mycobacterium leprae* isolates from Brazilian relapsed leprosy patients. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):1912–1917. doi:10.1128/JCM.06561-11

Danelishvili, Lia.Chinison, Jessica J. J. Pham, Tuan.Gupta, Rashmi. Bermudez, Luiz E.2017 2017/08/01. The Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) of

Mycobacterium avium phagosome are associated with bacterial survival and lipid export in macrophages- Scientific Reports 7007712045-2322.

David M. Scollard, Richard W. Truman, Gigi J. Ebenezer. Mechanisms of nerve injury in leprosy. Clinics in Dermatology. Volume 33, Issue 1, 2015, Pages 46-54.

Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. Immunology (2015) 144:541–8.

Dawes SS, Mizrahi V. DNA metabolism in Mycobacterium leprae Lepr Rev. 2001 Dec;72(4):408-14.

De Oliveira CC, Paiva Caria CR1, Ferreira Gotardo EM, Ribeiro ML, Gambero A Role of A1 and A2A adenosine receptor agonists in adipose tissue inflammation induced by obesity in mice. Eur J Pharmacol. 2017 Mar 15;799:154-159. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.02.017. Epub 2017 Feb 13.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med. 2007;204(6):1257–65.

Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res. 2009;29(6):313–326. doi:10.1089/jir.2008.0027

Di Virgilio F, Pinton P, Falzoni S. Assessing Extracellular ATP as Danger Signal In Vivo: The pmeLuc System. Methods Mol Biol. 2016;1417:115-29. doi: 10.1007/978-1-4939-3566-6_7.

Dia Mundial de combate e prevenção da Hanseníase. Rio com saúde , Rio de Janeiro , 21 de Jan. de 2019. Disponível em <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/site/conteudo/Noticia.aspx?C=7117>. Acesso em: 15 de set. de 2019.

Dietrich Van Calker, Margarete Müller, Bernd Hamprecht. Adenosine Regulates Via Two Different Types Of Receptors, The Accumulation Of Cyclic Amp In Cultured Brain Cells. Journal Neurochemical 1979 ;33(5):999-1005.

Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TL, et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful Mycobacterium leprae colonization of peripheral nerves. PLoS Pathog. 2018;14(7):e1007151. Published 2018 Jul 6. doi:10.1371/journal.ppat.1007151

Dorothy Fallows, Blas Peixoto, Gilla Kaplan, and Claudia Manca Mycobacterium leprae alters classical activation of human monocytes in vitro J Inflamm (Lond). 2016; 13: 8.

Doyle C, Cristofaro V, Sullivan M, P, Adam R, M: Inosine – a Multifunctional Treatment for Complications of Neurologic Injury. Cell Physiol Biochem 2018;49:2293-2303. doi: 10.1159/000493831

Dubois-Colas N, Petit-Jentreau L, Barreiro LB, Durand S, Soubigou G, Lecointe C, Klibi J, Rezaï K, Lokiec F, Coppée JY, Gicquel B, Tailleux L Extracellular adenosine triphosphate affects the response of human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 2014 Sep 1;210(5):824-33. doi: 10.1093/infdis/jiu135. Epub 2014 Mar 5.

E.M.R. Zenha, M.A.N. Ferreira and N.T. Foss. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. *Braz J Med Biol Res*, October 2009, Volume 42(10) 968-972

Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* virulence: lipids inside and out. *Nat. Med.* 13, 284–285

Eisenstein A.; Carrol S.; Johnston-Cox H. An Adenosine Receptor-Krüppel-Like Factor 4 Protein Axis Inhibits Adipogenesis. *The Journal Of Biologic Chemistry*. V. 289, N. 30, P. 21071–21081, Julho 25, 2014.

Eisenstein A.; CARROL S.; JOHNSTON-COX H. An Adenosine Receptor-Krüppel-like Factor 4 Protein Axis Inhibits Adipogenesis. *The Journal of Biologic Chemistry*. v. 289, n. 30, p. 21071–21081, Julho 25, 2014.

Elioenai Dornelles Alves, Telma Leonel Ferreira, Isaías Nery, organizadores ; Alberto Novaes Ramos Júnior ... [et al.] *Hanseníase: avanços e desafios.* – Brasília: NESPROM, 2014. 492p.; 23

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, et al. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009;461(7261):282–286. doi:10.1038/nature08296

Ersland K, Wuthrich M, Klein BS. Dynamic interplay among monocyte-derived, dermal, and resident lymph node dendritic cells during the generation of vaccine immunity to fungi. *Cell Host Microbe*. 2010;7(6):474–87. pmid:20542251; PubMed Central PMCID: PMC2896205.

Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, Lammas DA ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X(7)-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol*. 2001 Sep 15;167(6):3300-7.

Fang J, Alderman MH. Serum uric acid and cardiovascular mortality the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1992. National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2000; 283:2404–2410

Farthing DE, Farthing CA, Xi L. Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(6):821–831. doi:10.1177/1535370215584931

Faulhaber-Walter, R., Jou, W., Mizel, D., Li, L., Zhang, J., Kim, S.M., Huang, Y., Chen, M., Briggs, J.P., Gavrilova, O., Schnermann, J.B., 2011. Impaired glucose

tolerance in the absence of adenosine A1 receptor signaling. *Diabetes* 60, 2578–2587

Feng W, Song Y, Chen C, Lu ZZ, Zhang Y. Stimulation of adenosine A2B receptors induces interleukin-6 secretion in cardiac fibroblasts via the PKC- δ -P38 signalling pathway. *British Journal of Pharmacology*. 2010;159(8):1598-1607. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00558.x.

Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(4):1979-1986.

Fernando SL, Saunders BM, Sluyter R, Skarratt KK, Wiley JS, Britton WJ. *J Infect Dis*. 2005 Jul 1; 192(1):149-55.

Ferrante A, De Nuccio C, Pepponi R, Visentin S, Martire A, Bernardo A, Minghetti L, Popoli P. Stimulation Of Adenosine A2A Receptors Reduces Intracellular Cholesterol Accumulation And Rescues Mitochondrial Abnormalities In Human Neural Cell Models Of Niemann-Pick C1. *Neuropharmacology*. 2016 ;103:155-62.

Fishman P, Bar-Yehuda S, Synowitz M, et al. Adenosine receptors and cancer. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(193):399–441. doi:10.1007/978-3-540-89615-9_14

Flores-Villanueva, P. O., J. A. Ruiz-Morales, C. H. Song, L. M. Flores, E. K. Jo, M. Montano, P. F. Barnes, M. Selman, and J. Granados. 2005. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J. Exp. Med*. 202:1649-1658.

Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C (Jul 1997). "Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme". *Progress in Neurobiology*. 52 (4): 283–94. doi:10.1016/S0301-0082(97)00013-0. PMID 9247966.

Franco, R., Valenzuela, A., Lluís, C., & Blanco, J. (1998). Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunological Reviews*, 161(1), 27–42. doi:10.1111/j.1600-065x.1998.tb01569.x

Fredholm Bb, Chern Y, Franco R. Aspects of the general biology of adenosine A2A signalling. *Prog Neurobiol*. 2007;83:263–276.

Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J (2001). "International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors". *Pharmacol. Rev*. 53 (4): 527–52. PMID 11734617.

Fukami K., Inanobe S., Kanemaru K., Nakamura Y. (2010). Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog. Lipid Res*. 49:429–437. 10.1016/j.plipres.2010.06.001

Fukutomi Y, Maeda Y, Makino M. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* (2011) 55:4000–5. 10.1128/AAC.00434-11

G. Robert Greenberg. 1950. DE NOVO SYNTHESIS OF HYPOXANTHINE VIA INOSINE PHOSPHATE AND INOSINE. Gachet C (2006). "Regulation of Platelet Functions by P2 Receptors". Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 46: 277–300. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141207. PMID 16402906.

Gallo MEN, NERY JAC, GARCIA CC. Intercorrências pelas drogas utilizadas nos esquemas poliquimioterápicos em hanseníase. Hansen Int 1995;20(2):46-50.

Geoffrey Burnstock. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. Front. Pharmacol., 25 September 2017 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00661>

Gil R, Silva FJ, Peretó J, Moya A. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. Microbiol Mol Biol Rev. 2004;68(3):518–537. doi:10.1128/MMBR.68.3.518-537.2004

Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. Curr Pharm Des. 2005;11(32):4145-51.

Gunnar Schulte & Bertil B. Fredholm. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases Cellular Signalling. Volume 15, Issue 9, September 2003, Pages 813-827.

Guzman SJ, Gerevich Z. P2Y Receptors in Synaptic Transmission and Plasticity: Therapeutic Potential in Cognitive Dysfunction. Neural Plast. 2016;2016:1207393. doi:10.1155/2016/1207393

György Haskó, David G. Kuhel, Jiang-Fan Chen, Michael A. Schwarzschild, Edwin A. Deitch, Jon G. Mabley, Anita Marton, And Csaba Szabó. Adenosine inhibits IL-12 and TNF- α production via adenosine A2A receptor-dependent and independent mechanisms. The FASEB Journal 2000 14:13, 2065-2074

Han, Xiang Y.; Sizer, Kurt C.; Thompson, Erika J.; Kabanja, Juma; Li, Jun; Hu, Peter; Gómez-Valero, Laura; Silva, Francisco J. (2009). «Comparative Sequence Analysis of Mycobacterium leprae and the New Leprosy-Causing Mycobacterium lepromatosis». Journal of Bacteriology. 191 (19): 6067–74. PMC 2747882. PMID 19633074.

Hancock J, Salisbury V, Ovejero-Boglione M, Cherry R, Hoare C, Eisenthal R, Harrison R. 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite. Antimicrob Agents Chemother 46:3308–3310.

HARTMAN SC, BUCHANAN JM. Nucleic acids, purines, pyrimidines (nucleotide synthesis). Annu Rev Biochem. 1959;28:365-410.

Hasan Z, Ashraf M, Tayyebi A, Hussain R. M leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression. BMC Microbiol 2006;6:78.

Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol.* 2013;4:85. Published 2013 Apr 8. doi:10.3389/fimmu.2013.00085

Hasko G, Csoka B, Koscsó B, Chandra R, Pacher P, Thompson LF, Deitch EA, Spolarics Z, Virag L, Gergely P, Rolandelli RH, Nemeth ZH. 2011. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) decreases mortality and organ injury in sepsis. *J Immunol* 187:4256–4267. doi:10.4049/jimmunol.1003379.

Haskó G, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) decreases mortality and organ injury in sepsis. *J. Immunol.* 2011;187:4256–4267.

Hasko G, Sitkovsky MV, Szabo C: Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 152-157.

Hasko G, Szabo C, Nemeth ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. 1996. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF- α , and nitric oxide production in RAW 2647 macrophages and in endotoxemic mice. *J Immunol* 157:4634–4640

Hasko, G., Kuhel, D.G., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Deitch, E.A., Mabley, J.G., Marton, A., and Szabo, C. (2000) Adenosine inhibits IL-12 and TNF β production via adenosine A2A receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14, 2065–2074.

Hatta M, van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89:381-5.

Herbert Zimmermann. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2000) 362: 299–309

Hereford J. 2009. A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. *Am. Nat.* 173:579–588.

Hohl TM, Rivera A, Lipuma L, Gallegos A, Shi C, Mack M, et al. Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection. *Cell Host Microbe.* 2009;6(5):470–81. pmid:19917501; PubMed Central PMCID: PMC2785497.

Humphreys BD, Dubyak GR Induction of the P2z/P2X7 nucleotide receptor and associated phospholipase D activity by lipopolysaccharide and IFN- γ in the human THP-1 monocytic cell line. *J Immunol.* 1996 Dec 15;157(12):5627-37

Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, Di Virgilio F, la Sala A, Girolomoni G, Panther E, Norgauer J. Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood.* 2002;100(3):925–932.

Idzko, M., Ferrari, D., and Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509, 310–317. doi: 10.1038/nature13085

Igor Allaman , Sylvain Lengacher, Pierre J. Magistretti, and Luc Pellerin A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. American Physiological Society. Volume 284. Issue3. March 2003. Pages C696-C704

Jacob, F., Perez, N. C., Bachert, C., and Van, C. K. (2013). Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal*. 9, 285–306. doi: 10.1007/s11302-013-9357-4

Jain, M., Petzold, C.J., Schelle, M.W., Leavell, M.D., Mougous, J.D., Bertozzi, C.R., Leary, J.A., & Cox, J.S. (2007). Lipidomics reveals control of Mycobacterium tuberculosis virulence lipids via metabolic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5133–5138.

Jiang YJ, Lu B, Tarling EJ, et al. Regulation of ABCG1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J Lipid Res*. 2010;51(11):3185–3195. doi:10.1194/jlr.M006445

Job c.; jayajumar j.; kearney M. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*. USA 2008.

Joel Linden, Tami Thai, Heidi Figler, Xiaowei Jin and Anna S. Robeva Characterization of Human A2B Adenosine Receptors: Radioligand Binding, Western Blotting, and Coupling to Gqin Human Embryonic Kidney 293 Cells and HMC-1 Mast Cells. *Molecular Pharmacology* October 1999, 56 (4) 705-713.

Johnston-cox h.; koupenova m.; yanh d. the a2b adenosine receptor modulates glucose homeostasis and obesity. *Plos one*. Usa 2012. Johnstone, p.a. (1987). The search for animal models for leprosy. *Int. J. Lepr. Other mycobact. Dis.* 55, 535–547.

José Luis Muñoz-Carrillo, Juan Francisco Contreras-Cordero, Oscar Gutiérrez-Coronado, Paola Trinidad Villalobos-Gutiérrez, Luis Guillermo Ramos-Gracia and Viridiana Elizabeth Hernández-Reyes. Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens. Submitted: April 10th 2018 Reviewed: August 10th 2018 Published: November 5th 2018

Junger, Wolfgang G - Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*- 2011/02/18.-11201.

K. Tanabe, K. Murakami. Reduction in the mitochondrial membrane potential of *Toxoplasma gondii* after invasion of host cells. *Journal of Cell Science* 1984 70: 73-81;

Kassen R. 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *J. Evol. Biol.* 15:173–190

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

Kawano A, Tsukimoto M, Noguchi T, Hotta N, Harada H, Takenouchi T, Kitani H, Kojima S (2012). "Involvement of P2X4 receptor in P2X7 receptor-dependent cell death of mouse macrophages". *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 419 (2): 374–380. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.156. PMID 22349510.

Khadra A, Tomić M, Yan Z, Zemkova H, Sherman A, Stojilkovic SS. Dual gating mechanism and function of P2X7 receptor channels. *Biophys J.* 2013;104(12):2612–2621. doi:10.1016/j.bpj.2013.05.006

Kreckler LM, Gizewski E, Wan TC, Auchampach JA. Adenosine suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production by murine macrophages through a protein kinase A- and exchange protein activated by cAMP-independent signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(3):1051–1061. doi: 10.1124/jpet.109.157651.

KING B.F. Novel P2X7 receptor antagonists ease the pain. *Br. J. Pharmacol.* (2007) 151565-567.

Kirchheimer, W.F., & Storrs, E.E. (1971). Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 39, 693–702.

Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E., & Binford, C.H. (1972). Attempts to establish the Armadillo (*Dasypus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the Armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 40, 229–242.

Klatsewr PR. Serology of leprosy. *Trop Geogr Med* 1994; 46: 115-118.

Komori T. Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12):2045. Published 2016 Dec 6. doi:10.3390/ijms17122045

Koupenova M, Ravid K. Adenosine, adenosine receptors and their role in glucose homeostasis and lipid metabolism [published online ahead of print, 2013 Mar 4]. *J Cell Physiol.* 2013;10.1002/jcp.24352. doi:10.1002/jcp.24352

Kratofil RM, Kubes P, Deniset JF. Monocyte Conversion During Inflammation and Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Jan;37(1):35-42. Epub 2016 Oct 20.

Krutzik S. R., Ochoa M. T., Sieling P. A., Uematsu S., Ng Y. W., Legaspi A., et al.. (2003). Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 9, 525–532. 10.1038/nm864

Kuricova M, Ledecy V, Liptak T, Madari A, Grulova I, Slovinska L, Nagyova M, Cizkova D: Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat. *Neurol Sci* 2014; 35: 1785-1791

Kusner DJ, Barton JA. ATP stimulates human macrophages to kill intracellular virulent *Mycobacterium tuberculosis* via calcium-dependent phagosome-lysosome fusion. *J Immunol.* 2001 Sep 15;167(6):3308-15.

L. David Sibley and James L. Krahenbuhl}, *Mycobacterium leprae*-burdened macrophages are refractory to activation by gamma interferon. *Infection and immunity.* 1987,55 2.446-50.

Laetitia Petit- *Infection and Immunity* Aug 2015, 83 (9) 3666-3674;

Lahiri, R., Randhawa, B., & Krahenbuhl, J. (2005). Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J. Med. Microbiol.* 54, 235–242.

Lammas DA, Stober C, Harvey CJ, Kendrick N, Panchalingam S, Kumararatne DS ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity.* 1997 Sep; 7(3):433-44.

Lancaster RD, Hilson GR, McDougall AC, Colston MJ. *Mycobacterium leprae* infection in nude mice: bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. *Infect Immun.* 1983;39(2):865–872.

Lara, F.A. ; Mattos, K.A. ; RODRIGUES, L. S. ; MARQUES, M. A. M. ; Pessolani, Maria Cristina V.. *Hanseníase: Lições e Desafios. Ciência Hoje*, p. 42 - 47, 01 ago. 2012.

Lázaro, F.P., Werneck, R.I., Mackert, C.C.O., Cobat, A., Prevedello, F.C., Pimentel, R.P., Macedo, G.M.M., Eleutério, M.A.M., Vilar, G., Abel, L., et al. (2010). A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J. Infect. Dis.* 201, 1598–1605

Lazarowski ER. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal.* 2012;8(3):359–373. doi:10.1007/s11302-012-9304-9

Leanne M. Smith, Robin C. May Mechanisms of microbial escape from phagocyte killing. *Biochemical Society Transactions.* Mar 21, 2013,41(2)475-490;DOI: 10.1042/BST20130014.

Lena J. Heung ,Tobias M. Hohl :Inflammatory monocytes are detrimental to the host immune response during acute infection with *Cryptococcus neoformans* (2019) *PLoS Pathogens*, 15 (3) , art. no. e1007627

Lenertz, L. Y., Gavala, M. L., Zhu, Y., and Bertics, P. J. (2011). Transcriptional control mechanisms associated with the nucleotide receptor P2X7, a critical regulator of immunologic, osteogenic, and neurologic functions. *Immunol. Res.* 50, 22–38. doi: 10.1007/s12026-011-8203-4

Lévesque SA, et al. NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2010;40:1473–1485.

Li CM, Campbell SJ, Kumararatne DS, Bellamy R, Ruwende C, McAdam KP, Hill AV, Lammas DA. *J Infect Dis.* 2002 Nov 15; 186(10):1458-62.

Liao H, Hyman MC, Baek AE, Fukase K, Pinsky DJ. cAMP/CREB-mediated transcriptional regulation of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) expression. *J Biol Chem.* 2010;285(19):14791–14805. doi:10.1074/jbc.M110.116905

Liang D, Zuo A, Shao H, Chen M, Kaplan HJ, Sun D. Anti-inflammatory or proinflammatory effect of an adenosine receptor agonist on the Th17 autoimmune response is inflammatory environment-dependent. *J Immunol.* 2014;193(11):5498–5505. doi:10.4049/jimmunol.1401959

Liese AD, Hense HW, Löwel H, Döring A, Tietze M, Keil U. Association of serum uric acid with all-cause and cardiovascular disease mortality and incident myocardial infarction in the MONICA Augsburg cohort. *World Health Organization Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases. Epidemiology.* 1999; 10:391–397

Lima Ede O, de Macedo CS, Esteves CZ, de Oliveira DN, Pessolani MC, Nery JA, Sarno EN, Catharino RR. Skin imprinting in silica plates: a potential diagnostic methodology for leprosy using high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem.* 2015 Apr 7;87(7):3585-92. doi: 10.1021/acs.analchem.5b00097. Epub 2015 Mar 25.

Lin CM, Lin SM, Chung FT, et al. Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for diagnosing tuberculous pleurisy--a diagnostic accuracy study. *PLoS One.* 2012;7(9):e44842. doi:10.1371/journal.pone.0044842

Lin MC, ALMUS-JACOBS F, CHEN HH. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest.* 1997;99:737–744.

Linden J. Regulation of Leukocyte Function by Adenosine Receptors. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif).* 2011;61:95-114. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00004-7.

Lobato, L.S., Rosa, P.S., Ferreira, J.D.S., Neumann, A.D.S., Silva, M.G. Da, Nascimento, D.C. Do, Soares, C.T., Pedrini, S.C.B., Oliveira, D.S.L. De, Monteiro, C.P., et al. (2014). Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5766–5774.

Ma Y, Pei Q, Zhang L, et al. Live Mycobacterium leprae inhibits autophagy and apoptosis of infected macrophages and prevents engulfment of host cell by phagocytes. *Am J Transl Res.* 2018;10(9):2929–2939. Published 2018 Sep 15.

Mahajan M, Kaur S, Mahajan S, Kant R. Uric acid a better scavenger of free radicals than vitamin C in rheumatoid arthritis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2009;24(2):205-207. doi:10.1007/s12291-009-0038-6.

Mahamed DA, Mills JH, Egan CE, Denkers EY, Bynoe MS. 2012. CD73-generated adenosine facilitates *Toxoplasma gondii* differentiation to long-lived tissue cysts in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:16312–16317

Mariathasan S., Weiss D.S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M., LEE W.P., Weinrauch Y., Monack D.M., DIXIT V.M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* (2006) 440 228-232.

Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Journal of clinical microbiology*2006;44(9):3154.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*2009;47(7):2124.

Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(10):e1354.

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect* 2010;7(11):1653-8.

Martinon, F. Burns K, Tschopp J.(2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL1b. *Mol. Cell* 10, 417–426

Mattos Ka, Oliveira Vcg, Berrêdo-Pinho M, Et Al. *Mycobacterium Leprae*intracellular Survival Relies On Cholesterol Accumulation In Infected Macrophages: A Potential Target For New Drugs For Leprosy Treatment. *Cellular Microbiology*. 2014;16(6):797-815. Doi:10.1111/Cmi.12279.

Mattos Ka, Oliveira Vcg, Berrêdo-Pinho M, Et Al. *Mycobacterium Leprae* intracellular Survival Relies On Cholesterol Accumulation In Infected Macrophages: A Potential Target For New Drugs For Leprosy Treatment. *Cellular Microbiology*. 2014;16(6):797-815. Doi:10.1111/Cmi.12279.

Martín M, Huguet J, Centelles JJ, Franco R.Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule.*J Immunol*. 1995 Nov 15; 155(10):4630-43

McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 2010;330:362e6.

McDougall AC, Rees RJ, Weddell AG, Kanan MW. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. *J Pathol* (1975) 115:215–26

McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, et al. Interplay between IFN-gamma and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest*. 2003;112:598–607.

Medeiros Rca, Girardi K Do C De V, Cardoso Fkl, Et Al. Subversion Of Schwann Cell Glucose Metabolism By Mycobacterium Leprae. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2016;291(41):21375-21387. Doi:10.1074/Jbc.M116.725283.

Mendonça, Vanessa Amaral, Costa, Rosane Dias, Melo, Gustavo Eustáquio Brito Alvim de, Antunes, Carlos Maurício, & Teixeira, Antonio Lúcio. (2008). Imunologia da hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 83(4), 343-350. <https://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962008000400010>

Mei L, Du W, Gao W, Mei QB. Purinergic signaling: a novel mechanism in immune surveillance. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(9):1149–1153.

Michael Silverman, Vibeke Strand, Pnina Fishman et al. Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *The Journal of Rheumatology* Jan 2008, 35 (1) 41-48;

Mills JH, Thompson LF, Mueller C, Waickman AT, Jalkanen S, Niemela J, Airas L, Bynoe MS. 2008. CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9325–9330.

Ministério da Saúde (2016). Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase, estados, Brasil, 2015.

Mira, M.T., Alcaïs, A., Nguyen, V.T., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Vu, H.T., Mai, C.P., Nguyen, T.H., Nguyen, N.B., Pham, X.K., et al. (2004). Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427, 636–640

Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S, Ikehara Y (August 1990). "Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form". *European Journal of Biochemistry*. 191 (3): 563–9. doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb19158.x

Moises B. da Silva, Juliana M. Portela, Wei Li, Mary Jackson, John S. Spencer. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2018; 12 (6): e0006532

MONTEIRO, Y. N. Hanseníase: história e poder no Estado de São Paulo. *Hansenologia Internationalis*, São Paulo, v. 12, n.1, p.1-7, 1987.

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

Nigam PK, Srivastava P, Patra PK. Serum adenosine deaminase levels in reactional and non-reactional leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2005 Jan-Feb;71(1):20-2.

Morandini AC, Savio LE, Coutinho-Silva R The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomed J*. 2014 Jul-Aug;37(4):169-77. doi: 10.4103/2319-4170.127803.

MORELLO S.; Adenosine A2a receptor agonists as regulators of inflammation: pharmacology and therapeutic opportunities. *Journal of Receptor, Ligand and Channel Research*. Italia 2009.

Mortaz E, Adcock IM, Shafei H, Masjedi MR, Folkerts G. Role of P2X7 Receptors in Release of IL-1 β : A Possible Mediator of Pulmonary Inflammation. *Tanaffos*. 2012;11(2):6-11.

Mortaz E, Adcock IM, Shafei H, Masjedi MR, Folkerts G. Role of P2X7 Receptors in Release of IL-1 β : A Possible Mediator of Pulmonary Inflammation. *Tanaffos*. 2012;11(2):6–11.

Mortaz E, Adcock IM, Tabarsi P, et al. Interaction of Pattern Recognition Receptors with Mycobacterium Tuberculosis. *J Clin Immunol*. 2015;35(1):1–10. doi:10.1007/s10875-014-0103-7

Mortensen SP, González-Alonso J, Bune LT, Saltin B, Pilegaard H, Hellsten Y. ATP-induced vasodilation and purinergic receptors in the human leg: roles of nitric oxide, prostaglandins, and adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Apr;296(4):R1140-8. doi: 10.1152/ajpregu.90822.2008. Epub 2008 Dec 31.

Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008;41(Sup II):11-8.

Naviaux JC, Wang L, Li K, Bright AT, Alaynick WA, Williams KR, Powell SB, Naviaux RK. Antipurinergic therapy corrects the autism-like features in the Fragile X (Fmr1 knockout) mouse model. *Mol Autism*. 2015; 6():1.

Nery JA, Schreuder PA, de Mattos PC et al. Hansen's disease in a general hospital: uncommon presentations and delay in diagnosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23:150–6.

Noordeen SK. *The epidemiology of leprosy* Leprosy. 2. ed. 1994.

Okada M., KAWATA Y., MURAKAMI T., WADA K., MIZUNO K., KONDO T. AND KANEKO S. (1999) Differential effects of adenosine receptor subtypes on release and reuptake of hippocampal serotonin. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1–9.

Oldenburg R, Mayau V, Prandi J, et al. Mycobacterial Phenolic Glycolipids Selectively Disable TRIF-Dependent TLR4 Signaling in Macrophages. *Front Immunol.* 2018;9:2. Published 2018 Jan 19. doi:10.3389/fimmu.2018.00002

Opromolla D. Noções de hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. 1981.

OPROMOLLA, D. Noções de hansenologia. Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato. Hospital Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. 2000.

Organização Mundial da Saúde. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO Tech Rep Ser 675; 1982.

Ouyang X, Ghani A, Malik A, et al. Adenosine is required for sustained inflammasome activation via the A2A receptor and the HIF-1 α pathway. *Nature communications.* 2013;4:2909. Doi:10.1038/ncomms3909.

Oliveira RM, Hungria EM, de Araújo Freitas A, de Sousa AL, Costa MB, Reed SG, Duthie MS, Stefani MM. Synergistic antigen combinations for the development of interferon gamma release assays for paucibacillary leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 Aug;33(8):1415-24. doi: 10.1007/s10096-014-2077-z. Epub 2014 Mar 12.

Pandolfo p., Machado n. J., KeOFALVI a., Takahashi r. N. and Cunha r.a. (2013) Caffeine regulates frontocorticostratial dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23, 317–328

Park AJ, Rendini T, Martiniuk F, Levis WR. Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. *J Leukoc Biol.* 2016 Jul;100(1):47-54. doi: 10.1189/jlb.5RU1215-537RR. Epub 2016 Apr 22.

Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*2005;44:311-6.

Pellegatti P, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Di Virgilio F (2005) A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell* 16:3659–3665

Petit-Jentreau. *Infection and Immunity* September 2015 Volume 83 Number 9

Petrovic-Djergovic D, et al. Tissue-resident ecto-5' nucleotidase (CD73) regulates leukocyte trafficking in the ischemic brain. *J. Immunol.* 2012;188:2387–2398

Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β

and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(23):8067–8072. doi:10.1073/pnas.0709684105.

Pinhasi R, Foley R, Donoghue HD. Reconsidering the Antiquity of Leprosy. *Science* 2005;312:846.

Polycarpou A, Holland MJ, Karageorgiou I, et al. Mycobacterium leprae Activates Toll-Like Receptor-4 Signaling and Expression on Macrophages Depending on Previous Bacillus Calmette-Guerin Vaccination. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:72. Published 2016 Jul 8. doi:10.3389/fcimb.2016.00072

Pons V, Serhan N, Gayral S, Malaval C, Nauze M, Malet N, Laffargue M, Galés C, Martinez LO. Role of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of P2Y13 receptor expression: impact on hepatic HDL uptake. *Cell Mol Life Sci*. 2014 May;71(9):1775-88. doi: 10.1007/s00018-013-1471-5. Epub 2013 Sep 13.

Praetorius HA, Leipziger J. ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signalling*. 2009;5(4):433-446. Doi:10.1007/s11302-009-9146-2.

Raczkowski F, Rissiek A, Ricklefs I, et al. CD39 is upregulated during activation of mouse and human T cells and attenuates the immune response to *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*. 2018;13(5):e0197151. Published 2018 May 9. doi:10.1371/journal.pone.0197151

Rahul Sharma, Ramanuj Lahiri, David M. Scollard, Maria Pena, Diana L. Williams, Linda B. Adams, John Figarola, Richard W. Truman. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Disease Models & Mechanisms* 2013 6: 19-24; doi: 10.1242/dmm.010215

Rahul Sharma, Ramanuj Lahiri, David M. Scollard, Maria Pena, Diana L. Williams, Linda B. Adams, John Figarola, Richard W. Truman The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases, *Disease Models & Mechanisms* 2013 6: 19-24; doi: 10.1242/dmm.010215

Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-492

Ramesh Marne Bhat and Chaitra Prakash. Leprosy: An Overview of Pathophysiology. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. Volume 2012, Article ID 181089, 6 pages

Ravigne V., Dieckmann U., and Olivieri I.. 2009. Live where you thrive: joint evolution of habitat choice and local adaptation facilitates specialization and promotes diversity. *Am. Nat.* 174:E141–E169.

Rees RJW. Impact of experimental human leprosy in the mouse on leprosy research. *Int J Lepr other Mycobact Dis*. 1971; 39: 210-5

Renesto P, Ogata H, Audic S, Claverie JM, Raoult D. 2005. Some lessons from *Rickettsia* genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:99–117

Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretti LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, et al. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. *Eur J Pharmacol*. 2012;678:78–85.

Rimmerman N, Ben-Hail D, Porat Z, et al. Direct modulation of the outer mitochondrial membrane channel, voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) by cannabidiol: a novel mechanism for cannabinoid-induced cell death. *Cell Death & Disease*. 2013;4(12):e949-. doi:10.1038/cddis.2013.471.

Riteau N, Baron L, Villeret B, et al. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis*. 2012;3(10):e403. Published 2012 Oct 11. doi:10.1038/cddis.2012.144

Rittiner JE, Korboukh I, Hull-Ryde EA, et al. AMP is an adenosine A1 receptor agonist. *J Biol Chem*. 2012;287(8):5301–5309. doi:10.1074/jbc.M111.291666

Romanov RA, Rogachevskaja OA, Khokhlov AA, Kolesnikov SS Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. *J Gen Physiol*. 2008 Dec;132(6):731-44. doi: 10.1085/jgp.200810108

Rombo d. M., Newton k., Nissen w., Badurek s., Horn j. M., Minichiello I., Jefferys j. G., Sebastiao a. M. And Iamsa k. P. (2015) Synaptic mechanisms of adenosine A2A receptor-mediated hyperexcitability in the hippocampus. *Hippocampus* 25, 566–580.

Roy B, Depaix A, Périgaud C, Peyrottes S Recent Trends in Nucleotide Synthesis *Chem Rev*. 2016 Jul 27; 116(14):7854-97.

Salas E, Carrasquero LM, Olivos-Oré LA, Bustillo D, Artalejo AR, Miras-Portugal MT, Delicado EG. Purinergic P2X7 receptors mediate cell death in mouse cerebellar astrocytes in culture. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013 Dec;347(3):802-15. doi: 10.1124/jpet.113.209452. Epub 2013 Oct 7.

Salmi M, Jalkanen S. 2012. Host CD73 impairs anti-tumor immunity. *Oncoimmunology* 1:247–248.

Samstein M, Schreiber HA, Leiner IM, Susac B, Glickman MS, Pamer EG. Essential yet limited role for CCR2(+) inflammatory monocytes during Mycobacterium tuberculosis-specific T cell priming. *Elife*. 2013;2:e01086. pmid:24220507; PubMed Central PMCID: PMC3820971.

Santana NL, Rêgo JL, Oliveira JM, et al. Polymorphisms in genes TLR1, 2 and 4 are associated with differential cytokine and chemokine serum production in patients with leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(4):260–268. doi:10.1590/0074-02760160366

Santos AA Jr, Rodrigues-Junior V, Zanin RF, Borges TJ, Bonorino C, Coutinho-Silva R, Takyia CM, Santos DS, Campos MM, Morrone FB. Implication of purinergic P2X7 receptor in M. tuberculosis infection and host interaction mechanisms: a mouse

model study. *Immunobiology*. 2013 Aug;218(8):1104-12. doi: 10.1016/j.imbio.2013.03.003. Epub 2013 Mar 16.

Savio LEB, de Andrade Mello P, Figliuolo VR, et al. CD39 limits P2X7 receptor inflammatory signaling and attenuates sepsis-induced liver injury. *J Hepatol*. 2017;67(4):716–726. doi:10.1016/j.jhep.2017.05.021

Savio Luiz E. B., de Andrade Mello Paola, da Silva Cleide Gonçalves, Coutinho-Silva Robson. The P2X7 Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Frontiers in Pharmacology*. VOLUME,9 ,2018.PAGES=52 .

Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med*. 2012;18(4):555–563. Published 2012 Mar 25. doi:10.1038/nm.2650

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med*. 1991;174(5):1031–1038. doi:10.1084/jem.174.5.1031

Schorn C, Janko C, Krenn V, Zhao Y, Munoz LE, Schett G, Herrmann M. 2012. Bonding the foe—NETting neutrophils immobilize the pro-inflammatory monosodium urate crystals. *Front Immunol* 3:376.

Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. 2012. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol* 3:277. *Biophys Res Commun* 443:556–561.

Schulze-Lohoff E, Hugo C, Rost S, Arnold S, Gruber A, Brüne B, Sterzel RB. Extracellular ATP causes apoptosis and necrosis of cultured mesangial cells via P2Z/P2X7 receptors. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6):F962-71. doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.6.F962.

Schwarzschild MA, Macklin EA, Ascherio A: Urate and neuroprotection trials. *Lancet Neurol* 2014; 13: 758.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19:338–381.

Sergio Visentin, Chiara De Nuccio, Antonietta Bernardo, Rita Pepponi, Antonella Ferrante, Luisa Minghetti, Patrizia Popoli The Stimulation of Adenosine A2A Receptors Ameliorates the Pathological Phenotype of Fibroblasts from Niemann-Pick Type C Patients *Journal of Neuroscience* 25 September 2013, 33 (39) 15388-15393; DOI:10.1523/JNEUROSCI.0558-13.2013

Sergio V, Chiara DeN, Antonietta B, Rita P, Antonella F, Luisa M, Patrizia P. The Stimulation of Adenosine A2A Receptors Ameliorates the Pathological Phenotype of Fibroblasts from Niemann-Pick Type C Patients. *Journal of Neuroscience* 25 September 2013, 33 (39) 15388.

Shende RK, Bardapurker J, Patil V, Gaikwad A. Adenosine deaminase activity in leprosy. *Indian J Lepr.* 1993 Apr-Jun;65(2):201-5.

Shieh, C. H., Heinrich, A., Serchov, T., van Calker, D., and Biber, K. (2014). P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF-alpha in cultured mouse microglia. *Glia* 62, 592–607. doi: 10.1002/glia.22628

Silva BJ, Barbosa MG, Andrade PR, et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):e1006103. Published 2017 Jan 5. doi:10.1371/journal.ppat.1006103

Singh V, Donini S, Pacitto A, et al. The Inosine Monophosphate Dehydrogenase, GuaB2, Is a Vulnerable New Bactericidal Drug Target for Tuberculosis. *ACS Infect Dis.* 2017;3(1):5–17. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00102

Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun.* 2010;78(1):293–300. doi:10.1128/IAI.00816-09

Soares-Bezerra, R. J., Pinho, R. T., Bisaggio Rda, C., Benevolo-De-Andrade, T. C., and Alves, L. A. (2015). The search for new agonists to P2X7R for clinical use: tuberculosis as a possible target. *Cell Physiol. Biochem.* 37, 409–418. doi: 10.1159/000430364

Spencer JS, Brennan PJ The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.* 2011 Dec;82(4):344-57.

Storrs, E.E. (1971). The nine-banded armadillo: a model for leprosy and other biomedical research. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 39, 703–714

Sun S, Xia S, Ji Y, Kersten S, Qi L. The ATP-P2X7 signaling axis is dispensable for obesity-associated inflammasome activation in adipose tissue. *Diabetes.* 2012;61(6):1471–1478. doi:10.2337/db11-1389.

Sun Y, Wu F, Sun F, Huang P. Adenosine promotes IL-6 release in airway epithelia. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):4173-81.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272:735–738. CrossRef Medline

Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:333-59. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630.

Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 2002;110(7):993–1002. doi:10.1172/JCI15337

Tanaka K, Choi J, Cao Y, Stacey G. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front Plant Sci.* 2014;5:446. Published 2014 Sep 3. doi:10.3389/fpls.2014.00446.

Thiele A, Kronstein R, Wetzel A, Gerth A, Nieber K, Hauschildt S. Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. *Infect Immun.* 2004;72(3):1349–1357. doi:10.1128/iai.72.3.1349-1357.2004

TERRA, F. Esboço histórico da lepra no Brasil. *Anais brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p.3-4, 1926.

Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bull, NY Acad Med* 1984;60:689-95.

Trautmann, A. Extracellular ATP in the immune system: More than just a “danger signal”. *Sci. Signal* 2009, 2, pe6

Truman, R. (2005). Leprosy in Wild Armadillos. *Lepr. Rev.* 76, 198–208.

Truman, R.W., & Krahenbuhl, J.L. (2001). Viable *M. leprae* as a Research Reagent. *Int. J. Lepr.* 69, 1–12.

Verma SK, Dubey AL, Singh PA, Tewerson SL, Sharma D. Adenosine Deaminase (ADA) Level in Tubercular Pleural Effusion. *Lung India.* 2008;25(3):109–110. doi:10.4103/0970-2113.44121

Vergne I, Chua J, Lee H-H, Lucas M, Belisle J, Deretic V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(11):4033-4038.

Vogel-Scheel J, et al. Requirement of purine and pyrimidine synthesis for colonization of the mouse intestine by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76:5181–5187.

Wan TC, Ge ZD, Tampo A, et al. The A3 adenosine receptor agonist CP-532,903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)-3'-aminoadenosine-5'-N-methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(1):234–243. doi:10.1124/jpet.107.127480

Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jun;26(6):1310-6. Epub 2006 Mar 23.

Westing YH, Ekblom B, Sjödín B. The metabolic relation between hypoxanthine and uric acid in man following maximal short-distance running. *Acta Physiol Scand.* 1989 Nov;137(3):341-5.

Wewers MD, Sarkar A (2009). "P2X7 receptor and macrophage function". *Purinergic Signalling*. 5 (2): 189–195. doi:10.1007/s11302-009-9131-9. PMC 2686821. PMID 19214778.

Wheeler PR. Biosynthesis and scavenging of purines by pathogenic mycobacteria including *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*, 1987; 133: 2999-301 1.

Wheeler PR. Biosynthetic pathways in *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol*, 1989; 7: 2 1 -24.

Wheeler PR. Enzymes for purine synthesis and scavenging in pathogenic mycobacteria and their distribution in *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*, 1987; 133: 3013-3018.

WHO (1998). Expert Committee on Leprosy. Seventh Report (Geneva).

WHO. 2014. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire 36:389–400.

Woehrle, T., Yip, L., Manohar, M., Sumi, Y., Yao, Y., Chen, Y., Junger, W.G., 2010. Hypertonic stress regulates T cell function via pannexin-1 hemichannels and P2X receptors. *J. Leukoc. Biol.* 88 (6), 1181e1189

Xiang Y. Han, Yiel-Hea Seo, Kurt C. Sizer, Taylor Schoberle, Gregory S. May, John S. Spencer, Wei Li, R. Geetha Nair, A New *Mycobacterium* Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy, *American Journal of Clinical Pathology*, Volume 130, Issue 6, December 2008, Pages 856–864,

Yamada Y, Saito H, Tomioka H, Jidoi J. 1987. Susceptibility of micro-organisms to active oxygen species: sensitivity to the xanthine-oxidase-mediated antimicrobial system. *J Gen Microbiol* 133:2007–2014.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. 1992. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 149:1470–1475.

YAMANOUCHI, ANA AZUSSA et al. Hanseníase e sociedade: um problema sempre atual. In: *Anais Bras. Dermatol.* Rio de Janeiro, (6), p.396-404, 1993.

Yang D, Chen J, Zhang L, Cha Z, Han S, Shi W, Ding R, Ma L, Xiao H, Shi C, Jing Z, Song N. *Mycobacterium leprae* upregulates IRGM expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Inflammation*. 2014 Aug;37(4):1028-34. doi: 10.1007/s10753-014-9825-1.

Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemela J, Laurila JP, Elima K, Jalkanen S, Salmi M. 2011. Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol* 41:1231–1241

YEGUTKIN GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008 May; 1783(5):673-94

Zhang F, Chen S, Sun Y, Chu T. Healthcare seeking behaviour and delay in diagnosis of leprosy in a low endemic area of China. *Lepr Rev* 2009; 80:416–23.

Zhao GJ, Mo ZC, Tang SL, Ouyang XP, He PP, Lv YC, Yao F, Tan YL, Xie W, Shi JF, Wang Y, Zhang M, Liu D, Tang DP, Zheng XL, Tian GP, Tang CK. Chlamydia pneumoniae negatively regulates ABCA1 expression via TLR2-Nuclear factor-kappa B and miR-33 pathways in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Atherosclerosis*. 2014 Aug; 235(2):519-25

Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JD. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol*. 1991;112(2):279–288. doi:10.1083/jcb.112.2.279

Zhou Y, Mohsenin A, Morschl E, et al. Enhanced airway inflammation and remodeling in adenosine deaminase-deficient mice lacking the A2B adenosine receptor. *J Immunol*. 2009;182(12):8037–8046. doi:10.4049/jimmunol.0900515
Zumerle S, Cali B, Munari F, et al. Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. *Cell Rep*. 2019;27(1):1–10.e4. doi:10.1016/j.celrep.2019.03.011