

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

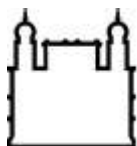
**Mestrado em Medicina Tropical**

**PAPEL DA AUTOFAGIA NA RESPOSTA IMUNE AO**  
*Mycobacterium leprae*

**BRUNO JORGE DE ANDRADE SILVA**

**Rio de Janeiro**

**2012**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*BRUNO JORGE DE ANDRADE SILVA*

Papel da Autofagia na Resposta Imune ao *Mycobacterium leprae*

Tese ou dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Medicina Tropical.

**Orientador (es):** Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno  
Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

**RIO DE JANEIRO**

2012

S586

Silva, Bruno Jorge de Andrade

Papel da autofagia na resposta imune ao *Mycobacterium leprae* / Bruno Jorge de Andrade Silva. – Rio de Janeiro, 2012.

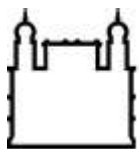
xviii, 103f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.

Bibliografia: f. 78-99

1. Hanseníase. 2. Autofagia. 3. Interferon-gama. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTOR: BRUNO JORGE DE ANDRADE SILVA***

***PAPEL DA AUTOFAGIA NA RESPOSTA IMUNE AO *Mycobacterium leprae****

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno**  
**Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Maria Cristina Vidal Pessolani - **Presidente**  
**Prof. Dr.** Leonardo Holanda Travassos Correa  
**Prof. Dra.** Marise Pinheiro Nunes  
**Prof. Dra.** Andrea Henriques Pons  
**Prof. Dra.** Verônica Schmitz Pereira

Rio de Janeiro, de de 20

“Um homem de ciência deve pensar no que se dirá dele nos séculos futuros e não nos insultos ou elogios que recebe em vida. O verdadeiro sábio tem um só dever e uma única tarefa: procurar aquilo que existe, sem se importar com os outros”.

Louis Pasteur

“Aos animais utilizados nos experimentos de pesquisa, que olham questionando o que ocorre, que sentem medo e não compreendem, que não entendem a dor, a perda da liberdade e que lambem as mãos do algoz confundindo-o com um amigo”.

Dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Dr<sup>a</sup>. Euzenir Nunes Sarno pela dedicação, incentivo, disponibilidade, orientação e preocupação para que este trabalho terminasse da melhor forma.

À Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro pela orientação, encorajamento diante das adversidades, pela dedicação e carinho com esse trabalho e comigo. Pela oportunidade de crescer e aprimorar minha visão científica nas agradáveis conversas que tivemos ao longo desses anos.

À Dr<sup>a</sup>. Thaís Porto Amadeu por ter me aberto as portas da FIOCRUZ e por toda ajuda com as imagens e imunofluorescências.

À amiga e eterna professora mais querida, Dr<sup>a</sup>. Elisabeth Martins da Silva Rocha por ter me mostrado o maravilhoso mundo da ciência.

Ao Dr. José Augusto e todos que trabalham no Ambulatório Souza Araújo, pela ajuda com os pacientes.

Aos pacientes do ASA pela boa vontade na doação das amostras. Sem eles este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

À Cristiane e a todos da administração pela boa vontade e ajuda sempre que precisei.

A Solange e ao Paulo pela limpeza do material e por sempre me ajudarem.

À Coordenação de Pós-graduação em Medicina Tropical e aos funcionários do departamento de ensino. Aos professores da Pós-graduação em Medicina Tropical que através do conhecimento transmitido, enriqueceram a minha formação.

Aos amigos de MedTrop pela amizade e apoio: Daiane, Fernando, Geane, Kelly, Luciana, Priscila, Lívia e Vinicius.

Aos amigos do laboratório de hanseníase pela amizade, ajuda nos experimentos e por tornar os meus dias mais agradáveis: Andressa, Ariane, Daniel Serra, Danielle, Eliane, Jô, Luciana, Mayara, Paulinha, Priscila, Rafael, Rhana, Tamires, Tatiana Fulco e Verônica. Ao Daniel Pedrosa por fazer nosso horário de almoço mais feliz.

Às alunas de iniciação científica que passaram por esse projeto: Larissa, Raquel e Renata. A todos os demais amigos do departamento pelo carinho e amizade.

Aos membros do Laboratório de Patologia da hanseníase por toda ajuda e pela amizade, em especial a Helen, Vânia e ao Dr. Sérgio Antunes.

À Dr<sup>a</sup>. Luciana Rodrigues e ao Dr. Flávio Lara pela ajuda durante a tese, assim como aos demais membros do LAMICEL pela amizade.

À Dr<sup>a</sup>. Suzana Côrte-Real Faria e a Vanessa Álvaro Diniz por todo suporte com a microscopia eletrônica. Ao Rômulo da Plataforma de ME por me “apresentar” o JEOL e por toda ajuda sempre que precisei.

Ao CNPq e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

Aos amigos do CAD pelo apoio e amizade: Alexandre, Cláudia, Luiz, Neide e Renata.

À minha mana Rachel por sempre estar do meu lado nos momentos alegres e tristes, e por cuidar do meu computador todas as vezes que ele não queria trabalhar durante a dissertação.

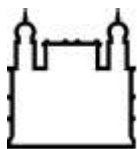
À minha mãe, minha tia e ao meu tio por todo amor, carinho, paciência e incentivo acadêmico. Sem seus exemplos, dedicação e esforços eu não teria conseguido.

Aos meus filhotes pelo carinho e fonte de inspiração: Alemão, Bigode, Cabeção, Chiquinha, Cigano, Galinho, Kiko, Macumbinha, Whippet e a todos os outros que me deram o prazer de sua companhia nesta vida.

À Deus pela força e presença constante em mim.

**Muito obrigado!**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

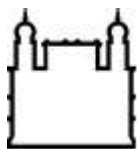
### PAPEL DA AUTOFAGIA NA RESPOSTA IMUNE AO *Mycobacterium leprae*

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Bruno Jorge de Andrade Silva**

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que pode se manifestar em diferentes formas clínicas e há evidências de que o estabelecimento das diferentes formas clínicas seja direcionado por mecanismos inatos da resposta imune. Os macrófagos de pacientes tuberculoides (BT) e lepromatosos (LL) parecem ter um comportamento diferente em relação à bactéria. Enquanto nos pacientes LL são encontrados macrófagos altamente parasitados, em BT poucos ou raros bacilos são encontrados. O IFN $\gamma$  é capaz de ativar diversos mecanismos microbicidas nos macrófagos, entre eles a autofagia. Estudos de microscopia eletrônica demonstraram a presença de fagossomos com dupla membrana em macrófagos expostos ao *M. leprae*, o que sugere um possível envolvimento da autofagia na modulação da resposta. No presente estudo foi avaliado o papel da autofagia na resposta imune ao *M. leprae* através de estudos utilizando a linhagem monocítica THP-1, monócitos de indivíduos saudáveis e macrófagos de pacientes LL e BT. A análise ultraestrutural de lesões de pele de pacientes LL e BT mostrou haver um número maior de autofagossomos em células de lesão de paciente BT quando comparado aos de LL e tecido normal. A análise por imunoperoxidase ou *Western blotting* revelou uma maior expressão tecidual do marcador de autofagossomos LC3 nos pacientes BT, quando comparados aos LL. Adicionalmente, foi observado um aumento na expressão de LC3 em macrófagos obtidos *ex vivo* de paciente BT, na presença ou não de IFN $\gamma$ . A estimulação com o *M. leprae* foi capaz de induzir a autofagia nos macrófagos THP-1, mas não de forma dose dependente. O tratamento com IFN $\gamma$  em células previamente estimuladas com o *M. leprae* foi capaz de aumentar a expressão de LC3 em relação aos estímulos sozinhos, ou ao controle, em monócitos e macrófagos THP-1. O pré-tratamento com os inibidores autofágicos wortmanina ou 3-metiladenina foi capaz de reduzir a expressão de LC3 induzida por IFN $\gamma$ . O IFN $\gamma$  promoveu a co-localização *M. leprae*-LC3 nos macrófagos, mas não na presença da wortmanina. Em adição, na presença de ambos IFN $\gamma$  e *M. leprae*, houve uma maior expressão de Atg3, a enzima responsável pela lipidação de LC3. A indução de autofagia com IFN $\gamma$  foi capaz de aumentar a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12p40 e TNF em macrófagos THP-1. O IFN $\gamma$ , em células previamente estimuladas com o *M. leprae*, foi capaz de aumentar a secreção de IL-15 em relação aos estímulos sozinhos ou ao controle, mas não a secreção de IL-10. O bloqueio da autofagia com 3-metiladenina levou à redução dos níveis de IL-15 em resposta ao estímulo com IFN $\gamma$  e *M. leprae*, mas também não afetou a produção de IL-10. Adicionalmente, o tratamento com IFN $\gamma$  foi capaz de reduzir o percentual de associação do *M. leprae* aos macrófagos THP-1. Em conjunto, esses dados indicam que em macrófagos estimulados com *M. leprae*, a citocina IFN $\gamma$  induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-15, que contribuem para o aumento da atividade microbicida da célula hospedeira através da indução de autofagia. Tais achados podem contribuir para a maior compreensão dos mecanismos associados à imunopatogênese da hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PAPEL DA AUTOFAGIA NA RESPOSTA IMUNE AO *Mycobacterium leprae*

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Bruno Jorge de Andrade Silva**

Leprosy is a chronic infectious disease that can present different clinical forms and there is evidence that the establishment of different clinical forms is driven by host innate mechanisms. Macrophages from tuberculoid (BT) and lepromatous (LL) patients seem to have a different behavior in relation to the bacteria. While in LL patients there are highly infected macrophages, in BT rare or few bacilli are found. IFN $\gamma$  can activate various microbicidal mechanisms in macrophages, including autophagy. Electron microscopy studies showed the presence of phagosomes with double membrane in macrophages exposed to *M. leprae*, suggesting a possible involvement of autophagy in the immunomodulatory response. In the present study we evaluated the role of autophagy in the immune response to *M. leprae* through studies using the THP-1 monocytic cell line and monocytes from healthy subjects and LL and BT macrophages. Ultrastructural analysis of skin lesions of LL and BT patients showed a higher number of autophagosomes in cells from skin lesions of BT patient compared to LL patient or normal tissue. Immunoperoxidase or Western blotting analysis revealed a greater tissue expression of the autophagosome marker LC3 in BT patients when compared with LL. Additionally, there was an increase on LC3-punctae expression in *ex vivo* macrophages from BT patient, in the presence or absence of IFN $\gamma$ . *M. leprae* stimulation induced autophagy in THP-1 macrophages but not in a dose dependent manner. IFN $\gamma$  treatment in *M. leprae*-stimulated cells increased LC3-punctae expression compared with stimuli alone or non-stimulated monocytes and THP-1 macrophages. The pre-treatment with autophagic inhibitors wortmannin or 3-methyladenine was able to reduce IFN $\gamma$ -induced LC3 expression. IFN $\gamma$  treatment promotes *M. leprae*-LC3 colocalization in THP-1 macrophages, but did not in the presence of wortmannin. In addition, in the presence of both IFN $\gamma$  and *M. leprae*, there was a higher expression of Atg3, the enzyme responsible for LC3 lipidation. Autophagy induction with IFN $\gamma$  increased the secretion of proinflammatory cytokines IL-6, IL-12p40 and TNF in THP-1 macrophages. IFN $\gamma$  treatment in *M. leprae*-stimulated cells was able to increase IL-15 secretion in relation to non-stimulated cells, but not IL-10. Autophagic blockage by 3-methyladenine led to decreased IL-15 levels in response to stimulation with IFN $\gamma$  and *M. leprae*, but did not affect the IL-10 production. In addition, IFN $\gamma$  treatment led to reduction on macrophage-*M. leprae* association. Together, these data indicate that in *M. leprae*-stimulated macrophages, IFN $\gamma$  induces the production of proinflammatory cytokines including IL-15, which contribute to host cell increase in microbicidal activity by autophagy induction. These findings may contribute to a better understanding of the mechanisms associated with leprosy immunopathogenesis.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

3-MA - 3-metiladenina	CaMKK - Quinase dependente de $Ca^{2+}$ /calmodulina quinase
4E-BP1 - Fator eucariótico de iniciação traducional 4E - proteína de ligação 1	CD - Grupamento de diferenciação
A - Adenina	CFP-10 - Antígeno de filtrado de cultura de 10 kDa
AEC - 3-amino-9-etilcarbazol	CFU - Unidades formadoras de colônias
AF - Autofagossomo	CO <sub>2</sub> - Dióxido de carbono
AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida	Coro1a - Coronina 1a
Akt - Cepa Ak de camundongos, associada a um retrovírus “transformante”. Também pode ser chamada de Proteína quinase B	COX - Ciclooxygenase
AMBRA1 - Molécula ativadora na autofagia regulada por beclina-1	CR - Receptores de complemento
AMP - Monofosfato de adenosina	CS - Células de Schwann
AMPK - Proteína quinase ativada por AMP	CXCL10 - Quimiocina 10 contendo motivo C-X-C
APC - Células apresentadoras de antígenos	CYP27b1- Citocromo P450, família 27, sub família B, polipeptídeo 1
APMA - Ativação Autofágica de Macrófagos	DAMP - Padrões moleculares associados à perigo
ATG - Genes relacionados com a autofagia	DAPI - 4,6 diamidino-2-fenilindol
Atg - Proteínas relacionadas com a autofagia	DC-SIGN (ou CD209) - Molécula de adesão intercelular 3 específica de células dendríticas-não ligante de integrinas
ATP - Trifosfato-5' de adenosina	DFCP1 - Proteína 1 contendo duplo FYVE
BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente	DMSO - Dimetilsulfóxido
BB - “Borderline borderline”	DTT - Ditioneitol
BCG - <i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo de Calmette-Guérin	E2 - Enzima do sistema ubiquitina
Bcl-2 - Proteína recombinante Linfoma de células B 2	EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético
BD - Bactérias degeneradas	EGTA - Ácido etilenoglicoltetraacético
Bfl-1/A1 (ou BCL2A1) - Proteína relacionada ao gene de Bcl-2 expressa no fígado fetal	Eis - Gene que “Reforça a sobrevivência intracelular” de Mtb
BL - “Borderline” lepromatoso	ELISA - Ensaio Imunoenzimático
BSA - Albumina sérica bovina	ENH - Eritema nodoso hansênico ou reação tipo 2
BT - “Borderline” tuberculóide	ER - Retículo endoplasmático
	Erk - Quinase regulada por sinal extra
	ESAT-6 - Alvo antigênico de secreção inicial de 6 kDa
	ETZ - Zona transparente eletrondensa

Exo84 - Subunidade de 84 kDa do complexo exocítico

FasL - Ligante de Fas

FIP200 - Proteína de interação com ULK

FKBP12 - Proteína ligadora de FK506 (ou Tacrolimus)

FOXO3 - “Forkhead box” O3

G - Guanina

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GAS - Sítio de ativação de IFN $\gamma$

GBP - Proteína de ligação à guanilato

GERL - Golgi-Reticulo Endoplasmático-Lisossomos

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

GTP - Guanosina trifosfato

GTPase - Guanosina 5' trifosfatases induzidas por IFN

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

HCl - ácido clorídrico

HLA-DR - Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR

IB - Índice baciloscópico

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1

IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN - Interferon

IFN $\gamma$ R1 - Cadeia de ligação do ligante (ou cadeia  $\alpha$ ) do receptor de IFN $\gamma$

IFN $\gamma$ R2 - Cadeia acessória (ou cadeia  $\beta$ ) do receptor de IFN $\gamma$

IFNG - Gene de IFN $\gamma$

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

IL-12p40 e p70 - Subunidades p40 e p70 da IL-12

IL-2R - Receptor de IL-2

IP-10 - Proteína 10-induzida por IFN $\gamma$

IRF - Fator regulador de IFN

IRGM - Família de GTPase relacionada à imunidade

ISGF - Complexo fator gênico estimulado por IFN

ISRE - Elemento de resposta estimulado por IFN

Jak - Quinases da família Janus

JNK - Quinase c-jun NH2-terminal

kDa - Quilodáton

LAM - Lipoarabinomanana

LAMP-2 - Proteína de membrana-2 associada ao lisossomo

LC3 (Atg8) - Cadeia leve 3 complexada com as proteínas associadas aos microtúbulos 1A e 1B

LKB1 - Quinase B1 do fígado

LL - Lepromatosa Lepromatosa

LPS - Lipopolissacarídeo

LRG-47 - GTPase de 47 kDa induzida por IFN $\gamma$

M - Molar

M1 - Macrófagos inflamatórios

M2 - Macrófagos antiinflamatórios

MB - Multibacilares

MCF-7 - Fundação de Câncer de Michigan 7, linhagem de câncer de mama

M-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos

MD - Mitocôndria danificada

MDT - Multidrogaoterapia

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

ML - *Mycobacterium leprae*

mLST8 - mTORC subunidade LST8

mm - Milímetro

mM - Milimolar

MOI - Multiplicidade de infecção

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

mTOR - Alvo da rapamicina nos mamíferos

mTORC - Complexo mTOR

MΦs - Macrófagos

N - Núcleo

N.E. - Não estimulado

NaCl - Cloreto de Sódio

NaF - Fluoreto de sódio

NALP3 - Família de receptores do tipo NOD, contendo o domínio 3 pirina

NaOH - Hidróxido de Sódio

NBR1 - Proteína vizinha ao gene BRCA1

NDP52 - Proteína de antígeno nuclear 52 kDa ou proteína de domínio nuclear 10

NF-κB - Fator nuclear κB

NK - Células matadoras naturais

nM - Nanomolar

NO - Óxido nítrico

NOD - Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo

NOS2 (ou iNOS) - Óxido nítrico sintase induzida

NP - Forma neural pura

Nramp1 - Proteínas de macrófagos associadas à resistência natural

NTM - Micobactérias não tuberculosas

OsO<sub>4</sub> - Tetróxido de ósmio

oxLDL - Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas

p47 - Família de GTPases relacionadas à imunidade de 47 kDa

p62 - Sequestrassomo 1/SQSTM1

PA - Peptídeos antimicrobianos

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

PB - Paucibacilares

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Salina tampão fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PD-1 - Morte programada 1

PE - Fosfatidiletanolamina

PFA - Paraformaldeído

PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E2

PGL-1 - Glicolípido fenólico-1

phox (gp91) – Glicoproteína 91 kDa que forma a NADPH oxidase flavocitocromo b558

PI - Fosfatidilinositol

PI3K - Fosfatidilinositol 3-quinase

PI3KC - Complexo PI3K de classe III

PIKK - Superfamília de quinases relacionadas à PI3K

PMA - Acetato-13 de forbol miristato-12

PN - Pele normal

PRK - Proteína quinase dependente de RNA

PTEN - Fosfatase e angiotensina homólogo

RalB - Proteína relacionada a Ras

Raptor - Proteína regulatória associada ao mTOR

RHEB - Homólogo de Ras enriquecido em cérebro

rhuIFNγ - IFNγ recombinante humano

Rictor - Companheiro de mTOR não sensível a rapamicina

RIG-I - Gene 1 induzido por retinóide

RLR – Receptores do tipo RIG-I

RNA - Ácido ribonucléico

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro

RP - Rapamicina

RPMI - Meio do Instituto Memorial Roswell Park

RR - Reação reversa ou reação tipo 1

Rubicon - Domínio RUN, rico em cisteína, contendo interação com beclina 1

S - Serina

S6K - Proteína ribossomal p70-quinase S6

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SLR - Receptores do tipo sequestassoma p62/SQSTM1

SNP - Polimorfismo de base única

SR - Receptores “scavenger”

Src - Sarcoma/Proto-oncogene proteína tirosina quinase

Stat - Transdutor de sinal e ativador da transcrição

T - Timina

TACO (ou Coro1a) - Proteína triptofano-aspartato contendo capa protéica

TBK1 - Quinase 1 de ligação a TANK

TBS - Tampão tris salino

TCR - Receptores de célula T

TGF- $\beta$ 1 - Fator de transformação do crescimento  $\beta$ 1

Th - Célula T auxiliar

THP-1 - Linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana

Tir - Tirosina

TLR - Receptores semelhantes ao Toll (de *Drosophila melanogaster*)

TNF - Fator de necrose tumoral

TSC - Complexo da esclerose tuberosa

TT - Tuberculóide

Tyk - Tirosina quinase

U - Unidade internacional

ULK - Família similar a Unc-51

UVRAG (VPS38) - Gene associado à resistência à irradiação UV

VDR - Receptor de vitamina D3

VLIG - Grandes GTPases induzíveis

VMP1 - Proteína de membrana de vacúolo 1

VPS - Proteína vacuolar associada à separação

WIPI - Domínio de repetição WD, interação a fosfoinosítídeo

Wort - Wortmanina

x g - velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E ANEXOS

<b>Figura 1.1:</b> Fotomicrografia de lesão de pele de um paciente multibacilar, mostrando os bacilos corados em vermelho.	<b>2</b>
<b>Figura 1.2:</b> Taxas de prevalência de hanseníase no mundo.	<b>4</b>
<b>Figura 1.3:</b> Representação esquemática do espectro clínico na hanseníase.	<b>7</b>
<b>Figura 1.4:</b> Modelo de divergência dos macrófagos na polarização da hanseníase.	<b>15</b>
<b>Figura 1.5:</b> A via de sinalização através do complexo entre IFN $\gamma$ e seu receptor.	<b>17</b>
<b>Figura 1.6:</b> Autofagossomos: estruturas de dupla membrana características da autofagia.	<b>22</b>
<b>Figura 1.7:</b> Modelo esquemático simplificado da autofagia (macroautofagia).	<b>25</b>
<b>Figura 1.8:</b> Ensaios de monitoração da autofagia através de LC3.	<b>26</b>
<b>Figura 1.9:</b> Autofagia no modelo de tuberculose.	<b>31</b>
<b>Figura 1.10:</b> Microscopia eletrônica mostrando a presença de vacúolos de dupla membrana contendo <i>M. leprae</i> .	<b>33</b>
<b>Figura 4.1:</b> Presença de autofagossomos em lesões de pele de pacientes com hanseníase.	<b>46</b>
<b>Figura 4.2:</b> Redistribuição de LC3 em lesões de pele de pacientes com hanseníase.	<b>48</b>
<b>Figura 4.3:</b> Aumento da expressão proteica da forma associada ao autofagossomo LC3-II em lesões de pele de pacientes BT.	<b>49</b>
<b>Figura 4.4:</b> Aumento da expressão de LC3-II em macrófagos de lesões de pele de pacientes BT.	<b>51</b>
<b>Figura 4.5:</b> A estimulação com <i>M. leprae</i> induz a autofagia em macrófagos THP-1.	<b>53</b>
<b>Figura 4.6:</b> O IFN $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em monócitos estimulados com o <i>M. leprae</i> .	<b>55</b>
<b>Figura 4.7:</b> O IFN $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i> .	<b>56</b>
<b>Figura 4.8:</b> O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de LC3-II em monócitos estimulados com o <i>M. leprae</i> .	<b>58</b>

<b>Figura 4.9:</b> O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de LC3-II em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i> .	<b>60</b>
<b>Figura 4.10:</b> O IFN $\gamma$ induz a co-localização do <i>M. leprae</i> com LC3 em macrófagos THP-1.	<b>61</b>
<b>Figura 4.11:</b> O IFN $\gamma$ aumenta a expressão proteica de LC3-II em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i> .	<b>62</b>
<b>Figura 4.12:</b> O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i> .	<b>64</b>
<b>Figura 4.13:</b> O IFN $\gamma$ aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i> , mas não a de IL-10.	<b>66</b>
<b>Figura 4.14:</b> O IFN $\gamma$ reduz o percentual de associação <i>M. leprae</i> -macrófago.	<b>67</b>
<b>Anexo 1.1:</b> Principais dados na literatura associando autofagia e micobacterioses.	<b>100</b>



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES E ANEXOS</b>	<b>xv</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. A Hanseníase	1
1.1.1. Agente Etiológico	1
1.1.2. Epidemiologia	2
1.1.3. Aspectos clínicos	4
1.1.4. Resposta imunológica na hanseníase	8
<b>1.2. Interação do <i>M. leprae</i> com as células do hospedeiro</b>	<b>10</b>
1.2.1. Interação do <i>M. leprae</i> com as células da resposta imune inata e adaptativa	10
1.2.2. A Fagocitose do <i>M. leprae</i>	13
<b>1.3. Os Interferons (IFNs)</b>	<b>15</b>
1.3.1. Papel do IFN $\gamma$ na hanseníase	18
<b>1.4. Autofagia</b>	<b>20</b>
1.4.1. Mecanismo de execução da autofagia	22
1.4.2. A Autofagia e o sistema imune	26
1.4.3. A Autofagia e Patologias	28
1.4.4. A Autofagia e os processos infecciosos	28
1.4.5. A Autofagia e a regulação da sobrevivência de micobactérias	29
<b>2. Objetivos</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
<b>3. Material e métodos</b>	<b>36</b>
3.1. Biossegurança e permissão ética	36
3.2. Cultura celular de monócitos THP-1 e diferenciação para macrófagos-“like”	36
3.3. Coleta de sangue, processamento e obtenção de PBMC e monócitos	37
3.4. Autofagia: indução e inibição	37

3.5. Obtenção e utilização do <i>M. leprae</i>	37
3.6. <i>M. leprae</i> fluorescente	38
3.7. Imunoperoxidase	38
3.8. Western “blotting”	39
3.9. Isolamento de macrófagos de lesões de pele	40
3.10. Imunofluorescência	41
3.11. Microscopia eletrônica de transmissão	42
3.12. Dosagem de citocinas	43
3.13. Avaliação do percentual de associação do <i>M. leprae</i> aos macrófagos	44
3.14. Análise estatística	44
<b>4. Resultados</b>	<b>45</b>
4.1. Análise dos aspectos ultraestruturais em biópsias de lesão de pele de pacientes com hanseníase.	45
4.2. Análise da redistribuição de LC3 em lesões de pele de pacientes com hanseníase	47
4.3. Análise da expressão de LC3 em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase	49
4.4. A estimulação com o <i>M. leprae</i> induz a autofagia em macrófagos THP-1	52
4.5. O IFN $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em monócitos e macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i>	54
4.6. O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de LC3 em monócitos e macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i>	57
4.7. O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i>	63
4.8. O IFN $\gamma$ aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1 estimulados com o <i>M. leprae</i>	65
4.9. O IFN $\gamma$ reduz a associação do <i>M. leprae</i> aos macrófagos THP-1	67
<b>5. Discussão</b>	<b>68</b>
<b>6. Conclusões e Perspectivas</b>	<b>77</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b>	<b>78</b>

## **1. Introdução**

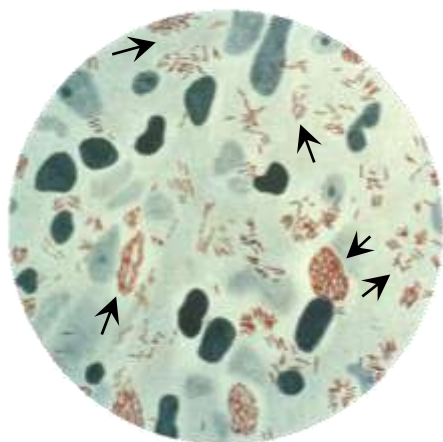
### **1.1. A Hanseníase**

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos (Lockwood 2004). A rota de transmissão da hanseníase ainda não está definitivamente comprovada, mas acredita-se que seja através das vias respiratórias, embora não seja descartada a possibilidade de infecção via lesões de pele. Porém, órgãos internos podem ser afetados quando a enfermidade não é controlada (Jopling 1982). A doença apresenta um longo período de incubação e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois a dez anos após a infecção. O *Mycobacterium leprae* (ML) tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas, no entanto, só poucas adoecem. Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente à infecção pelo ML e não apresente sintomas clinicamente detectáveis (Godal et al. 1972).

#### **1.1.1. Agente Etiológico**

O ML (Figura 1.1), agente causador da hanseníase, é um patógeno intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann (CS) (Bloom 1986). Possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado de 1,5 a 8,0 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool ácido, sendo portanto um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Rees 1984). É uma bactéria de crescimento lento, fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias (WHO 1987). Compartilha algumas características com outras micobactérias como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em sua parede celular. Além disso, mais externamente estão localizados glicolipídeos, como o glicolipídeo fenólico-1 (PGL-1), encontrado exclusivamente no ML. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico (Hunter & Brennan 1981). Estudos anteriores já mostraram que o PGL-1 pode ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares, possibilitando sua utilização no diagnóstico da hanseníase (Cho et al. 1983). Além disso, ele também foi detectado em tatus infectados com o ML (Hunter et al. 1985). Este antígeno não apresenta reação cruzada com *M. tuberculosis* (Mtb) ou outras

microbactérias e estimula uma potente resposta de anticorpos da classe IgM, que é proporcional à carga bacteriana nos pacientes (Cho et al. 1983).



**Figura 1.1:** Fotomicrografia de lesão de pele de um paciente multibacilar, mostrando os bacilos corados em vermelho (setas) e as células coradas em azul. Fonte: Universidade de Stanford

<<http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2005/Leprosy/bio.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2011.

Desde sua descoberta em 1873 por Armauer Hansen, todas as tentativas para cultivar este microorganismo falharam (Hansen 1874). Entretanto, em 1962 foi demonstrado por Shepard que o coxim plantar de camundongos infectados com  $10^3$  a  $10^4$  bacilos promovia uma lesão localizada de hanseníase durante 9 a 12 meses (Shepard 1962). Outra fonte de ML utilizada para estudos é o tatu nove bandas (*Dasypus novencinctus*). Ele permite o crescimento do bacilo de forma disseminada durante 18 a 24 meses comprometendo pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Após a purificação, os bacilos podem ser usados vivos por até uma semana ou letalmente irradiados (Kirchheimer & Storrs 1971).

O genoma do ML foi completamente sequenciado em 2001 e gerou grande expectativa sobre o conhecimento de sua funcionalidade na patogênia da hanseníase. Apenas 49,5% do genoma do ML (1.605 genes) contém genes que codificam proteínas, sendo o restante constituído de pseudogenes ou genes degenerados (Cole et al. 2001). Quando comparado ao Mtb, percebe-se a perda de um grande número de genes pelo ML, muitos dos quais seriam importantes para o crescimento e reprodução bacteriana, o que poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua incapacidade de multiplicação *in vitro* (Vissa & Brennan 2001).

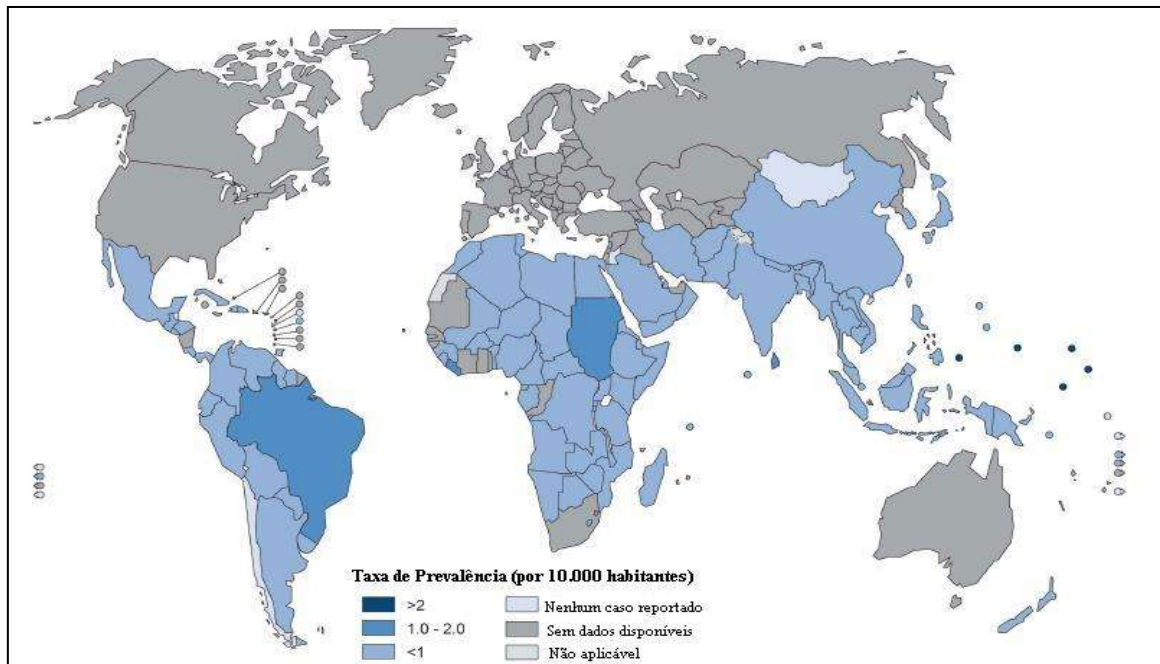
### 1.1.2. Epidemiologia

A hanseníase é a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infecto-contagiosas. A maneira mais eficaz de prevenir as complicações decorrentes da

hanseníase se dá através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, antes de ocorrerem lesões nervosas. A doença e as deformidades a ela associadas são responsáveis pelo estigma social e pela discriminação contra os pacientes e suas famílias em muitas sociedades. A erradicação da doença, porém, parece distante, pelo menos em alguns países. No Brasil, em 2007, a doença teve taxa de detecção de 2,3 novos casos a cada 10 mil habitantes, bem abaixo dos 19,5 casos de 1990 e dos 4,52 casos de 2004, mas ainda quase três vezes maior que o índice aceito pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de menos de um caso a cada 10 mil habitantes. O país é responsável por 90% dos casos no continente americano e continua em primeiro lugar na classificação mundial de novos casos por 100 mil habitantes (Machado 2008, WHO 2008).

Outro indicador relevante é a proporção de crianças entre os novos casos detectados. No ano de 2006, o Brasil apresentou um coeficiente de detecção em menores de 15 anos de 0,70/10.000 habitantes, considerado muito alto segundo os parâmetros nacionais (1,0 a 0,5/10.000 habitantes). No estado de Rio de Janeiro, neste mesmo ano, este coeficiente foi de 0,40/10.000 habitantes, considerado alto segundo os parâmetros estaduais (0,5 a 0,25/10.000 habitantes). A detecção da doença em menores de quinze anos é indicador de alta endemicidade e de transmissão recente da infecção (Machado 2008).

Estima-se a ocorrência de  $\pm$  200 mil casos de hanseníase em todo o mundo e que sejam registrados 250.000 novos casos por ano (Britton & Lockwood 2004, Rodrigues & Lockwood 2011). A prevalência global de hanseníase no primeiro trimestre de 2011 foi de 192.246 casos e 228.474 novos casos foram detectados durante o ano de 2010 (WHO 2011a). No Brasil foram detectados 34.894 novos casos em 2010, a menor taxa de incidência dos últimos 6 anos, mostrando uma redução de quase 15.000 casos quando comparado ao ano de 2004. Em 2011 foram detectados 29.761 casos no Brasil até o final do primeiro trimestre (WHO 2011a). Índia, Brasil, Indonésia, Sudão, Madagascar, Moçambique, Nepal entre outros são os países mais endêmicos do globo, sendo responsáveis por 83% dos casos registrados e 95% dos casos novos no mundo (Britton & Lockwood 2004, WHO 2011a). No Brasil, os estados das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste detêm o maior número de doentes. Em alguns municípios do estado do Maranhão e do Pará os índices são alarmantes, chegando a 50 casos para cada 10 mil habitantes (Machado 2008). As taxas de prevalência de hanseníase em níveis mundiais são mostradas na Figura 1.2.



**Figura 1.2: Taxas de prevalência de hanseníase no mundo.** Dados notificados à OMS a partir do início de janeiro de 2011. Fonte: adaptado de WHO 2011a.

Desde 1982 quando a multidrogaterapia (MDT) foi introduzida, observou-se uma redução significativa da prevalência da hanseníase, com cerca de 85% de cura. Em conjunto, mais de 14,5 milhões de pacientes foram curados através da MDT e cerca de 2 milhões de pacientes não chegaram a desenvolver incapacidades físicas. No entanto, o número de casos globais ainda tem se mantido alto e, a OMS tem atribuído essa baixa redução a vários fatores, como os esforços na detecção de novos casos, a alta transmissão em certas áreas onde existam pacientes assintomáticos, porém transmissores da doença, resistência aos antimicrobianos, ou ainda a reincidência de casos tratados (WHO 2008, Rodrigues & Lockwood 2011).

### 1.1.3. Aspectos clínicos

A hanseníase se manifesta segundo um espectro de formas clínicas resultante do grau de resposta imune celular desenvolvida por cada indivíduo contra o ML. Portanto, a classificação correta dos pacientes é de extrema importância para determinar o tratamento adequado da doença.

Existem dois sistemas principais utilizados para classificar os pacientes com hanseníase. De acordo com Ridley e Jopling (1966), os pacientes com hanseníase são classificados em cinco subgrupos de acordo com os critérios clínicos, bacteriológicos e,

principalmente, imunológicos e histopatológicos. Em um pólo desse espectro clínico são encontrados os pacientes tuberculoide (TT), que na maioria das vezes desenvolvem apenas uma lesão com pequeno número de bactérias. Estes pacientes apresentam baixos níveis de anticorpos específicos, mas resposta imune celular eficiente, que é responsável pela restrição do crescimento do patógeno. No outro pólo, os pacientes lepromatosos (LL) apresentam doença disseminada, com inúmeras lesões contendo um alto número de bactérias. Estes pacientes apresentam altos níveis de anticorpos e ausência de resposta imune celular detectável. Além das formas polares, existem formas intermediárias denominadas “borderline”: “borderline” tuberculoide (BT), “borderline borderline” (BB) e “borderline” lepromatosa (BL). Nestes casos, a resposta imune celular é maior de acordo com a proximidade ao pólo tuberculoide. A medida padrão da imunidade mediada por células ao patógeno é a reação de Mitsuda, uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (tipo IV ou mediada por células), que é avaliada após uma injeção intradérmica de bacilos mortos aplicada nos pacientes, cuja duração é medida após 3 a 4 semanas (Narayan et al. 2001). O teste de Mitsuda é positivo quando forma-se infiltração nodular maior que 5 mm de diâmetro ou quando o infiltrado ulcera e, é negativo quando há ausência de reação. A outra classificação bem mais simplificada, a de 1982 da OMS (WHO 1982), tem como base o índice baciloscópico (IB) ou o número de lesões. São considerados pacientes paucibacilares (PB) aqueles com até cinco lesões ou IB=0 e multibacilares (MB) aqueles com mais de 6 lesões ou IB>0. Na classificação de Ridley e Jopling, pacientes paucibacilares incluem pacientes TT e BT, enquanto pacientes multibacilares incluem pacientes BB, BL e LL (Figura 1.3) (WHO 1987).

Existe ainda outra classificação muito utilizada na prática clínica, a de 1953, de Madri. Esta também leva em conta as características clínicas da doença, acrescidas dos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo assim os grupos polares tuberculoide e virchoviano (ou lepromatoso), a forma indeterminada e o grupo instável e intermediário, a forma dimorfa (Languillon & Carayon 1986).

A manifestação inicial da doença pode ser a forma clínica indeterminada, onde a resposta do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. Esta pode evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos da doença estabelecida dentro do espectro, dependendo da sua capacidade em montar uma resposta imune celular contra o ML. Normalmente, pessoas com Mitsuda positivo tendem a desenvolver a forma tuberculoide e as pessoas com Mitsuda negativo têm maior probabilidade de desenvolver a forma clínica lepromatosa. O tratamento dos pacientes com hanseníase é realizado com a MDT. Para

pacientes multibacilares, cujo tratamento dura um ano, são utilizados rifampicina (600 mg, uma dose por mês), clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia) e dapsona (100 mg por dia). Para pacientes paucibacilares, somente rifampicina e dapsona são empregados por um período de seis meses (Hastings 1998).

Outra característica marcante da hanseníase é o desenvolvimento de episódios reacionais. Estes episódios podem ser definidos como manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante, o ML. Esses episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade das funções dos nervos periféricos. Os episódios reacionais podem se apresentar durante o curso natural da doença, durante o tratamento e até mesmo após a alta, quando o paciente é considerado curado (Naafs 1994). Dois tipos de reações são conhecidos: a reação reversa (RR) ou reação tipo 1, que ocorre nos pacientes “borderline”, e o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação tipo 2, que ocorre nos pacientes multibacilares. Clinicamente, a RR se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele, nervo ou ambas, bem como pelo aparecimento de novas lesões (Jih et al. 2002). Além disso, edema nas mãos, pés e face também podem ser uma característica da reação, mas sintomas sistêmicos, como febre, são incomuns. O aumento do processo inflamatório nos nervos compromete a função nervosa e, se não for tratada rápida e adequadamente, leva à perda permanente dessa função, causando neuropatia periférica sensorial e motora. A RR é frequentemente recorrente e isso pode conduzir a um maior dano nervoso (van Brakel et al. 1994). Além disso, há um aumento do número de receptores de interleucina (IL)-2 (IL-2R) nas células imunocompetentes, assim como dos níveis de RNAm de IL-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF), IL-2 e interferon (IFN) $\gamma$ . Entretanto, há um decréscimo dos níveis de outras citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-10, dando suporte à hipótese de aumento de resposta imune mediada por células (Yamamura et al. 1991).

O ENH é uma complicação imunológica da hanseníase que acomete cerca de 50% dos pacientes lepromatosos e 10% dos pacientes “borderline” lepromatosos (Pocaterra et al. 2006). O risco de se desenvolver o ENH é maior quanto maior forem o IB e o infiltrado inflamatório presentes na lesão (Manandhar et al. 1999). As lesões cutâneas podem apresentar-se como eritematosas, pápulas ou nódulos que podem ser superficiais ou profundos. Clinicamente, o ENH é caracterizado por sintomas sistêmicos, como febre alta, mal estar, edema da face, mãos e pés (Pfaltzgraff & Ramu 1994). A neurite também pode ser observada nesses pacientes, porém, é muito mais branda do que o observado na RR. Tem sido mostrado que durante o ENH há um aumento seletivo na expressão de RNAm de IL-6, IL-8 e



IL-10 nas lesões, assim como aumento dos níveis de citocinas como TNF, IL-12p70 e IL-12p40 nas lesões (Yamamura et al. 1991, Barnes et al. 1992, Singh et al. 1994). Entretanto, não há consenso sobre o envolvimento da imunidade celular neste tipo de reação, a despeito de terem sido demonstradas células imunocompetentes expressando IL-2R e antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR (HLA-DR) nas lesões, um indicativo da presença de IFN $\gamma$  (Modlin et al. 1988, Sampaio & Sarno 1998). A ocorrência dos episódios reacionais é considerada uma emergência clínica e o tratamento antiinflamatório precisa ser prontamente iniciado. Pacientes com RR são tratados com esteróides (prednisona a 1,0 mg/kg), enquanto pacientes ENH são tratados preferencialmente com talidomida (300 mg/dia) ou pentoxifilina (400 mg de 8 em 8 horas), associada ou não a esteróides (Ustianowski & Lockwood 2003, Walker et al. 2007). Além da neurite reacional, existe ainda outra forma de comprometimento neurológico na hanseníase, o qual precede o comprometimento dermatológico, a chamada forma Neural Pura (Figura 1.3) (Ridley & Jopling 1966, Pinheiro et al. 2011).



**Figura 1.3: Representação esquemática do espectro clínico na hanseníase.** Relação entre as formas clínicas, resposta imune, carga bacteriana, lesões de pele e episódios reacionais. TT – forma tuberculoide; BT – forma “borderline” tuberculoide; BB – forma “borderline borderline”; BL – forma “borderline” lepromatosa; LL – forma lepromatosa; PB – formas paucibacilares; MB – formas multibacilares; ENH – eritema nodoso hansênico. Fonte: própria.

#### 1.1.4. Resposta imunológica na hanseníase

O ML entra provavelmente no organismo através das vias aéreas superiores e em seguida segue para a pele e nervos periféricos através da circulação. A resposta imune específica desencadeada pela infecção pelo ML determina não só o curso da infecção, como as diversas formas clínicas da hanseníase. Embora a imunidade celular e a humoral estejam simultaneamente ativadas na hanseníase, o componente celular assume maior importância na eliminação bacilar, pois o ML é um patógeno intracelular (Sehgal et al. 1989).

Nas formas multibacilares da doença (LL, BL e BB) os pacientes são caracterizados pela ausência de imunidade celular específica contra o ML, levando a uma proliferação bacteriana descontrolada com várias lesões e com infiltração extensa na pele e nervos. Altos títulos de anticorpos anti-PGL-1 e contra antígenos proteicos específicos do ML são encontrados nesses pacientes. Eles apresentam um quadro de anergia local e as lesões são caracterizadas por macrófagos com muitos vacúolos cheios de bacilos, relação CD4/CD8 invertida (1:2), ausência de organização e diferenciação dos macrófagos para formar granuloma e atrofia da epiderme (Van Voorhis et al. 1982, Cho et al. 2001). O aspecto quiescente das lesões lepromatosas sugere que o microambiente tissular impede a migração e o acúmulo de linfócitos, especialmente células T CD4+, visto que os linfócitos do sangue periférico nestes pacientes mantêm uma proporção de células T CD4:CD8 normal (2:1). Os mecanismos deletérios nestes pacientes envolvem tanto componentes da resposta imune celular, quanto da humoral (Van Voorhis et al. 1982, Yamamura et al. 1991, Triccas et al. 1996).

Nas formas paucibacilares da doença (TT e BT), as lesões são infiltradas predominantemente por linfócitos T CD4+ que secretam níveis altos de citocinas pró-inflamatórias, levando à formação de granulomas bem definidos, contendo células epitelióides e células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans que invadem os ramos nervosos da derme (Yamamura et al. 1992, Jullien et al. 1997, Little et al. 2001). No entanto, células com fenótipo T CD8+ também estão presentes, mas mantendo uma relação CD4/CD8 normal (Modlin et al. 1986). Ocorre a expressão de antígenos HLA-DR em queratinócitos hiperplasiados e presença de linfócitos intraepiteliais (Modlin & Rea 1988). Além disso, praticamente nenhum bacilo é encontrado nas lesões (Yamamura et al. 1992). A proliferação de células T e a produção de citocinas em resposta a antígenos do ML confirmam a forte imunidade celular desses pacientes. O teste cutâneo (Mitsuda) nesses pacientes também é positivo (García et al. 1999, Kim et al. 2001).

O padrão de resposta imune Th1 x Th2 na hanseníase foi determinado através da detecção da expressão de RNAm de citocinas na lesão de pacientes tuberculoídes e lepromatosos. Os pacientes lepromatosos apresentam um perfil predominante de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), havendo também produção dessas citocinas por células T do sangue periférico, sugerindo susceptibilidade à doença, já que estas citocinas levam à falha na ativação dos macrófagos e ineficácia da resposta imune protetora (Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991, Sieling & Modlin 1994a). A IL-10 tem sido detectada em altos níveis nesses pacientes, mostrando correlação positiva com o IB (Moubasher et al. 1998). A IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10, estimulam células B que inibem a ativação dos macrófagos resultando em infecção progressiva (Modlin 1994). Essa citocina (IL-4) também é capaz de reduzir a expressão de CD14 em monócitos, assim como a produção de IL-1 $\beta$  e TNF, bloqueando assim a geração de óxido nítrico (NO), necessário para destruição de patógenos intracelulares (Salgame et al. 1991). Em adição à IL-4, a IL-13 tem sido incluída no mecanismo de supressão de células T na hanseníase, por seus efeitos sobre células B e macrófagos, similares aos da IL-4. Tem sido demonstrado que apenas clones de células T tipo 2 de lesões lepromatosas produzem IL-13, sugerindo que essa citocina possa ter um papel na imunossupressão encontrada nesses pacientes (Sieling & Modlin 1994a, b).

A presença do fator de transformação do crescimento (TGF)- $\beta$ 1, um dos mais potentes fatores imunossupressores endógenos, foi revelada por imunohistoquímica em lesões de pacientes com hanseníase, com grande quantidade de macrófagos positivos para esta proteína no infiltrado lepromatoso e sua ausência no granuloma tuberculoide (Goulart et al. 1996, Goulart et al. 2000). O TGF- $\beta$ 1 tem ação supressora sobre macrófagos, contrapondo os efeitos do IFN $\gamma$  na ativação da atividade antimicrobiana mediada pelo NO e inibindo a produção de TNF, podendo assim contribuir para a perpetuação da infecção (Bermudez et al. 1993). Além disso, já foi demonstrado que em lesões de pacientes lepromatosos a expressão de ciclooxigenase (COX)-2 está aumentada quando comparada às lesões de pacientes tuberculoídes (Kiszewski et al. 2003). Esses dados corroboram estudos anteriores que observaram a liberação de mediadores como prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) e IL-10 por monócitos de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculoídes. Tais mediadores contribuíram para a inibição da linfoproliferação frente ao ML em indivíduos sabidamente respondedores à bactéria. A PGE<sub>2</sub> inibe a produção de IL-2 e também de IFN $\gamma$ , citocinas em geral fracamente expressas nas lesões lepromatosas, mas importantes para gerar resposta imune específica (Misra et al. 1995).

Os pacientes paucibacilares, ao contrário dos lepromatosos, possuem uma intensa resposta imune celular contra o ML, a qual limita a doença a poucas e bem definidas lesões cutâneas ou nervos lesados (Britton 2004). As lesões de pacientes tuberculoides apresentam predominantemente RNAm de citocinas do tipo Th1 (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN $\gamma$  e TNF) em comparação com as lesões de pacientes lepromatosos (Arnoldi et al. 1990, Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991, Sieling et al. 1994, García et al. 1999).

A IL-2 induz a expansão clonal de células T antígeno-específicas e aumenta a produção de IFN $\gamma$  (Kasahara et al. 1983). O IFN $\gamma$  por sua vez ativa os macrófagos, assim como aumenta a secreção de citocinas e a produção de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio, estimulando-os a matar ou restringir a proliferação de micobactérias e outros patógenos intracelulares (Kaplan et al. 1986, Rook et al. 1986, Murray 1994, Raupach & Kaufman 2001). Além disso, essa citocina também é responsável pelo aumento da expressão de HLA-DR e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que facilitam a interação das células apresentadoras de antígenos (APC) com as células T (Dustin et al. 1988). A abundância de IL-2 e IFN $\gamma$  nas lesões tuberculoides provavelmente contribui para uma maior resistência nesses pacientes, resultando em doença mais branda ou cura (Modlin 1994). Ao mesmo tempo, a produção de TNF pelos macrófagos em nível local, favorece uma ação sinérgica autócrina para manter o macrófago ativado e formar o granuloma, o qual restringe a disseminação do patógeno (Silva & Foss 1989).

## **1.2. Interação do ML com as células do hospedeiro**

### **1.2.1. Interação do ML com as células da resposta imune inata e adaptativa**

Os patógenos intracelulares sobrevivem ao escapar da resposta imune do hospedeiro e ao acessar suas vias metabólicas de modo a obterem um microambiente favorável para o seu crescimento. O ML parece ser uma das micobactérias mais dependentes das vias metabólicas do hospedeiro, incluindo lipídeos (Cruz et al. 2008). Foi demonstrado que o ML multiplica abundantemente em macrófagos ricos em colesterol (Kato 1979) e que os lipídeos de parede celular da micobactéria inibem as funções dos macrófagos, reduzindo o “burst” oxidativo e a fagocitose de macrófagos murinos. Além disso, os lipídeos de parede do ML parecem apresentar atividade antiinflamatória *in vivo* (Moura et al. 1997).

A infecção com ML leva a alterações na membrana de macrófagos que se refletem na expressão de moléculas de superfície como os ácidos siálicos. Tais alterações de membrana podem afetar a capacidade microbicida de macrófagos (Agarwal et al. 1986). Um dos principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas são os receptores do tipo “Toll” (TLR) que estão presentes na superfície de monócitos, macrófagos, entre outros tipos celulares (Brightbill et al. 1999). Além disso, esses receptores também participam da ativação do fator nuclear (NF)- $\kappa$ B que modula a transcrição de vários genes relacionados à resposta imune (Texereau et al. 2005). No caso do ML, o reconhecimento pelos TLR parece ocorrer principalmente através do heterodímero TLR2/1 para lipoproteínas triaciladas, levando à diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas (Krutzik et al. 2005) e pelo heterodímero TLR2/6 para lipoproteínas diaciladas, ativando uma resposta de citocinas inflamatórias (Montoya & Modlin 2010). A expressão de ambos TLR1 e TLR2 foi aumentada preferencialmente em lesões de pacientes BT quando comparados aos pacientes LL (Krutzik et al. 2003).

Estudos anteriores demonstraram que células T de pacientes LL em combinação com macrófagos de pacientes BT ou de contatos saudáveis, respondem bem ao ML após estímulo *in vitro*. Ao contrário, células T de pacientes BT ou contatos saudáveis em combinação com macrófagos de pacientes LL falham em responder, sugerindo que a ausência de resposta observada nos pacientes lepromatosos está associada à deficiente apresentação antigênica pelos macrófagos ou mesmo pela produção de mediadores capazes de negativamente regular o padrão da resposta imune celular resultante (Hirschberg 1978, Nath et al. 1980). A proliferação celular induzida pelo ML pode ser inibida por fatores supressores presentes no lisado de macrófagos de pacientes LL. Tal evento não é observado em macrófagos de pacientes tuberculoides e controles saudáveis (Salgame et al. 1983). Machadevan e Antia (1980) demonstraram que macrófagos provenientes de pacientes LL apresentam reduzida síntese proteica, ao contrário do observado em pacientes BT e controles saudáveis. Os macrófagos de pacientes LL apresentam ainda níveis reduzidos de ácido siálico quando comparados aos pacientes BT e indivíduos saudáveis (Agarwal et al. 1986). Cruz e colaboradores (2008) demonstraram o acúmulo de fosfolipídeos oxidados derivados do hospedeiro em lesões de pacientes LL, sugerindo que a interface existente entre o metabolismo lipídico no hospedeiro e a imunidade inata contribui para a patogênese da infecção. Uma característica importante dos macrófagos de pacientes LL é a alta quantidade de lipídeos. Recentemente foi demonstrado que o ML é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nas CS por um mecanismo dependente de TLR6, mas não de TLR2

(Mattos et al. 2011a, b). No entanto, ambos TLR2 e TLR6 parecem estar envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos pelo ML em macrófagos (Mattos et al. 2010). Os corpúsculos lipídicos induzidos pelo ML constituem sítios para a síntese de eicosanóides e podem ser reguladores críticos na subversão da resposta imune na hanseníase. Além de alterações fisiológicas, foram observadas alterações morfológicas em macrófagos de pacientes LL e BT. Enquanto os macrófagos repletos de micobactérias dos pacientes LL são caracterizados por longos processos celulares, os macrófagos de pacientes BT apresentam uma aparência arredondada e são caracterizados por muitos vacúolos intracelulares (Ridley et al. 1980). No indivíduo infectado com ML os bacilos podem ser encontrados em uma variedade de tecidos e tipos celulares (Drutz et al. 1972).

De Souza Sales e colaboradores (2011) demonstraram que macrófagos de pacientes lepromatosos apresentam elevada expressão da enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) quando comparados aos macrófagos de pacientes tuberculoides, podendo a IDO ser induzida tanto pelo ML, quanto via  $IFN\gamma$ . Esta enzima possui diversas funções biológicas e, neste caso, parece contribuir para a imunossupressão encontrada nos pacientes lepromatosos.

Dagur e colaboradores (2010) demonstraram que o ML interfere com eventos anteriores e posteriores da interação do TCR e CD28 com seus ligantes, resultando em redução na produção de IL-2 e inibição da proliferação de células T, o que pode estar associado à progressão da doença. O uso combinado de IL-2 e IL-12 recupera a resposta Th1 em linfócitos de pacientes BL e LL, o que sugere que o efeito inibitório é reversível (Sieling & Modlin 1994a, de Jong et al. 1997). Um redirecionamento similar da produção de citocinas de um perfil Th2 para Th1 foi verificado quando células dendríticas apresentam o ML para células T de pacientes LL (Nath et al. 2000). Em adição, Lopez Roa e colaboradores (2008) demonstraram que em pacientes LL é possível reverter a baixa produção de  $IFN\gamma$  *in vitro* com a adição de IL-12/IL-18 exógenos, mas os mecanismos moleculares envolvidos, bem como a relevância disso no controle da infecção não foram descritos.

Através da análise da resposta imune celular em lesões de pele na hanseníase, classes adicionais de células T recrutadas para o sítio de infecção foram identificadas, incluindo células T expressando receptores  $\gamma\delta$  e um tipo de célula T  $\alpha\beta$  duplo negativo (CD4- e CD8-) (Beckman et al. 1994, García et al. 1997, Porcelli & Modlin 1999). Estas células reconhecem antígenos não proteicos, incluindo o LAM e ácido micólico micobacterianos, os quais são apresentados por moléculas CD1 em APC, independente de MHC de classe I e II (Porcelli & Modlin 1999, Sieling et al. 2005, Torrelles et al. 2011). As proteínas CD1 são altamente

expressas nas células dendríticas nos granulomas dérmicos de pacientes TT, mas o mesmo perfil não acontece em lesões de pacientes lepromatosos, o que sugere que as células T restritas ao CD1 contribuem para o controle do patógeno (Sieling et al. 1995, 1999).

Cree e colaboradores (1987) descreveram a presença de células apoptóticas no granuloma de lesões de pacientes lepromatosos e tuberculoides. Posteriormente foi observado que 56% das biópsias de pacientes paucibacilares e 20% das biópsias de pacientes multibacilares apresentavam células em apoptose. Em adição, nas lesões de paucibacilares as células em apoptose foram identificadas como linfócitos T (Walsh et al. 2004). Outro trabalho demonstrou que nas lesões de pacientes paucibacilares o número de células CD68<sup>+</sup> (macrófagos) em apoptose é maior do que nas lesões de pacientes multibacilares (Cruz et al. 2008). Foi ainda demonstrado que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hanseníase apresentam elevada apoptose *in vitro* em resposta ao ML, quando comparadas aos controles (Gupta et al. 1999). Mediadores como FasL e os membros da família Bcl-2 podem estar envolvidos na indução e/ou manutenção do processo ativo de morte celular *in vitro*. Mustafa e colaboradores (2001) observaram que macrófagos de pacientes com hanseníase e tuberculose tinham uma alta expressão de FasL, indicando que infecções micobacterianas podem induzir a expressão desta molécula em uma população de macrófagos infectados, fazendo com que eles possam se proteger dos ataques de linfócitos T citotóxicos.

### **1.2.2. A Fagocitose do ML**

Estudos anteriores demonstraram que o ML é internalizado por projeções citoplasmáticas e incorporação em um fagossomo, no qual enzimas lisossomais foram subsequentemente liberadas (Chandi e Job 1978). A fagocitose do ML parece envolver os receptores de complemento (CR)1, CR3 e CR4, conforme estudo realizado em macrófagos derivados de monócitos (Schlesinger & Horwitz 1991). Outro mecanismo envolvido na entrada da micobactéria na célula é a interação do LAM presente na parede celular do ML com o receptor CD209 dos macrófagos, levando à fagocitose do patógeno. O CD209 é abundantemente expresso nos pacientes LL, mas não nos BT (Soilleux et al. 2006, Montoya & Modlin 2010). Em macrófagos de pacientes lepromatosos tratados com citocalasina B, um inibidor de fagocitose, foi observada uma redução na ingestão de ML morto; no entanto, a ingestão de ML viável pelos macrófagos de pacientes LL não foi afetada pela droga (Mistry et

al. 1986). A resistência do ML à atividade bactericida dos macrófagos parece ser devida à composição de parede da micobactéria.

Estudos utilizando o modelo de Mtb demonstraram que esta micobactéria inibe a maturação do fagossomo ao inibir a fusão com os lisossomos, acidificação e exposição à hidrolases lisossomais, mas permite a fusão com endossomos iniciais contendo transferrina, o que mantém um meio ambiente favorável a sua sobrevivência (Russell 2001, Deretic et al. 2006). Quando tratados *in vitro* com IFN $\gamma$ , os macrófagos são capazes de reverter o bloqueio da maturação do fagossomo (Schaible et al. 1998, Via et al. 1998). O ML vivo é capaz de evadir a fusão lisossomo-fagossomo, pelo menos por 48h (Alves et al. 2004), mas estudos recentes demonstraram que lisossomos rapidamente fusionam com fagossomos contendo ML em macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos (van der Wel et al. 2007). O ML é protegido por uma zona transparente eletrondensa (ETZ) que parece ser composta por micosídeos (Ryter et al. 1984). Esta camada parece inibir a difusão de enzimas lisossomais nos fagossomas e não parece requerer a participação ativa da bactéria, uma vez que experimentos utilizando ML morto demonstraram a formação de ETZ (Ryter et al. 1984).

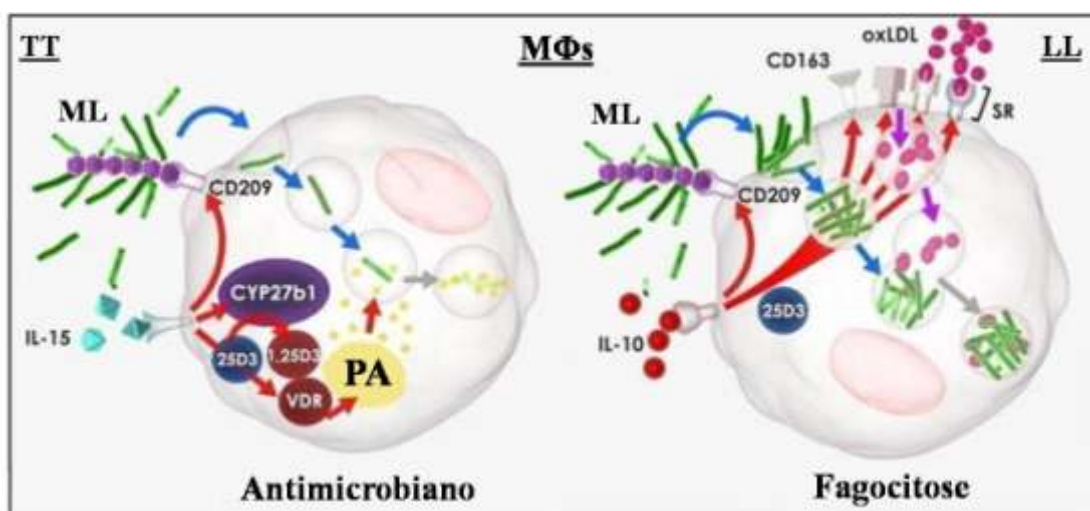
O *M. bovis* BCG (BCG), Mtb e o ML são capazes de utilizar a proteína triptofano-aspartato contendo capa proteica (TACO) do hospedeiro para inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, permitindo sua sobrevivência nos macrófagos. Estudos recentes sugerem que a TACO suprime a ativação mediada por TLR em macrófagos humanos e que a ativação mediada por TLR2 resulta em supressão da expressão de TACO. O ML é capaz de inibir a supressão da TACO mediada por TLR2. Uma vez que ambos TLR2 e TACO co-localizam na membrana fagossomal em lesões dérmicas de pacientes com a forma lepromatosa da doença, é possível que o balanço entre a sinalização via TLR2 e a expressão de TACO seja um ponto chave em determinar o destino do ML após a infecção (Ferrari et al. 1999, Suzuki et al. 2006, Tanigawa et al. 2009).

Montoya e colaboradores (2009) descreveram que enquanto a IL-10 induz a via fagocítica em macrófagos, levando à expressão de CD209 e receptores “scavenger”, resultando na fagocitose da micobactéria e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade; a IL-15 induz uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3. Neste trabalho os autores especularam que a programação para fagocitar e respostas antimicrobianas por macrófagos são distintas e diferencialmente reguladas, uma vez que a via mediada pela IL-10 foi observada predominantemente em pacientes multibacilares, enquanto que a via



antimicrobiana mediada pela IL-15 foi observada preferencialmente em pacientes paucibacilares (Figura 1.4) (Montoya et al. 2009).

Mattos e colaboradores (2011a) demonstraram que corpúsculos lipídicos são prontamente recrutados para os fagossomos contendo ML nas CS e que este processo é dependente da reorganização do citoesqueleto e da sinalização via fosfatidilinositol (PI)3-quinase (PI3K), o qual pode representar um aspecto fundamental da patogênese bacteriana no nervo.



**Figura 1.4: Modelo de divergência dos macrófagos (MΦs) na polarização da hanseníase.** No pólo tuberculoide (TT), a IL-15 induz peptídeos antimicrobianos (PA) por uma via dependente de vitamina D3 (CYP27b1 converte a forma intracelular 25D3 para a forma ativa 1,25D3, que interage com seu receptor VDR) levando à morte do ML, enquanto no pólo lepromatoso (LL) a IL-10 induz a expressão de CD163, CD209 e receptores “scavenger” (SR), resultando na fagocitose do ML e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (oxLDL), favorecendo assim a persistência da micobactéria nos MΦs. Fonte: adaptado de Montoya et al. 2009.

### 1.3. Os Interferons (IFNs)

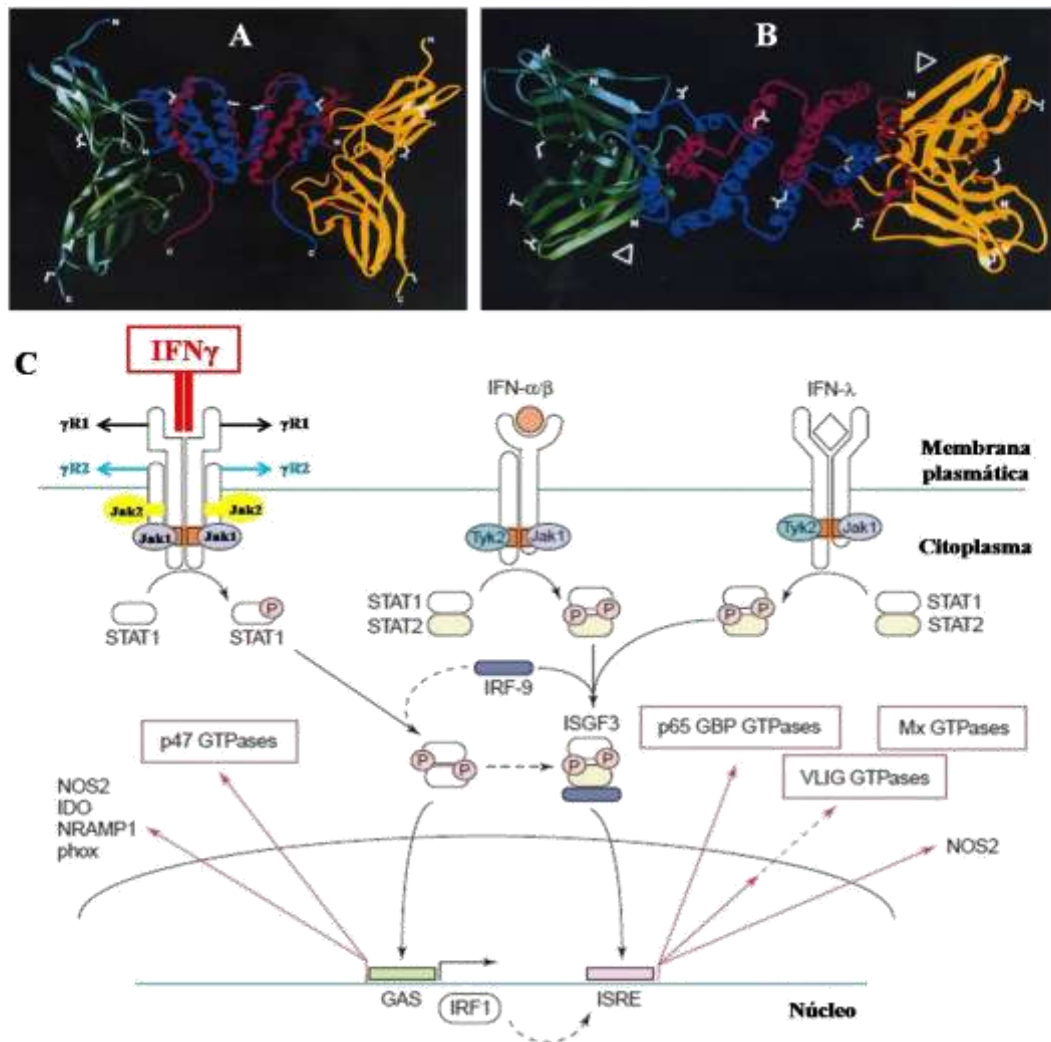
Os IFNs são membros de uma família multigênica, cujos produtos proteicos são potentes citocinas antivirais e imunorregulatórias que são produzidas pelas células do sistema imune, assim como por outros tipos celulares (Nguyen et al. 2000). Os IFNs são classificados como IFN do tipo I (IFN $\alpha/\beta$ ) e IFN do tipo II (IFN $\gamma$ ), com base no complexo receptor utilizado para sinalização, assim como na homologia da sequência. O IFN do tipo II compreende apenas um membro da família, o IFN $\gamma$  (inicialmente descrito como fator ativador de macrófagos). Os IFNs do tipo I são produtos de uma multifamília de genes, incluindo 14–

20 genes de IFN $\alpha$  (dependendo da espécie animal), um gene de IFN $\beta$ , e os menos extensivamente estudados IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$ , IFN $\omega$ , IFN $\delta$ , IFN $\tau$  e IFN $\zeta$  (ou limitina, presente apenas em camundongos). Além dos IFNs dos tipos I e II, existe ainda uma recente família de IFNs do tipo III, a IFN $\lambda$  (representada por IL-28 A/B e IL-29), a qual é estruturalmente e funcionalmente relacionada com a família de IFNs do tipo I, mas que utiliza um diferente complexo receptor para sinalização. O IFN $\zeta$  e a família IFNs III são consideradas citocinas semelhantes ao IFN (Sen 2001, Malmgaard 2004, Pestka et al. 2004).

Ao contrário dos IFNs do tipo I, que podem ser produzidos por quase todos os tipos de células nucleadas em cultura (mediante estímulo adequado), a produção de IFN do tipo II é restrita a um estreito grupo de células. O IFN $\gamma$  é produzido principalmente pelas células T (CD4+ e CD8+) ativadas durante a resposta imune adaptativa, enquanto as células NK e NK T parecem ser a principal fonte de IFN $\gamma$  durante a resposta inata. No entanto, tem sido descrito que outros tipos celulares, tais como macrófagos, células dendríticas e células T $\gamma\delta$  são capazes de produzir IFN $\gamma$  em condições específicas (Nguyen et al. 2000, Malmgaard 2004).

Apesar do IFN $\gamma$  também possuir funções antivirais, campo em que os IFN $\alpha/\beta$  desempenham o principal papel, sua principal função protetora é contra patógenos intracelulares que vivem em fagossomos (como ML e Mtb) ou vacúolos (como *Toxoplasma gondii*), e tem as células CD4 Th1 como principal fonte produtora. O IFN $\gamma$  aumenta a capacidade microbicida dos macrófagos, os estimulando a matarem os patógenos localizados dentro dos fagossomos através da facilitação da fusão do fagossomo-lisossomo e da produção de radicais do oxigênio e NO; ele também é capaz de ativar as células T citotóxicas a matarem as células infectadas. Apesar de conferir defesa contra patógenos intracelulares, o IFN $\gamma$  também pode estimular as células B a secretarem subclasses específicas de anticorpos IgG que podem revestir os patógenos extracelulares e ativar o sistema complemento (Alberts et al. 2002). Estima-se que o IFN $\gamma$  regule a expressão de mais de 1.200 genes, enquanto os IFN $\alpha/\beta$  regulam pelo menos 100 a 300 genes, presumivelmente funcionando os produtos como mediadores da resposta imune do hospedeiro. Essas proteínas têm funções celulares e moleculares diferentes, mas agem em conjunto para criar uma barreira de defesa do hospedeiro, que efetivamente impede o estabelecimento de infecções produtivas pelos patógenos. Vários mediadores imunes induzidos por IFN $\gamma$  são conhecidos (Figura 1.5), tais como NOS2, Nramp1, phox, IDO, e os também induzidos por IFN $\alpha/\beta$ , PRK e as GTPases das famílias p47, GBP, VLIG (somente por  $\gamma$ ) e Mx (somente por  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\lambda$ ) (MacMicking 2004,

Taylor et al. 2004, Martens & Howard 2006). O IFN $\gamma$  também é capaz de ativar a autofagia (Gutierrez et al. 2004).



**Figura 1.5: A via de sinalização através do complexo entre IFN $\gamma$  e seu receptor.** (A) Estrutura cristalográfica do complexo entre IFN $\gamma$  e o domínio extracelular da cadeia R1 do receptor de IFN $\gamma$  solúvel. As duas cadeias simples da forma ativa do homodímero de IFN $\gamma$  são mostradas em azul e vermelho. Cada monômero de IFN $\gamma$  se liga a um receptor solúvel, mostrados em verde e amarelo. A posição da membrana plasmática seria o final da figura. (B) Visão paralela do complexo em relação ao eixo de simetria, mostrando os sítios de ligação da cadeia R2 do receptor de IFN $\gamma$  (cabeças de seta). C: carboxi-terminal, N: amino-terminal. (C) Após a formação do complexo, a via de sinalização Jak/Stat é ativada, ocorrendo a fosforilação de Stat1 e translocação para o núcleo, onde ele se liga ao sítio de ativação de IFN $\gamma$  (GAS), ativando os genes induzidos por IFN $\gamma$ . Para a produção de GBPs e VLIGs, é necessária a produção do fator regulador de IFN (IRF)-1, que se liga ao elemento de resposta estimulado por IFN (ISRE), induzindo a expressão. A produção de Mxs é induzida através de IFN $\alpha/\beta$  ou  $\lambda$ , e requer Jak1 ou a tirosina quinase (Tyk)2, em conjunto com Stat1/2 e IRF-9, para formar o complexo fator gênico estimulado por IFN (ISGF)3, que também se liga a ISRE, ativando a transcrição. Fonte: adaptado de Bach et al. 1997 (A-B) e MacMicking 2004 (C).

### 1.3.1. Papel do IFN $\gamma$ na hanseníase

O IFN $\gamma$  tem sido considerado como potencial tratamento para doenças causadas por patógenos virais e não virais, através da sua capacidade de aumentar a defesa antimicrobiana do hospedeiro. O tratamento humano com doses imunoestimulantes de IFN $\gamma$  é seguro, bem tolerado e estimula os mecanismos antimicrobianos de monócitos, neutrófilos circulantes e macrófagos teciduais, além de ativar os macrófagos alveolares, quando da sua administração via aerossóis. Monócitos de pacientes com câncer, hanseníase e AIDS tratados com IFN $\gamma$  respondem todos com alteração para um fenótipo ativado *in vitro* e a supressão da expressão de HLA-DR em monócitos de pacientes com trauma pode ser revertida pela terapia com IFN $\gamma$ . Assim, ele parece ser eficaz como terapia adjuvante para pelo menos uma infecção intracelular disseminada, a leishmaniose visceral e, em conjunto com a terapia convencional, pode beneficiar pacientes com certas formas de leishmaniose cutânea, infecção disseminada pelo complexo *M. avium* e hanseníase lepromatosa, além de ser aprovado para uso como profilaxia em pacientes com doença granulomatosa crônica (Murray 1994, 1996). A associação entre uma resposta imune celular intacta, produção de citocinas chave do tipo Th1 (como IFN $\gamma$ ) e a relativa restrição da infecção nos pacientes com hanseníase TT, sugerem que os pacientes LL poderiam ser imunomodulados pela administração direta de IFN $\gamma$ . Assim, vários estudos têm descrito a resposta benéfica da administração intradérmica de IFN $\gamma$  recombinante humano (rhuIFN $\gamma$ ) em pacientes com hanseníase LL (Bermudez & Kaplan 1995).

Nathan e colaboradores (1986) demonstraram, em um pequeno estudo piloto controlado que três injeções intradérmicas de 10  $\mu$ g de rhuIFN $\gamma$  induziam uma evidente hipersensibilidade tardia local, uma reação tipicamente ausente nas lesões LL. Adicionalmente, a carga de ML em amostras de biópsias de pele foi reduzida em mais de 10 vezes em vários pacientes. Estes efeitos locais, incluindo a formação de granuloma, foram confirmados em dois estudos maiores, um dos quais demonstrou que após 2 a 6 injeções de 10  $\mu$ g de rhuIFN $\gamma$ , havia uma redução superior a 10 vezes no IB de ML na área de injeção, em 16 dos 24 pacientes tratados. Sem nenhum tratamento adicional, durante os próximos 6 meses, ocorreu uma redução de mais de 10 vezes na carga bacilar na maioria dos pacientes em que amostras adicionais de biópsias foram obtidas (Samuel et al. 1987, Kaplan et al. 1989).

A injeção intradérmica de rhuIFN $\gamma$  por 6 dias em conjunto com MDT, resulta tanto numa redução do número de BAAR na pele, no local da injeção, quanto numa redução em

locais distais, mostrando que o IFN $\gamma$  pode acelerar a eliminação do ML em comparação com a MDT sozinha e mudar o padrão histológico de lesão LL para um padrão semelhante ao TT (Sampaio et al. 1992, 1996). Outro estudo realizado com pacientes LL, sugeriu que os bacilos que persistem nos locais que receberam injeções intradérmicas de rhuIFN $\gamma$  também mostram viabilidade reduzida (Damasco et al. 1992). Num estudo de hanseníase LL, no qual a terapia sistêmica foi testada, os efeitos antimicrobianos não puderam ser medidos com precisão por causa dos baixos IBs iniciais. Porém, a injeção intramuscular de rhuIFN $\gamma$  (10 ou 30  $\mu$ g/dia, durante 10 dias) claramente induziu evidências histológicas de uma reposta imune mediada por células, de longa duração, em amostras de biópsias de pele obtidas a partir de áreas distantes dos locais de injeção de rhuIFN $\gamma$  (Nathan et al. 1990).

Em conformidade com os ensaios clínicos, outros tipos de estudos também têm demonstrado a importância do IFN $\gamma$  na hanseníase. A administração intradérmica de rhuIFN $\gamma$  em pacientes LL induz um rápido influxo local de monócitos e células T, similar a uma reação de hipersensibilidade tardia, mas faltando a migração de células de Langerhans para a derme, e induz uma grande expressão de MHC de classe II na superfície de queratinócitos epidérmicos (Kaplan et al. 1987a, b, c). Em resposta ao IFN $\gamma$ , queratinócitos sintetizam a quimiocina IP-10 (ou CXCL10) *in vitro*, assim como a injeção de rhuIFN $\gamma$  em pacientes LL induz a expressão de IP-10 nas lesões de pele, o que naturalmente só é observado nas lesões de pacientes TT (Kaplan et al. 1987c). Em adição, macrófagos derivados de monócitos de pacientes LL respondem ao rhuIFN $\gamma$  com uma secreção aumentada de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de forma semelhante as células obtidas de doadores normais, mostrando assim que esta citocina é capaz de ativar os macrófagos LL *in vitro* (Kaplan et al. 1986).

A estimulação *in vitro* de células aderentes CD14+ provenientes de pacientes LL, com IFN $\gamma$  ou proteínas de membrana do ML, leva a maiores níveis de RNAm de IFN $\gamma$ R1 e IFN $\gamma$ R2, quando comparadas às células de controles saudáveis sob os mesmos estímulos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na expressão de IFN $\gamma$ R1 na superfície das células aderentes de controles saudáveis e pacientes LL. No entanto, a análise da expressão proteica de IFN $\gamma$ R2 revelou que as células de controles saudáveis expressam apenas a forma madura glicosilada de 61-67 kDa desse receptor, enquanto as células de pacientes LL mostram 3 padrões diferentes de expressão: (a) a forma imatura deglicosilada de 34.8 kDa, a forma madura glicosilada de 61-37 kDa, e (c) ambas as formas proteicas do IFN $\gamma$ R2; independentemente da estimulação com IFN $\gamma$ , sugerindo a existência de diferenças no processamento intracelular e na expressão proteica do receptor de IFN $\gamma$  em células aderentes

de pacientes LL (Guerrero-Velázquez et al. 2010). Cardoso e colaboradores (2010) demonstraram em um estudo de caso-controle que o polimorfismo de base única (SNP) no gene de IFN $\gamma$ , *IFNG* +874 T>A, mais especificamente no alelo +874 T, é associado com um efeito protetor para a hanseníase entre os brasileiros. Adicionalmente, a liberação espontânea de IFN $\gamma$  por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foi maior entre os carreadores do SNP +874 T.

Embora o tratamento de pacientes MB com rhuIFN $\gamma$  apresente efeitos benéficos, a administração prolongada dessa citocina pela via intradérmica foi associada com o desenvolvimento de ENH em 60% dos pacientes (versus 8-15% no tratamento apenas com a MDT). Essa indução de ENH pode ser atenuada através do tratamento desses pacientes com talidomida, que resulta na redução do infiltrado dérmico, dos sintomas tóxicos, dos altos níveis de TNF, e na eliminação das lesões do estado reacional, diminuindo assim o ENH (Sampaio et al. 1992, 1993, Bermudez & Kaplan 1995, Sampaio et al. 1996). Assim, apesar do aparente papel protetor do IFN $\gamma$ , verificado mesmo *in vivo*, onde diversos autores citam níveis reduzidos dessa citocina em PBMC de pacientes LL, não se sabe por que pacientes TT, ainda que apresentem resposta celular, com presença de IFN $\gamma$ , são incapazes de eliminar completamente o bacilo.

O IFN $\gamma$  está associado ao controle da infecção pelo Mtb por um processo relacionado à autofagia (Gutierrez et al. 2004). Curiosamente, a via autofágica converge com a via vitamina D3-catelicidina, a qual é preferencialmente observada na forma paucibacilar da hanseníase (Krutzik et al. 2008, Montoya et al. 2009). A vitamina D3 induz autofagia via catelicidina e é requerida para a atividade antimicrobiana mediada pelo IFN $\gamma$  (Yuk et al. 2009, Fabri et al. 2011).

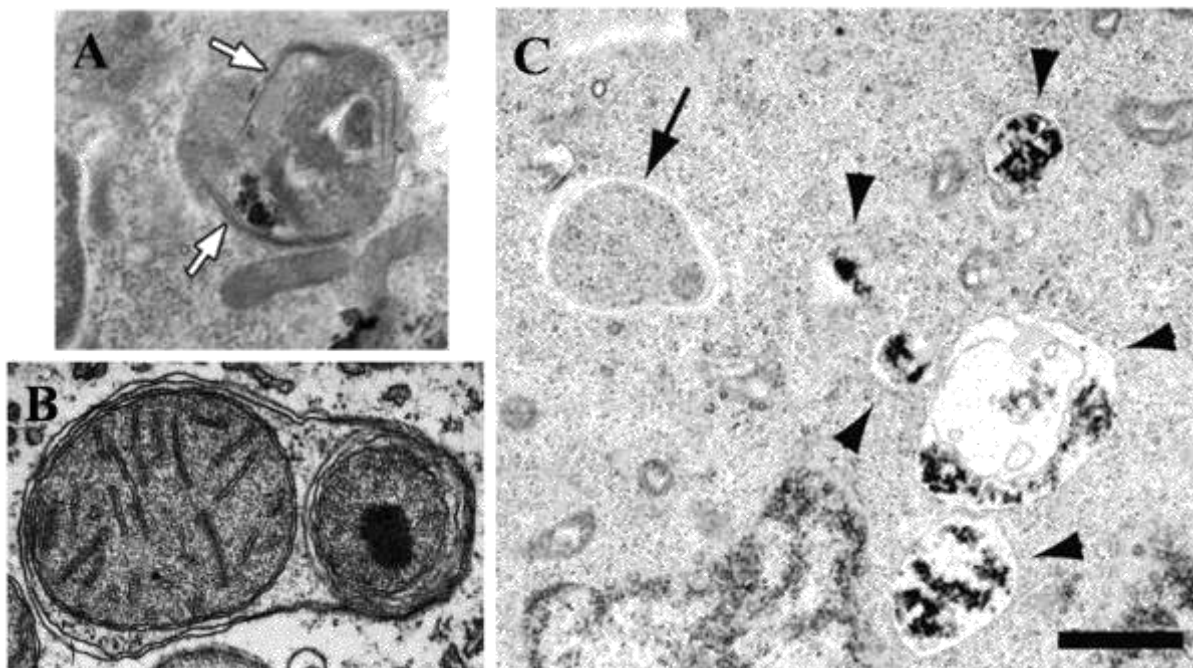
#### **1.4. Autofagia**

O termo autofagia (do grego *auto* para próprio e *phagein*, significando comer) foi utilizado na década de 60 por Christian de Duve e se refere a uma série de processos intracelulares que levam à remoção de proteínas citosólicas ou organelas celulares pelos lisossomos (de Duve & Wattiaux 1966, Klionsky 2008). A autofagia é um processo homeostático fundamental que ocorre em todos os sistemas eucarióticos, onde as células ingerem e digerem porções de seu próprio citoplasma para a remoção ou renovação

(Mizushima et al. 2002, Levine & Klionsky 2004). Atualmente a autofagia tem sido descrita em processos de resposta imune inata e adaptativa (Deretic 2005, Levine & Deretic 2007, Deretic & Levine 2009, Münz 2009). A autofagia é reconhecida como um sistema citoplasmático para a eliminação direta de bactérias intracelulares (Gutierrez et al. 2004, Nakagawa et al. 2004, Deretic 2005), um processo que aumenta a apresentação de antígenos via MHC II (Paludan et al. 2005) e um sistema antimicrobiano do hospedeiro o qual pode ser subvertido por adaptações bacterianas e virais (Ogawa et al. 2005, Orvedahl et al. 2007, Gannagé et al. 2009, Kyei et al. 2009).

Existem várias formas descritas de autofagia, podendo ser seletivas ou não seletivas, diferindo principalmente no tipo de carga e no seu local de sequestração. Estas incluem: macroautofagia, microautofagia, autofagia mediada por chaperonas, micro e macropexofagia, microautofagia fragmentada do núcleo, a via citoplasma-para-vacúolo alvo (em leveduras), entre outras (Legakis & Klionsky 2006). A macroautofagia, aqui chamada de autofagia, é o foco corrente da atenção porque este é o processo que envolve o seqüestro e o transporte de regiões completas do citoplasma – incluindo proteínas solúveis e organelas inteiras – com vacúolos de dupla membrana para o sistema lisossomal com a finalidade de degradação (Xie & Klionsky 2007).

A autofagia é capaz de remover por seqüestro e degradação (Mizushima et al. 2008), ou algumas vezes por secreção (Duran et al. 2010, Manjithaya et al. 2010) ou extrusão (Heynen et al. 1985, Schweers et al. 2007, Taylor et al. 2009), uma ampla gama de componentes intracelulares que varia de agregados proteicos a organelas, tais como mitocôndrias. Uma característica da autofagia é que alvos citoplasmáticos são capturados em organelas de dupla membrana de origem endomembranosa, denominadas autofagossomos, as quais subsequentemente maturam em autolisossomos onde a carga capturada é degradada ou eliminada (Figura 1.6). Entre as funções fisiológicas descritas para a autofagia, podemos destacar: a provisão de energia e aminoácidos para a célula em estresse metabólico ou mesmo de privação de nutrientes; prevenção de morte celular ou senescência devido ao acúmulo de agregados macromoleculares ou organelas com mau funcionamento e, por fim, o seu potencial de induzir morte celular (Gozuacik & Kimchi 2004, Kroemer & Levine 2008, McPhee et al. 2010).



**Figura 1.6: Autofagossomos: estruturas de dupla membrana características da autofagia.** (A) A estrutura inicial, o fagóforo (setas) circundando componentes citoplasmáticos. (B) Autofagossomo envolvendo uma mitocôndria e um peroxissomo. (C) Um autofagossomo (seta) e vários autolisossomos (cabeças de seta), as estruturas finais. Fonte: adaptado de Florez-McClure et al. 2004 (A), Friend 1994 (B) e Mizushima 2005 (C).

#### 1.4.1. Mecanismo de execução da autofagia

Três estágios morfológicos são descritos na indução de autofagia: (1) iniciação (formação de membranas crescentes denominadas fagóforos), (2) alongamento e fechamento (aumento do tamanho do fagóforo e sua transformação em um autofagossomo completo contendo a carga sequestrada), e (3) maturação (conversão de autofagossomos em organelas degradativas denominadas autolisossomos pela fusão com organelas de endossomo (formando anfissomo) e depois com lisossomos). A via de sinalização do processo autofágico também pode ser mecanicamente dividida em diferentes etapas: (a) indução, (b) seleção de carga e empacotamento, (c) nucleação da vesícula, (d) expansão e conclusão da vesícula, (e) recuperação, (f) alvo, ancoragem e fusão da vesícula com o lisossomo, e (g) quebra da membrana interna da vesícula e de seu conteúdo (Legakis & Klionsky 2006).

Um regulador chave da autofagia é o alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), estando presente em 2 complexos (mTORC)1 e 2. Esta proteína é uma serina/treonina quinase pertencente à superfamília de quinases relacionadas à PI3K (PIKK), que regula a proliferação celular e o metabolismo em resposta aos fatores de crescimento e demandas nutricionais e



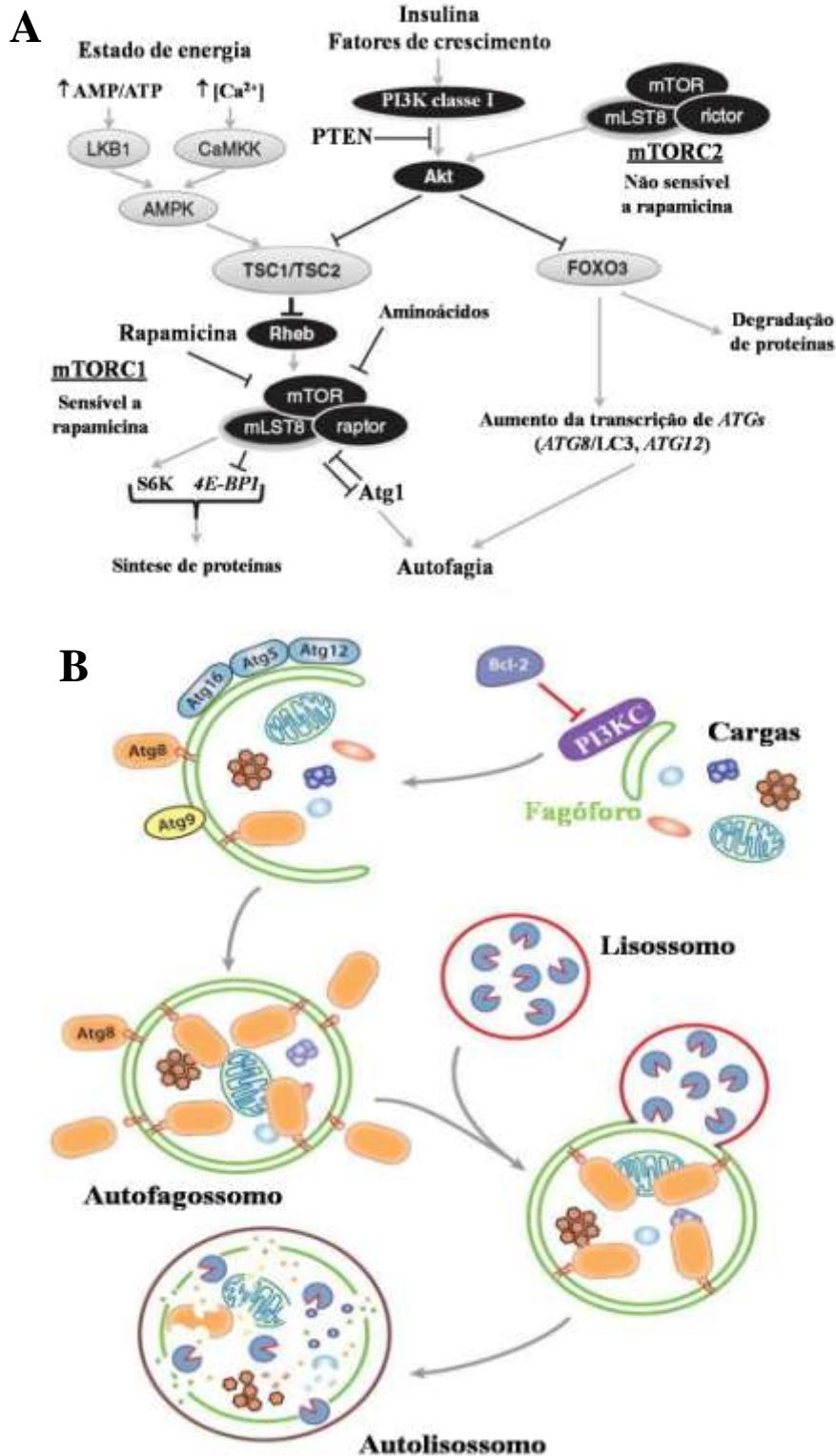
energéticas. A mTOR estimula processos anabólicos, enquanto a sua inibição aumenta os processos catabólicos, incluindo a autofagia. Por exemplo, mTOR se mantém ativada por fatores de crescimento via Akt (proteína cinase B), resultando na inibição da autofagia (Wullschleger et al. 2006). Ao contrário, o tratamento com rapamicina ou com privação de aminoácidos ou nutrientes leva à inibição de mTOR e a indução de autofagia. A biogênese do autofagossomo é controlada por um sistema de conjugação composto de mais de 30 genes e proteínas relacionadas com a autofagia, designados *ATG* e *Atg*, respectivamente, identificados primeiramente em estudos genéticos em leveduras (Klionsky et al. 2003).

Sob condições ricas de nutrientes, mTORC1 suprime o complexo ULK (homólogo de *Atg1*, composto por *ULK1/2*, *Atg13*, *FIP200*, *Atg101*). Quando a autofagia é induzida, inicia-se a etapa de nucleação e formação do autofagossomo através do complexo ULK, que é ativado e se transloca para um determinado domínio provavelmente do retículo endoplasmático (ER). Uma vez no ER, o complexo ULK recruta o complexo PI3K de classe III (PI3KC) (Beclin-1 (*Atg6*), *mAtg14*, *p150* (*VPS15*), *hVPS34*, *AMBRA1*, *UVRAG* (*VPS38*), *Rubicon*) ou complexo I para o ER (o recrutamento de Beclin-1 é necessário para a ativação deste complexo, esta proteína forma um complexo com *Bcl-2*, ficando inibida; para a ativação do complexo a quinase *JNK1* fosforila *Bcl-2*, liberando Beclin-1 para o PI3KC), e essa regulação é promovida por *RalB* e pelo complexo exocítico contendo *Exo84*. O PI3KC forma PI3-fosfato, que recruta moléculas efetoras como proteína 1 contendo duplo FYVE (DFCP1) e domínio de repetição WD-interação a fosfoinosítídeo (WIPI)s, promovendo a formação do omegassoma no ER (local de onde o autofagossomo parece ser gerado e onde as outras *Atg* são montadas). As WIPIs são cruciais para a maturação/desenvolvimento do omegassoma em fagóforos (assim como elas, as proteínas *VMP1* e *Atg9* também estão presentes na membrana externa do fagóforo e parecem participar do estágio inicial de formação do autofagossomo). Começa então a etapa de alongamento e fechamento do fagóforo, que requer dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina. Inicialmente, forma-se o conjugado *Atg12-Atg5*, produzido pelas enzimas *Atg7* e *Atg10* e, por sua vez, esse conjugado interage com *Atg16L1*, formando o complexo *Atg12-Atg5-Atg16L1* presente na membrana externa do fagóforo. O segundo sistema de conjugação inicia-se com *Atg4*, fazendo a conversão do pró-LC3 (cadeia leve 3 complexada com as proteínas associadas aos microtúbulos 1A e 1B) em LC3-I no citoplasma, depois a *Atg7* ativa LC3-I, que é então conjugado ao lipídio fosfatidiletanolamina (PE) pela enzima *Atg3* com auxílio do complexo *Atg12-Atg5-Atg16L1*, formando sua forma lipidada LC3-II (ou LC3-PE), que se transloca do citoplasma principalmente para as pontas das membranas interna e externa do fagóforo.

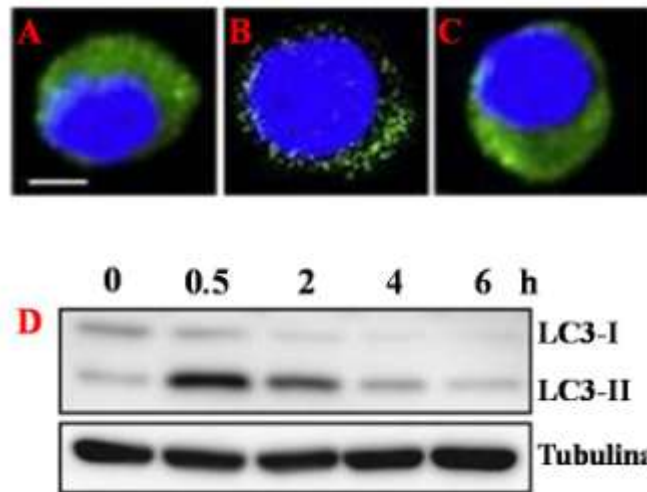
Quando a formação do autofagossomo é completada, o LC3 presente na membrana externa é clivado do PE por Atg4, sendo liberado para retornar ao citoplasma, juntamente com a maioria das outras proteínas Atg que também são dissociadas do autofagossomo. Ocorre então a fusão com o endossomo (formando anfissomo) e depois com o lisossomo por um processo dependente do complexo II (hVPS34, Beclin-1 e UVRAG) e de LAMP-2 e Rab7, formando o autolisossomo, que quebra a membrana interna do autofagossomo e degrada a carga através das hidrolases lisossomais (Figura 1.7). As macromoléculas resultantes são liberadas através de permeases e recicladas no citosol (He & Klionsky 2009, Deretic 2011, Levine et al. 2011, Mizushima & Komatsu 2011). A autofagia também pode ocorrer por vias independentes de mTOR (He & Klionsky 2009, Kumar & Rao 2011) e das proteínas Atg (Nishida et al. 2009).

A origem correta do fagóforo até hoje permanece desconhecida, no entanto, evidências sugerem que membranas adicionais derivadas do complexo de Golgi, mitocôndria, membrana plasmática, membrana nuclear, e de uma área da célula chamada de GERL (Golgi-Retículo Endoplasmático-Lisossomos), possam contribuir para a formação do autofagossomo (Legakis & Klionsky 2006, Levine et al. 2011, Mizushima & Komatsu 2011).

A detecção e quantificação de autofagia por microscopia eletrônica é um método clássico e importante, sendo um dos mais usados, porém pode apresentar muitos artefatos e a classificação morfológica dos compartimentos pode ser problemática (Kirkegaard et al. 2004, Klionsky et al. 2008). Quando o LC3 (um dos 6 ortólogos humanos do Atg8 de leveduras) é analisado por microscopia de fluorescência, ele mostra dois padrões diferentes: o LC3-I apresenta uma fluorescência difusa no citoplasma, enquanto LC3-II apresenta um padrão puntiforme na membrana do autofagossomo ou do fagóforo. O LC3 também pode ser diferenciado por imunoblotting, sendo considerado um bom marcador para monitorar a autofagia (Figura 1.8) (Deretic 2006, Mizushima & Yoshimori 2007, Klionsky et al. 2008). Nas células de mamíferos, a via pode ser inibida através da adição dos inibidores farmacológicos 3-metiladenina (3-MA) ou Wortmanina (Wtm) (Tanida et al. 1999, Kabeya et al. 2000, Kirkegaard et al. 2004).



**Figura 1.7: Modelo esquemático simplificado da autofagia (macroautofagia).** (A) Esquema de indução da autofagia através da sinalização via complexos mTOR. As moléculas ativadoras da autofagia são mostradas em cinza, enquanto as inibidoras são representadas em preto. As setas em cinza representam ativação, enquanto as barras em preto representam inibição. (B) Esquema do fluxo autofágico, mostrando a formação do autofagossomo, fusão com o lisossomo e a degradação das cargas no autolisossomo. Fonte: adaptado de Esclatine et al. 2009 (A) e He & Klionsky 2009 (B).



**Figura 1.8: Ensaio de monitoração da autofagia através de LC3.** Fluorescência em monócitos mostrando LC3-I (A) e LC3-II (B). A autofagia pode ser bloqueada usando 3-MA (C). Quando a autofagia é induzida, a lipidação de LC3 também pode ser monitorada por imunoblotting, os valores indicam os tempos de indução de autofagia (D). Fonte: adaptados de Yuk et al. 2009 (A-C) e Mizushima & Yoshimori 2007 (D).

#### 1.4.2. A Autofagia e o sistema imune

A autofagia participa de quase todos os aspectos da resposta imune, afetando mecanismos inatos e adaptativos. Recentemente, foi proposto o termo imunofagia para descrever tais processos coletivamente (Deretic 2006, 2011). Há três tipos de contribuição da autofagia no sistema imune: 1) Processos especializados e que são realizados em nível celular (imunofagia do tipo 1); 2) Homeostasia celular (imunofagia do tipo 2) e 3) O papel não autofágico das proteínas Atg (imunofagia do tipo 3).

##### 1. Processos imunes autofágicos especializados e que são realizados ao nível celular (imunofagia do tipo 1)

Estão incluídos aqui o reconhecimento, a captura e a eliminação de patógenos intracelulares (Dupont et al. 2009, Thurston et al. 2009, Yoshikawa et al. 2009, Zheng et al. 2009, Orvedahl et al. 2010), por um processo denominado xenofagia (Levine 2005), ou liberação de produtos antimicrobianos para nichos intracelulares levando à morte de patógenos (Ponpuak et al. 2010). Estes processos contribuem para a ativação autofágica de macrófagos (APMA), o aumento do reconhecimento de produtos microbianos por receptores da imunidade inata, tais como os receptores do tipo Toll, e o aumento da apresentação de

antígenos endógenos ou não, via MHC (Lee et al. 2007, Deretic & Levine 2009, Münz 2009, Lee et al. 2010). Tem sido descrito que a autofagia ou os fatores relacionados à autofagia não somente ajudam na indução e execução da resposta imune inata, mas também limitam essa resposta e inflamação (Jounai et al. 2007, Saitoh et al. 2008, 2009). Assim, de um modo geral, a autofagia atua como um importante mecanismo homeostático (Deretic 2011).

Ainda podem ser incluídas outras funções da via de autofagia e/ou suas proteínas nos mecanismos efetores durante infecções, e nos mecanismos de resposta inata e adaptativa, tais como: remoção de corpos apoptóticos, regulação da produção de citocinas inflamatórias, regulação da produção de IFNs do tipo I, maturação do fagossomo, seleção negativa no timo, desenvolvimento de células B e T, citoproteção contra fatores ou toxinas microbianas e recrutamento de moléculas efetoras imunes para membranas intracelulares (Levine et al. 2011, Mizushima & Komatsu 2011).

A autofagia é um mecanismo efetor posterior à estimulação de receptores da imunidade inata, tais como TLR, receptores do tipo NOD, receptores do tipo RIG-I (RLR) ou estimulação intracelular por padrões moleculares associados a perigo (DAMP) (Sanjuan et al. 2007, Yano et al. 2008, Cooney et al. 2010, Shi & Kehrl 2010, Tang et al. 2010, Travassos et al. 2010).

## **2. O papel genérico da autofagia na homeostasia celular (imunofagia do tipo 2)**

Neste caso a influência da autofagia sobre as células imunes é a mesma que sobre os demais tipos celulares. Normalmente, a autofagia está direcionada como um mecanismo de manutenção da viabilidade celular e manutenção de organelas intracelulares em bom estado. Alguns tipos celulares são mais dependentes de autofagia, como as células T. Estas células podem recorrer à autofagia para sobrevivência quando há escassez de fatores de crescimento. Também, quando as células T maturam, a autofagia é o processo envolvido na redução programada no número de mitocôndrias que ocorre durante a saída de células T “naive” do timo (Pua et al. 2007, 2009, Motensen et al. 2010).

## **3. Papel não autofágico das proteínas Atg (imunofagia do tipo 3)**

Baseia-se em um conjunto de atividades que refletem a participação não-autofágica de um ou mais genes (e seus produtos) de autofagia, como: a inibição da sinalização via quinase

1 de ligação a TANK (TBK1), inibição da sinalização de receptores RLR, e a formação de corpúsculos lipídicos (Shibata et al. 2009, 2010, Deretic 2011).

### **1.4.3. A Autofagia e patologias**

A autofagia e os genes de autofagia estão relacionados a um amplo espectro de doenças humanas, incluindo doença de Alzheimer (Lee et al. 2010), doença de Huntington (Martinez-Vicente et al. 2010), doença de Parkinson, diabetes (Ebato et al. 2008, Jung et al. 2008, Meijer & Codogno 2008), atrofia muscular e miopatias (Mammucari et al. 2007, Cuervo 2008, Zhang & Cuervo 2008, Henriques-Pons & Nagaraju 2009, Vergne et al. 2009), fibrose cística, hipertrofia cardíaca, obesidade, doença de Paget, doenças de armazenamento lisossomal, pancreatite aguda, deficiência de  $\alpha$ 1-antitripsina (Mizushima & Komatsu 2011), com papéis adicionais no fígado, em respostas antioxidantes, metabolismo lipídico e câncer (Hara et al. 2006, Komatsu et al. 2006, 2007, Levine 2007, Singh et al. 2009). A autofagia tem sido associada através de triagens genômicas com doenças inflamatórias como a doença de Crohn e através de análise genética populacional com susceptibilidade à tuberculose (Consortium, 2007, Parkes et al. 2007, Intemman et al. 2009).

### **1.4.4. A Autofagia e os processos infecciosos**

Além do papel da autofagia na eliminação de agregados proteicos potencialmente tóxicos e na prevenção contra a neurodegeneração (Nixon 2006), a autofagia desempenha um importante papel na imunidade inata contra patógenos intracelulares (Deretic 2005, Levine & Deretic 2007, Schmid & Münz 2007). Tem sido mostrado que a maquinaria autofágica pode liberar padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) para receptores tipo Toll endossomais (Lee et al. 2007) e recentemente foi demonstrado que diversos PAMP e outros ligantes de Toll podem induzir autofagia em macrófagos (Delgado et al. 2008).

Estudos anteriores demonstraram a autofagia como um mecanismo importante na eliminação de *Mtb*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Rickettsia conorii*, exotoxina de *Vibrio cholerae*, *Toxoplasma gondii*, *Respirovirus* (Sendai), entre outros (Gutierrez et al. 2004, Nakagawa et al. 2004, Kirkegaard et al. 2004, Andrade et al. 2006, Birmingham et al. 2006, Ling et al. 2006, Lee et

al. 2007, Hussey et al. 2009). Esse processo também parece envolver fatores do hospedeiro, uma vez que no modelo experimental de infecção com *Leishmania amazonensis*, a indução de autofagia pode tanto controlar como amplificar a replicação parasitária em macrófagos, dependendo da cepa de camundongo (Pinheiro et al. 2009). Em adição, muitos patógenos regulam a via da imunofagia para sua sobrevivência, escapando da degradação ou utilizando como nicho de replicação, entre eles: *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetti*, *Shigella flexneri*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Chlamydia trachomatis*, *L. mexicana*, *Lentivirus* (HIV), *Rotavirus*, *Flavivirus* (Dengue), entre outros (Kirkegaard et al. 2004, Hussey et al. 2009, Münz 2009, Li et al. 2011, Ogawa et al. 2011).

Recentemente foi descrito um grupo de receptores de imunidade inata que funcionam como adaptadores autofágicos e reconhecem microorganismos intracelulares para a eliminação por autofagia. Esses receptores são denominados receptores do tipo sequestrassoma (p62/SQSTM1) (SLR). Os receptores SLR, p62 (Pankiv et al. 2007), NBR1, e NDP52 desempenham um importante papel na autofagia envolvendo *Salmonella*, *Streptococcus* (Thurston et al. 2009, Zheng et al. 2009), *Shigella* (Dupont et al. 2009) e *Listeria* (Yoshikawa et al. 2009).

Uma função dos SLRs, demonstrada para o p62, é direcionar precursores citoplasmáticos para a conversão nos lisossomos em produtos antimicrobianos (Ponpuak et al. 2010). O p62 captura proteínas citoplasmáticas inócuas, como ubiquitina ou proteínas precursoras ribossomais e as direciona para os autofagossomos, onde são digeridas em peptídeos com novas atividades biológicas. A carga de peptídeos autolisossomais é direcionada para os fagossomos contendo o microorganismo, onde os fragmentos ribossomais e ubiquitinados gerados em organelas autofágicas finalmente encontram seus alvos e expressam as propriedades antimicrobianas que irão eliminar o patógeno, como descrito no modelo de Mtb (Ponpuak et al. 2010).

#### **1.4.5. A Autofagia e a regulação da sobrevivência de micobactérias**

A identificação da autofagia como um importante fator na determinação da infecção micobacteriana está associada a observações anteriores. Enquanto as citocinas pró-inflamatórias IFN $\gamma$  e TNF promovem a eliminação do Mtb, as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13 facilitam a persistência da bactéria (Monack et al. 2004, Blaser & Kirschner

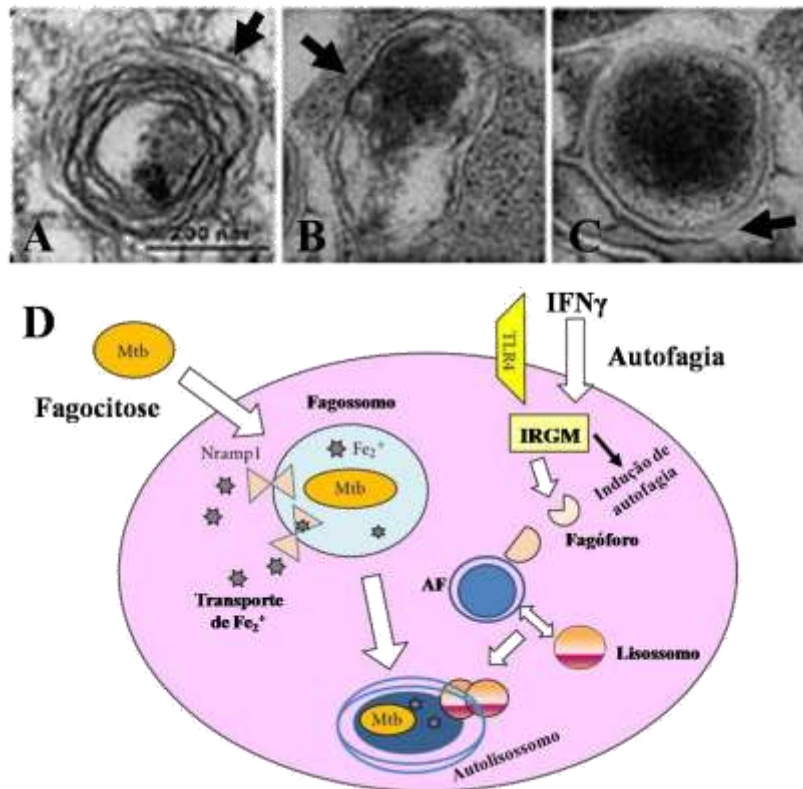
2007). Estudos recentes demonstraram que pelo menos um dos mecanismos efetores das citocinas pró-inflamatórias ocorre por indução de autofagia, enquanto as citocinas anti-inflamatórias regulam negativamente esse efeito. Sendo assim, enquanto IFN $\gamma$  e TNF estimulam a autofagia, as citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 inibem (Harris et al. 2007, 2009, Park et al. 2010).

A autofagia representa uma via adicional para a eliminação de patógenos intracelulares e este processo é fundamental para determinar a sobrevivência do Mtb em macrófagos. Estudos anteriores demonstraram que tanto a indução farmacológica quanto a indução fisiológica da autofagia em macrófagos levam os fagossomos micobacterianos a maturarem em fagolisossomos, com a consequente degradação do patógeno. A indução imunológica de autofagia com IFN $\gamma$  em macrófagos induz o recrutamento de LC3-II para o fagossomo micobacteriano, via molécula efetora IRGM/LRG-47 (Figura 1.9) (MacMicking et al. 2003, Gutierrez et al. 2004, Singh et al. 2006).

Estudos anteriores relataram deficiente internalização do ML na presença de IFN $\gamma$  (Schlesinger & Horwitz 1991) e que a interação ML–macrófagos leva ao aumento dos níveis de TNF (Hussain et al. 1999, Hernandez et al. 2003). O TNF é essencial para a formação e manutenção do granuloma tubercular (Flynn & Chan 2001) e, é secretado em resposta ao *M. bovis* BCG e ao Mtb. Harris e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento de macrófagos infectados com bloqueadores de TNF (adalimumab, infliximab e etanercept), foi capaz de inibir a maturação do fagossomo micobacteriano induzida pelo IFN $\gamma$ . Outros estudos também relataram a importância do TNF na modulação da autofagia. Na linhagem celular MCF-7, o TNF induziu autofagia por uma via dependente de Erk1/2 (Sivaprasad & Basu 2008). Esses dados sugerem que os efeitos do IFN $\gamma$  sobre a maturação de fagossomos em macrófagos parecem ser dependentes da secreção autócrina de TNF.

A análise funcional de 44 genes do hospedeiro associados à regulação da autofagia demonstrou que mesmo após o estabelecimento da infecção, a persistência do Mtb na célula hospedeira está relacionada à sua capacidade de manter as vias de ativação de autofagia controladas. O reconhecimento de que a persistência de micobactérias virulentas em macrófagos infectados se correlaciona com a capacidade de sustentar a inibição de processos de indução de autofagia tem um grande impacto sobre a nossa compreensão global sobre a infecção com Mtb (Kumar et al. 2010, Kumar & Rao 2011).





**Figura 1.9: Autofagia no modelo de tuberculose.** (A-C) Autofagossomos contendo Mtb (setas), podendo ser observada (A) uma estrutura semelhante a figuras de mielina (membranas concêntricas) típica da autofagia. (D) Modelo esquemático da indução de autofagia por IFN $\gamma$ , que requer a molécula efetora IRGM, que por sua vez ativa a autofagia. Assim, o fagossomo contendo Mtb é englobado pelo autofagossomo (AF), que se funde com o lisossomo, degradando o Mtb. O IFN $\gamma$  também pode mediar a morte de Mtb através de Nrampl, que é expresso na membrana do fagossomo e é capaz de sequestrar o ferro (Fe $_2^+$ ), impedindo a captação pelo Mtb. Fonte: adaptado de Yuk et al. 2009 (A-C) e Saiga et al. 2011 (D).

Foi descrito que o Mtb induz a supressão da autofagia, o que resulta em acúmulo de lipídeos (Neyrolles et al. 2006, Singh et al. 2009, Kumar & Rao 2011). Estudos recentes demonstraram que os fagossomos contendo as micobactérias migram na direção de corpúsculos lipídicos e que isso resulta no engolfamento do bacilo em partículas lipídicas (de Chastellier 2009, de Chastellier et al., 2009). É possível que o encapsulamento do bacilo em um meio ambiente rico em lipídeos contribua para a manutenção do reservatório nutricional que permite a persistência do bacilo na célula hospedeira. Esse processo também protege o patógeno do estresse hipóxico e de outras respostas microbicidas do hospedeiro, incluindo aquelas que envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (de Chastellier 2009, de Chastellier et al. 2009). A autofagia parece desempenhar um importante papel na mediação da reciclagem de triglicerídeos e ésteres de colesterol, os principais componentes dos corpúsculos lipídicos. O excesso de corpúsculos lipídicos na célula tem um efeito atenuador sobre a autofagia, o que leva à hipótese da existência de uma ligação entre as vias

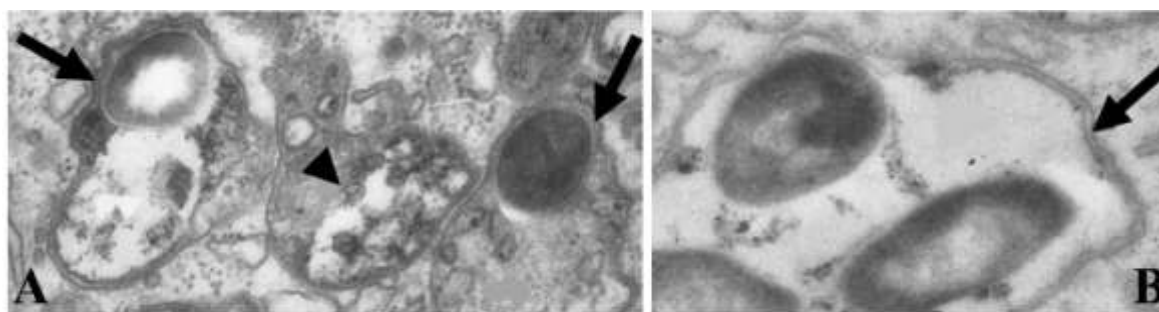
regulatórias de autofagia e aquelas regulando a geração de corpúsculos lipídicos (Singh et al. 2009).

Uma relação direta entre autofagia e inflamação foi recentemente descrita por Kleinnijenhuis e colaboradores (2011). Foi observado que o bloqueio da autofagia em monócitos derivados de voluntários saudáveis, estimulados com Mtb, leva à redução dos níveis de TNF, com aumento de IL-1 $\beta$ . Por outro lado, a indução de autofagia por privação de nutrientes ou IFN $\gamma$  teve o efeito contrário (Kleinnijenhuis et al. 2011). Outros estudos utilizando o modelo murino identificaram que o bloqueio da via autofágica leva ao aumento de IL-1 $\beta$  por um mecanismo que leva à ativação do inflamassoma NALP3 (Nakahira et al. 2011). No entanto, os polimorfismos nos genes *ATG16L1* e *IRGM* não apresentaram maiores impactos na produção de citocinas induzida pelo Mtb em voluntários saudáveis. Foi observado apenas um moderado efeito na produção de IFN $\gamma$  pelo polimorfismo em *ATG16L1* T300A (Kleinnijenhuis et al. 2011).

Há atualmente cerca de 90 artigos listados (bancos de dados PubMed e SCIRUS, Acesso em: 22 jan. 2012) associando a autofagia e infecção por micobactérias, sendo a maioria em Mtb. O Anexo 1.1 mostra um resumo dos principais achados descritos nos últimos anos, associando autofagia e micobacterioses.

O papel da autofagia no controle da infecção por Mtb em macrófagos humanos tem sido demonstrado por diferentes grupos. No entanto, não há estudos demonstrando o papel da autofagia na hanseníase, em parte devido à impossibilidade de protocolos *in vitro* para análise de crescimento bacteriano com o ML. No entanto, inúmeras evidências apontam para a participação da autofagia na resposta imune inata ao ML. Estudos antigos de microscopia eletrônica observaram a presença de vacúolos de dupla membrana contendo ML (Figura 1.10), porém este processo não foi elucidado posteriormente (Evans & Levy 1972, Chandi & Job 1978). Recentemente, Yuk e colaboradores (2009) demonstraram que a vitamina D3 induz autofagia em macrófagos/monócitos humanos via catelicidina. Foi demonstrada em estudos anteriores uma correlação direta entre o polimorfismo do receptor de vitamina D3 e a forma LL da hanseníase, levando à evidência de que o receptor de vitamina D3 seja capaz de regular a susceptibilidade da doença em humanos (Roy et al. 1999). A vitamina D3 tem sido utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com tuberculose (Martineau et al. 2007a, b, Selvaraj 2011) e, estudos iniciais de tratamento da hanseníase com vitamina D3 parecem ser consistentes com um possível efeito imunomodulador sobre a micobactéria (Herrera 1949). Mas recentemente, Liu e colaboradores (2012) sugeriram que a vitamina D3 poderia ser um

dos componentes de um tratamento ideal para a hanseníase e outras doenças infecciosas crônicas em que a resposta imune celular é desregulada. Adicionalmente, estudos genéticos em hanseníase revelaram que polimorfismos em genes de moléculas associadas com o controle da via autofágica (IFN $\gamma$ , NOD e TLR), desempenham um importante papel na susceptibilidade à doença (Kang & Chae 2001, Johnson et al. 2007, Bochud et al. 2009, Zhang et al. 2009, Berrington et al. 2010, Cardoso et al. 2010).



**Figura 1.10:** (A-B) Microscopia eletrônica mostrando vacúolos de dupla membrana contendo ML (setas) e um lisossomo (cabeça de seta) pode ser observado entre dois desses vacúolos em (A). Fonte: adaptado de Evans & Levy 1972.

A citocina IFN $\gamma$  induz autofagia em macrófagos por um mecanismo ainda não completamente elucidado (Harris et al. 2009). Níveis séricos elevados de IFN $\gamma$  têm sido observados em pacientes BT em comparação a pacientes LL e, numerosos estudos têm demonstrado que a adição de IFN $\gamma$  a macrófagos e células dendríticas antes da infecção aumenta a morte intracelular de micobactérias (Russell 2001, Hope et al. 2004). Estudos de nosso laboratório, utilizando macrófagos diferenciados *in vitro* com GM-CSF (perfil M1) e M-CSF (perfil M2), os quais simulam macrófagos de pacientes paucibacilares (TT) e multibacilares (LL), respectivamente, demonstraram aumento dos níveis de citocinas microbicidas em M1 quando do estímulo com ML. Houve ainda vacúolos com dupla membrana, ou seja, com características autofágicas pela análise de ultraestrutura, corroborando com observações prévias de autofagossomos contendo ML (Evans & Levy 1972, Chandi & Job 1978). Tais vacúolos não foram observados nos macrófagos M2 (Fulco e colaboradores, dados não publicados). A hipótese é a de que em pacientes LL, a alta carga bacilar seja resultado do bloqueio da via autofágica, utilizado pelo ML como um mecanismo de subversão da resposta do hospedeiro. Por outro lado, células de pacientes TT ou reacionais, que apresentam aumento nas citocinas pró-inflamatórias circulantes, teriam aumentada capacidade de indução de autofagia, o que justifica a redução da carga bacilar nesses casos.

A estimulação de macrófagos com ML é um excelente modelo de estudo. Tal afirmação justifica-se pelo fato da hanseníase ser, entre as doenças infecciosas, a única doença que apresenta um espectro de formas clínicas que parece ser determinado não apenas por mecanismos imunes adaptativos, mas principalmente por mecanismos inatos de resposta (Modlin 2010, Montoya & Modlin 2010, Pinheiro et al. 2011). Assim, existe a necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos autofágicos associados aos diferentes pólos da doença, o que poderá levar ao estabelecimento de novos alvos e estratégias terapêuticas de controle da hanseníase.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel da autofagia na infecção com *M. leprae* (ML), bem como o envolvimento da citocina pró-inflamatória IFN $\gamma$  na indução de autofagia em células estimuladas com o *M. leprae*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de autofagossomos em células de biópsias de lesão pele de pacientes com hanseníase lepromatosa e tuberculóide;
- Avaliar a indução de autofagia em macrófagos isolados de lesões de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa e tuberculóide, estimulados ou não com IFN $\gamma$ ;
- Avaliar se há autofagia em monócitos e células da linhagem monocítica THP-1 *in vitro*, estimulados ou não com o ML e/ou IFN $\gamma$ ;
- Avaliar a produção de citocinas em células da linhagem monocítica THP-1, estimuladas ou não com ML e/ou IFN $\gamma$ .
- Determinar o percentual de associação do ML em macrófagos estimulados ou não com IFN $\gamma$ .

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Biossegurança e permissão ética**

As amostras biológicas dos pacientes com hanseníase (fragmentos das lesões de pele obtidos por biópsias com “Punch” de 6 mm antes do início do tratamento) foram coletadas no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ, Rio de Janeiro), totalizando 06 de pacientes lepromatosos (LL) e 06 de pacientes tuberculoides (BT). Uma amostra de pele normal obtida de procedimento cirúrgico foi utilizada como controle. Cada amostra de paciente com hanseníase foi utilizada individualmente para um único experimento, assim todos os resultados mostrados são de amostras de diferentes pacientes com as mesmas formas clínicas. Todas as amostras foram manipuladas de acordo com as normas preconizadas para a manipulação de material biológico. A participação de cada indivíduo no estudo foi condicionada à assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FIOCRUZ (Protocolo nº. 518/09). Para a proteção e o bem estar dos indivíduos incluídos neste projeto, não foi divulgado o nome de qualquer um dos participantes. Pacientes com idade inferior a 18 anos, diabetes, infecções causadas por outras micobactérias e, aqueles co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana foram excluídos.

#### **3.2. Cultura celular de monócitos THP-1 e diferenciação para macrófagos-“like”**

Células THP-1 foram obtidas do “American Type Culture Collection” (ATCC; VA, USA). As culturas celulares foram mantidas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) contendo meio RPMI1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina a 2 mM, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (meio completo; todos obtidos da Gibco, CA, USA) e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> (Shel Lab, OR, USA).

Para diferenciação *in vitro* de monócitos THP-1 para macrófagos-“like”, as células foram mantidas em microplacas de 24 poços ou garrafas de cultura (Corning Inc., NY, USA) contendo meio completo com 2% de SFB e 200 nM/mL de PMA (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) por 24 horas. Após esse período foi feita a retirada das células em suspensão no meio de cultura e foi feita uma lavagem com PBS (LGC, RJ, Brasil) a 25 °C para remover as

células não aderentes, sendo o meio completo com 10% de SFB repostado para as células aderentes.

### **3.3. Coleta de sangue, processamento e obtenção de PBMC e monócitos**

Foram utilizadas capas leucoplaquetárias (“buffy-coats”) obtidas de doadores saudáveis, resultantes do processo de separação do sangue total em componentes e cedidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/UFRJ. O sangue periférico foi diluído 1:1 em PBS para separação das células mononucleares (PBMC) por gradiente de densidade em Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Após centrifugação a 900 xg por 30 minutos (min) à temperatura ambiente as PBMC foram lavadas duas vezes com PBS (500 xg, por 10 min, a 4 °C) e ressuspensas em meio completo. Uma pequena alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Tripán 0,4% (1:10; Gibco) e avaliada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis. Para a obtenção de monócitos, as PBMC foram plaqueadas em garrafas ou microplacas de cultura contendo meio completo com 2% de SFB e mantidas por 2 horas em estufa para a aderência dos monócitos. Após esse período foi feita a retirada das células em suspensão no meio de cultura e foram realizadas 3 lavagens com PBS fresco para remover as células não aderentes, sendo o meio completo com 10% de SFB repostado para as células aderentes.

### **3.4. Autofagia: indução e inibição**

A indução de autofagia foi realizada através de tratamento com rapamicina (200 ng/mL; Enzo Life Sciences Inc., NY, USA) ou com IFN $\gamma$  recombinante humano (10 ng/mL; PharMingen, NJ, USA), por 18 horas em estufa. Quando indicado, foi realizada a inibição da autofagia utilizando os inibidores farmacológicos 3-MA (10 mM/mL; Acros Organics, NJ, USA) ou Wortmanina (Wtm) (100 nM/mL; Enzo Life Sciences Inc.), 1 hora antes da indução de autofagia. A autofagia foi avaliada por microscopia de imunofluorescência, microscopia eletrônica ou por Western blotting.

### **3.5. Obtenção e utilização do ML**

Nos ensaios de interação entre patógeno e célula hospedeira foram utilizadas suspensões de ML (tratado com NaOH) irradiado, provenientes de camundongos ou tatus, gentilmente doadas pelo Dr. Patrick Brennan (Colorado State University, CO, USA) ou pelas Dr<sup>as</sup>. Maria Cristina Vidal Pessolani (Fundação Oswaldo Cruz, RJ) e Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP). As culturas celulares foram expostas à suspensão de ML morto por 30 min antes da indução de autofagia, de forma a se obter multiplicidade de internalização (MOI) igual a 10 bactérias por célula. Antes da estimulação com o ML, a suspensão de bactérias foi homogeneizada 10 vezes em seringa de insulina ultrafina de 100 U (Becton Dickinson, NJ, USA) para desfazer as globias. A possível contaminação das amostras de ML por LPS foi avaliada pelo Kit Limulus Amebocyte Lysate (Bio Whittaker, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.6. ML fluorescente**

Para obtenção do ML fluorescente foi utilizado o Kit PKH26 “red” (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), um fluorocromo vermelho com pico de excitação em 551 nm e emissão em 567 nm. O ML fluorescente foi gentilmente doado pela Dr<sup>a</sup>. Rosane Magda Brandão Teles (University of California, CA, USA). As culturas celulares foram expostas à suspensão de ML marcado por 30 min antes da indução de autofagia ou quando indicado, de forma a se obter MOI igual a 2, 10 ou 50 bactérias por célula. O mesmo ML não marcado foi usado como controle negativo da fluorescência.

### **3.7. Imunoperoxidase**

Para verificar a expressão de LC3 como marcador de autofagia em lesões de pele de pacientes BT e LL; cortes de 5 µm de espessura em criostato LM3000 (Leica, Wetzlar, Alemanha) foram obtidos a partir de biópsias congeladas e foram analisados pela técnica de imunoperoxidase, utilizando anticorpo policlonal de coelho IgG anti-LC3 humano (Novus Biologicals, CO, USA) na diluição de 1:200. Os criocortes foram fixados em acetona, permeabilizados e bloqueados antes da incubação com o anticorpo policlonal. O bloqueio e a incubação com anticorpo secundário e a peroxidase foram feitos utilizando o Kit VECTASTAIN Elite ABC (complexo avidina-biotina peroxidase) IgG de coelho (Vector Laboratories, CA, USA), e a revelação foi feita utilizando o Kit Substrato de Peroxidase AEC



(3-amino-9-etilcarbazol) (Vector Labs.), ambos de acordo com as instruções dos fabricantes. A contracoloração foi feita com Hematoxilina por 1 min. Controles negativos também foram realizados suprimindo o anticorpo primário. Foi realizada a montagem entre lâmina/lamínula e os cortes foram analisados através do microscópio óptico de campo claro Nikon Eclipse E400 (Nikon Instruments Inc., NY, USA), com auxílio do programa Infinity Capture (Lumenera Corporation, ON, Canadá).

A quantificação de LC3 foi feita através do número total de células positivas por tecido, sendo contados ao menos 5 campos randômicos em cada amostra e os resultados são apresentados como a mediana  $\pm$  range.

### **3.8. Western blotting**

Para verificar a expressão de LC3-I/II em lesões de pele de pacientes BT e LL, 30 cortes de 15  $\mu$ m foram colocados em tampão de lise celular (Tris-HCl a 50 mM, pH 7,5, EDTA a 5 mM, EGTA a 10 mM, NaF a 50 mM,  $\beta$ -glicerofosfato a 20 mM, NaCl a 250 mM, Triton X-100 a 0,1% e coquetel de inibidores protease; Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) e incubados por 30 min, a 4°C. Ao término da incubação, os lisados celulares foram centrifugados a 18.300 xg por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Paralelamente, a expressão de LC3-I/II foi avaliada em cultura de células. Para isso, macrófagos THP-1 foram plaqueados (concentração final de  $2,0 \times 10^6$  células viáveis por poço em meio completo) em microplacas de 6 poços, tratados com 3-MA, estimulados com ML morto e, em seguida, a autofagia foi induzida com IFN $\gamma$  ou rapamicina. Para a extração de proteínas totais, as células aderidas foram lavadas 3 vezes com 1 mL de PBS/EDTA (Gibco) 0,05 mM sobre camada de gelo e mecanicamente dissociadas da placa de cultivo. As células foram centrifugadas a 100 xg por 10 min a 4°C para descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento celular em 1 mL de PBS. Após uma nova centrifugação, as células foram tratadas com tampão de lise (conforme descrito anteriormente) e o sobrenadante armazenado para dosagem de proteínas utilizando o método de Bradford (Bio-Rad, CA, USA).

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE). Para isso, 30  $\mu$ g de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (Tris-HCl a 50 mM em pH 8,0, DTT a 100 mM, SDS a 2%, azul de

bromofenol a 0,01% e glicerol a 10%) e desnaturados a 100 °C, por 5 min. Após corrida eletroforética a 100 V em tampão contendo Tris a 25 mM e glicina a 250 mM, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Amershan, NJ, USA). A transferência para membrana de nitrocelulose foi feita em tampão de transferência (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM e metanol a 20%), a 100 V por 45 min em cuba semi-seca (Bio-Rad). Após transferência, as interações inespecíficas foram bloqueadas com aproximadamente 10 mL de tampão contendo Tris a 20 mM, pH 7,4, NaCl a 137 mM e Tween a 0,1% (TBS-Tween) acrescido de leite desnatado a 5% por 1 hora. Para verificar a presença de LC3-I/II, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal de coelho IgG anti-LC3 humano (I de 19 kDa e II de 17 kDa; Novus Biologicals) na diluição de 1:3.000 ou monoclonal de camundongo IgG anti-GAPDH (37 kDa) humano (Santa Cruz, CA, USA) na diluição de 1:10.000, ambos em TBS-Tween com 5% de leite desnatado, por 12 horas a 4 °C. Ao término da incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-Tween por 5 min e então incubada por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Santa Cruz) ou com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ambos conjugados à peroxidase na diluição de 1:2.000 (Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) em TBS-Tween contendo 5% de leite desnatado. Finalmente, foram realizadas 4 lavagens de 5 min com TBS-Tween. Com exceção da incubação com o anticorpo primário, todas as outras etapas descritas acima foram realizadas à temperatura de 25 °C e sob agitação.

A detecção das bandas foi feita por quimioluminescência utilizando o reagente Western blotting Luminol (Santa Cruz). Para isso, partes iguais (500 µl de cada) das soluções fornecidas foram misturadas e aplicadas sobre a membrana por 2 min. Em seguida, a membrana foi exposta a um filme radiográfico X (X-OMAT LS; Kodak, NY, USA), por diversos períodos de tempo e o filme foi revelado em câmara escura após imersão em solução reveladora e solução fixadora.

A quantificação do Western blotting para LC3 foi realizada através de densitometria utilizando o programa Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated, USA) e os resultados foram apresentados como a mediana ± range da razão LC3-II/GAPDH.

### **3.9. Isolamento de macrófagos de lesões de pele**

Após o diagnóstico dos pacientes com as formas clínicas da hanseníase, amostras de pele dos mesmos foram coletadas e, em seguida, os fragmentos foram colocados em tubos

contendo RPMI 1640 e mantidos a 4 °C. Após um breve período, a derme e a epiderme foram separadas mecanicamente com o auxílio de um bisturi, sendo a derme fragmentada em porções menores para facilitar a ação das enzimas na presença de uma solução de dispase a 4 mg/mL e colagenase a 0,5 mg/mL (Roche Applied Science, IN, USA) e soro fetal bovino a 10% em RPMI 1640. Em seguida, a solução com os fragmentos da derme foi colocada em uma cubeta de teflon e mantida em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 12 horas. Após este período, as células foram lavadas com RPMI 1640 por três vezes a 500 xg durante 10 min à 4 °C e todos os sobrenadantes foram estocados para posterior obtenção de ML. As células foram então lavadas, ressuspensas em meio completo e contadas por exclusão em azul de Tripán. Em seguida, as células foram distribuídas em microplacas e mantidas em estufa a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub> por 7 dias. Após esse período as células não aderentes foram removidas e os macrófagos foram mantidos em meio completo.

### **3.10. Imunofluorescência**

Para detectar a autofagia, foram realizados múltiplos experimentos (conforme descrito abaixo), baseados na avaliação das proteínas Atg por fluorescência.

Macrófagos THP-1 foram plaqueados em meio completo na concentração final de 5,0 x 10<sup>5</sup> células viáveis por poço, em microplacas de 12 poços contendo lamínulas circulares de 15 mm estéreis (GLASSCYTO). As células foram então estimuladas com ML marcado (MOI 2, 10 ou 50:1) ou tratadas com rapamicina e incubadas em estufa por 18 horas. A expressão de Atg3 e LC3-I/II foram avaliadas por microscopia de fluorescência. Em alguns experimentos foram utilizados macrófagos THP-1 ou monócitos aderentes pré-tratados com 3-MA ou Wtm, estimulados com ML marcado (MOI 10:1) por 30 min e, em seguida, com IFN $\gamma$  ou rapamicina por 18 h. A expressão de LC3-I/II e sua co-localização com o ML foram avaliadas.

Alternativamente, macrófagos de pele de pacientes LL e BT foram plaqueados em meio completo na concentração final de 1,0 x 10<sup>5</sup> células viáveis por poço, em microplacas de 12 poços contendo lamínulas circulares de 15 mm estéreis. Em seguida a autofagia foi induzida com IFN $\gamma$  ou rapamicina. A expressão de LC3-I/II foi avaliada por microscopia de fluorescência.

Os procedimentos a seguir foram utilizados para os tipos celulares mencionados anteriormente. As células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS/Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) a 0,01% e bloqueadas com uma solução de SFB 10%\BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram incubadas com os anticorpos primários de interesse: IgG policlonal de coelho anti-LC3 humano (Novus Biologicals) na diluição de 1:300, IgG policlonal de cabra anti-Atg3 humano (Santa Cruz) na diluição de 1:300 e IgG monoclonal de camundongo anti-CD68 humano (marcador de macrófagos; R&D Systems, Minneapolis, USA) na diluição de 1:100 por 12 horas a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de PBS/Triton X-100 e foi então realizada a incubação dos seguintes anticorpos secundários por 2 horas à temperatura ambiente: anti-IgG de coelho Alexa Fluor 633<sup>®</sup>, anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488<sup>®</sup> e anti-IgG de camundongo Alexa Fluor 532<sup>®</sup> (Invitrogen Corporation, CA, USA), todos na diluição de 1:500. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de PBS/Triton X-100 e foi adicionado o DAPI (Invitrogen) diluído em 1:5.000. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e as lâminas foram montadas em meio anti-“fading” Permafluor (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) e seladas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) nas bordas. Controles negativos também foram realizados, consistindo na omissão do anticorpo primário. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Colibri Zeiss com iluminação à base de LED (Zeiss, Heidelberg, Alemanha) com auxílio do programa AxioVision 4.6 (Zeiss).

A quantificação de autofagossomos foi realizada através do percentual de células expressando LC3 puntiforme (LC3-II)/total de células nucleadas. A quantificação de Atg3 foi realizada através do percentual de células expressando Atg3/total de células nucleadas. Em ambos os casos foram contadas ao menos 100 células em cada variável (em pelo menos 5 campos randômicos) por experimento e os resultados foram apresentados como a mediana  $\pm$  desvio padrão.

### **3.11. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para investigar a presença de características autofágicas em lesões de pele de pacientes BT e LL, e em pele normal, foi realizada análise ultraestrutural com ênfase na pesquisa de autofagossomos. Para isso, foram feitos cortes semi finos de biópsias fixadas em glutaraldeído

2,5% e corados com Azul de toluidina a 1% em solução aquosa de Bórax a 1%. Depois, os cortes foram colocados em placa aquecida à 50 °C, lavados com água e secos na placa. Em seguida, foram montados com lamínula em Entellan e analisados em microscópio óptico de campo claro Nikon Eclipse E400 para seleção dos campos de cortes para processamento de microscopia eletrônica de transmissão.

Paralelamente, macrófagos THP-1 ou monócitos aderentes foram plaqueados em meio completo na concentração final de  $5,0 \times 10^6$  células viáveis por garrafa de 25 cm<sup>2</sup>. As células foram então estimuladas com ML morto e, em seguida, a autofagia foi induzida com IFN $\gamma$ . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 com 3,5% de sacarose por 1 hora a 4 °C.

Em seguida, as células e os cortes semi finos foram lavados no mesmo tampão anteriormente mencionado e pós-fixados com 1% de Tetróxido de Ósmio (OsO<sub>4</sub>) por 1 hora a 4 °C. Após estes procedimentos, foram lavados em tampão cacodilato, desidratados em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltrados com a mistura de acetona 100% e resina Poly/Bed<sup>®</sup> 812 (Polysciences Inc., PA, USA) e polimerizados à 60 °C por 2 dias. Após a polimerização, foram feitos cortes ultrafinos de 70-80 nm em ultramicrotomo Reichert OMU3 (Leica, Wetzlar, Alemanha), recolhidos em grades de cobre de 300 mesh, contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL, Tokyo, Japão; Plataforma de Microscopia Eletrônica IOC/FIOCRUZ).

### **3.12. Dosagem de citocinas**

Macrófagos THP-1 foram plaqueados em meio completo na concentração final de  $5,0 \times 10^5$  células viáveis por poço em microplacas de 24 poços. Foram então tratados com 3-MA e estimulados com ML morto. Em seguida, a autofagia foi induzida com IFN $\gamma$  ou rapamicina e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C após 18 horas de incubação.

A dosagem de citocinas nos sobrenadantes das culturas foi realizada por ELISA, avaliando a produção de IL-6, IL-10, IL-15, IL-12p40/IL-23 e TNF. A técnica foi realizada conforme as especificações do fabricante (R&D Systems). As absorvâncias foram mensuradas através do leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, CA, USA) e analisadas pelo programa SoftMax Pro v5.3 (Molecular Devices).

### **3.13. Avaliação do percentual de associação de ML aos macrófagos**

Para avaliação do papel da autofagia na associação do ML a macrófagos, foram plaqueados macrófagos THP-1 em meio completo na concentração final de  $5,0 \times 10^5$  células viáveis por poço em microplacas de 12 poços contendo lamínulas circulares de 15 mm estéreis. Eles foram então estimulados com ML morto e, em seguida, a autofagia foi induzida com IFN $\gamma$  ou Rapamicina. Após a indução, os macrófagos aderidos foram lavados 2 vezes com PBS e fixados com metanol por 10 min e, em seguida, corados (pela técnica de Ziehl-Neelsen) com Fucsina por 30 min, lavados 2 vezes com água destilada e cuidadosamente tratados com solução álcool-ácido. Para interromper a diferenciação, as amostras foram mergulhadas em água corrente. Por fim, as células foram contracoradas com azul de metileno por 10 min e o excesso de corante foi retirado em água corrente. As lamínulas foram desidratadas e montadas em Entellan. O percentual de associação de ML foi calculado pelo número de macrófagos contendo pelo menos uma bactéria/número total de macrófagos observados e os resultados foram apresentados como a mediana  $\pm$  range.

### **3.14. Análise estatística**

Os dados foram expressos como mediana  $\pm$  range. Os dados foram analisados utilizando os testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, com o auxílio do programa GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software Inc., CA, USA). A significância estatística foi considerada quando  $p \leq 0.05$ .

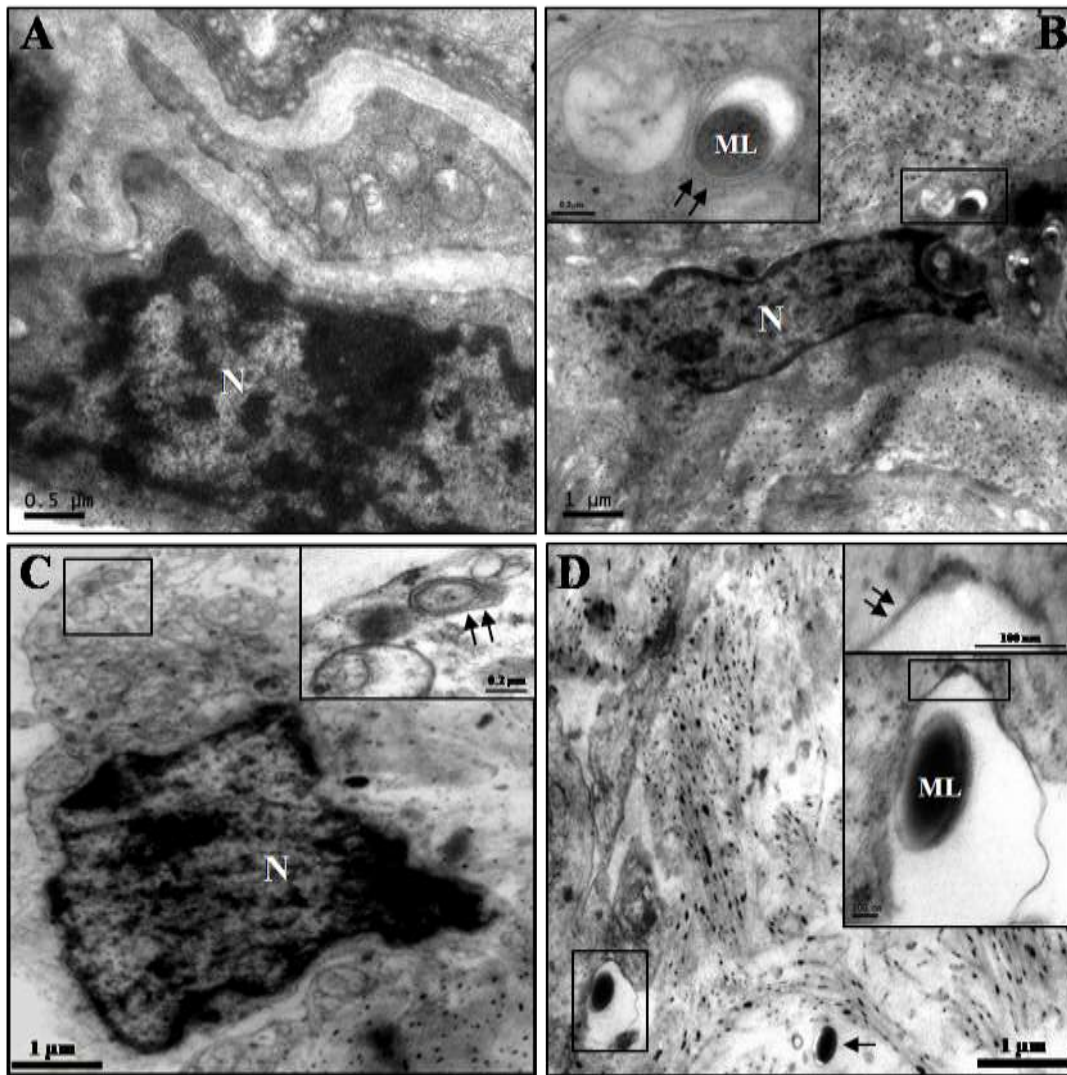
## 4. Resultados

### 4.1. Análise dos aspectos ultraestruturais em biópsias de lesão de pele de pacientes com hanseníase

Em pacientes infectados com o *M. leprae*, os organismos podem ser encontrados em uma variedade de tecidos e tipos celulares. Para investigar a possível participação da autofagia na infecção pelo ML, a presença de vacúolos de dupla membrana (característica de autofagossomos) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão.

Foram analisadas biópsias de lesões de pele de pacientes com as formas clínicas da doença - LL e BT, avaliando células com morfologia similar a macrófagos do tecido conjuntivo. Como controle, utilizamos fragmentos de pele normais (Figura 4.1A). Foi observada a presença de autofagossomos em células de lesão de pele tanto de pacientes LL (Figura 4.1B) como BT (Figura 4.1C e D). A análise ultraestrutural demonstrou a presença de bacilos em vacúolos com membrana simples ou dupla (Figura 4.1D).

A análise do material de lesão revelou a presença de bacilos degenerados e figuras mielínicas sem bactérias (não mostrado) no tecido do paciente BT, mas não no do LL ou do tecido normal. O número total de autofagossomos por corte de tecido foi avaliado em ao menos 10 campos randômicos. Foi observado um número maior de autofagossomos em células de lesão de paciente BT quando comparado aos de LL e tecido normal (Figura 4.1E).



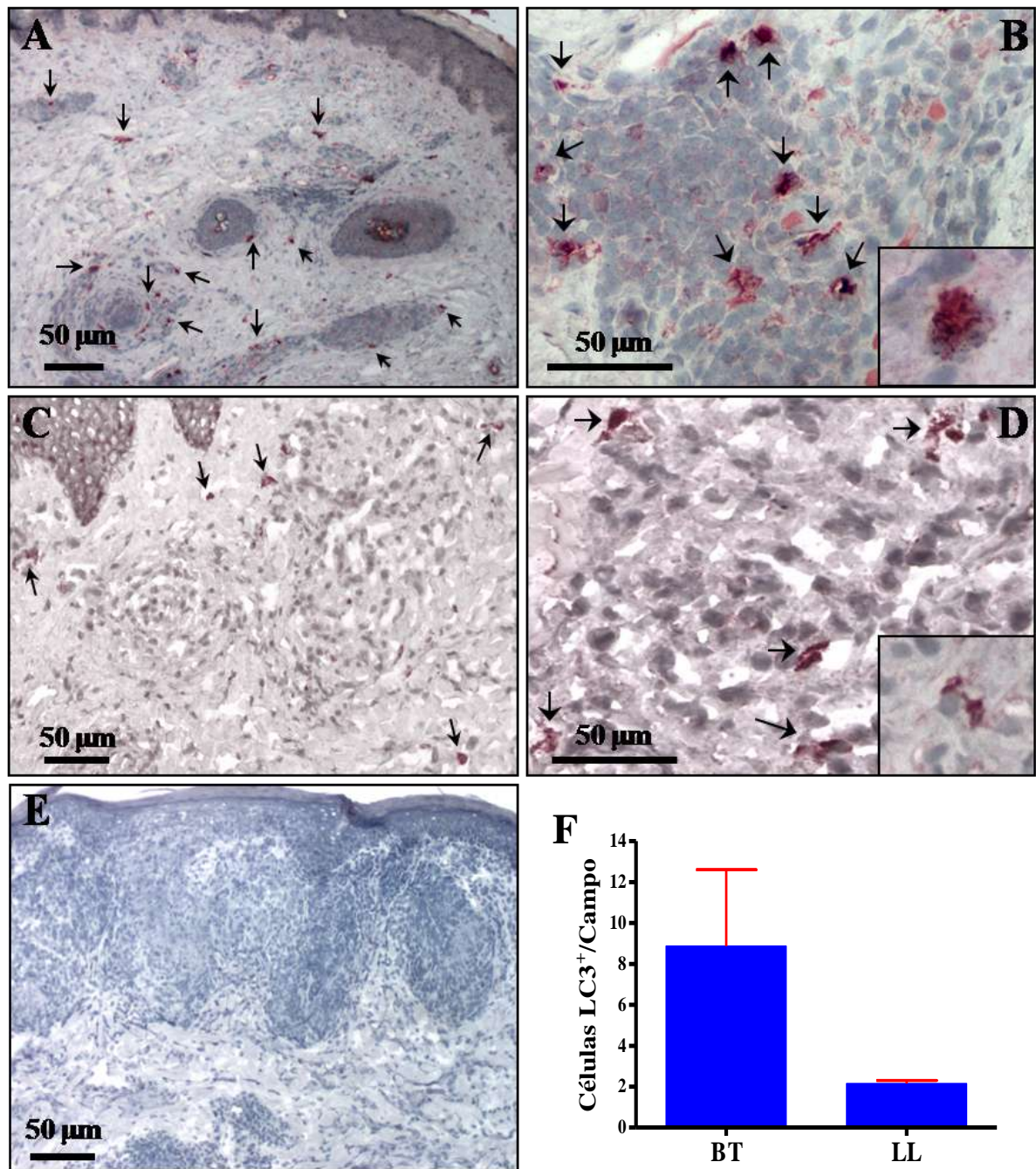
**Figura 4.1: Presença de autofagossomos em lesões de pele de pacientes com hanseníase.** Biópsias de lesão de pele foram obtidas de pacientes com as formas clínicas LL e BT, ou de indivíduo sadio, e processadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Pele normal (PN). (B) *M. leprae* (ML) dentro de um autofagossomo no tecido do paciente LL (inserto). (C-D) Tecido do paciente BT. (C) Autofagossomo (inserto). (D) ML no interior de um fagossomo (seta), assim como em um autofagossomo (inserto). (E) A quantificação foi realizada através da contagem total de autofagossomos por corte de tecido, em ao menos 10 campos randômicos em cada amostra. As imagens são representativas de um experimento com uma amostra de cada variável. Setas indicam fagossomos. Setas duplas indicam autofagossomos. N: núcleo. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso.



## **4.2. Análise da redistribuição de LC3 em lesões de pele de pacientes com hanseníase**

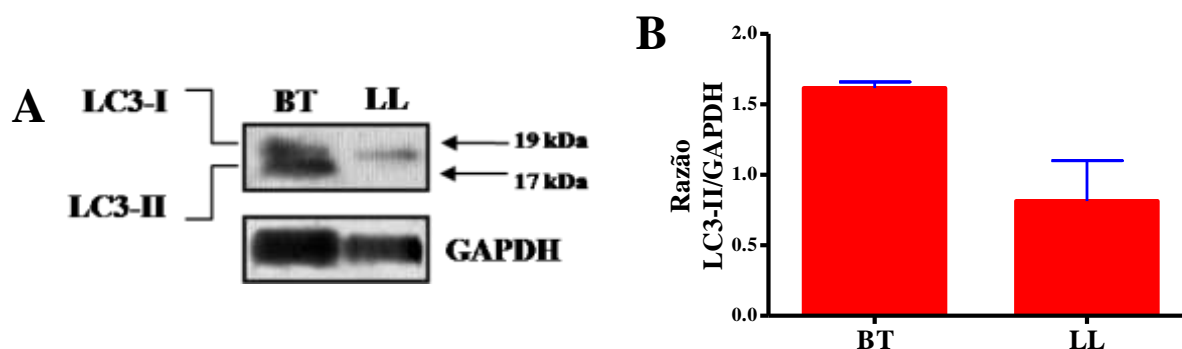
Apesar da análise por microscopia eletrônica ser uma metodologia amplamente utilizada para monitorar a autofagia, algumas desvantagens técnicas limitam o seu uso, como a presença de artefatos. Além disso, dependendo da etapa autofágica, nem sempre é possível a observação de vacúolos de dupla membrana, como no estágio de anfissomo. Por vezes, a dupla membrana presente nos autofagossomos é degradada por fosfolipases e outras enzimas secretadas durante a infecção com microrganismos patogênicos (Birmingham et al. 2007, Klionsky et al. 2008). Desse modo, no intuito de verificarmos se os vacúolos com dupla membrana observados em células presentes na lesão de pacientes com hanseníase eram autofagossomos, a expressão de LC3, uma proteína expressa no autofagossomo maduro e que é utilizada como marcador de autofagia (Kabeya et al. 2000, Mizushima & Yoshimori 2007) foi avaliada por imunoperoxidase.

A análise da expressão de LC3 em biópsias de lesões de pele de pacientes com as formas clínicas LL (n=2) e BT (n=2), por imunoperoxidase, revelou um maior número de células expressando este marcador nos pacientes BT ( $8.87 \pm 5.27$ ), quando comparados aos LL ( $2.15 \pm 0.21$ ) (Figura 4.2A-E e F).



**Figura 4.2: Redistribuição de LC3 em lesões de pele de pacientes com hanseníase.** Biópsias de lesões de pele foram obtidas de pacientes com as formas clínicas BT e LL e a expressão de LC3 foi avaliada pela técnica de imunoperoxidase contrastada com hematoxilina, utilizando um anticorpo anti-LC3 I/II. (A e B) Os pacientes BT apresentam um número maior de células marcadas para LC3, assim como uma marcação mais intensa (insetos, tom vermelho-acastanhado), quando comparados aos pacientes LL (C e D). (E) Controle negativo. (F) A quantificação das células LC3<sup>+</sup> foi feita através da contagem de células positivas por campo do corte de tecido em ao menos 05 campos randômicos em cada amostra e os resultados são apresentados como a mediana ± desvio padrão. As imagens são representativas de duas amostras de cada grupo de pacientes. BT: “borderline” tuberculoides; LL: lepromatoso lepromatoso. Setas indicam células positivas.

Quando a autofagia é induzida, o LC3 é convertido de sua forma citoplasmática (LC3-I), para a sua forma conjugada à PE (LC3-II), que se deposita em ambas as membranas externa e interna do autofagossomo (Mizushima & Yoshimori 2007). O LC3-II é o único marcador proteico associado a autofagossomos completos em eucariotos superiores. Assim, visando confirmar se em células de lesão de pacientes BT há aumento de LC3-II, extratos de biópsias de lesão de pele foram submetidos a uma corrida eletroforética e a análise por Western blotting confirmou a maior expressão da proteína LC3-II nos pacientes BT ( $1.61 \pm 0.06$ ), quando comparados aos LL ( $0.81 \pm 0.40$ ), sendo a densitometria do gel realizada através da razão LC3-II/GAPDH (Figura 4.3A-B).



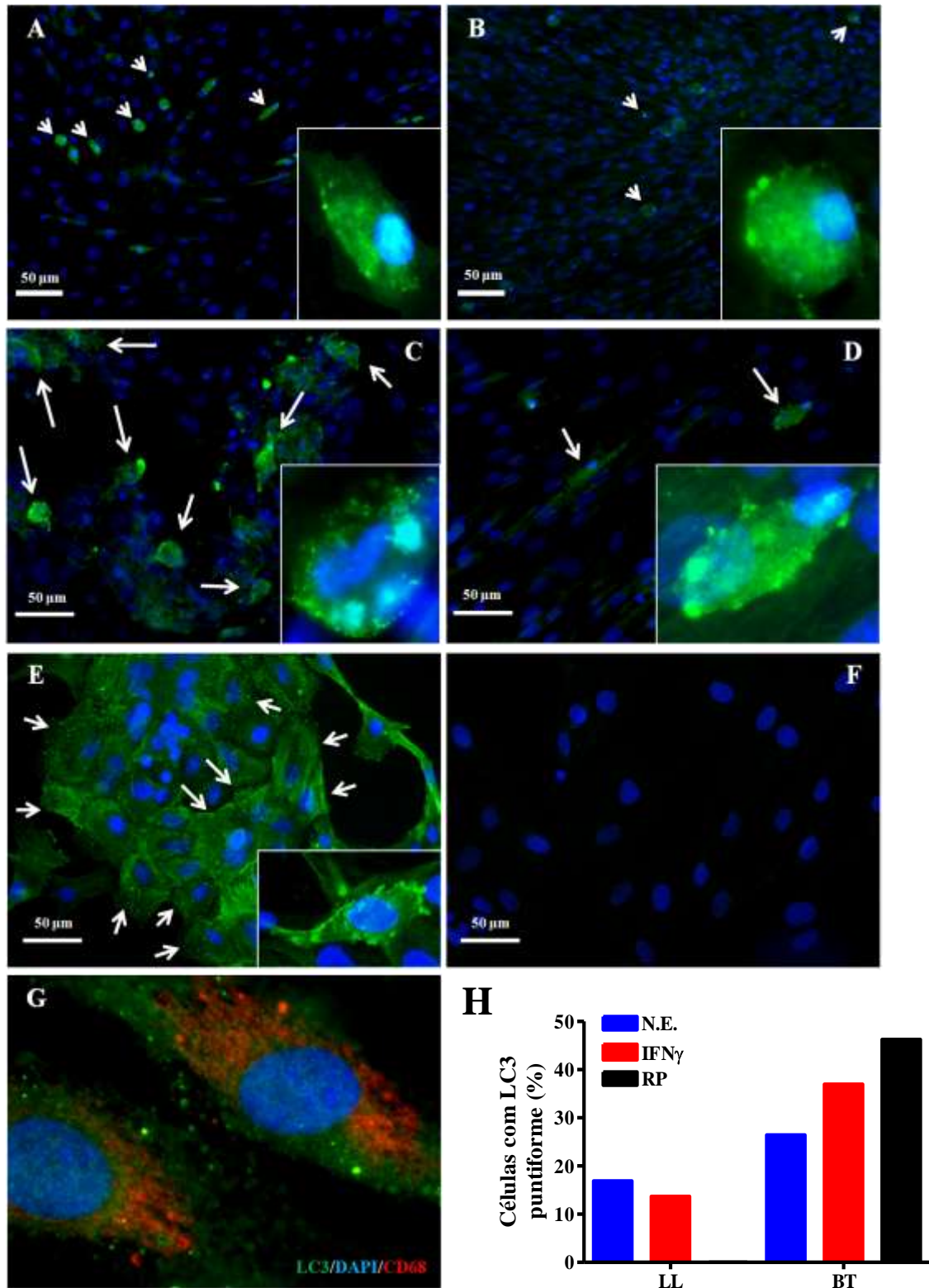
**Figura 4.3: Aumento da expressão proteica da forma associada ao autofagossomo LC3-II em lesões de pele de pacientes BT.** Biópsias de lesões de pele foram obtidas de pacientes com as formas clínicas BT ou LL e a expressão de LC3 foi avaliada por Western blotting, utilizando um anticorpo anti-LC3 I/II (A). A quantificação foi realizada através da razão LC3-II/GAPDH em cada amostra e os resultados são apresentados como a mediana  $\pm$  range (B). Os resultados são representativos de dois extratos proteicos de cada grupo de pacientes. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

#### 4.3. Análise da expressão de LC3 em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase

Nossos dados utilizando biópsias de lesões de pele de pacientes com hanseníase indicaram a ativação da autofagia. Porém, quando analisadas tanto por microscopia eletrônica quanto por imunoperoxidase, os tipos celulares com essas características não foram definidos, embora muitas apresentassem características morfológicas compatíveis com macrófagos. Para confirmar a presença de autofagossomos em macrófagos de lesão de pele, as biópsias foram digeridas com dispase e colagenase, conforme protocolo previamente descrito por Moura e colaboradores (2007). Após o isolamento, as células foram cultivadas para a análise do fenótipo celular utilizando o anticorpo anti-hCD68. Observamos que após 7 dias de cultura

mais de 95% das células eram positivas para o CD68. Foram avaliadas células isoladas de biópsias de lesões de pele de pacientes LL e BT, não sendo observadas diferenças significativas quanto ao percentual de células CD68<sup>+</sup> nas culturas (dados não mostrados).

Os macrófagos foram estimulados ou não com IFN $\gamma$  e a ocorrência de autofagia foi avaliada por imunofluorescência através da conversão da fluorescência difusa no citoplasma (LC3-I) para a fluorescência puntiforme na membrana do autofagossomo (LC3-II ou LC3 puntiforme; Deretic 2006). As células não estimuladas derivadas do paciente BT (Figura 4.4A) apresentaram um número maior de células LC3 puntiformes em relação às células dos pacientes LL (Figura 4.4B). A estimulação dos macrófagos de BT com o IFN $\gamma$  (Figura 4.4C) induziu um aumento no número de células com LC3 puntiforme, quando comparados às células não estimuladas (Figura 4.4A). Através da avaliação da marcação de LC3 puntiforme, foi possível observar que os macrófagos do paciente BT foram mais sensíveis ao estímulo com IFN $\gamma$  (Figura 4.4C) em relação aos macrófagos do LL (Figura 4.4D). A rapamicina foi utilizada como controle positivo (Figura 4.4E). O controle negativo é ilustrado na Figura 4.4F. O CD68 foi utilizado como marcador de macrófagos (Figura 4.4G). A análise do percentual de macrófagos de lesões de pele expressando LC3 puntiforme sugere uma maior expressão deste marcador de autofagia no paciente BT em relação ao paciente LL, na ausência ou presença de IFN $\gamma$  (Figura 4.4H).



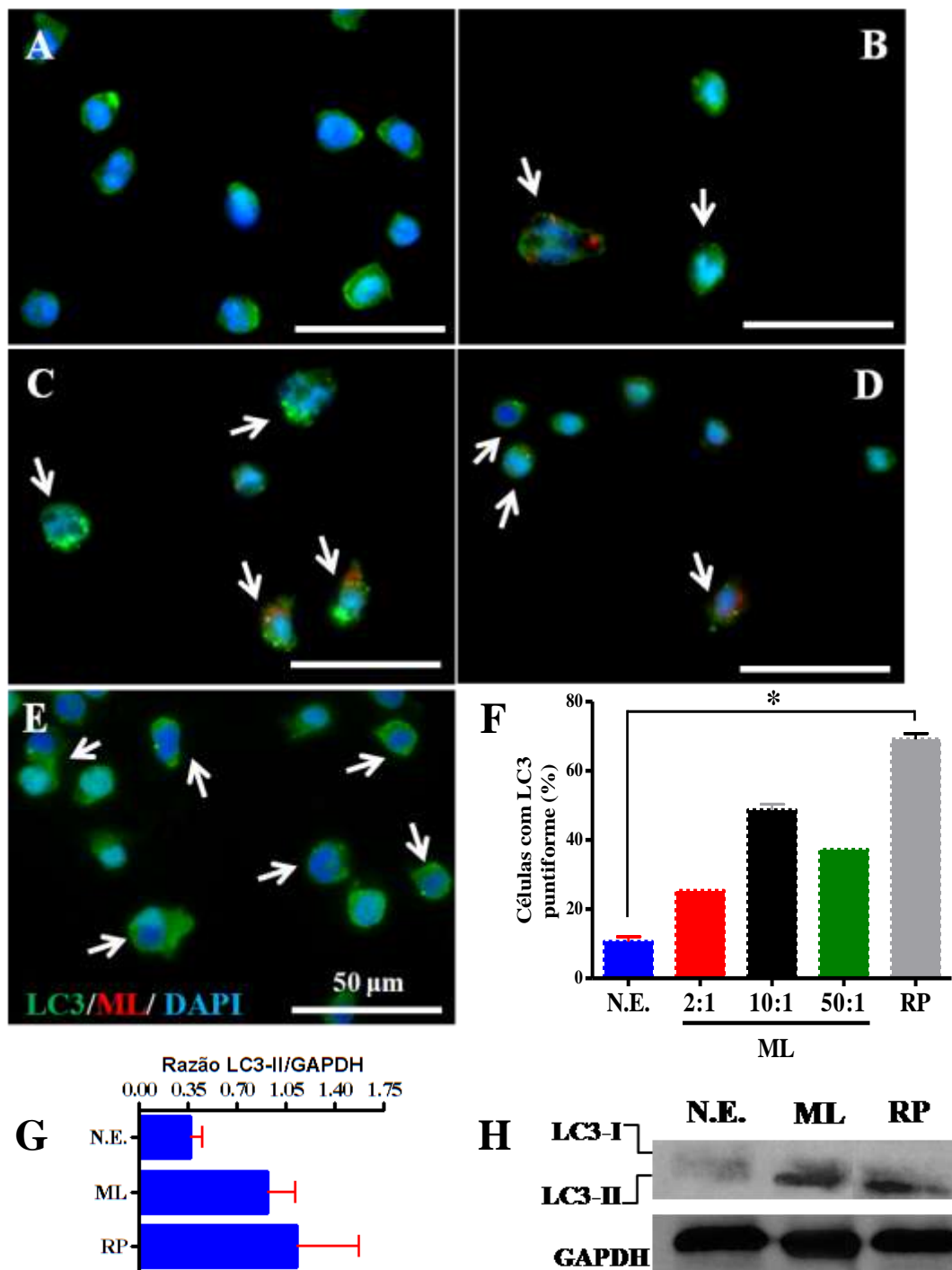
**Figura 4.4: Aumento da expressão de LC3-II em macrófagos de lesões de pele de pacientes BT.** Macrófagos de lesões de pele foram isolados de pacientes BT e LL e estimulados ou não (N.E.) com 10 ng de IFN $\gamma$  ou 200 ng de rapamicina (RP) por 18 horas. A expressão de LC3 foi avaliada por microscopia de imunofluorescência utilizando anticorpos para LC3 I/II (verde) e CD68 (vermelho), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). (A e C) Paciente BT. (A) N.E. (C) IFN $\gamma$ . (B e D) Paciente LL. (B) N.E. (D) IFN $\gamma$ . (E) RP. (F) Controle negativo. (G) CD68. (H) Percentual de células expressando LC3-II. As imagens são representativas de um experimento. Setas indicam células positivas.



#### 4.4. A estimulação com o ML induz a autofagia em macrófagos THP-1

O isolamento de macrófagos de lesões de pele é um ótimo modelo de estudo da interação *M. leprae*-célula (Moura et al. 2007). No entanto, é um processo relativamente demorado, pois depende da disponibilidade de pacientes, do tempo entre o atendimento clínico e o diagnóstico, além do tempo entre a obtenção da amostra, isolamento propriamente dito e cultivo. Além disso, o número de células obtidas é variável e baixo. Tendo em vista a menor disponibilidade de macrófagos de lesão de pacientes com hanseníase, foi utilizado um modelo *in vitro* para estudar a interação *M. leprae*-célula com macrófagos derivados de monócitos da linhagem humana THP-1 e monócitos de indivíduos saudáveis. Primeiramente, foi avaliado se a estimulação com o ML é capaz de levar à indução de autofagia em macrófagos, uma vez que recentemente foi descrito que várias micobactérias diretamente induzem autofagia (Hartman & Kornfeld 2011, Zullo & Lee 2012).

A estimulação com concentrações crescentes de ML (2:1, 10:1 e 50:1) foi capaz de induzir um aumento na expressão de LC3 puntiforme nas culturas de macrófagos THP-1, quando comparadas às culturas não estimuladas (Fig. 4.5A-D), mas não de uma forma dose dependente, sendo observada a seguinte relação de indução: ML 2:1 < ML 10:1 > ML 50:1 (Figura 4.5A-D). A rapamicina (Figura 4.5E) foi utilizada como controle positivo, sendo capaz de aumentar significativamente a expressão de LC3-II em relação ao não estimulado (Figura 4.5A) (rapamicina=69.12 ± 2.01% vs. N.E.=10.55 ± 2.31%,  $p < 0.05$ ). A estimulação com ML na concentração de 10:1 foi capaz de induzir os níveis de LC3 puntiformes (48.64 ± 1.71%; Figura 4.5C) mais próximos aos da rapamicina (69.12 ± 2.01%; Figura 4.5E). A quantificação das células expressando LC3 puntiforme é mostrada na Figura 4.5F. O MOI de ML 10:1 também foi capaz de induzir a expressão proteica de LC3-II (0.92 ± 0.26), em nível superior ao não estimulado (0.37 ± 0.11) e similarmente a rapamicina (1.12 ± 0.62) (Figura 4.5G-H).



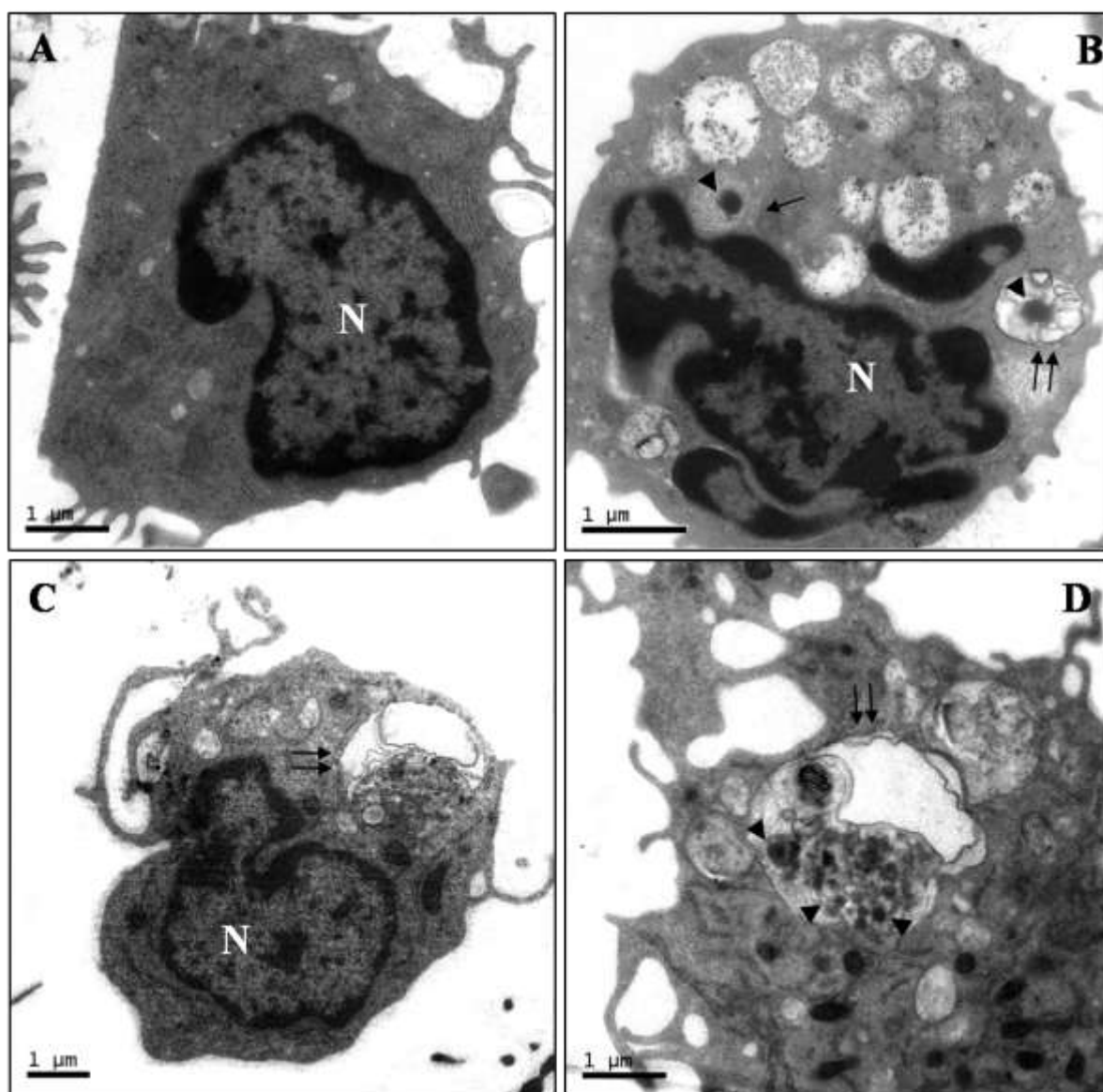
**Figura 4.5:** A estimulação com *M. leprae* (ML) induz a autofagia em macrófagos THP-1. Macrófagos THP-1 foram diferenciados com 200 nM de PMA por 24 horas e estimulados com o ML-PKH26 (vermelho) por 18 horas, com o MOI de 2, 10 ou 50:1. A expressão de LC3 foi avaliada por microscopia de fluorescência utilizando anticorpo para LC3 I/II (verde), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). (A) Não estimulado (N.E.). (B) ML 2:1. (C) ML 10:1. (D) ML 50:1. (E) rapamicina (RP) (200 ng). (F) Percentual de células expressando LC3 puntiforme. Os resultados são apresentados como a mediana  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn, onde (\*) representa valor de  $p < 0.05$ . As imagens são representativas de 3 experimentos para A, C e E; e um experimento para B e D. As setas brancas indicam as células positivas. (G-H) Macrófagos THP-1 foram estimulados com o ML 10:1 ou com RP por 18 horas. O resultado representa duas análises densitométricas de LC3 (G) por Western blotting (H).

#### **4.5. O IFN $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em monócitos e macrófagos THP-1 estimulados com o ML**

Sabe-se que o IFN $\gamma$  é uma citocina capaz de ativar os mecanismos microbicidas dos macrófagos. Estudos preliminares demonstraram que a indução de autofagia pelo IFN $\gamma$  é um importante mecanismo de defesa contra o *M. tuberculosis* (Gutierrez et al. 2004). Para avaliar se macrófagos ativados na presença de IFN $\gamma$  e ML apresentavam aumento no percentual de autofagossomos, macrófagos humanos foram estimulados com o ML e/ou IFN $\gamma$  e analisados inicialmente por microscopia eletrônica de transmissão.

Os monócitos não estimulados apresentaram raros vacúolos (Figura 4.6A). Foram observados nos monócitos estimulados com o ML, vacúolos de uma única membrana (fagossomos) ou dupla membrana (autofagossomos) contendo bactérias (Figura 4.6B). O IFN $\gamma$  foi capaz de induzir a formação de autofagossomos em monócitos (Fig. 4.6C). Nos monócitos estimulados com ambos ML e IFN $\gamma$ , foram observados autofagossomos próximos ao fagossomo contendo ML (não mostrado), bem como bactérias envoltas por um vacúolo de dupla membrana (Figura 4.6D).

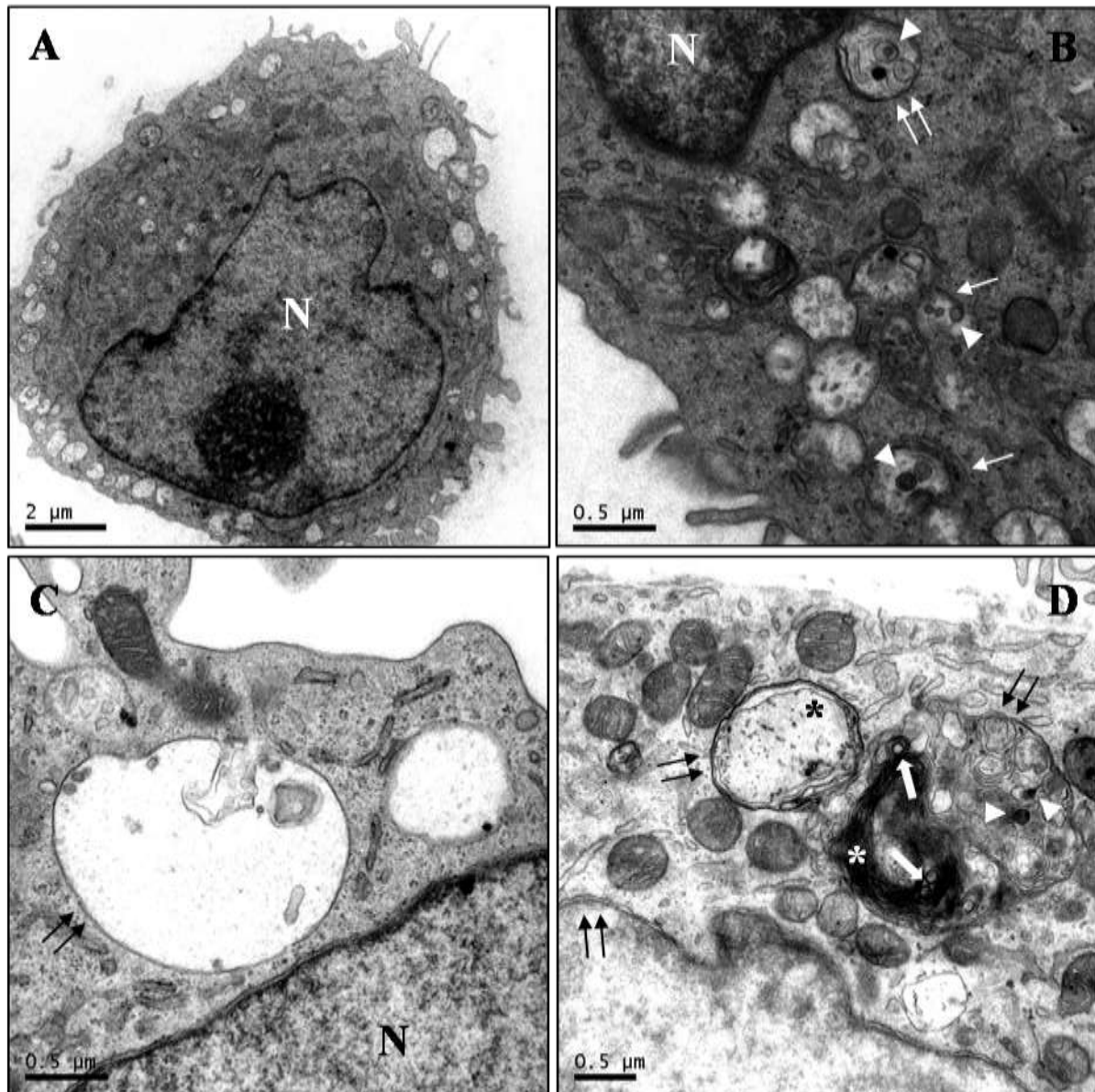




**Figura 4.6: O IFN $\gamma$  induz a formação de autofagossomos em monócitos estimulados com o *M. leprae* (ML).** Monócitos de indivíduos saudáveis foram estimulados com o ML (MOI 10:1) por 30 minutos, posteriormente tratados com 10 ng de IFN $\gamma$  por 18 horas e processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Não estimulado. (B) Estimulado com ML. (C) Estimulado com IFN $\gamma$ . (D) Estimulado com IFN $\gamma$ +ML. As imagens são representativas de um experimento. Setas indicam fagossomos. Setas duplas indicam autofagossomos. Cabeças de seta indicam o ML. N: núcleo.

Os monócitos THP-1 tratados com PMA apresentaram um aspecto multivacuolar, com diversas mitocôndrias, sugerindo um perfil de diferenciação para macrófagos (Figura 4.7A). Nos macrófagos THP-1 estimulados com o ML, foram observadas bactérias em vacúolos de uma única ou dupla membrana, similarmente ao observado nos monócitos (Figura 4.7B). O IFN $\gamma$  induziu a formação de autofagossomos em monócitos (Fig. 4.7C), os quais aparentavam o englobamento de componentes citoplasmáticos. Na presença de ambos IFN $\gamma$  e ML são observadas bactérias degeneradas envoltas em um autofagossomo contendo figuras

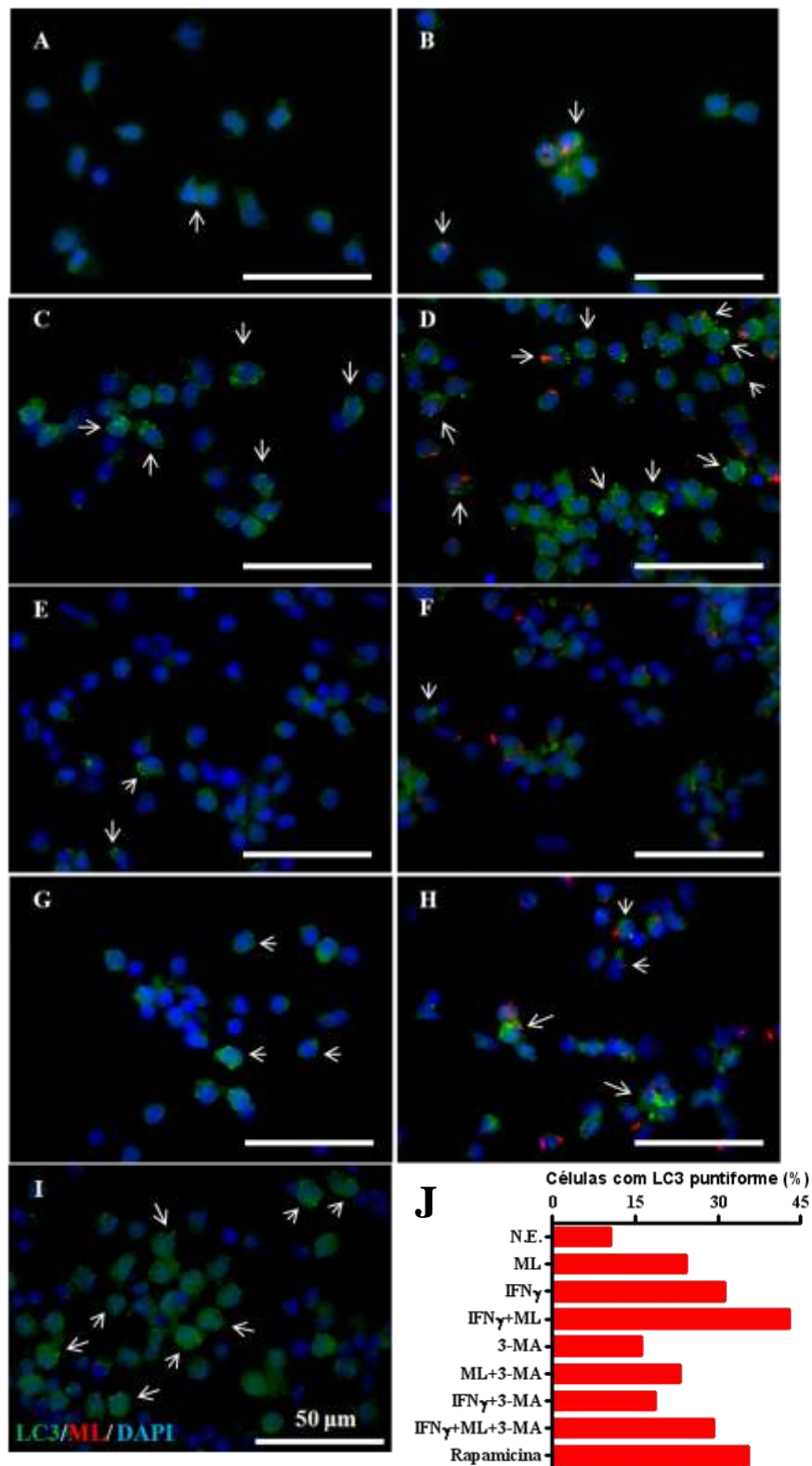
mielínicas, assim como são observadas bactérias íntegras (Figura 4.7D). Outro autofagossomo contendo uma figura mielínica e com conteúdo degradado também pode ser observado na Figura 4.7D. Em adição, foi observado aumento no número de mitocôndrias por célula na presença de ambos ML e  $\text{IFN}\gamma$ , em ambos os tipos celulares.



**Figura 4.7: O  $\text{IFN}\gamma$  induz a formação de autofagossomos em macrófagos THP-1 estimulados com o *M. leprae* (ML).** Macrófagos THP-1 (diferenciados com PMA 200 nM por 24 horas) foram estimulados com o ML (MOI 10:1) por 30 minutos, posteriormente tratados com 10 ng de  $\text{IFN}\gamma$  por 18 horas e processados para análise por microscopia eletrônica de transmissão. (A) Não estimulado. (B) Estimulado com ML. (C) Estimulado com  $\text{IFN}\gamma$ . (D) Estimulado com  $\text{IFN}\gamma$ +ML. As imagens são representativas de um experimento. Setas indicam fagossomos. Setas duplas indicam autofagossomos. Cabeças de seta indicam o ML. Setas brancas largas indicam bactérias degeneradas. Asteriscos indicam estruturas multilamelares semelhantes a figuras de mielina. N: núcleo.

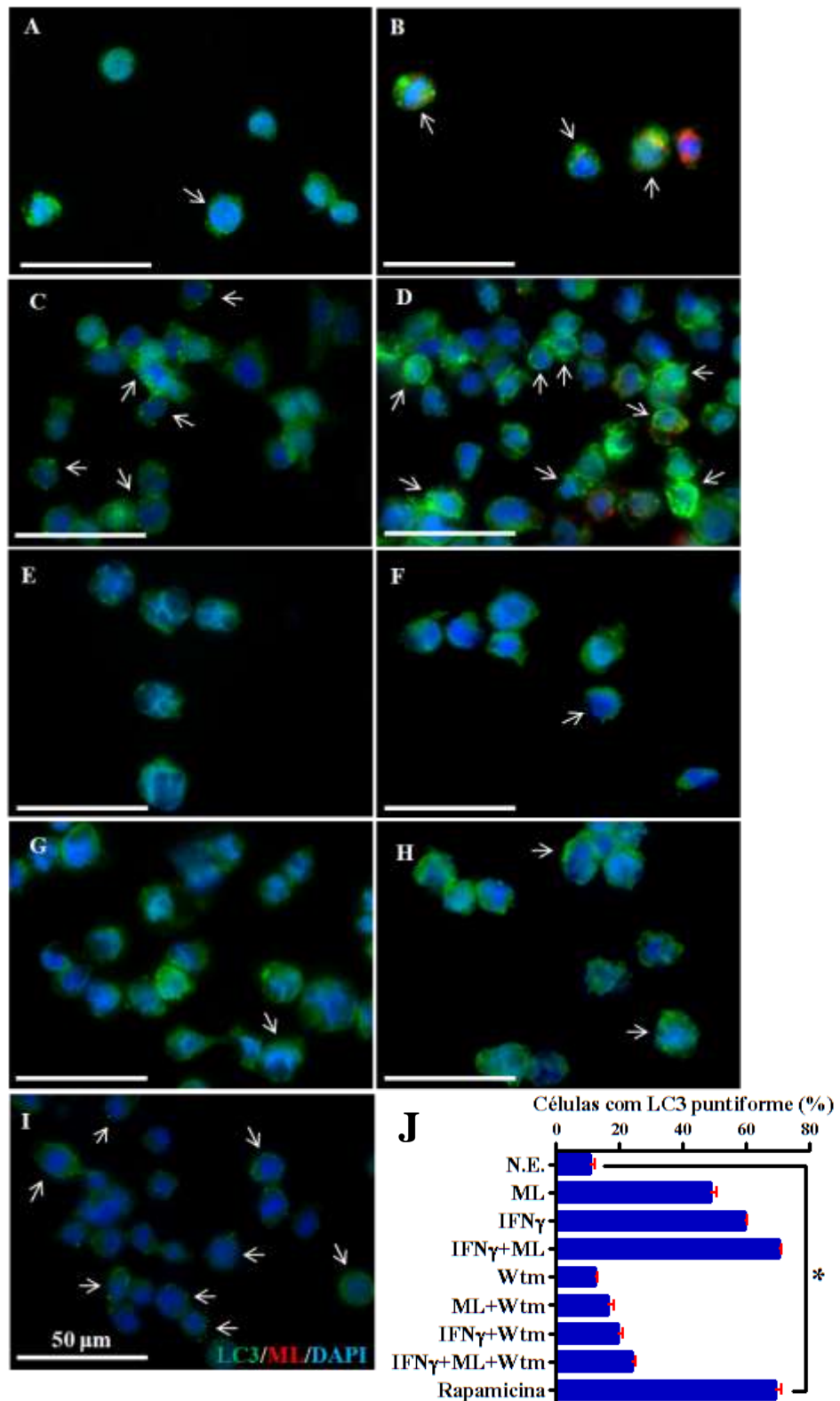
#### **4.6. O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de LC3 em monócitos e macrófagos THP-1 estimulados com o ML**

No intuito de confirmar a indução de autofagia na presença de ambos IFN $\gamma$  e ML, a expressão do marcador de autofagia LC3 foi avaliada por imunofluorescência e Western blotting. Em comparação ao não estimulado (Figura 4.8A) ou ao ML (Figura 4.8B), a estimulação com IFN $\gamma$  aumenta a expressão de LC3 puntiforme em monócitos (Figura 4.8C). Na presença de ambos IFN $\gamma$  e ML, parece haver um aumento na expressão de LC3 puntiforme nos monócitos (Figura 4.8D). O inibidor de PI3K 3-MA (3-metiladenina) foi capaz de reduzir a expressão de LC3 (Figura 4.8E), mesmo na presença do ML (Figura 4.8F). O aumento da expressão de LC3 nos monócitos induzido pelo IFN $\gamma$  ou pelo IFN $\gamma$ +ML pode ser parcialmente revertido utilizando 3-MA, Figuras 4.8G e H, respectivamente. A análise por Western blotting revelou um aumento na expressão proteica de LC3-II em monócitos estimulados com IFN $\gamma$  e/ou ML, comparados ao não estimulado (não mostrado). A rapamicina foi utilizada como controle positivo (Figura 4.8I). A quantificação dos monócitos expressando LC3 puntiforme é mostrada na Figura 4.8J.



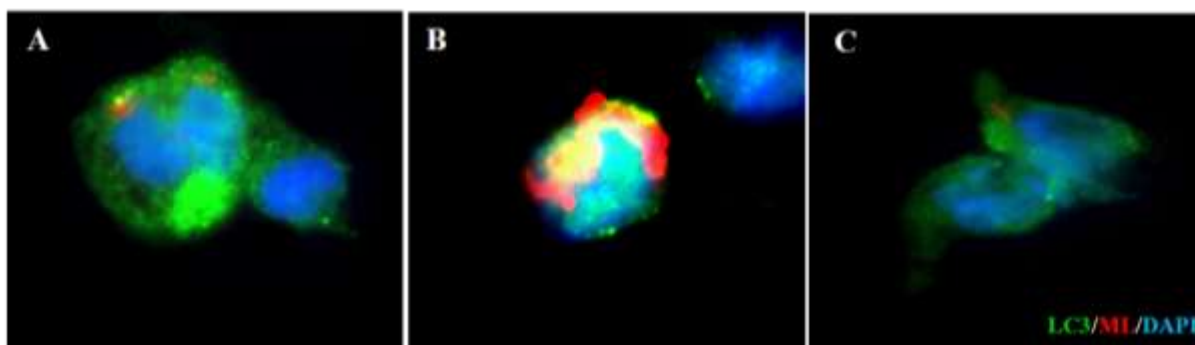
**Figura 4.8:** O IFN $\gamma$  aumenta a expressão de LC3-II em monócitos estimulados com o *M. leprae* (ML). Monócitos de indivíduos saudáveis foram pré-tratados com 10 mM de 3-MA (3-metiladenina) por 30 minutos, estimulados com o ML-PKH26 (vermelho) por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng de IFN $\gamma$  ou 200 ng de rapamicina (RP) por 18 horas. A expressão de LC3 foi avaliada por microscopia de imunofluorescência utilizando um anticorpo anti-LC3 I/II (verde), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). (A) Não estimulado (N.E.). (B) ML. (C) IFN $\gamma$ . (D) IFN $\gamma$ +ML. (E) 3-MA. (F) ML+3-MA. (G) IFN $\gamma$ +3-MA. (H) IFN $\gamma$ +ML+3-MA. (I) RP. (J) Percentual de expressão de LC3 puntiforme. Setas indicam células positivas. As imagens representam um experimento.

Em relação às células não estimuladas ( $10.55 \pm 2.31\%$ ; Figura 4.9A) ou ao ML sozinho ( $48.64 \pm 1.71\%$ ; Figura 4.9B), a estimulação com  $\text{IFN}\gamma$  aumentou a expressão de LC3 puntiforme nos macrófagos THP-1 ( $59.31 \pm 0.67\%$ ; Figura 4.9C), como observado nos monócitos. Na presença de ambos,  $\text{IFN}\gamma$  e ML, parece haver um aumento na expressão de LC3 puntiforme nos macrófagos THP-1 ( $70.25 \pm 0.65\%$ ; Figura 4.9D). O pré-tratamento com outro inibidor de PI3K, a Wtm (wortmanina), foi capaz de inibir a expressão de LC3 puntiforme ( $12.34 \pm 0.41\%$ ; Figura 4.9E), mesmo na presença do ML ( $16.14 \pm 2.23\%$ ; Figura 4.9F). Assim como nos monócitos, o pré-tratamento com inibidor de PI3K (Wtm) foi capaz de inibir parcialmente a expressão de LC3-II induzida por  $\text{IFN}\gamma$  ( $19.35 \pm 1.71\%$ ) ou pelo  $\text{IFN}\gamma$ +ML ( $23.79 \pm 1.21\%$ ) nos macrófagos THP-1, Figuras 4.9G e H, respectivamente. O controle positivo foi realizado utilizando a rapamicina (rapamicina= $69.12 \pm 2.01\%$  vs. N.E.= $10.55 \pm 2.31\%$ ,  $p < 0.05$ ; Figura 4.9I). A quantificação das células expressando LC3 puntiforme é mostrada na Figura 4.9J.



**Figura 4.9: O IFN $\gamma$  aumenta a expressão de LC3-II em macrófagos THP-1 estimulados com o *M. leprae* (ML).** Macrófagos THP-1 foram pré-tratados com 100 nM de Wtm (wortmanina) por 30 minutos, estimulados com o ML-PKH26 (vermelho) por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng de IFN $\gamma$  ou 200 ng de rapamicina (RP) por 18 horas. A expressão de LC3 foi avaliada por imunofluorescência utilizando um anticorpo anti-LC3 I/II (verde), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). (A) Não estimulado (N.E.). (B) ML. (C) IFN $\gamma$ . (D) IFN $\gamma$ +ML. (E) Wtm. (F) ML+Wtm. (G) IFN $\gamma$ +Wtm. (H) IFN $\gamma$ +ML+Wtm. (I) RP. (J) Percentual de LC3 puntiforme. Setas indicam células positivas. As imagens representam 3 experimentos para A, B e I, e 2 para os demais. (\*)  $p < 0.05$  pelo teste de Kruskal-Wallis.

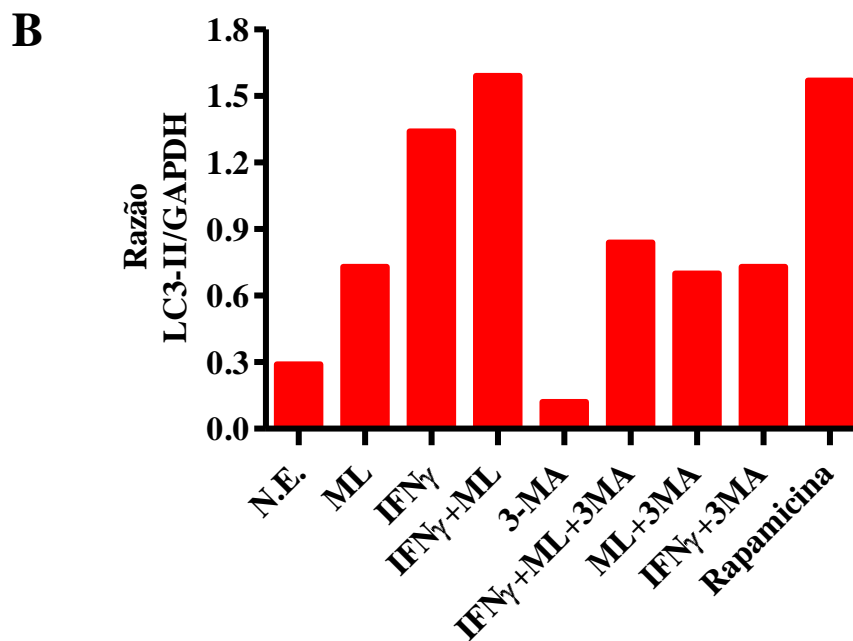
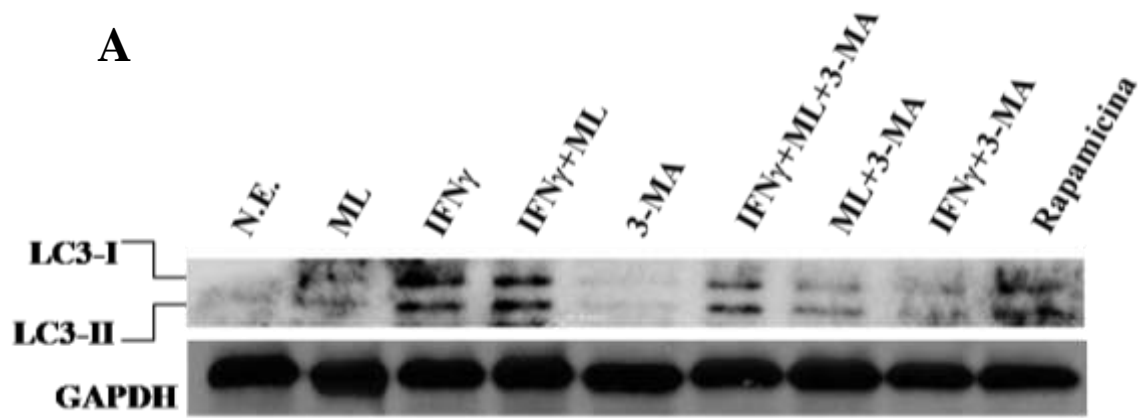
Ao contrário da estimulação apenas com o ML (Figura 4.10A), na presença do IFN $\gamma$ , o ML co-localiza com o LC3 em macrófagos THP-1 (Figura 4.10B), o que é revertido através da inibição da autofagia pela Wtm (Figura 4.10C).



**Figura 4.10: O IFN $\gamma$  induz a co-localização do *M. leprae* (ML) com LC3 em macrófagos THP-1.** (A) ML. (B) IFN $\gamma$ +ML. (C) IFN $\gamma$ +ML+Wtm. A fluorescência amarela indica a co-localização de ML com LC3. Wtm: wortmanina. As imagens são derivadas dos experimentos da Figura 4.9.

Quando comparada às células não estimuladas, parece haver um aumento na expressão proteica de LC3-II em macrófagos THP-1 estimulados com ML ou IFN $\gamma$  (Figura 4.11A-B) através da análise por Western blotting. Nas células tratadas com IFN $\gamma$ , após a estimulação com o ML, foi observado um pequeno aumento da expressão de LC3-II em relação às células tratadas apenas com IFN $\gamma$  e o pré-tratamento das células com 3-MA foi capaz de bloquear a conjugação de LC3-I ao PE (Figura 4.11A-B). Não houve alteração da expressão de LC3-II nos macrófagos THP-1 que foram pré-tratados com o 3-MA e posteriormente estimulados com ML (Figura 4.11A-B). Na presença de IFN $\gamma$  ou de ambos IFN $\gamma$  e ML, o pré-tratamento das células com 3-MA apresentou um efeito atenuador sobre a expressão de LC3-II (Figura 4.11A-B).





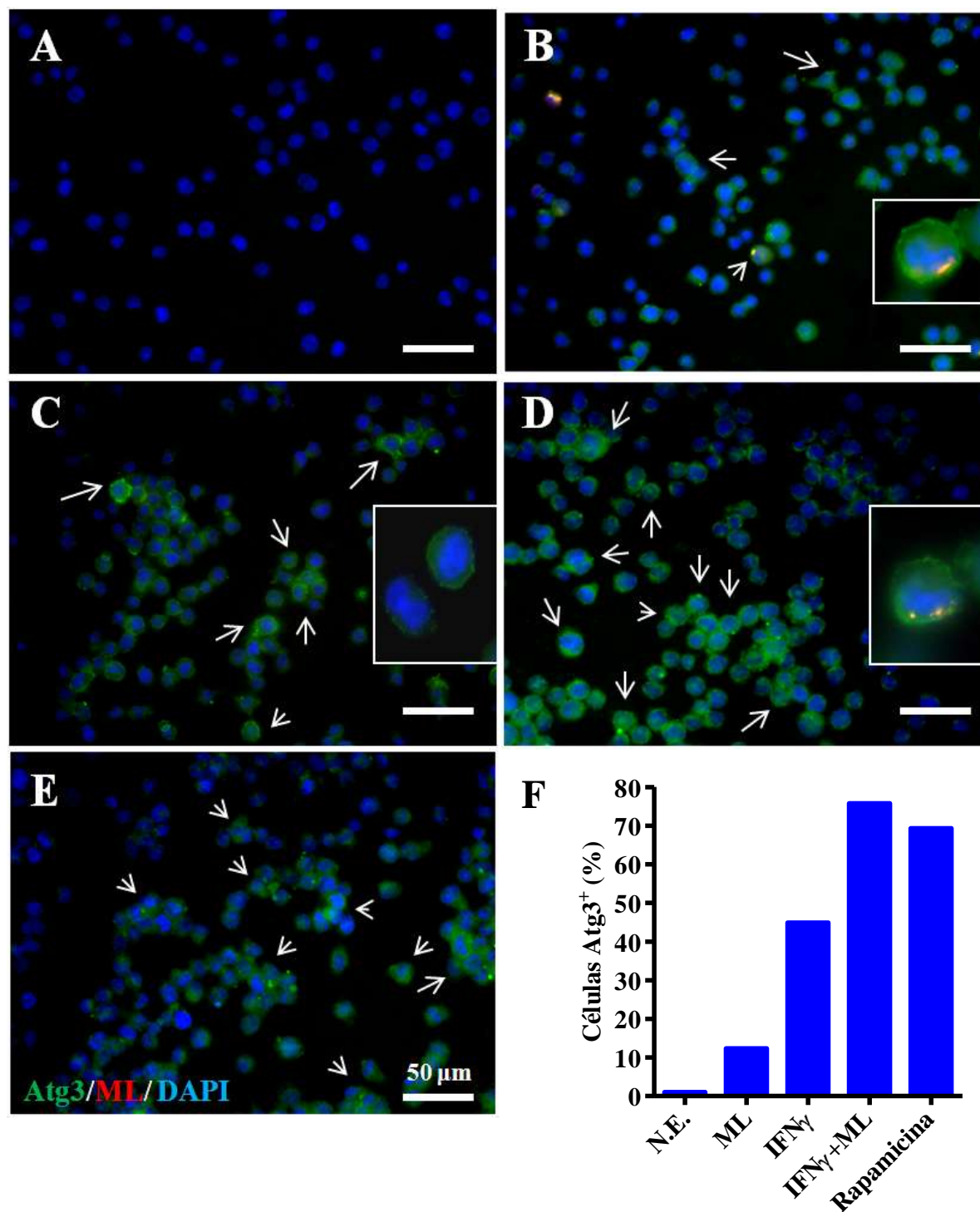
**Figura 4.11: O IFN $\gamma$  aumenta a expressão proteica de LC3-II em macrófagos THP-1 estimulados com o *M. leprae* (ML).** Macrófagos THP-1 foram diferenciados por 24 horas na presença de 200 nM de PMA, pré-tratados com 10 mM de 3-MA (3-metiladenina) por 30 minutos, estimulados com ML por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng de IFN $\gamma$  ou 200 ng de rapamicina (RP) por 18 horas. (A) A expressão de LC3 foi avaliada por Western blotting utilizando anticorpo anti-LC3 I/II. (B) O resultado representa a análise densitométrica de um experimento. N.E.: não estimulado.



#### **4.7. O IFN $\gamma$ aumenta a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 estimulados com o ML**

A Atg3 é uma enzima semelhante à E2 do sistema de ubiquitinação e é responsável pela conjugação de LC3-I à PE, formando o LC3-II (Münz 2009). Uma vez que existe um aparente aumento na conversão de LC3-I para LC3-II na presença combinada de IFN $\gamma$  e ML, fomos avaliar a expressão de Atg3 nos macrófagos por imunofluorescência.

Quando comparada às células não estimuladas (Figura 4.12A) ou ao ML sozinho (Figura 4.12B), a estimulação com IFN $\gamma$  parece aumentar a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 (Figura 4.12C). A estimulação com o ML sozinho gera uma discreta co-localização com a Atg3 (Figura 4.12B inserto). Na presença de ambos IFN $\gamma$  e ML (Figura 4.12D), parece haver um aumento na expressão de Atg3 em relação ao ML ou IFN $\gamma$  e também há uma discreta co-localização com o ML (Figura 4.12D inserto). A rapamicina foi utilizada como controle positivo (Figura 4.12E). A quantificação das células expressando Atg3 é mostrada na Figura 4.12F.



**Figura 4.12: O IFN $\gamma$  aumenta a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 estimulados com o *M. leprae* (ML).** Macrófagos THP-1 foram diferenciados por 24 horas na presença de 200 nM de PMA, estimulados com o ML-PKH26 (vermelho) por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng de IFN $\gamma$  ou 200 ng de rapamicina (RP) por 18 horas. A expressão de Atg3 foi avaliada por microscopia de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-Atg3 (verde), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). (A) Não estimulado (N.E.). (B) ML. (C) IFN $\gamma$ . (D) IFN $\gamma$ +ML. (E) RP. (F) Percentual de células expressando Atg3. Setas indicam células positivas. Insertos indicam células positivas ou a co-localização de Atg3 e ML. As imagens são representativas de um experimento.

#### **4.8. O IFN $\gamma$ aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1 estimulados com o ML**

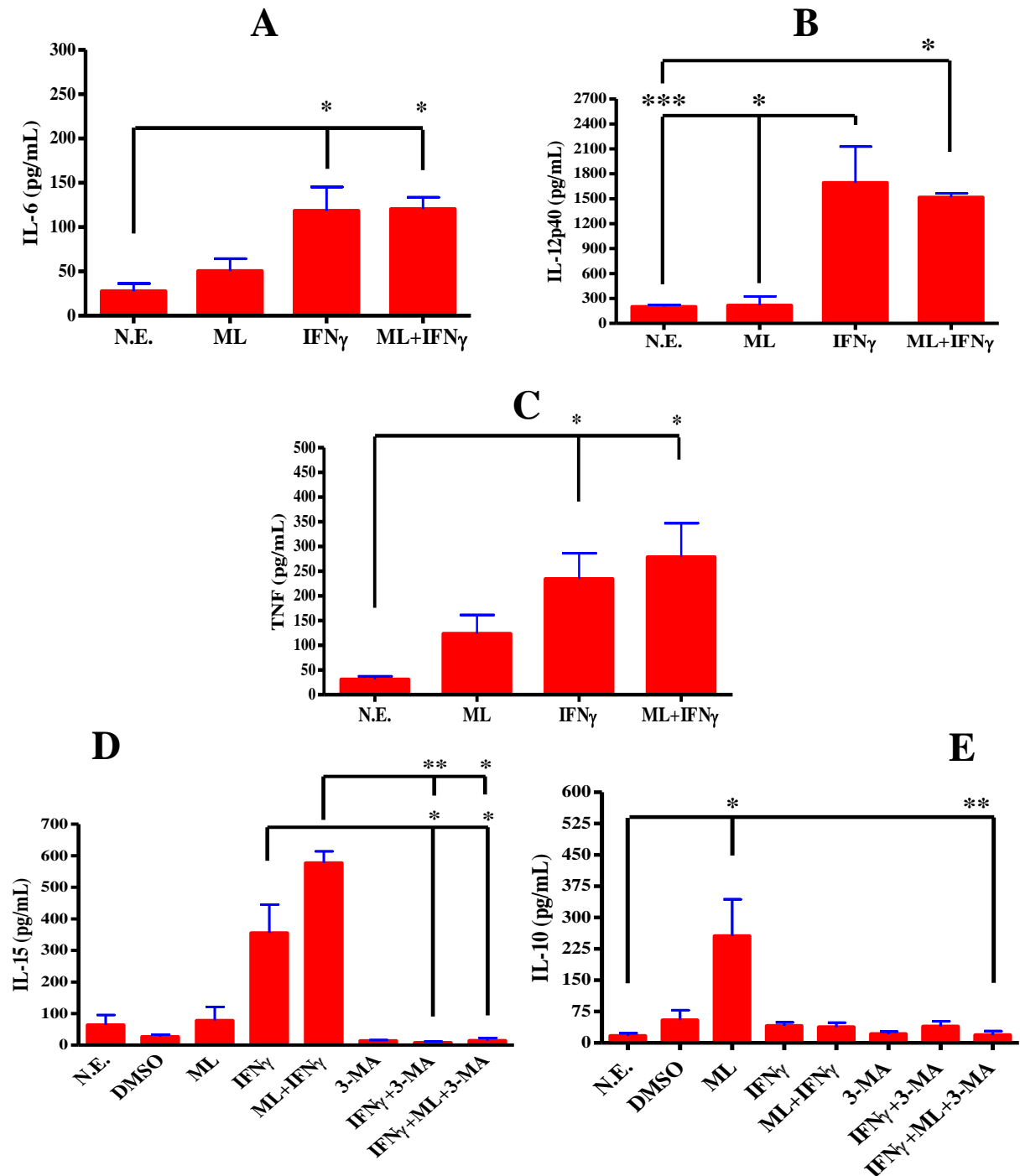
A indução de autofagia é um dos mecanismos efetores das citocinas pró-inflamatórias, ao contrário, as citocinas antiinflamatórias regulam negativamente esse efeito (Harris et al. 2007, 2009). A citocina pró-inflamatória IL-15 induz uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3, observada nos pacientes PB, enquanto a antiinflamatória IL-10 induz a via fagocítica nos macrófagos, observada nos pacientes MB (Montoya et al. 2009). Por sua vez, o IFN $\gamma$  induz IL-15 por uma via dependente de Stat1, levando à conversão da vitamina D3 e ativação de uma via antimicrobiana mediada pela autofagia (Yuk et al. 2009, Fabri et al. 2011). Com o objetivo de avaliar se a presença de autofagossomos observados em macrófagos estimulados com IFN $\gamma$  e ML está associada à modulação dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos após 18h para a dosagem de citocinas por ELISA.

A estimulação de macrófagos THP-1 com IFN $\gamma$  parecer ser capaz de aumentar a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (IFN $\gamma$ = 118.9  $\pm$  66.6 pg/mL vs. N.E.= 26.25  $\pm$  24.52 pg/mL,  $p < 0.05$  ou IFN $\gamma$  vs. ML= 41.09  $\pm$  39.47 pg/mL), IL-12p40 (IFN $\gamma$ = 1724.0  $\pm$  1776 pg/mL vs. N.E.= 162.6  $\pm$  12.35 pg/mL,  $p < 0.001$  ou vs. ML=193.8  $\pm$  496.2 pg/mL,  $p < 0.05$ ) e TNF (IFN $\gamma$ = 241.0  $\pm$  159.0 pg/mL vs. N.E.= 23.87  $\pm$  20.45 pg/mL,  $p < 0.05$  ou IFN $\gamma$  vs. ML= 127.4  $\pm$  90.84 pg/mL) (Figura 4.13A, B e C, respectivamente). Porém, em conjunto com o ML, o IFN $\gamma$  não aumentou a secreção dessas citocinas (Figura 4.13A, B e C, respectivamente) em relação ao IFN $\gamma$  sozinho (IL-6: IFN $\gamma$ +ML= 116.8  $\pm$  26.48 pg/mL; IL-12: IFN $\gamma$ +ML= 1482  $\pm$  84.94 pg/mL; TNF: IFN $\gamma$ +ML= 271.2  $\pm$  190.0 pg/mL).

A estimulação com IFN $\gamma$  também aumentou a secreção de IL-15 nos macrófagos THP-1 (IFN $\gamma$ =368.5  $\pm$  237.8 pg/mL vs. N.E.=69.29  $\pm$  72.69 pg/mL), mas não a de IL-10, que foi produzida em maiores níveis apenas em resposta ao ML (ML=251.5  $\pm$  285.1 pg/mL vs. N.E.=12.35  $\pm$  16.10 pg/mL,  $p < 0.05$ ) (Figura 4.13D e E, respectivamente). Na presença de ambos ML e IFN $\gamma$  ocorreu um aumento na secreção de IL-15, em relação ao ML ou IFN $\gamma$  sozinhos (ML+IFN $\gamma$ =594.2  $\pm$  191.9 pg/mL vs. ML=79.86  $\pm$  90.85 pg/mL ou vs. IFN $\gamma$ =368.5  $\pm$  237.8 pg/mL) (Figura 4.13D). Em conjunto, na presença de ambos ML e IFN $\gamma$  ocorreu uma redução na secreção de IL-10, em relação ao ML sozinho (ML+IFN $\gamma$ =31.88  $\pm$  23.68 pg/mL vs. ML=251.5  $\pm$  285.1 pg/mL) (Figura 4.13E).

O pré-tratamento das células com o inibidor de autofagia 3-MA leva a uma redução na produção de IL-15 em resposta a ambos ML e IFN $\gamma$  (3-MA+IFN $\gamma$ +ML=5.30  $\pm$  18.93 pg/mL

vs.  $\text{IFN}\gamma + \text{ML} = 594.2 \pm 191.9 \text{ pg/mL}$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 4.13D), mas não afeta a produção de IL-10 ( $\text{ML} + \text{IFN}\gamma = 31.88 \pm 23.68 \text{ pg/mL}$  vs.  $3\text{-MA} + \text{IFN}\gamma + \text{ML} = 9.67 \pm 24.61 \text{ pg/mL}$ ) (Figura 4.13E).

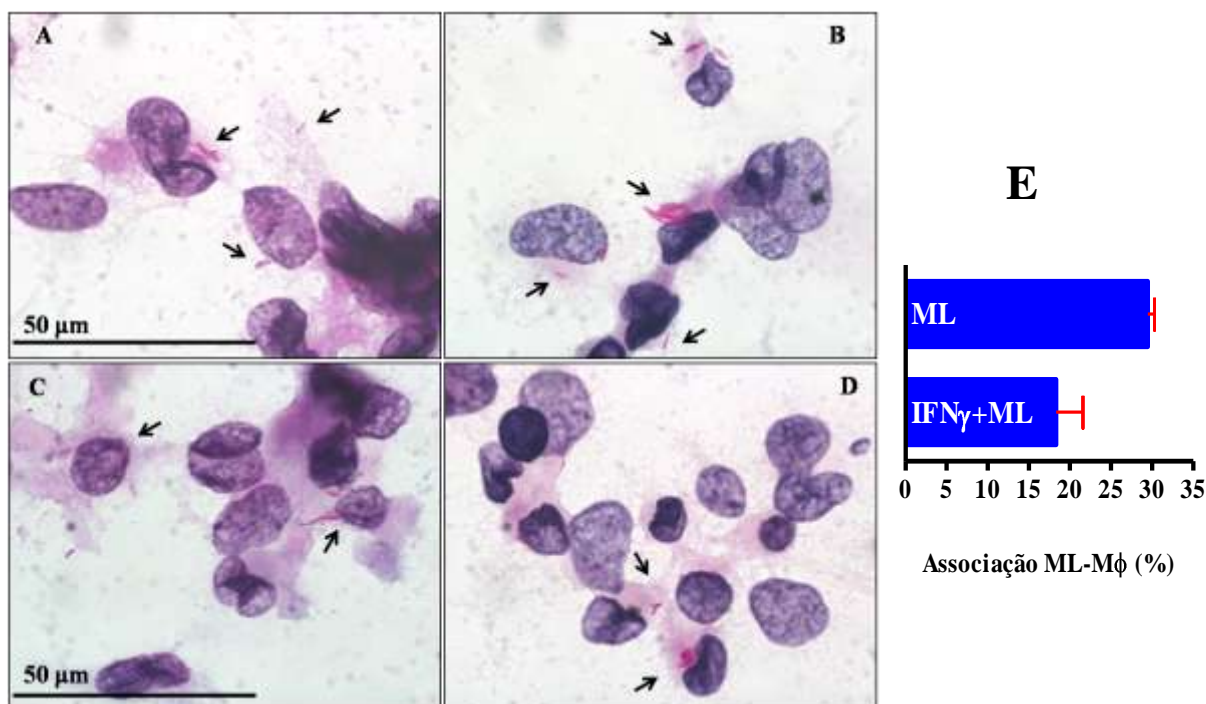


**Figura 4.13: O  $\text{IFN}\gamma$  aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1 estimulados com o *M. leprae* (ML), mas não a de IL-10.** Macrófagos THP-1 foram pré-tratados ou não com 10 mM de 3-MA (3-metiladenina) por 30 minutos, estimulados com o ML por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng de  $\text{IFN}\gamma$  por 18 horas. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA. (A) IL-6. (B) IL-12p40. (C) TNF. (D) IL-15. (E) IL-10. (\*) representa valor de  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  e (\*\*\*)  $p < 0.001$  pelo teste de Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunn. Os gráficos são representativos de 5 (A, B e C) ou 3 (D e E) experimentos. N.E.: não estimulado. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como controle do solvente.

#### 4.9. O IFN $\gamma$ reduz a associação do ML aos macrófagos THP-1

Montoya e colaboradores (2009) demonstraram que em lesões de pacientes PB há o predomínio de macrófagos com características similares aos que são tratados *in vitro* com IL-15. Tais macrófagos apresentam pouca capacidade fagocítica, mas alta capacidade microbicida. Ao contrário, nas lesões de MB há o predomínio de macrófagos com elevada capacidade fagocítica e baixo poder microbicida, como aqueles que são diferenciados *in vitro* com IL-10. Uma vez que os macrófagos estimulados com IFN $\gamma$  e ML apresentaram aumento na secreção de IL-15, fomos investigar se o tratamento com o IFN $\gamma$  afeta a associação do ML ao macrófago. As células THP-1 diferenciadas foram estimuladas com o ML, tratadas com IFN $\gamma$  e então fixadas e posteriormente coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen.

Em relação às células estimuladas apenas com o ML ( $29.50 \pm 1.13\%$ ; Figura 4.14A-B), na presença do IFN $\gamma$  ocorreu uma ligeira redução no percentual de associação *M. leprae*-macrófago ( $18.32 \pm 4.63\%$ ; Figura 4.14C-D). A quantificação do percentual de associação *M. leprae*-macrófago é mostrada na Figura 4.14E.



**Figura 4.14: O IFN $\gamma$  reduz o percentual de associação *M. leprae* (ML)-macrófago.** Macrófagos THP-1 foram diferenciados por 24 horas na presença de 200 nM de PMA, estimulados com o ML por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng de IFN $\gamma$  por 18 horas. As células foram fixadas e posteriormente coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen. (A-B) ML. (C-D). IFN $\gamma$ +ML. (E) O percentual de associação do ML foi calculado pelo número de macrófagos contendo pelo menos uma bactéria/número total de macrófagos observados e os resultados são apresentados como a mediana  $\pm$  desvio padrão. Setas indicam o ML no interior dos macrófagos. As imagens são representativas de dois experimentos.

## 5. Discussão

No presente estudo foi avaliada a participação da via autofágica nas formas clínicas polares da hanseníase. Em conjunto, foi avaliada a capacidade da citocina pró-inflamatória IFN $\gamma$  de induzir autofagia em células estimuladas com o *M. leprae*.

As micobactérias são capazes de utilizar diversos mecanismos para evadir a resposta imune, sendo clássicas inibidoras da degradação lisossomal após a fagocitose, de mecanismos microbicidas diretos dos macrófagos e do processamento e apresentação de antígenos (Schaible et al. 1998, Via et al. 1998, Russell 2001, Alves et al. 2004, Deretic et al. 2006, van der Wel et al. 2007, Kumar et al. 2010, Kumar & Rao 2011, Shui et al. 2011). A autofagia tem papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção com micobactérias, pois é capaz de reverter o bloqueio da maturação do fagossomo, inibindo a sobrevivência intracelular do patógeno (Deretic et al. 2006). Ela é importante na defesa contra micobactérias não tuberculosas, tais como: a causadora do granuloma de peixe de tanque, *M. marinum*; a causadora de infecções pós-cirúrgicas e de doença pulmonar em pacientes com fibrose cística, *M. abscessus*; a micobactéria associada à infecção em pacientes imunossuprimidos, *M. avium*; assim como na defesa contra o principal patógeno bacteriano humano, o agente causador da tuberculose, Mtb (Early et al. 2011, Fabri et al. 2011, Lerena & Colombo 2011, Renna et al. 2011). No entanto, o papel da autofagia na infecção pelo *M. leprae*, o agente causal da hanseníase, permanece desconhecido. Parte disso se deve ao fato de o *M. leprae* não ser cultivável em meios de cultura artificiais como as outras micobactérias e possuir um prolongado ciclo de crescimento, dificultando sua obtenção e a realização de ensaios de viabilidade como o de unidades formadoras de colônias (CFU) (Vissa & Brennan 2001).

Os modelos animais de propagação do *M. leprae*, como a infecção de tatus ou camundongos, fornecem recursos básicos para estudos genéticos, metabólicos e antigênicos do bacilo, assim como permitem a realização de testes de sensibilidade aos medicamentos antimicrobianos. No entanto, a viabilidade do *M. leprae* obtido de diferentes fontes é muito variável e práticas laboratoriais padrão, tais como a incubação a 37 °C, rapidamente reduzem a viabilidade desta micobactéria, que possui preferência por temperaturas mais baixas (Scollard et al. 2006).

A capacidade da citocina pró-inflamatória IFN $\gamma$  induzir o aumento da atividade microbicida em macrófagos já foi amplamente descrita na literatura. Estudos mais recentes descreveram que o IFN $\gamma$  é capaz induzir autofagia, sendo este um dos principais mecanismos

de controle da infecção pelo Mtb (Gutierrez et al. 2004, Deretic et al. 2006, Kim et al. 2011). Foi descrito que a autofagia induzida pelo IFN $\gamma$  inibe o crescimento intracelular do Mtb após a subversão da via fagolissomal, fazendo o recrutamento da molécula efetora autofágica LC3 para o fagossomo micobacteriano (Gutierrez et al. 2004, Harris et al. 2007). Na hanseníase, quando comparados aos pacientes LL, os pacientes BT apresentam maiores níveis de expressão/secreção de citocinas pró-inflamatórias em resposta aos antígenos micobacterianos, entre elas o IFN $\gamma$  (Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991, Sieling & Modlin 1994a). Desde a descoberta do *M. leprae* em 1863 por Armauer Hansen (Hansen 1874) e da primeira descrição da autofagia em 1957 por Sam L. Clark (Clark 1957), uma relação direta entre a hanseníase e a autofagia ainda não foi demonstrada. No entanto, evidências sugerem a possível participação da autofagia na infecção pelo *M. leprae*. Estudos de microscopia eletrônica mostraram o *M. leprae* no interior da estrutura característica da autofagia, o autofagossomo, porém este processo não foi esclarecido posteriormente (Evans & Levy 1972, Chandi & Job 1978). Vários estudos recentes têm mostrado a relação entre moléculas que participam tanto da regulação autofágica quanto da patogênese da hanseníase, tais como IL-15 e vitamina D3 (Montoya et al. 2009, Yuk et al. 2009, Fabri et al. 2011), NOD2 (Zhang et al. 2009, Berrington et al. 2010), IFN $\gamma$  (Cardoso et al. 2010) e TLR (Kang & Chae 2001, Johnson et al. 2007, Bochud et al. 2009).

No presente trabalho, a análise da ultraestrutura de células presentes em lesões de pacientes com as formas polares da hanseníase demonstrou uma maior quantidade de autofagossomos com bactérias no interior em amostra de um paciente BT em comparação com a lesão de pele do paciente LL. Nesta, observamos uma maior quantidade de bactérias em fagossomos de uma única membrana e raras bactérias em autofagossomos. Mesmo na amostra do paciente BT, foi possível visualizar debris celulares no interior de autofagossomos, sugestivos de bactérias degradadas. No entanto, devido à limitação técnica e pelo fato de não havermos realizado uma marcação com ouro coloidal que nos permitisse uma marcação mais específica, não excluimos a possibilidade de que alguns artefatos possam estar interferindo na nossa análise. Desse modo, no intuito de confirmar a presença de autofagossomos, a expressão tecidual da proteína autofágica LC3 foi avaliada por duas técnicas diferentes, o Western blotting e a imunoperoxidase, revelando um aumento da expressão de LC3-II nos pacientes BT quando comparados às amostras dos pacientes LL, corroborando com a análise ultraestrutural. Em adição, foi realizada uma análise *ex vivo* dos macrófagos de lesões de pele de pacientes hansenícos, que mostrou um aparente aumento na quantidade de células LC3 puntiformes positivas no paciente BT, quando comparado ao LL.

Estudos anteriores demonstraram que citocinas pró-inflamatórias apresentam a capacidade de induzir o aumento da formação de autofagossomos. Ao contrário, citocinas anti-inflamatórias inibem essa capacidade (Harris et al. 2007, 2009). A maior frequência de autofagossomos encontrados no paciente BT pode ser devido à maior presença de citocinas Th1 (como IFN $\gamma$  e TNF) no microambiente tecidual, que estariam levando à indução de autofagia e à redução da carga micobacteriana observada nesses pacientes. Da mesma forma, a menor frequência de autofagossomos observada no paciente LL pode ser em função da maior presença de citocinas Th2 (como IL-4, IL-10 e IL-13) que estariam exercendo um efeito inibitório na via autofágica, contribuindo para a alta proliferação bacilar observada nos pacientes LL.

Já foi demonstrado que várias espécies de micobactérias induzem autofagia diretamente, incluindo *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* e *M. kansasii* (Early et al. 2011, Hartman & Kornfeld 2011, Zullo & Lee 2012). No entanto, informações sobre a capacidade do *M. leprae* induzir autofagia diretamente ainda permanecem desconhecidas. Aqui, nós mostramos que a estimulação com diferentes concentrações do *M. leprae* resulta na indução do LC3 puntiforme (LC3-II), a forma presente nas membranas autofagossomais, mas não de forma dose dependente. Hartman e Kornfeld (2011) mostraram a indução direta de autofagia em macrófagos infectados com uma alta carga bacilar de Mtb (MOI 50:1), similarmente à indução pela rapamicina. Em contraste, a infecção com uma baixa carga bacilar de Mtb (MOI 10:1), com o Mtb morto (MOI 50:1) ou com o *M. smegmatis* (MOI 50:1) fracamente induziu a expressão de LC3 puntiforme. Neste estudo, nós observamos uma maior indução de autofagia nos macrófagos estimulados com o *M. leprae* no MOI de 10:1, quando comparado ao MOI de 2:1 ou 50:1. Zullo e Lee (2012) demonstraram que a infecção de macrófagos murinos com Mtb ou *M. smegmatis* no MOI de 10:1 é capaz de induzir autofagia, ao contrário do observado por Hartman e Kornfeld (2011). Aqui nós utilizamos bactérias mortas e ambos os estudos citados utilizaram bactérias vivas, contudo a direta indução de autofagia parece não requerer a participação ativa da bactéria, uma vez que foi demonstrado que os lipídeos micobacterianos induzem a autofagia (Zullo & Lee 2012), corroborando com nossos resultados.

A estimulação de monócitos com o *M. leprae* induz a secreção de TNF (Hussain et al. 1999, Hernandez et al. 2003, Fulco et al. 2007, Hernandez et al. 2011), uma citocina pró-inflamatória associada com a patogênese do ENH nos pacientes MB (Sampaio et al. 1991, Sarno et al. 1991, Sarno & Sampaio 1996). Em adição, o TNF é capaz de induzir autofagia (Sivaprasad & Basu 2008). O mecanismo pelo qual o *M. leprae* induz a autofagia não foi



elucidado, mas é possível que a síntese de TNF desempenhe um importante papel na indução de autofagia mediada pelo *M. leprae*.

Zullo e Lee (2012) também mostraram que as micobactérias avirulentas (como o *M. smegmatis*) induzem mais autofagia do que as virulentas (como o Mtb) e que o Mtb ou BCG podem reduzir a autofagia em resposta ao *M. smegmatis*. Nós mostramos que os pacientes BT apresentam mais características autofágicas do que os pacientes LL. No entanto, os pacientes LL apresentam quantidades muito superiores de bactérias nas lesões em comparação com os pacientes BT (Ridley & Jopling 1966, Scollard et al. 2006). Foi ainda demonstrado neste estudo que o *M. leprae* diretamente induz autofagia nos macrófagos. Nossa hipótese é que assim como o *M. leprae* é capaz de utilizar vários mecanismos para escapar da degradação fagolisossomal após a fagocitose (Alves et al. 2004, Suzuki et al. 2006, van der Wel et al. 2007, Tanigawa et al. 2009), ele também seria capaz de evitar a degradação autolisossomal após a indução da via autofágica. A estimulação com o *M. leprae* é capaz de induzir a produção de citocinas antiinflamatórias como IL-4 (Murray et al. 2007), IL-10 (Fulco et al. 2007, Sinsimer et al. 2010) e IL-13 (Sieling & Modlin 1994a, b), assim como de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Murray et al. 2007, Dagur et al. 2010, Sinsimer et al. 2010) e essas citocinas antiinflamatórias estão associadas à forma LL da hanseníase (Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991). Foi descrito que após a indução de autofagia, essas citocinas antiinflamatórias são capazes de inibir o processo, bloqueando também a maturação dos fagossomos micobacterianos em compartimentos degradativos autolisossomais, inibindo assim a habilidade dos macrófagos de controlarem a infecção pelo Mtb (Harris et al. 2007, Park et al. 2010). Assim, após a indução de autofagia pelo *M. leprae*, as citocinas antiinflamatórias também induzidas por ele, poderiam exercer um efeito inibitório no fluxo autofágico, bloqueando a etapa de fusão dos autofagossomos/anfissomos com os lisossomos. O *M. leprae* é capaz de utilizar a proteína TACO do hospedeiro para inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, permitindo sua sobrevivência nos macrófagos e a TACO é expressa na membrana fagossomal em lesões dérmicas de pacientes com a forma LL da hanseníase (Suzuki et al. 2006, Tanigawa et al. 2009). Recentemente foi descrito que a TACO inibe a formação do autofagossomo ao redor do fagossomo contendo Mtb e inibe a colocalização dos fagossomos LC3 positivos com os lisossomos, permitindo a sobrevivência da micobactéria nos macrófagos (Seto et al. 2012). Deste modo, após a indução de autofagia, o *M. leprae* poderia utilizar a TACO para impedir a fusão dos autofagossomos/anfissomos com os lisossomos, persistindo assim no nicho intracelular. Foi descrito que o Mtb induz a supressão da autofagia o que resulta em acúmulo de lipídeos (Neyrolles et al. 2006, Singh et

al. 2009, Kumar & Rao 2011). Os fagossomos contendo as micobactérias migram na direção de corpúsculos lipídicos resultando no engolfamento do bacilo em partículas lipídicas (de Chastellier 2009, de Chastellier et al., 2009). O encapsulamento do bacilo em um meio ambiente rico em lipídeos pode contribuir para a manutenção do reservatório nutricional que permite a persistência do bacilo na célula hospedeira. Esse processo também protege o patógeno do estresse hipóxico e de outras respostas microbidas do hospedeiro, incluindo aquelas que envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (de Chastellier 2009, de Chastellier et al. 2009, Kumar & Rao 2011).

Os macrófagos de lesões de pele de pacientes LL apresentam grandes quantidades de lipídeos e bactérias, estas células são conhecidas como macrófagos espumosos de Virchow (ou células Lepra), não sendo observadas nas lesões de pacientes TT (Virchow 1863). Esse aspecto espumoso dos macrófagos de pacientes LL é devido pelo menos em parte ao acúmulo de corpúsculos lipídicos, induzidos durante a infecção pelo *M. leprae*. Recentemente foi demonstrado que o *M. leprae* induz a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos e células Schwann. Esses corpúsculos lipídicos induzidos pelo *M. leprae* constituem sítios para a síntese de eicosanóides e podem ser reguladores críticos na subversão da resposta imune na hanseníase (Mattos et al. 2010, Mattos et al. 2011a, b). Singh e colaboradores (2009) demonstram pela primeira vez a associação entre o metabolismo lipídico e a autofagia, onde o excesso de corpúsculos lipídicos na célula tem um efeito atenuador sobre a autofagia. Adicionalmente, além das membranas autofagossomais, o LC3 também se localiza na membrana dos corpúsculos lipídicos e o sistema de conjugação das proteínas autofágicas Atg/LC3 está envolvido na formação de corpúsculos lipídicos (Shibata et al. 2009, 2010). Assim, nós hipotetizamos que o *M. leprae* poderia utilizar de forma não-autofágica, o sistema de conjugação das proteínas Atg (imunofagia do tipo 3; Deretic 2006, 2011) para indução da formação de corpúsculos lipídicos, por sua vez, esses corpúsculos lipídicos teriam um efeito atenuador na função imune efetora da autofagia (imunofagia do tipo 1), propiciando a sobrevivência do *M. leprae* nos macrófagos espumosos de pacientes LL.

O IFN $\gamma$  desempenha um importante papel na defesa contra patógenos intracelulares, ativando os macrófagos e os estimulando a matarem os patógenos localizados no interior dos fagossomos, através da facilitação da fusão do fagossomo-lisossomo (Alberts et al. 2002). Ele é capaz de induzir vários mediadores imunes com função microbicida, tais como NOS2, Nramp1, phox, IDO e GTPases (Taylor et al. 2004, Martens & Howard 2006), além de ser capaz de reduzir a fagocitose (Schlesinger & Horwitz 1991, Backman & Guyre, 1994, Konopski et al. 1994) e de induzir a autofagia (Gutierrez et al. 2004, Harris et al. 2007, 2009,

Fabri et al. 2011, Li et al. 2011). Os dados obtidos aqui mostraram que o IFN $\gamma$  foi capaz de ativar os macrófagos e de induzir autofagia em macrófagos e monócitos, assim como previamente descrito por outros autores.

A grande importância da autofagia induzida pelo IFN $\gamma$  é que ela representa uma fonte adicional para a eliminação de micobactérias. Após o Mtb escapar da fusão fagossomo-lisossomo, o IFN $\gamma$  pode promover a incorporação do Mtb em autofagossomos via molécula efetora IRGM/LRG-47 e realizar a entrega aos lisossomos, com a conseqüente degradação do patógeno (MacMicking et al. 2003, Gutierrez et al. 2004, Singh et al. 2006). Assim, nós fomos avaliar o papel da autofagia mediada pelo IFN $\gamma$  no controle da infecção pelo *M. leprae*. A indução de autofagia por IFN $\gamma$  em células previamente estimuladas com *M. leprae* levou ao aumento da formação de autofagossomos tanto pela avaliação da expressão do marcador de autofagia LC3, quanto por análise ultraestrutural de vacúolos de dupla membrana. Na presença do IFN $\gamma$ , o LC3 co-localiza com o fagossomo contendo o *M. leprae*, mas não quando as células são estimuladas apenas com o *M. leprae* ou tratadas com o inibidor de autofagia Wortmanina. Em adição, a indução de autofagia por IFN $\gamma$  em macrófagos previamente estimulados com *M. leprae* levou ao aumento do número de células expressando Atg3, uma enzima essencial para a conjugação da fosfatidiletanolamina ao LC3-I (Hanada et al. 2009, Yamagushi et al. 2010) e que participa da regulação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (uma reguladora negativa da autofagia; Radoshevich et al. 2010).

A polarização da hanseníase está intimamente relacionada com a polarização da resposta imune. Os pacientes LL apresentam um perfil predominante de citocinas do tipo Th2, enquanto os pacientes TT apresentam um perfil predominante de citocinas do tipo Th1 (Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991, Sieling & Modlin 1994a). A IL-10 induz uma via fagocítica nos macrófagos, levando à expressão de CD209 e receptores “scavenger”, o que resulta na fagocitose de grandes quantidades da micobactéria e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, sendo esta via observada principalmente nos pacientes LL. Por outro lado, a IL-15 induz uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3 nos macrófagos, onde raras bactérias são observadas, sendo esta via observada principalmente nos pacientes TT (Montoya et al. 2009). O IFN $\gamma$  é capaz de aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-15 (Murray 1994, Musso et al. 1999, Raupach & Kaufman 2001) e a indução de autofagia é um dos mecanismos efetores das citocinas pró-inflamatórias (Harris et al. 2007, 2009). Fabri e colaboradores (2011) descreveram que o IFN $\gamma$  induz IL-15 por uma via dependente de Stat1, levando à conversão da vitamina D3 e ativação de uma via antimicrobiana mediada pela autofagia, promovendo a fusão autolisossomal e a eliminação do

Mtb. Em adição, a vitamina D3 pode suprimir a expressão da TACO (Anand & Kaul 2003, Anand et al. 2008). Nós avaliamos então, a produção de citocinas em macrófagos estimulados com ambos *M. leprae* e IFN $\gamma$ . A indução de autofagia por IFN $\gamma$  em células previamente estimuladas com *M. leprae* levou ao aumento da secreção das citocinas IL-6, IL-12p40, TNF e IL-15, mas não de IL-10. O bloqueio da via autofágica levou à redução dos níveis de IL-15, mas não aumentou a produção de IL-10, sugerindo que a síntese de IL-15 é dependente da autofagia mediada pelo IFN $\gamma$ . A IL-15, assim como as outras citocinas pró-inflamatórias poderiam exercer uma ação parácrina e autócrina nas células, estimulando a autofagia, que por sua vez estimularia a produção de citocinas, fazendo um “feedback” positivo. Adicionalmente, a IL-15 poderia ativar outras vias antimicrobianas dependentes da vitamina D3, como a produção de catelicidina e  $\beta$ -defensina, assim como a inibição da expressão da TACO. A etapa final da via autofágica culmina na degradação do patógeno nos autolisossomos, no entanto, a avaliação da função antimicrobiana da autofagia na infecção pelo *M. leprae* é complicada, devido à ausência de crescimento *in vitro* deste patógeno o que gera uma carência de ensaios de viabilidade bacteriana em cultura de células (Vissa & Brennan 2001).

Montoya e colaboradores (2009) demonstraram que na presença da IL-15 há um número menor de células contendo BCG, quando comparado ao número de células infectadas na presença de IL-10 e que a autofagia mediada pelos receptores TLR é capaz de aumentar a destruição dos microorganismos fagocitados (Sanjuan et al. 2007). Aqui, o tratamento com IFN $\gamma$  resultou em redução do percentual de associação do *M. leprae* morto aos macrófagos. Em conjunto, esses dados sugerem que o IFN $\gamma$  desempenha um importante papel no controle da infecção pelo *M. leprae*, ativando a autofagia e a via antimicrobiana dependente da IL-15, a qual também inclui a autofagia. A autofagia pode ser crucial no desenvolvimento das formas polares da hanseníase, onde a polarização da resposta imune em um perfil Th1 levaria à ativação da função antimicrobiana autofágica, controlando a infecção, sendo esta via predominantemente observada nos pacientes com a forma tuberculóide e, por outro lado, a polarização da resposta imune em um perfil Th2 levaria à inibição da função antimicrobiana mediada pela autofagia, proporcionando a proliferação bacteriana, sendo esta via observada nos pacientes com a forma lepromatosa. No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre o papel da autofagia na hanseníase, como o envolvimento da sinalização via GTPase IRGM na autofagia induzida pelo IFN $\gamma$ , o envolvimento da autofagia mediada pela via IFN $\gamma$ /IL-15/Vitamina D3, assim como os mecanismos envolvidos na subversão da degradação

autofágica pelo *M. leprae*, os quais poderiam explicar o fato de os pacientes tuberculóides não controlarem totalmente a infecção, apesar de terem uma maior ativação da via autofágica.

Apesar da multidrogaterapia ser efetiva para a hanseníase, a resistência às drogas utilizadas no tratamento é um dos fatores que contribuem para a ocorrência de recidivas e a persistência da doença (Lockwood 2011, Sekar et al. 2011). Diante da importância deste fator no controle da doença, a OMS criou em 2009 a rede sentinela de vigilância da resistência medicamentosa em hanseníase, estando presente em 9 países, incluindo o Brasil (WHO 2011b). A compreensão da relação entre a autofagia e a hanseníase é extremamente importante, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e/ou imunomoduladoras que auxiliem no controle da doença. Apesar de vários estudos terem descrito a resposta benéfica da administração intradérmica de IFN $\gamma$  recombinante humano em pacientes com a forma LL da hanseníase (Samuel et al. 1987, Kaplan et al. 1989, Damasco et al. 1992, Bermudez & Kaplan 1995, Murray 1996, Sampaio et al. 1996), a administração prolongada dessa citocina pela via intradérmica foi associada com o desenvolvimento de ENH nesses pacientes (Sampaio et al. 1992, 1993, Bermudez & Kaplan 1995, Sampaio et al. 1996). No presente estudo, a rapamicina, uma clássica indutora de autofagia, produziu efeitos similares ao do IFN $\gamma$ , no que se refere à indução de autofagia e citocinas pró-inflamatórias nas células estimuladas com o *M. leprae* (dados não mostrados). A rapamicina é um antibiótico lipofílico do grupo das lactonas macrocíclicas, que se liga à proteína FKBP12 formando um complexo droga-receptor que interage com o mTORC1 promovendo sua inibição, sendo muito utilizada em receptores de transplante renal e hepático (Loewith et al. 2002, Reichen et al. 2011). O tratamento com rapamicina também mostrou ser capaz de melhorar os sintomas da doença de Crohn (Massey et al. 2008). A doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal crônica intimamente ligada à autofagia, tendo como fatores de risco polimorfismos em genes que regulam a via autofágica, tais como *NOD2*, *ATG16L1* e *IRGM*. As células de pacientes com doença de Crohn associada às variantes *NOD2* e *ATG16L1* são defeituosas na indução de autofagia, na apresentação de antígenos e na eliminação de bactérias (Ramjeet et al. 2010, Travassos et al. 2010, Fritz et al. 2011, Kleinnijenhuis et al. 2011). Esses efeitos negativos apresentados pelos pacientes com Doença de Crohn poderiam ser modulados através do tratamento com rapamicina (Massey et al. 2008). A rapamicina também é capaz de reduzir a toxicidade da doença neurodegenerativa de Huntington e, de aumentar a destruição do BCG e do *M. marinum in vitro* (Floto et al. 2007, Sarkar et al. 2007, Lerena & Colombo 2011), assim como de inibir o crescimento de micobactérias isoladas de pacientes com doença de Crohn (Greenstein et al. 2008). Assim, apesar da validade terapêutica do IFN $\gamma$  ser bem

estabelecida para várias doenças, como a doença granulomatosa crônica, onde ele restabelece a capacidade defectiva dos leucócitos eliminarem os patógenos (Naderi Beni et al. 2012), na hanseníase o tratamento com IFN $\gamma$  desencadeia uma complicação imunológica sistêmica emergencial, o ENH, contrabalanceando seus efeitos benéficos para os pacientes.

A rapamicina pode ser uma droga para potencial utilização na hanseníase, no entanto necessitaria de uma avaliação cautelosa, pois devido às suas propriedades imunossupressoras e antiproliferativas, o tratamento com rapamicina (Sirolimus) tem sido associado com a reativação da tuberculose, assim como o tratamento com seus derivados Everolimus e Temsirolimus (Coriat et al. 2011, Fijałkowska-Morawska et al. 2011, Ngo et al. 2011). Assim, a rapamicina poderia funcionar como um protótipo para o desenvolvimento de fármacos análogos que alternativamente propiciariam efeitos benéficos para os pacientes com hanseníase através da indução de autofagia, com consequente potencialização da via antimicrobiana mediada pela IL-15 e eliminação das micobactérias, porém sem os efeitos adversos indesejáveis.

Em resumo tais dados indicam que, em macrófagos estimulados com *M. leprae*, a citocina IFN $\gamma$  induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-15, que contribuem para o aumento da atividade microbicida da célula hospedeira através da indução de autofagia. Não fica claro nessa etapa do estudo quais os mecanismos utilizados pelo IFN $\gamma$  para induzir a autofagia, mas estudos anteriores demonstraram que a IL-15 induz CYP27b1 e a subsequente bioconversão da 25-hidroxi-vitamina D3 (25D3) na forma bioativa 1,25D3, levando à ativação de VDR e indução de catelicidina (Krutzik et al. 2008). Estudos recentes demonstraram que a vitamina D induz autofagia em monócitos via catelicidina (Yuk et al. 2009) e que esse mecanismo parece ser importante para o controle de infecções como as causadas por *M. tuberculosis* (Jo 2010, Shin et al. 2010b, Ní Cheallaigh et al. 2011) e pelo HIV (Campbell & Spector 2011).

Com base nesses dados, nossos estudos futuros buscarão um maior entendimento sobre as vias de sinalização associadas à indução de autofagia em células estimuladas com o *M. leprae* na presença ou não de IFN $\gamma$ , bem como o estudo dos genes relacionados à indução de autofagia em pacientes com hanseníase.

## 6. Conclusões

- Os autofagossomos e fagossomos micobacterianos foram observados em ambas as células de lesões de pele de pacientes BT e LL. No entanto, a presença do *M. leprae* em autofagossomos e de bactérias degeneradas foi mais notável no paciente BT;
- Pacientes BT apresentaram uma maior expressão tecidual de LC3-II em relação aos LL;
- Na presença ou ausência de IFN $\gamma$ , um maior número de macrófagos de lesões de pele expressando LC3 puntiforme foi observado no paciente BT, comparado ao LL;
- O ML é capaz de diretamente induzir autofagia em macrófagos;
- O IFN $\gamma$  foi capaz de induzir a formação de autofagossomos em monócitos e macrófagos;
- Na presença do *M. leprae*, o IFN $\gamma$  aumenta a formação de autofagossomos e os fagossomos micobacterianos se co-localizam com os autofagossomos LC3 positivos;
- O IFN $\gamma$  foi capaz de aumentar a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12p40 e TNF em macrófagos estimulados com o *M. leprae*;
- O IFN $\gamma$  foi capaz de aumentar a secreção da citocina microbicida IL-15 em macrófagos estimulados com o *M. leprae*, através de um mecanismo aparentemente dependente da via autofágica;
- O IFN $\gamma$  reduz a secreção da citocina regulatória IL-10 em macrófagos estimulados com o *M. leprae* e o bloqueio da autofagia não restaura a síntese de IL-10;
- Na presença do IFN $\gamma$  há um número menor de macrófagos associados ao *M. leprae*.

## 7. Referências bibliográficas

- Agarwal S, Vemuri N, Mahadevan PR. Macrophage membrane alterations in leprosy as determined by change in sialic acid level. *J Clin Lab Immunol.* 1986 Mar;19(3):119–22.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* 4. ed., New York, Garland Science, 2002; Cap. 24-25.
- Alonso S, Pethe K, Russell DG, Purdy GE. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 abr 3;104(14):6031–6.
- Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004 Sep 15;238(2):429–37.
- Anand PK, Kaul D, Sharma M. Synergistic action of vitamin D and retinoic acid restricts invasion of macrophages by pathogenic mycobacteria. *J Microbiol Immunol Infect.* 2008 fev;41(1):17–25.
- Anand PK, Kaul D. Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 out 24;310(3):876–7.
- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels M-J, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest.* 2006 Sep;116(9):2366–77.
- Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* 1990 out;137(4):749–53.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:563–91.
- Backman KA, Guyre PM. Gamma-interferon inhibits Fc receptor II-mediated phagocytosis of tumor cells by human macrophages. *Cancer Res.* 1994 maio 1;54(9):2456–61.
- Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect. Immun.* 1992 Apr;60(4):1441–6.
- Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature.* 1994 dez 15;372(6507):691–4.
- Bermudez LE, Covaro G, Remington J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect. Immun.* 1993 out;61(10):4126–30.
- Bermudez LE, Kaplan G. Recombinant cytokines for controlling mycobacterial infections. *Trends Microbiol.* 1995 Jan;3(1):22–7.



- Berrington WR, Macdonald M, Khadge S, Sapkota BR, Janer M, Hagge DA, et al. Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *J. Infect. Dis.* 2010 maio 1;201(9):1422–35.
- Birmingham CL, Canadien V, Gouin E, Troy EB, Yoshimori T, Cossart P, et al. *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy.* 2007 out;3(5):442–51.
- Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* 2006 Apr 21;281(16):11374–83.
- Blaser MJ, Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature.* 2007 out 18;449(7164):843–9.
- Bloom BR. Learning from leprosy: a perspective on immunology and the Third World. *J. Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):i-x.
- Bochud P-Y, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2009 set;28(9):1055–65.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999 jul 30;285(5428):732–6.
- Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209–19.
- Bührer-Sekula S, Cunha MG, Ferreira WA, Klatser PR. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998 Jul;21(3):197–201.
- Campbell GR, Spector SA. Hormonally active vitamin D3 (1 $\alpha$ ,25-dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. *J. Biol. Chem.* 2011 maio 27;286(21):18890–902.
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum. Genet.* 2010 Nov;128(5):481–90.
- Chandi SM, Job CK. The early cellular response to *M. leprae*. An ultrastructural study. *Lepr India.* 1978 Jul;50(3):345–57.
- Che N, Li S, Gao T, Zhang Z, Han Y, Zhang X, et al. Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin. Chim. Acta.* 2010 nov 11;411(21-22):1645–9.
- Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Balagon MV, Abalos RM, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001 jan;8(1):138–42.
- Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 1983 Sep;41(3):1077–83.

- Clark SL Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol.* 1957 maio 25;3(3):349–62.
- Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev.* 2001 Dec;72(4):449–61.
- Collins CA, De Mazière A, van Dijk S, Carlsson F, Klumperman J, Brown EJ. Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. *PLoS Pathog.* 2009 maio;5(5):e1000430.
- Consortium, Wellcome Trust Case Control. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007 jun 7;447(7145):661–78.
- Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 2010 Jan;16(1):90–7.
- Coriat R, Mir O, Ropert S, Loulergue P, Billefont B, Goldwasser F. Reactivation of tuberculosis during temsirolimus therapy. *Invest New Drugs.* 2011 dez;29(6):1494–6.
- Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Beck JS. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 1987 nov;40(11):1314–9.
- Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest.* 2008 ago;118(8):2917–28.
- Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet.* 2008 dez;24(12):604–12.
- Dagur PK, Sharma B, Kumar G, Khan NA, Katoch VM, Sengupta U, et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Mol. Immunol.* 2010 fev;47(5):943–52.
- Damasco MH, Sarno EN, Lobão AS, Alvarenga FB, Porto JA, Rosankaimer F, et al. Effect of cutaneous cell-mediated immune response to rIFN gamma on *Mycobacterium leprae* viability in the lesions of lepromatous leprosy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1992;25(5):457–65.
- de Chastellier C, Forquet F, Gordon A, Thilo L. *Mycobacterium* requires an all-around closely apposing phagosome membrane to maintain the maturation block and this apposition is re-established when it rescues itself from phagolysosomes. *Cell. Microbiol.* 2009 ago;11(8):1190–207.
- de Chastellier C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology.* 2009 jul;214(7):526–42.
- De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 1966;28:435–92.
- de Jong R, Janson AA, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. *J. Immunol.* 1997 jul 15;159(2):786–93.

- de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 2011 Aug;165(2):251–63.
- Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 2008 Apr 9;27(7):1110–21.
- Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* 2009 Jun 18;5(6):527–49.
- Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell. Microbiol.* 2006 May;8(5):719–27.
- Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* 2006 Aug;18(4):375–82.
- Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol. Rev.* 2011 Mar;240(1):92–104.
- Deretic V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2005 Oct;26(10):523–8.
- Drutz DJ, Chen TS, Lu WH. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med.* 1972 Jul 27;287(4):159–64.
- Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, et al. Shigella phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe.* 2009 Aug 20;6(2):137–49.
- Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J. Cell Biol.* 2010 fev 22;188(4):527–36.
- Early J, Fischer K, Bermudez LE. Mycobacterium avium uses apoptotic macrophages as tools for spreading. *Microb. Pathog.* 2011 fev;50(2):132–9.
- Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2008 out;8(4):325–32.
- Estrella JL, Kan-Sutton C, Gong X, Rajagopalan M, Lewis DE, Hunter RL, et al. A Novel in vitro Human Macrophage Model to Study the Persistence of Mycobacterium tuberculosis Using Vitamin D(3) and Retinoic Acid Activated THP-1 Macrophages. *Front Microbiol.* 2011;2:67.
- Evans MJ, Levy L. Ultrastructural changes in cells of the mouse footpad infected with Mycobacterium leprae. *Infect. Immun.* 1972 fev;5(2):238–47.
- Fabri M, Stenger S, Shin D-M, Yuk J-M, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med.* 2011 out 12;3(104):104ra102.
- Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999 maio 14;97(4):435–47.

- Fijałkowska-Morawska JB, Jagodzińska M, Nowicki M. Pulmonary embolism and reactivation of tuberculosis during everolimus therapy in a kidney transplant recipient. *Ann. Transplant.* 2011 dez 30;16(4):107–10.
- Florez-McClure ML, Linseman DA, Chu CT, Barker PA, Bouchard RJ, Le SS, et al. The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 2004 maio 12;24(19):4498–509.
- Floto RA, Sarkar S, Perlstein EO, Kampmann B, Schreiber SL, Rubinsztein DC. Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages. *Autophagy.* 2007 dez;3(6):620–2.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:93–129.
- Friend DS. In Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology.* 12. ed., New York, Chapman & Hall, 1994; 988 pp.
- Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut.* 2011 nov;60(11):1580–8.
- Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for Mycobacterium leprae-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol. Lett.* 2007 maio 15;110(1):82–5.
- Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe.* 2009 out 22;6(4):367–80.
- García VE, Sieling PA, Gong J, Barnes PF, Uyemura K, Tanaka Y, et al. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J. Immunol.* 1997 ago 1;159(3):1328–35.
- García VE, Uyemura K, Sieling PA, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J. Immunol.* 1999 maio 15;162(10):6114–21.
- Ghadimi D, de Vrese M, Heller KJ, Schrezenmeir J. Lactic acid bacteria enhance autophagic ability of mononuclear phagocytes by increasing Th1 autophagy-promoting cytokine (IFN-gamma) and nitric oxide (NO) levels and reducing Th2 autophagy-restraining cytokines (IL-4 and IL-13) in response to Mycobacterium tuberculosis antigen. *Int. Immunopharmacol.* 2010 jun;10(6):694–706.
- Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to M. leprae of healthy leprosy contacts. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1972 Sep;40(3):243–50.
- Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* 1996 mar;148(3):911–7.
- Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 2000 dez;122(3):330–4.
- Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2891–906.

- Greenstein RJ, Su L, Juste RA, Brown ST. On the action of cyclosporine A, rapamycin and tacrolimus on *M. avium* including subspecies *paratuberculosis*. *PLoS ONE*. 2008;3(6):e2496.
- Guerrero-Velázquez C, Lopez-Roa RI, Delgado-Rizo V, Guillen-Vargas CM, Montoya-Buelna M, Fafutis-Morris M. Abnormalities in intracellular processing and expression of interferon-gamma receptor in adherent cells from lepromatous leprosy patients. *J. Interferon Cytokine Res.* 2010 Feb;30(2):99–105.
- Gupta A, Sharma VK, Vohra H, Ganguly NK. Spontaneous apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of leprosy patients: role of cytokines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999 maio;24(1):49–55.
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004 Dec 17;119(6):753–66.
- Hanada T, Satomi Y, Takao T, Ohsumi Y. The amino-terminal region of Atg3 is essential for association with phosphatidylethanolamine in Atg8 lipidation. *FEBS Lett.* 2009 abr 2;583(7):1078–83.
- Hansen, GA. Undwersogelser angaende spedalskhedens arsager. *Norsk. Mag. Laegevid.* 1874; 4:1–88.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006 jun 15;441(7095):885–9.
- Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity.* 2007 set;27(3):505–17.
- Harris J, Hope JC, Keane J. Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 2008 Dec 15;198(12):1842–50.
- Harris J, Master SS, De Haro SA, Delgado M, Roberts EA, Hope JC, et al. Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009 Mar 15;128(1-3):37–43.
- Hartman ML, Kornfeld H. Interactions between naïve and infected macrophages reduce *Mycobacterium tuberculosis* viability. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e27972.
- Hastings RC. MDT and transmission. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1998 Jun;66(2):224.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 2009;43:67–93.
- Henriques-Pons A, Nagaraju K. Nonimmune mechanisms of muscle damage in myositis: role of the endoplasmic reticulum stress response and autophagy in the disease pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009 nov;21(6):581–7.
- Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS ONE.* 2011;6(5):e19105.

- Hernandez M de O, Fulco T de O, Pinheiro RO, Pereira R de MS, Redner P, Sarno EN, et al. Thalidomide modulates Mycobacterium leprae-induced NF- $\kappa$ B pathway and lower cytokine response. *Eur. J. Pharmacol.* 2011 nov 16;670(1):272–9.
- Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by Mycobacterium leprae in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. *Immunology.* 2003 May;109(1):156–64.
- Herrera G. Vitamin D in massive doses as an adjuvant to the sulfones in the treatment of tuberculoid leprosy. *Int J Lepr.* 1949 jun;17(1-2):35–42.
- Heynen MJ, Tricot G, Verwilghen RL. Autophagy of mitochondria in rat bone marrow erythroid cells. Relation to nuclear extrusion. *Cell Tissue Res.* 1985;239(1):235–9.
- Hirschberg H. The role of macrophages in the lymphoproliferative response to Mycobacterium leprae in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 1978 out;34(1):46–51.
- Hope JC, Thom ML, McCormick PA, Howard CJ. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004 ago;100(3-4):187–95.
- Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 1981 set;147(3):728–35.
- Hussain R, Kifayet A, Dojki M, Dockrell HM. Selective correlation of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with immunoglobulin G1 and immunoglobulin G3 subclass antibody in leprosy. *Immunology.* 1999 Oct;98(2):238–43.
- Hussey S, Travassos LH, Jones NL. Autophagy as an emerging dimension to adaptive and innate immunity. *Semin. Immunol.* 2009 ago;21(4):233–41.
- Intemann CD, Thye T, Niemann S, Browne ENL, Amanua Chinbuah M, Enimil A, et al. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by Mycobacterium tuberculosis but not by M. africanum strains. *PLoS Pathog.* 2009 set;5(9):e1000577.
- Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL Jr, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat. Med.* 2009 mar;15(3):267–76.
- Jih MH, Kimyai-Asadi A, Levis WR. Reversal reaction to Hansen's disease. *J Drugs Dermatol.* 2002 Jul;1(1):70–1.
- Jo E-K. Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy. *Cell. Microbiol.* 2010 ago;12(8):1026–35.
- Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 2007 jun 15;178(12):7520–4.
- Jopling WH. Clinical aspects of leprosy. *Tubercle.* 1982 Dec;63(4):295–305.
- Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin K-Q, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Aug 28;104(35):14050–5.

- Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J. Immunol.* 1997 jan 15;158(2):800–6.
- Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab.* 2008 out;8(4):318–24.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5720–8.
- Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001 jul;31(1):53–8.
- Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 1987c Oct 1;166(4):1098–108.
- Kaplan G, Mathur NK, Job CK, Nath I, Cohn ZA. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989 Oct;86(20):8073–7.
- Kaplan G, Nathan CF, Gandhi R, Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. Effect of recombinant interferon-gamma on hydrogen peroxide-releasing capacity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy. *J. Immunol.* 1986 ago 1;137(3):983–7.
- Kaplan G, Nusrat A, Sarno EN, Job CK, McElrath J, Porto JA, et al. Cellular responses to the intradermal injection of recombinant human gamma-interferon in lepromatous leprosy patients. *Am. J. Pathol.* 1987a Aug;128(2):345–53.
- Kaplan G, Nusrat A, Witmer MD, Nath I, Cohn ZA. Distribution and turnover of Langerhans cells during delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 1987b mar 1;165(3):763–76.
- Karim AF, Chandra P, Chopra A, Siddiqui Z, Bhaskar A, Singh A, et al. Express path analysis identifies a tyrosine kinase Src-centric network regulating divergent host responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Biol. Chem.* 2011 nov 18;286(46):40307–19.
- Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J. Immunol.* 1983 abr;130(4):1784–9.
- Kathania M, Raje CI, Raje M, Dutta RK, Majumdar S. Bfl-1/A1 acts as a negative regulator of autophagy in mycobacteria infected macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011 abr;43(4):573–85.
- Kato L. Cholesterol dynamics in macrophages implication for the bacteriology and pathology of leprosy. *Acta Leprol.* 1979 Jun;(75):35–47.
- Kim B-H, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN- $\gamma$ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science.* 2011 maio 6;332(6030):717–21.

- Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, et al. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J. Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):779–86.
- Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus 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.* 1971 Sep;39(3):693–702.
- Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 Apr;2(4):301–14.
- Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br. J. Dermatol.* 2003 Apr;148(4):795–8.
- Kleinnijenhuis J, Oosting M, Plantinga TS, van der Meer JWM, Joosten LAB, Crevel RV, et al. Autophagy modulates the *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine response. *Immunology.* 2011 Nov;134(3):341–8.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 2008 Feb;4(2):151–75.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 2003 Oct;5(4):539–45.
- Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy.* 2008 Aug;4(6):740–3.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006 Jun 15;441(7095):880–4.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y-S, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 2007 Dec 14;131(6):1149–63.
- Konopski Z, Seljelid R, Eskeland T. IFN-gamma inhibits internalization of soluble aminated beta-1,3-D-glucan by macrophages and thereby down-regulates the glucan induced release of TNF-alpha and IL-1 beta. *Scand. J. Immunol.* 1994 Jul;40(1):57–63.
- Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008 Dec;9(12):1004–10.
- Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J. Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):7115–20.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 2003 May;9(5):525–32.
- Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 2005 Jun;11(6):653–60.



- Kumar D, Nath L, Kamal MA, Varshney A, Jain A, Singh S, et al. Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. 2010 mar 5;140(5):731–43.
- Kumar D, Rao KVS. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. *Microbes Infect*. 2011 Feb;13(2):121–33.
- Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol*. 2009 Jul 27;186(2):255–68.
- Languillon J, Carayon A. Lésions cutanées. In Masson, Précis de léprologie. 2. ed., Paris, 1986; 62-101.
- Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*. 2007 Mar 9;315(5817):1398–401.
- Lee J-H, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*. 2010 jun 25;141(7):1146–58.
- Legakis JE, Klionsky DJ. Part I. Introduction to Autophagy: Overview of Autophagy. In Deretic, V. Ed. *Autophagy in Immunity and Infection: A Novel Immune Effector*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006; p. 3-17.
- Lerena MC, Colombo MI. *Mycobacterium marinum* induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell. Microbiol*. 2011 jun;13(6):814–35.
- Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol*. 2007 Oct;7(10):767–77.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell*. 2004 Apr;6(4):463–77.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):323–35.
- Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature*. 2007 abr 12;446(7137):745–7.
- Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*. 2005 Jan 28;120(2):159–62.
- Li JCB, Au K, Fang J, Yim HCH, Chow K, Ho P, et al. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN- $\gamma$  signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. *AIDS*. 2011 jan 2;25(1):15–25.
- Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJP, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med*. 2006 Sep 4;203(9):2063–71.
- Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect. Immun*. 2001 maio;69(5):3413–7.

- Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat. Med.* 2012;18(2):267–73.
- Lockwood D. Leprosy. *Clin Evid.* 2004 Dec;(12):1103–14.
- Lockwood DNJ. The different aspects of leprosy chemotherapy. *Lepr Rev.* 2011 mar;82(1):1–2.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell.* 2002 set;10(3):457–68.
- Lopez Roa RI, Guerrero Velásquez C, Alvarado Navarro A, Montoya Buelna M, Garcia Niebla C, Fafutis Morris M. Recovery of IFN-gamma levels in PBMCs from lepromatous leprosy patients through the synergistic actions of the cytokines IL-12 and IL-18. *Int. Immunopharmacol.* 2008 dez 20;8(13-14):1715–20.
- Machado K. Controle da hanseníase: Agora, de olho nos jovens. *RADIS Comunicação em saúde.* 2008; 68:10-13.
- MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science.* 2003 out 24;302(5645):654–9.
- MacMicking JD. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):601–9.
- Mahadevan PR, Antia NH. Biochemical alteration in cells following phagocytosis of *M. leprae*--the consequence--a basic concept. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1980 jun;48(2):167–71.
- Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interferon Cytokine Res.* 2004 Aug;24(8):439–54.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 2007 dez;6(6):458–71.
- Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1999 Sep;67(3):270–8.
- Manjithaya R, Anjard C, Loomis WF, Subramani S. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 2010 fev 22;188(4):537–46.
- Martens S, Howard J. The interferon-inducible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006;22:559–89.
- Martineau AR, Honecker FU, Wilkinson RJ, Griffiths CJ. Vitamin D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007a mar;103(3-5):793–8.
- Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007b jul 15;176(2):208–13.

- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* 2010 maio;13(5):567–76.
- Massey DCO, Bredin F, Parkes M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut.* 2008 set;57(9):1294–6.
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 2010 mar;87(3):371–84.
- Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell. Microbiol.* 2011a fev;13(2):259–73.
- Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J. Immunol.* 2011b set 1;187(5):2548–58.
- McPhee CK, Logan MA, Freeman MR, Baehrecke EH. Activation of autophagy during cell death requires the engulfment receptor Draper. *Nature.* 2010 Jun 24;465(7301):1093–6.
- Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: a sweet process in diabetes. *Cell Metab.* 2008 out;8(4):275–6.
- Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol. Lett.* 1995 dez;48(2):123–8.
- Mistry NF, Birdi TJ, Antia NH. *M. leprae* phagocytosis and its association with membrane changes in macrophages from leprosy patients. *Parasite Immunol.* 1986 Mar;8(2):129–38.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728–41.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008 Feb 28;451(7182):1069–75.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 2002 Dec;27(6):421–9.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007 Dec;3(6):542–5.
- Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ.* 2005 nov;12 Suppl 2:1535–41.
- Modlin RL, Gersuk GM, Nelson EE, Pattengale PK, Gunter JR, Chen L, et al. T-lymphocyte clones from leprosy skin lesions. *Lepr Rev.* 1986 dez;57 Suppl 2:143–7.

- Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988 fev;85(4):1213–7.
- Modlin RL, Rea TH. Immunopathology of leprosy granulomas. *Springer Semin. Immunopathol.* 1988;10(4):359–74.
- Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol.* 1994 jun;102(6):828–32.
- Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr. Opin. Immunol.* 2010 fev;22(1):48–54.
- Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 set;2(9):747–65.
- Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe.* 2009 Oct 22;6(4):343–53.
- Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv. Immunol.* 2010;105:1–24.
- Mortensen M, Ferguson DJP, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M, et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 jan 12;107(2):832–7.
- Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int. J. Dermatol.* 1998 out;37(10):733–40.
- Moura AC, Modolell M, Mariano M. Down-regulatory effect of *Mycobacterium leprae* cell wall lipids on phagocytosis, oxidative respiratory burst and tumour cell killing by mouse bone marrow derived macrophages. *Scand. J. Immunol.* 1997 nov;46(5):500–5.
- Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br. J. Dermatol.* 2007 Aug;157(2):273–83.
- Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:423–49.
- Murray HW. Current and future clinical applications of interferon-gamma in host antimicrobial defense. *Intensive Care Med.* 1996 out;22 Suppl 4:S456–461.
- Murray HW. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am. J. Med.* 1994 nov;97(5):459–67.
- Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J. Immunol.* 2007 jan 1;178(1):338–44.
- Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood.* 1999 maio 15;93(10):3531–9.

- Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH, Nilsen R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand. J. Immunol.* 2001 dez;54(6):630–9.
- Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop Geogr Med.* 1994;46(2):80–4.
- Naderi Beni F, Fattahi F, Mirshafiey A, Ansari M, Mohsenzadegan M, Movahedi M, et al. Increased production of nitric oxide by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on interferon-gamma treatment. *International Immunopharmacology* [Internet]. 2012 fev 11. doi:10.1016/j.intimp.2012.01.016.
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science.* 2004 Nov 5;306(5698):1037–40.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 2011 mar;12(3):222–30.
- Narayan NP, Ramu G, Desikan KV, Vallishayee RS. Correlation of clinical, histological and immunological features across the leprosy spectrum. *Indian J Lepr.* 2001 Dec;73(4):329–42.
- Nath I, Van Rood JJ, Mehra NK, Vaidya MC. Natural suppressor cells in human leprosy: the role of HLA-D-identical peripheral lymphocytes and macrophages in the in vitro modulation of lymphoproliferative responses. *Clin. Exp. Immunol.* 1980 Nov;42(2):203–10.
- Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, et al. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. *Immunol. Lett.* 2000 dez 1;75(1):69–76.
- Nathan C, Squires K, Griffo W, Levis W, Varghese M, Job CK, et al. Widespread intradermal accumulation of mononuclear leukocytes in lepromatous leprosy patients treated systemically with recombinant interferon gamma. *J. Exp. Med.* 1990 Nov 1;172(5):1509–12.
- Nathan CF, Kaplan G, Levis WR, Nusrat A, Witmer MD, Sherwin SA, et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med.* 1986 Jul 3;315(1):6–15.
- Neyrolles O, Hernández-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornès P, Tailleux L, Barrios Payán JA, et al. Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence? *PLoS ONE.* 2006;1:e43.
- Ngo BT, Pascoe M, Khan D. Drug interaction between rifampicin and sirolimus in transplant patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2011 jan;22(1):112–5.
- Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat. Immunol.* 2000 jul;1(1):70–6.
- Ní Cheallaigh C, Keane J, Lavelle EC, Hope JC, Harris J. Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives. *Clin. Exp. Immunol.* 2011 jun;164(3):291–300.

- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature*. 2009 Oct 1;461(7264):654–8.
- Nixon RA. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? *Trends Neurosci*. 2006 Sep;29(9):528–35.
- Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. *Autophagy*. 2011 Mar;7(3):310–4.
- Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science*. 2005 Feb 4;307(5710):727–31.
- Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe*. 2007 Mar 15;1(1):23–35.
- Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R Jr, Tallóczy Z, Zou Z, Levine B. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe*. 2010 Feb 18;7(2):115–27.
- Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO. IFNG +874T/A, IL10 -1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum. Genet*. 2008 Jun;123(5):477–84.
- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science*. 2005 Jan 28;307(5709):593–6.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem*. 2007 Aug 17;282(33):24131–45.
- Park H-J, Lee SJ, Kim S-H, Han J, Bae J, Kim SJ, et al. IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Mol. Immunol*. 2011 Jan;48(4):720–7.
- Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet*. 2007 Jul;39(7):830–2.
- Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev*. 2004 Dec;202:8–32.
- Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol*. 2011 Feb;6(2):217–30.
- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009 Feb;11(2):181–90.
- Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006 May;74(5):868–79.

- Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):329–41.
- Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:297–329.
- Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He Y-W. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J. Exp. Med.* 2007 Jan 22;204(1):25–31.
- Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol.* 2009 Apr 1;182(7):4046–55.
- PubMed [Internet]. National Center for Biotechnology Information (US). U.S. National Library of Medicine. Bethesda (MD). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>>. Acesso em: 22 Jan. 2012.
- Radoshevich L, Murrow L, Chen N, Fernandez E, Roy S, Fung C, et al. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell*. 2010 ago 20;142(4):590–600.
- Ramjeet M, Hussey S, Philpott DJ, Travassos LH. “Nodophagy”: New crossroads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes*. 2010;1(5):307–15.
- Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 2001 ago;13(4):417–28.
- Rees RJ. LEPROA’s elective period student programme, 1973-1983. *Lepr Rev.* 1984 Dec;55(4):321–5.
- Reichen J, Stickel F, Bhattacharya I, Matschke K, Maller E, Korth-Bradley J. Repeat-dose sirolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with hepatic allografts. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* [Internet]. 2011 dez 6. doi:10.1007/s00228-011-1172-7.
- Renna M, Schaffner C, Brown K, Shang S, Tamayo MH, Hegyi K, et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 2011 set;121(9):3554–63.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1966 Sep;34(3):255–73.
- Ridley MJ, Badenoch-Jones P, Turk JL. Ultrastructure of cells of the mononuclear-phagocyte series (MPS) across the leprosy spectrum. *J. Pathol.* 1980 Apr;130(4):223–7.
- Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis.* 2011 Jun;11(6):464–70.
- Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology*. 1986 nov;59(3):333–8.
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J. Infect. Dis.* 1999 Jan;179(1):187–91.

- Russell DG. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):569–77.
- Ryter A, Frehel C, Rastogi N, David HL. Macrophage interaction with mycobacteria including *M. leprae*. *Acta Leprol.* 1984 Dec;2(2-4):211–26.
- Saiga H, Shimada Y, Takeda K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011;2011:347594.
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 dez 8;106(49):20842–6.
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature.* 2008 nov 13;456(7219):264–8.
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991 out 11;254(5029):279–82.
- Salgame PR, Mahadevan PR, Antia NH. Mechanism of immunosuppression in leprosy: presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. *Infect. Immun.* 1983 Jun;40(3):1119–26.
- Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguel CP, Viana SM, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 1993 ago;168(2):408–14.
- Sampaio EP, Malta AM, Sarno EN, Kaplan G. Effect of rhuIFN-gamma treatment in multibacillary leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1996 Sep;64(3):268–73.
- Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J. Exp. Med.* 1992 Jun 1;175(6):1729–37.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 1991 mar 1;173(3):699–703.
- Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998 Jan;31(1):69–76.
- Samuel NM, Grange JM, Samuel S, Lucas S, Owilli OM, Adalla S, et al. A study of the effects of intradermal administration of recombinant gamma interferon in lepromatous leprosy patients. *Lepr Rev.* 1987 dez;58(4):389–400.
- Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature.* 2007 Dec 20;450(7173):1253–7.
- Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, Maglathlin RL, et al. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat. Chem. Biol.* 2007 jun;3(6):331–8.



- Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin. Exp. Immunol.* 1991 abr;84(1):103–8.
- Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1996 dez;64(4 Suppl):S69–73; discussion S73–74.
- Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1290–6.
- Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J. Immunol.* 1991 Sep 15;147(6):1983–94.
- Schmid D, Münz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.* 2007 Jul;27(1):11–21.
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Dec 4;104(49):19500–5.
- SCIRUS for scientific information only [Internet]. FAST Search & Transfer<sup>®</sup>. Elsevier. Disponível em: <<http://www.scirus.com/>>. Acesso em: 22 jan. 2012.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006 abr;19(2):338–81.
- Sehgal VN, Joginder, Sharma VK. Immunology of leprosy. A comprehensive survey. *Int. J. Dermatol.* 1989 nov;28(9):574–84.
- Sekar B, Arunagiri K, Kumar BN, Narayanan S, Menaka K, Oommen PK. Detection of mutations in *folP1*, *rpoB* and *gyrA* genes of *M. leprae* by PCR- direct sequencing--a rapid tool for screening drug resistance in leprosy. *Lepr Rev.* 2011 mar;82(1):36–45.
- Selvaraj P. Vitamin D, vitamin D receptor, and cathelicidin in the treatment of tuberculosis. *Vitam. Horm.* 2011;86:307–25.
- Sen GC. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001;55:255–81.
- Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cellular Microbiology* [Internet]. 2012 jan 18. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01754.x.
- Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr.* 1962 Sep;30:291–306.
- Shi C-S, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal.* 2010;3(123):ra42.
- Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, et al. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 maio 1;382(2):419–23.

- Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, et al. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010 mar 5;393(2):274–9.
- Shin D-M, Jeon B-Y, Lee H-M, Jin HS, Yuk J-M, Song C-H, et al. *Mycobacterium tuberculosis* eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog.* 2010a;6(12):e1001230.
- Shin D-M, Yuk J-M, Lee H-M, Lee S-H, Son JW, Harding CV, et al. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell. Microbiol.* 2010b nov;12(11):1648–65.
- Shui W, Petzold CJ, Redding A, Liu J, Pitcher A, Sheu L, et al. Organelle membrane proteomics reveals differential influence of mycobacterial lipoglycans on macrophage phagosome maturation and autophagosome accumulation. *J. Proteome Res.* 2011 jan 7;10(1):339–48.
- Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science.* 1995 jul 14;269(5221):227–30.
- Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 1999 fev 1;162(3):1851–8.
- Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology.* 1994a out;191(4-5):378–87.
- Sieling PA, Modlin RL. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994b ago 15;730:42–52.
- Sieling PA, Torrelles JB, Stenger S, Chung W, Burdick AE, Rea TH, et al. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J. Immunol.* 2005 mar 1;174(5):2637–44.
- Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J. Immunol.* 1994 out 15;153(8):3639–47.
- Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *J. Infect. Dis.* 1989 abr;159(4):787–90.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009 abr 30;458(7242):1131–5.
- Singh S, Narayanan NP, Jenner PJ, Ramu G, Colston MJ, Prasad HK, et al. Sera of leprosy patients with type 2 reactions recognize selective sequences in *Mycobacterium leprae* recombinant LSR protein. *Infect. Immun.* 1994 Jan;62(1):86–90.
- Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science.* 2006 set 8;313(5792):1438–41.
- Singh SB, Ornatowski W, Vergne I, Naylor J, Delgado M, Roberts E, et al. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2010 dez;12(12):1154–65.

- Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect. Immun.* 2010 jan;78(1):293–300.
- Sivaprasad U, Basu A. Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death in MCF-7 cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2008 Aug;12(4):1265–71.
- Soilleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, et al. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J. Pathol.* 2006 Jun;209(2):182–9.
- Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem.* 2006 ago 30;39(4):107–12.
- Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh C-W, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* 2010 set 6;190(5):881–92.
- Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, et al. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 1999 May;10(5):1367–79.
- Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2009 Jun;156(3):495–501.
- Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 fev;4(2):100–9.
- Taylor MP, Burgon TB, Kirkegaard K, Jackson WT. Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J. Virol.* 2009 jul;83(13):6599–609.
- Texereau J, Chiche J-D, Taylor W, Choukroun G, Comba B, Mira J-P. The importance of Toll-like receptor 2 polymorphisms in severe infections. *Clin. Infect. Dis.* 2005 nov 15;41 Suppl 7:S408–415.
- Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 2009 Nov;10(11):1215–21.
- Torrelles JB, Sieling PA, Arcos J, Knaup R, Bartling C, Rajaram MVS, et al. Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *J. Biol. Chem.* 2011 out 14;286(41):35438–46.
- Tousif S, Singh Y, Prasad DVR, Sharma P, Van Kaer L, Das G. T cells from Programmed Death-1 deficient mice respond poorly to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS ONE.* 2011;6(5):e19864.
- Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 2010 jan;11(1):55–62.
- Triccas JA, Roche PW, Winter N, Feng CG, Butlin CR, Britton WJ. A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1996 dez;64(12):5171–7.

- Universidade de Stanford [Internet]. A photomicrograph of *M. leprae* from a leprosy skin lesion (CDC). Leprosy. Biological Characteristics. Infectious Agent. Disponível em: <<http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2005/Leprosy/bio.htm>>. Acesso em: 20 dez. 2011.
- Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. *Lepr Rev.* 1994 Sep;65(3):190–203.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1287–98.
- Van Voorhis WC, Kaplan G, Sarno EN, Horwitz MA, Steinman RM, Levis WR, et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N. Engl. J. Med.* 1982 dez 23;307(26):1593–7.
- Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J. Cell. Sci.* 1998 Apr;111 ( Pt 7):897–905.
- Virchow R. *Die krankhaften Geschwülste.* Berlin, Germany, August Hirschwald, 1863; 208 pp.
- Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001;2(8):REVIEWS1023.
- Walker SL, Waters MFR, Lockwood DNJ. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev.* 2007 Sep;78(3):197–215.
- Walsh DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KSA. TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2004 jul 1;41(3):265–9.
- WHO, World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical Report Series. Geneva, 1982; 675.
- WHO, World Health Organization. Global leprosy situation, beginning of 2008. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2008 ago 15;83(33):293–300.
- WHO, World Health Organization. Laboratory Techniques for Leprosy, WHO/CSD/LEP/86.4. 1987; 30-35.
- WHO, World Health Organization. Leprosy update, 2011. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2011a set 2;86(36):389–99.
- WHO, World Health Organization. Surveillance of drug resistance in leprosy: 2010. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2011b jun 3;86(23):237.
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006 Feb 10;124(3):471–84.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102–9.

- Yamaguchi M, Noda NN, Nakatogawa H, Kumeta H, Ohsumi Y, Inagaki F. Autophagy-related protein 8 (Atg8) family interacting motif in Atg3 mediates the Atg3-Atg8 interaction and is crucial for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *J. Biol. Chem.* 2010 set 17;285(38):29599–607.
- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 1991 Oct 11;254(5029):277–9.
- Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 1992 ago 15;149(4):1470–5.
- Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, et al. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat. Immunol.* 2008 ago;9(8):908–16.
- Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, et al. Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* 2009 out;11(10):1233–40.
- Yuk J-M, Shin D-M, Lee H-M, Yang C-S, Jin HS, Kim K-K, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe.* 2009 Sep 17;6(3):231–43.
- Yuk J-M, Shin D-M, Song K-S, Lim K, Kim K-H, Lee S-H, et al. Bacillus calmette-guerin cell wall cytoskeleton enhances colon cancer radiosensitivity through autophagy. *Autophagy.* 2010 jan;6(1):46–60.
- Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat. Med.* 2008 set;14(9):959–65.
- Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 2009 dez 31;361(27):2609–18.
- Zhang L, Zhang H, Zhao Y, Mao F, Wu J, Bai B, et al. Effects of Mycobacterium tuberculosis ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein on the Autophagy Function of Mouse Macrophages. *DNA Cell Biol.* 2012 fev;31(2):171–9.
- Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* 2009 Nov 1;183(9):5909–16.
- Zullo AJ, Lee S. Mycobacterial induction of autophagy varies by species and occurs independently of mTOR inhibition. *The Journal of Biological Chemistry [Internet].* 2012 jan 24. doi:10.1074/jbc.M111.320135.

**Anexo 1.1:** Principais dados na literatura associando autofagia e micobacterioses.

<b>Espécie</b>	<b>Dados na literatura</b>	<b>Referência</b>
<i>M. avium</i>	O <i>M. avium</i> consegue escapar de macrófagos autofágicos e apoptóticos.	Early et al. 2011.
<i>M. abscessus</i>	A autofagia tem papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção com micobactérias não tuberculosas (NTM). O uso de azitromicina (que inibe a autofagia) em pacientes com fibrose cística predispõe à doença micobacteriana.	Renna et al. 2011.
<i>M. marinum</i>	A ubiquitinação bacteriana é seguida por sequestro de organelas, como os lisossomos, por uma via independente de autofagia (porém bactérias em vacúolos de dupla membrana foram observadas).  A indução de autofagia pelo tratamento com rapamicina leva à maturação do compartimento contendo <i>M. marinum</i> .	Collins et al. 2009.  Lerena & Colombo 2011.
<b>Mtb e BCG</b>	Mtb sobrevive em macrófagos em função de inibir a biogênese do fagolisossomo. A indução de autofagia via IFN $\gamma$ /IRGM se sobrepõe ao bloqueio da maturação do fagossomo, liberando Mtb e BCG em compartimentos degradativos onde eles são eliminados.  A autofagia aumenta a morte lisossomal de Mtb através do recrutamento de peptídeos derivados da ubiquitina para o autofagossomo.  Pequenas moléculas potenciadoras da rapamicina induzem autofagia e aumentam a destruição do BCG pelos macrófagos.  IL-4 e IL-13 inibem a autofagia e a morte mediada por autofagia de microorganismos intracelulares em macrófagos murinos e humanos. Ao contrário, a indução de autofagia por IFN $\gamma$ inibe a sobrevivência intracelular da micobactéria.  O SNP no gene de IFN $\gamma$ , um indutor de autofagia, é associado com a resistência à infecção pelo Mtb.  A autofagia aumenta a eficácia da vacina BCG através do aumento da apresentação de antígenos em células dendríticas de camundongos.  A catelicidina, uma proteína com atividade antimicrobiana, serve como mediador da autofagia induzida por vitamina D3.	Gutierrez et al. 2004, Deretic et al. 2006.  Alonso et al. 2007.  Floto et al. 2007.  Harris et al. 2007, 2009.  Pacheco et al. 2008.  Jagannath et al. 2009.  Yuk et al. 2009.

<p>O ácido láctico bacteriano reforça a resposta de fagócitos mononucleares ao antígeno de Mtb por induzir a produção dos fatores promotores de autofagia: IFN<math>\gamma</math> e NO.</p>	Ghadimi et al. 2010.
<p>O gene <i>Eis</i> (“Enhanced intracellular survival”) do Mtb modula a autofagia de macrófagos, a resposta inflamatória, e a morte celular via espécies reativas de oxigênio.</p>	Shin et al. 2010a.
<p>IRGM, uma GTPase relacionada a imunidade em humanos, age sobre a mitocôndria e confere proteção autofágica ou morte celular, explicando o papel da IRGM na defesa contra a tuberculose.</p>	Singh et al. 2010.
<p>Somente o polimorfismo -1208 A/G, da região promotora IRGM, está associado com a susceptibilidade ao Mtb.</p>	Che et al. 2010.
<p>A análise de 44 genes do hospedeiro associados à regulação da autofagia revelou que o Mtb é capaz de manter as vias de ativação de autofagia controladas.</p>	Kumar et al. 2010.
<p>A estrutura da parede celular do BCG potencializa o tratamento de câncer de cólon, através da indução de morte celular por autofagia.</p>	Yuk et al. 2010.
<p>Lipoproteínas micobacterianas ativam a autofagia via TLR2/1/CD14 e uma funcional sinalização do receptor de vitamina D3.</p>	Shin et al. 2010b.
<p>A lipoarabinomanana de Mtb, mas não de <i>M. smegmatis</i> inibe o acúmulo de vacúolos autofágicos em macrófagos.</p>	Shui et al. 2011.
<p>Bfl-1/A1, um membro da família Bcl-2 regula negativamente a autofagia em macrófagos infectados com Mtb.</p>	Kathania et al. 2011.
<p>GTPases de 65 kDa induzidas por IFN<math>\gamma</math> protegem contra a infecção bacteriana.</p>	Kim et al. 2011.
<p>Camundongos deficientes em PD-1 exibem diminuída expressão de LC3 em macrófagos e são mais susceptíveis à infecção com Mtb.</p>	Tousif et al. 2011.
<p>A combinação de vitamina D3 com ácido retinóico aumenta os níveis de DC-SIGN e receptores de manose em macrófagos THP-1, que aumentam a captura micobacteriana, inibindo o crescimento intracelular de Mtb através da indução de espécies reativas de oxigênio e autofagia.</p>	Estrella et al. 2011.

	<p>A tirosina quinase Src é o principal regulador de autofagia em células infectadas com Mtb.</p> <p>A indução de autofagia leva ao aumento de TNF e redução de IL-1<math>\beta</math> em macrófagos infectados com Mtb.</p> <p>As células T, pela liberação de IFN<math>\gamma</math>, induzem autofagia, maturação do fagossomo, produção de peptídeos antimicrobianos como catelicidina e atividade antimicrobiana sobre o bacilo por uma via dependente de vitamina D3.</p> <p>O IFN<math>\gamma</math> ativa os macrófagos e induz a morte das micobactérias através de apoptose mediada por NO e independente da autofagia. No entanto, o uso de 3-MA impede essa destruição de Mtb e BCG.</p> <p>Uma alta carga de Mtb é capaz de induzir autofagia diretamente, sem a necessidade de fatores indutores de autofagia exógenos.</p> <p>As proteínas ESAT-6 e CFP-10 desempenham papéis significantes na formação de autofagossomos durante a infecção pelo Mtb.</p> <p>A Coro1a (ou TACO) inibe a formação do autofagossomo ao redor do fagossomo contendo Mtb, permitindo a sobrevivência da micobactéria nos macrófagos.</p> <p>O Mtb e outras NTM diretamente induzem autofagia, por uma via independente de mTOR.</p>	<p>Karim et al. 2011.</p> <p>Kleinnijenhuis et al. 2011.</p> <p>Fabri et al. 2011.</p> <p>Herbst et al. 2011.</p> <p>Hartman &amp; Kornfeld 2011.</p> <p>Zhang et al. 2012.</p> <p>Seto et al. 2012.</p> <p>Zullo &amp; Lee 2012.</p>
<p><b>ML</b></p>	<p>Durante a fase inicial de crescimento do ML, ele está presente nos macrófagos em vacúolos de uma única membrana, com poucos lisossomos próximos, e as bactérias estão íntegras. No pico da fase de crescimento, o número de lisossomos aumenta e o ML é localizado em um grande número de vacúolos de dupla membrana. Durante a fase estacionária, os macrófagos apresentam uma aparência vacuolar e contêm um significativo número de lisossomos, o ML está presente em vacúolos de dupla membrana, e a maioria dessas bactérias estão degeneradas. Esse processo foi associado com a ativação dos macrófagos.</p>	<p>Evans &amp; Levy 1972.</p>



	<p>Um estudo de microscopia eletrônica observou a presença de fagossomos com dupla membrana em macrófagos, após 40 minutos de exposição ao ML, e que posteriormente os lisossomos se fundiam com esses fagossomos.</p> <p>SNPs nos genes de TLR, que são capazes de ativar a autofagia, são associados com a susceptibilidade à hanseníase.</p> <p>O SNP no gene de NOD2, um receptor citoplasmático conhecido por reconhecer micobactérias (além de outras bactérias) e que é capaz de ativar autofagia, é associado com a susceptibilidade à hanseníase.</p> <p>O SNP no gene de IFN<math>\gamma</math>, um indutor de autofagia, é associado com a resistência à infecção pelo ML.</p>	<p>Chandi &amp; Job 1978.</p> <p>Kang &amp; Chae 2001, Johnson et al. 2007, Bochud et al. 2009.</p> <p>Zhang et al. 2009, Berrington et al. 2010.</p> <p>Cardoso et al. 2010.</p>
--	---	---