

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Thiago Gomes de Toledo Pinto**

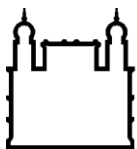
**Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos**

**Orientadores:** Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Prof. Dr. Flávio Alves Lara

**RIO DE JANEIRO**

2013



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Thiago Gomes de Toledo Pinto**

**Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos**

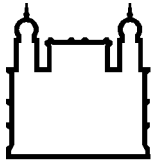
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadores:** Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Prof. Dr. Flávio Alves Lara

**RIO DE JANEIRO**

2013



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Thiago Gomes de Toledo Pinto**

**Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos**

**Orientador:** Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Prof. Dr. Flávio Alves Lara

Aprovada em: \_\_/07/2013

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Leila de Mendonça Lima – Instituto Oswaldo Cruz - Presidente

Prof. Dr. Leonardo Holanda Travassos Correa – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Afrânio Lineu Kritski – Universidade Federal do Rio de Janeiro

**SUPLENTE:**

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues – Instituto Oswaldo Cruz / Revisora

Prof. Dr. Alexandre Silva de Almeida – Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro, Julho de 2013

*“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”*

Benjamin Disraeli

*Aos meus pais, como gratidão pelo esforço dedicado a mim, especialmente na minha  
formação.*

## Agradecimentos

Aos meus pais, Lúcia Nogueira e Aydes Toledo, e demais familiares, pelo incondicional apoio e incentivo. Vocês nunca mediram esforços para me propiciar uma vida digna e honesta, mostrando que isso, aliado à força de vontade, é suficiente para atingir qualquer objetivo que tenho em mente. Minha eterna gratidão!

Ao meu orientador e mestre Dr. Milton Moraes, pela oportunidade e confiança em mim, além do exemplo como pesquisador. Sou grato também pelos “puxões de orelha” e incentivos; tiveram (e vem tendo) uma grande contribuição para a minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório (LAHAN), Lucia Elena, Carolinne Marques, Suelen, Caroline Xavier, Paula, Alexandre, Tiana, Ohanna, Cintia e Valcemir, pelo companherismo e também pelo ótimo ambiente de trabalho que vocês proporcionam. Sei que posso contar sempre com vocês! Tenho muito orgulho de fazer parte desse grupo! Cito aqui membros que já passaram por este grupo, mas também foram importantes na minha formação: Anna Beatriz (“Xuxu”), Alejandra, Dioguinho, Marcelo Ribeiro, Cláudia Covas, Sandro, Carlos Diego (“Chicó”).

À Luana Guerreiro, a qual já fez parte do nosso grupo de pesquisa e foi minha orientadora durante a iniciação científica, por sua considerável contribuição em minha formação acadêmica, além de ser uma grande amiga que conquistei.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL), chefiado pela Dra. Cristina Pessolani. Esse laboratório tem uma energia muito especial, tornando o “estressante” trabalho com *M. leprae* vivo um momento prazeroso. Agradeço em especial ao João (pela purificação do *M. leprae* vivo), Dr. Flávio Lara (pela grande ajuda na discussão de resultados e experimentos de microscopia), Rychelle (pela ajuda com western blot, e sua grande amizade), Robertha (pela ajuda com experimentos de transfecção, western blot). Aos meus

colegas André, Jéssica, Lívia, Fabrício, Leonardo, Adriano, Rodrigo, Sabrina, Arthur, Karina, Chyntia, pelo agradável convívio. Agradeço também aos demais membros desse grupo.

À Dra. Luciana Rodrigues, por sua minuciosa revisão dessa dissertação e sua ajuda em diversos ensaios experimentais presentes nesse trabalho. Além de uma pesquisadora incrível e dedicada, está sempre disposta a ajudar seus companheiros de trabalho. Obrigado por tudo!

Ao Bernardo Pascarelli por sua grande ajuda nos experimentos de microscopia confocal.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos pelo o uso/empréstimo de diversos materiais e equipamentos.

A todos do pavilhão de hanseníase que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Às agências de fomento CAPES, IOC, FAPERJ pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação.

## Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....	xi
Lista de figuras .....	xvi
Lista de tabelas .....	xviii
Resumo .....	xix
Abstract.....	xx
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 - Hanseníase .....	2
1.1.1 – Aspectos históricos .....	2
1.1.2 – Epidemiologia .....	3
1.1.3 – Agente etiológico .....	6
1.1.4 – Transmissão .....	11
1.1.5 – Diagnóstico .....	13
1.1.6 – Classificação .....	14
1.1.7 – Tratamento .....	16
1.1.8 – Episódios reacionais.....	16
1.1.9 – Prevenção .....	17
1.1.10 – Resposta imune na hanseníase .....	18
1.1.10.1 – Resposta imune inata .....	19
1.1.10.2 – Resposta imune adaptativa .....	23
1.2 – Mecanismos de sobrevivência de micobactérias virulentas na célula hospedeira .....	26
1.3 – Células THP-1 como modelo no estudo de associação patógeno-hospedeiro .....	28
1.4 – IFN tipo I na infecção por patógenos intracelulares .....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 – Objetivo geral.....	37
3.2 – Objetivos específicos .....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 – Cultivo de micobactérias.....	39
4.1.1 – <i>M. bovis</i> -BCG .....	39
4.1.2 – <i>M. leprae</i> .....	40
4.2 – Cultura de células e ensaios de infecção.....	41
4.2.1 – Células THP-1 .....	41
4.3 – Silenciamento gênico .....	41



4.4 – Transfecção de ácidos nucleicos .....	42
4.5 – Purificação de ácidos nucleicos .....	42
4.5.1 – Extração de RNA .....	42
4.5.2 – Extração de DNA .....	43
4.5.3 – Quantificação de ácidos nucleicos .....	43
4.5.4 – Análise da integridade do RNA .....	44
4.5.5 – Tratamento com DNase para o RNA extraído .....	44
4.6 – PCR em tempo real .....	44
4.6.1 – Síntese de cDNA .....	44
4.6.2 – RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR) .....	45
4.6.3 – RT-PCR em tempo real para determinação da viabilidade de <i>M. leprae</i> .....	46
4.6.4 – Análise dos dados de RT-PCR em tempo real .....	47
4.7 – Purificação de proteínas .....	48
4.7.1 – Quantificação de proteínas .....	48
4.8 – Análise dos níveis de OASL por Western Blot .....	49
4.9 – Imunofluorescência .....	50
4.10 – Dosagem de citocinas .....	51
4.11 – Análises estatísticas .....	51
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
5.1 – <i>M. leprae</i> induz IFNB e genes estimulados por IFN tipo I (ISG) em macrófagos derivados de células THP-1 (mdTHP-1) .....	54
5.2 – <i>M. leprae</i> vivo, mas não <i>M. leprae</i> irradiado nem <i>M. bovis</i> -BCG, induz a produção de OASL .....	55
5.3 – <i>M. leprae</i> perfura o fagossomo da célula hospedeira e induz a expressão de <i>OASL</i> de maneira dependente do sensoramento de DNA citoplasmático e ativação da sinalização STING/TBK1/IRF3 .....	59
5.4 – Silenciamento gênico de <i>OASL</i> afeta a produção de CCL-2/MCP-1 e diminui a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> .....	63
5.5 – A transfecção de DNA de <i>M. leprae</i> reverte o fenótipo avirulento de <i>M. bovis</i> -BCG durante a infecção em mdTHP-1 .....	66
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
6.1 – Investigação do papel do IFN tipo I e OASL na patogênese da hanseníase .....	69
6.2 – Considerações finais e perspectivas .....	76
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>78</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>80</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>102</b>

I – Artigo submetido .....	103
II – Artigo aceito .....	146

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	Graus Celsius
a.C	antes de Cristo
ADC	albumina bovina, dextrose, catalase
Ag85B	antígeno 85B
ANOVA	análise de variância
ASA	Ambulatório Souza Araújo
ATCC	“American type culture collection”
ATP	adenosina trifosfato
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BCL2	célula B de linfoma 2/ proteína oncogênica
BB	“borderline bordeline”
BL	“borderline” lepromatoso
BSA	albumina sérica bovina
BT	“borderline” tuberculóide
cDNA	ácido nucleico complementar
CCL	ligantes de quimiocinas
CD	grupo de diferenciação
CDS	sensor citoplasmático de DNA dupla-fita
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CYP	citocromo P450
DAI	ativador de fatores reguladores de IFN dependente de DNA
DATASUS	Departamento de Informatica do SUS
DC-SIGN	receptor de células dendríticas
DDX41	polipeptídeo caixa DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 41
DEPC	dietilpirocarbonato
DEFB4A	defensina beta 4A
DENV	Vírus da Dengue
DNA	ácido Desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsDNA	DNA dupla-fita
dsRNA	RNA dupla-fita

D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	ensaio imunoenzimático
ENH	eritema nodoso hansênico
ESAT-6	antígeno de secreção precoce de 6-kDa
ESX-1	sistema de antígeno de secreção precoce 1
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
g	força-G
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
G-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos
GFP	proteína verde fluorescente
GM-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
h	horas
HCl	ácido clorídrico
HCV	Vírus da Hepatite C
IFI16	ativador transcricional da diferenciação mielóide induzida por IFN
IFIT1	proteína induzida por IFN com repetições tetratricopeptídicas 1
IFN	interferon
IFNAR	receptor de IFN tipo I
IGF-I	fator de crescimento semelhante à insulina I
IRF	fator de transcrição regulador de IFN
IgM	imunoglobulina M
IL-	interleucina
ISG	genes induzidos por IFN
KCl	cloreto de potássio
LAM	lipoarabinomanana
LDL	lipoproteína de baixa intensidade
LL	lepomatoso lepomatoso
LTA	linfotóxina alfa
LTA4H	leucotrieno A4 hidrolase
LTB4	leucotrieno B4
LXA4	lipoxina A4

M	Molar
M.	Mycobacterium
Mb	mega pares de base
MB	multibacilar
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
mdTHP-1	macrófagos derivados de monócitos THP-1
mg	miligrama
miRNA	microRNA
mL	mililitro
$\mu$ M	micromolar
mM	milimolar
MOI	multiplicidade de infecção
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanesulfónico
MR	receptor de manose
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NAD	dinucleótido de nicotinamida e adenina
NCBI	“National Center for Biotechnology Information”
NF-kB	fator nuclear kappa B
ng	nanograma
nM	nanomolar
nm	nanômetros
NOD	domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo
OAS	oligoadenilato sintetase
OASL	oligoadenilato sintetase “like”
OligoDT	oligonucleotídeo iniciador de timidinas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACRG	gene coregulado com Parkina
PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PARK	gene que codifica a proteína parkina
PB	paucibacilar
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	tampão salina fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase

PGL-I	glicolípídeo fenólico I
PGN	peptideoglicano
pH	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PMA	acetato de forbol-miristila
PNL	forma neural pura
PPD	derivado de proteína purificada
PQT	poliquimioterapia
PRR	receptor de reconhecimento de padrões
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo (em tempo real)
RAB7	proteína de ligação a GTP relacionada a RAS 7
RD	região de diferença
RIP2	proteína do receptor de interação 2
RLEP	elemento repetitivo de <i>M. leprae</i>
RPL13a	proteína ribossomal 60S L13a
RNA	ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
ROS	espécies reativas de oxigênio
RPM	rotações por minuto
RPMI	“Royal Park Memorial Institute”
RR	reação reversa
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RT	transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SNP	polimorfismo de base única
SOD	superóxido dismutase 2
ssRNA	RNA simples-fita
STING	estimulador de genes de IFN
TBK1	quinase de ligação a TANK 1
TE	tampão Tris EDTA
Th	linfócitos T auxiliares (T helper)
TLR	receptores do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral

TNFSF15	ligante 15 da superfamília de fator de necrose tumoral
Treg	células T reguladoras
TT	tuberculóide tuberculóide
U	Unidade
V	Volts
VDR	receptor de vitamina D
v/v	volume por volume

## Lista de figuras

Figura 1.1 – Disseminação global da hanseníase demonstrada pelo padrão de frequência das diferentes cepas de <i>M. leprae</i> . .....	2
Figura 1.2 – Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012, referentes ao ano anterior. ....	3
Figura 1.3 – Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012, referentes ao ano anterior.....	4
Figura 1.1 – Disseminação global da hanseníase demonstrada pelo padrão de frequência das diferentes cepas de <i>M. leprae</i> . .....	4
Figura 1.4 – Evolução do número de casos de hanseníase detectados no Brasil, Índia e Indonésia durante o período de 2004 a 2011. ....	5
Figura 1.5 – Padrão de endemia da hanseníase no Brasil baseado nos indicadores epidemiológicos do Ministério da Saúde, 2012.. ....	6
Figura 1.6 – Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i> (adaptado de Vissa & Brennan, 2001).. ....	8
Figura 1.7 – Formas clínicas da hanseníase. ....	15
Figura 1.8 – Representação resumida das principais vias de sinalização (PRRs e CDS) envolvidas na produção de IFN tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) em humanos. ....	30
Figura 1.9 – Esquema representativo da participação da molécula STING na resposta do hospedeiro a patógenos intracelulares e sua ligação entre indução de IFN tipo I e autofagia... ..	31
Figura 2 – Fluxograma das etapas do estudo da interação patógeno-hospedeiro na hanseníase realizado por nosso grupo.....	35
Figura 5.1 – mdTHP-1 expressam <i>IFNB</i> e ISG após a infecção com <i>M. leprae</i> vivo. ....	55
Figura 5.2.1 – mdTHP-1 produzem <i>OASL</i> após a infecção por <i>M. leprae</i> vivo, mas não por <i>M. leprae</i> irradiado ou <i>M. bovis</i> -BCG.....	56
Figura 5.2.2 - mdTHP-1 produzem <i>OASL</i> após a infecção por <i>M. leprae</i> vivo, mas não por <i>M. leprae</i> irradiado ou <i>M. bovis</i> -BCG. ....	57
Figura 5.3.1 – Transfecção de DNA de <i>M. leprae</i> , mas não de RNA, induz <i>OASL</i> em mdTHP-1. ....	59
Figura 5.3.2 – <i>M. leprae</i> expressa <i>ESAT6</i> durante a infecção de mdTHP-1. ....	60
Figura 5.3.3 – Componentes do <i>M. leprae</i> são encontrados no citosol de mdTHP-1 durante a infecção. ....	61
Figura 5.3.4 – <i>M. leprae</i> induz <i>OASL</i> em mdTHP-1 via sinalização STING/TBK1/IRF3. ....	63
Figura 5.4 – Silenciamento de <i>OASL</i> afeta a produção de CCL-2/MCP-1, bem como a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> durante a infecção de mdTHP-1.....	65
Figura 5.5 – Transfecção de DNA de <i>M. leprae</i> aumenta a sobrevivência intracelular do <i>M. bovis</i> -BCG juntamente com a indução de CCL-2/MCP-1 em mdTHP-1... ..	67



Figura 6.1 – Modelo esquemático das etapas iniciais envolvidas na infecção de macrófagos pelo *M. leprae*, baseado nos resultados abordados no presente estudo..... 77

## Lista de tabelas

Tabela 1 – Comparação das características dos genomas de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> (adaptado de Cole, 2001).....	10
Tabela 2 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR.....	46
Tabela 3 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR para a determinação da viabilidade micobacteriana.....	47

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de IFN tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos.

### RESUMO

Thiago Gomes de Toledo Pinto

A indução da via de interferon (IFN) do tipo I (IFN- $\alpha$  e - $\beta$ ) é crucial para uma resposta protetora contra infecções virais. Entretanto, estudos recentes demonstraram que esta classe de IFNs tem a ativação mediada por receptores citoplasmáticos de DNA e regula negativamente a resposta protetora contra a infecção por bactérias intracelulares, com destaque para o *Mycobacterium tuberculosis*, criando um nicho favorável para a replicação micobacteriana. Um estudo anterior do nosso grupo, utilizando uma abordagem de expressão gênica global por microarranjos, demonstrou que a infecção de células de Schwann com *Mycobacterium leprae* induz genes ativados por IFN do tipo I, com destaque para o gene *OASL*, o qual codifica a proteína 2' 5' oligoadenilato sintetase like. No presente estudo, esses resultados foram estendidos e validados utilizando o modelo de macrófagos derivados de células THP-1. Nossos dados demonstram que a *OASL* foi induzida por *M. leprae* vivo, mas não *M. bovis* BCG ou *M. leprae* morto. Adicionalmente, a transfecção de DNA de *M. leprae*, mas não de RNA, induziu a produção de *OASL*. Em nosso modelo, a infecção por *M. leprae* não foi capaz de induzir a produção de IFN- $\alpha$ , assim como o tratamento CpG não induziu *OASL*, excluindo assim a sinalização de DNA mediada por TLR9. Além disso, mostramos evidências da permeabilização fagossomal mediada pelo fator de virulência micobacteriano ESAT-6, a qual permite acesso do conteúdo do fagossomo ao citoplasma e, conseqüente, produção de IFN- $\beta$ . O bloqueio farmacológico de TBK1 foi capaz de inibir a produção de *OASL* mediada pela infecção com *M. leprae*, indicando, dessa forma, que a indução de IFN- $\beta$  e seus genes a jusante, como o *OASL*, ocorre através do eixo de sinalização STING/TBK1/IRF3. Interessantemente, o silenciamento gênico de *OASL* resultou na redução da viabilidade intracelular do *M. leprae* juntamente com redução da liberação da quimiocina CCL2/MCP-1 induzida por *M. leprae*. Entretanto, a transfecção de DNA seguida por infecção com *M. bovis* BCG foi capaz de reverter o fenótipo avirulento dessa bactéria, aumentando sua viabilidade intracelular e induzindo altos níveis de CCL2/MCP-1. Dessa maneira, nossos dados sugerem que a ativação da via de IFN tipo I é, de fato, capaz de inibir a resposta protetora do hospedeiro contra micobactérias, criando um ambiente favorável para a sobrevivência da micobactéria no ambiente intracelular, representando assim um potencial alvo para intervenções farmacológicas e/ou prevenção.

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Host-pathogen interaction in leprosy: induction of type I IFN pathway as a potential mechanism for survival of *Mycobacterium leprae* in human macrophages.

### ABSTRACT

Thiago Gomes de Toledo Pinto

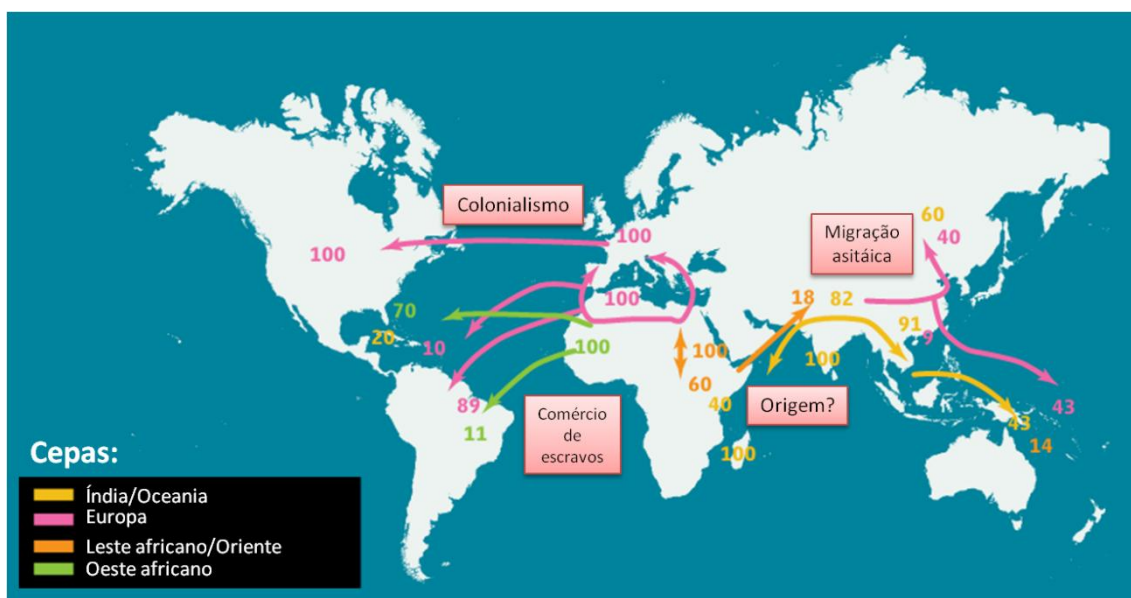
The induction of interferon pathway (IFN) type I (IFN- $\alpha$  and- $\beta$ ) is crucial for a protective response against viral infections. However, emergent research has shown that type I IFNs and cytoplasmic DNA signaling are negative regulators of the protective response against infection by intracellular bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*, and provide a favorable niche for mycobacterial replication. Recently, using an approach of global gene expression by microarray, our group showed that Schwann cells infection with *Mycobacterium leprae* induced genes activated by IFN type I, highlighting the OASL gene, which encodes the 2' '5' oligoadenylate synthetase like protein. In the present work, these results were extended and validated using the THP-1-derived macrophages model. Our data demonstrate that OASL and type I IFN pathway was upregulated by *M. leprae*, but not *M. bovis* BCG or dead *M. leprae*, in macrophage-like THP-1 infected cells. In addition, *M. leprae* DNA transfection but not RNA, was able to induce OASL production. In our model, *M. leprae* infection was not able to induce IFN- $\alpha$  and OASL was not induced by CpG, therefore excluding a TLR9 dependent pathway. Furthermore, we show evidence of fagossomal permeabilization mediated by mycobacterial virulence factor ESAT-6, which enables access of contents of the phagosome to host cytoplasm and subsequent induction of IFN- $\beta$ . Pharmacological blockage of TBK1 was able to inhibit *M. leprae*-induced OASL mRNA expression, indicating thereby that the IFN- $\beta$  induction and its downstream genes, such as *OASL* occur through the STING/TBK1/IRF3 pathway. Interestingly, *OASL* targeted silencing directly decreased intracellular *M. leprae* survival and impaired the CCL2/MCP-1 secretion. Furthermore, *M. leprae* DNA transfection followed by infection with *M. bovis* BCG has reverted the avirulent infection phenotype of this mycobacteria, increasing its intracellular viability and inducing high levels of CCL2/MCP-1. Together, these results suggest that OASL plays an important role in the response to mycobacteria and provide a potential pharmacological target for prevention or intervention.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 - Hanseníase

### 1.1.1 - Aspectos históricos

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica dermatológica e neurológica causada pelo patógeno *Mycobacterium leprae*. A história da hanseníase está intimamente ligada com a própria história da civilização humana. As primeiras referências textuais da doença podem ser encontradas em papiros egípcios datados de 1500 a.C. e também no Velho e Novo Testamento da bíblia cristã. Entretanto, as evidências históricas mais aceitas sobre relatos da doença são provenientes de textos do sul da Ásia (600 a.C.), da Grécia (400 a.C.), da China (300 a.C.) e da Itália (100 a.C.). Nesses textos são mencionadas autênticas descrições clínicas da hanseníase, como por exemplo, perda de sensibilidade, manchas brancas e avermelhadas, ulcerações, cegueira, rouquidão e deformações na face (Trautman, 1984; Robbins et al., 2009). Estudos recentes de genômica comparativa a partir de diferentes cepas de *M. leprae* sugerem que a origem da doença ocorreu no leste africano, ou próximo ao oriente, e se dispersou acompanhando as sucessivas migrações humanas (Figura 1.1). Nos últimos 500 anos, europeus e norte africanos introduziram a hanseníase no ocidente africano e nas Américas (Monot et al., 2005).

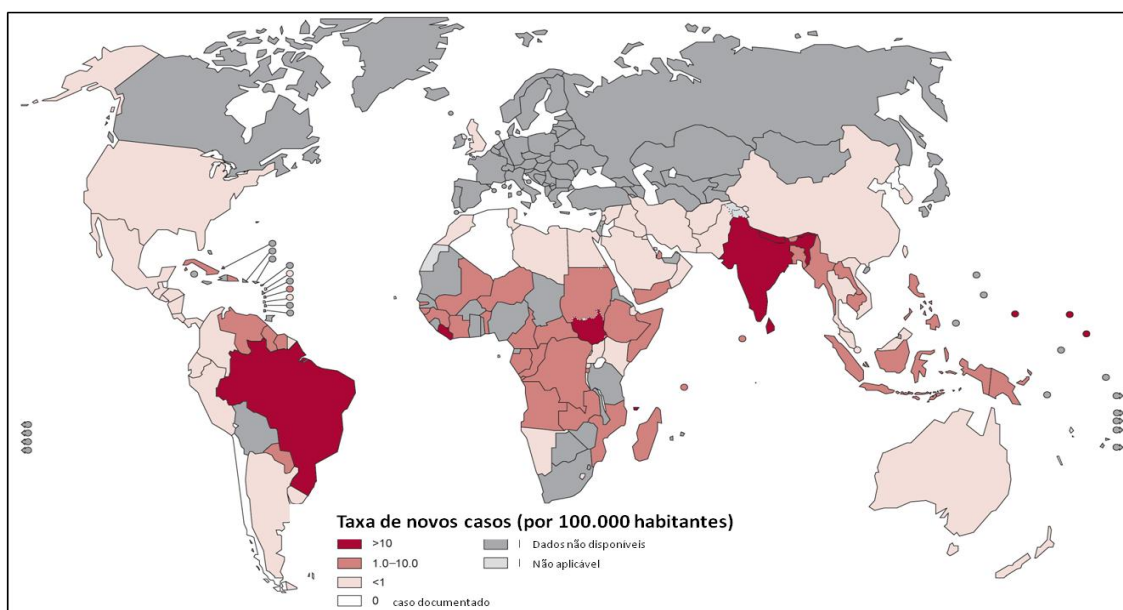


**Figura 1.1:** Disseminação global da hanseníase demonstrada pelo padrão de frequência das diferentes cepas de *M. leprae*. As setas indicam os vetores de dispersão que correlacionam com as direções dos eventos de migrações humanas baseadas em estudos antropológicos. Adaptado de Pinhasi et al., 2005.

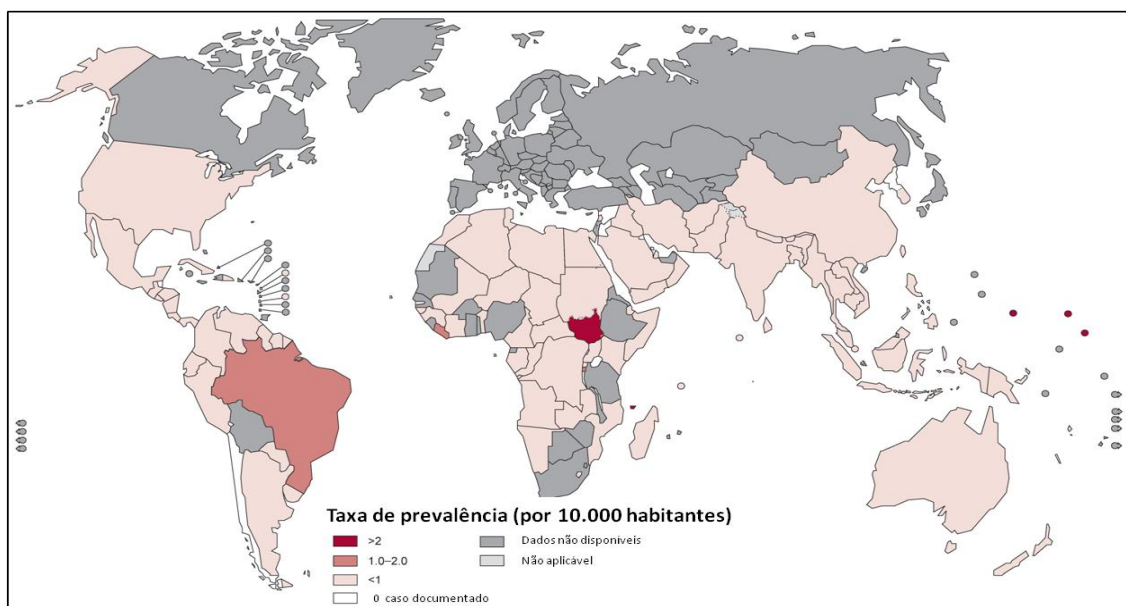
A terminologia *lepra* teve origem em traduções bíblicas do hebraico para o grego, a partir da palavra hebraica *tsaraath*. Porém, esse termo foi utilizado para designar diferentes doenças dermatológicas de origens variáveis (revisto por Trautman, 1984). No Brasil, em 1976, o termo *lepra* foi substituído por *hanseníase*, em homenagem a Gerhard Hansen, que descreveu o patógeno causador da doença. Essa substituição foi devido à conotação pejorativa do termo anterior, numa tentativa de amenizar o forte estigma social remetido pela palavra lepra. Porém, somente em 1995, com a lei federal 1.010/95, foi terminantemente proibida a utilização do termo lepra.

### 1.1.2 - Epidemiologia

Atualmente a hanseníase ainda constitui um problema mundial de saúde pública. De acordo com informações oficiais de 105 territórios e países, enviadas à Organização Mundial da Saúde (OMS) foram registrados 219.075 novos casos (Figura 1.2) e documentada a prevalência de 181.941 casos (Figura 1.3) (OMS, 2012). Cerca de 90% dos novos casos estão concentrados em 18 países, localizados nos continentes africano, asiático e americano.



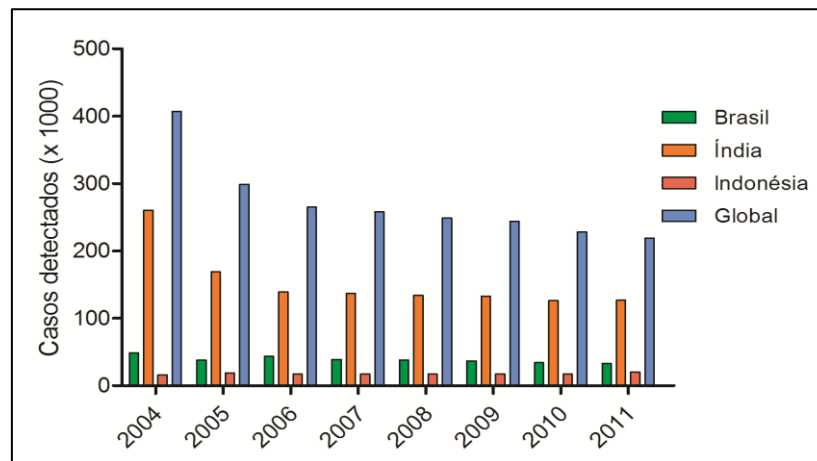
**Figura 1.2:** Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012, referentes ao ano anterior. As taxas de novos casos referem-se a cada 100.000 habitantes. Adaptado de OMS, 2012.



**Figura 1.3: Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012, referentes ao ano anterior.** As taxas de prevalência correspondem a cada 10.000 habitantes. Os países em destaque representam o Brasil (América do Sul) e o Sudão (África). Adaptado de OMS, 2012.

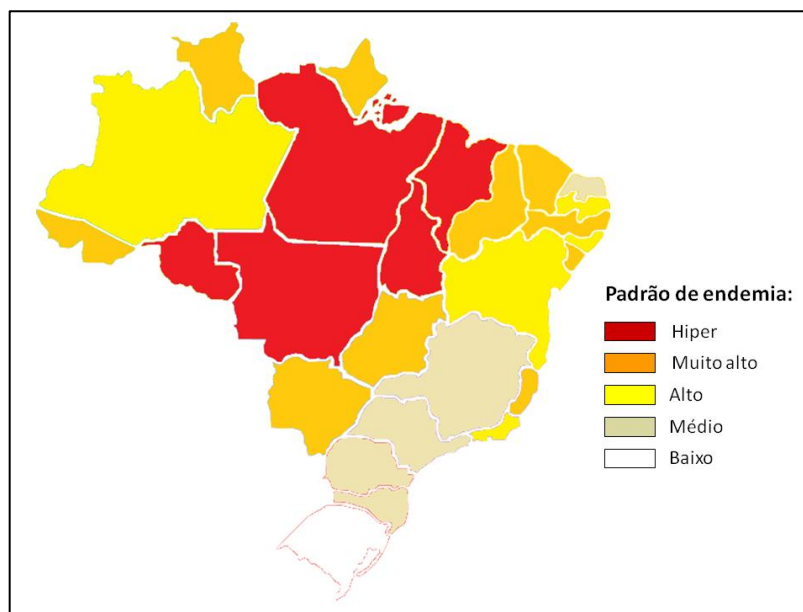
O controle global da hanseníase tem apresentando melhoras significativas, mesmo que lentamente, devido a campanhas nacionais de combate à doença na maioria dos países endêmicos e a implantação da poliquimioterapia (PQT) na década de 1980. A endemicidade da doença é fortemente correlacionada com os baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico. Em 2011, 83% dos novos casos detectados foram concentrados por três países: Índia (58%), Brasil (16%) e Indonésia (9%). A Índia e o Brasil vêm apresentando um lento declínio no número de casos desde 2006 e 2007, respectivamente, enquanto que a Indonésia, após um período de estabilização do índice de novos casos, apresentou um aumento deste índice em 2011 (de 17.012 novos casos em 2010 para 20.023 novos casos em 2011) (OMS, 2012) (Figura 1.4).





**Figura 1.4: Evolução do número de casos de hanseníase detectados no Brasil, Índia e Indonésia durante o período de 2004 a 2011.** Adaptado de OMS, 2012.

Assim como ocorre no mundo, as taxas de incidência e prevalência da hanseníase no Brasil acompanham os níveis de desenvolvimento social de cada região (Figura 1.5). Apesar da importante redução do coeficiente de prevalência de hanseníase no Brasil, algumas regiões ainda demandam intensificação das ações para eliminação da doença, justificadas por um padrão de alta endemicidade. Em 2011, a região Nordeste apresentou 41% dos novos casos no Brasil, seguida das regiões Norte (20,2%), Sudeste (17,7%), Centro-oeste (16,9%) e Sul (4%). Nesse mesmo ano, o Brasil apresentou um coeficiente de prevalência de 1,54 casos para cada 10.000 habitantes e detectou 33.955 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 17,6 para cada 100.000 habitantes. Tem sido verificado contínuo decréscimo no coeficiente de detecção da hanseníase, apesar da expansão do número de unidades de saúde com pacientes em tratamento. Em 2011, foram registrados 2.420 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos e um coeficiente de detecção desse grupo etário de 5,2 por 100.000 habitantes, em decorrência de circuitos ativos de transmissão localizados nas áreas mais endêmicas (Ministério da Saúde, [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/indi\\_epidemiologicos\\_operacionais\\_hans\\_br2000\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/indi_epidemiologicos_operacionais_hans_br2000_2011.pdf), 2012). A redução de casos em menores de 15 anos é uma das prioridades da secretaria de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde, uma vez que a manifestação da doença nessa faixa etária indica alta endemicidade e falta de ações de intervenção.



**Figura 1.5: Padrão de endemia da hanseníase no Brasil baseado nos indicadores epidemiológicos do Ministério da Saúde, 2012.** Parâmetros para a determinação do padrão de endemia: Hiper: acima de 40 casos/100.000 habitantes; Muito alto: 20 a 39 casos/100.000 habitantes; Alto: 10 a 19 casos/100.000 habitantes; Médio: 2 a 9 casos/100.000 habitantes; Baixo: menos de 2 casos/100.000 habitantes.

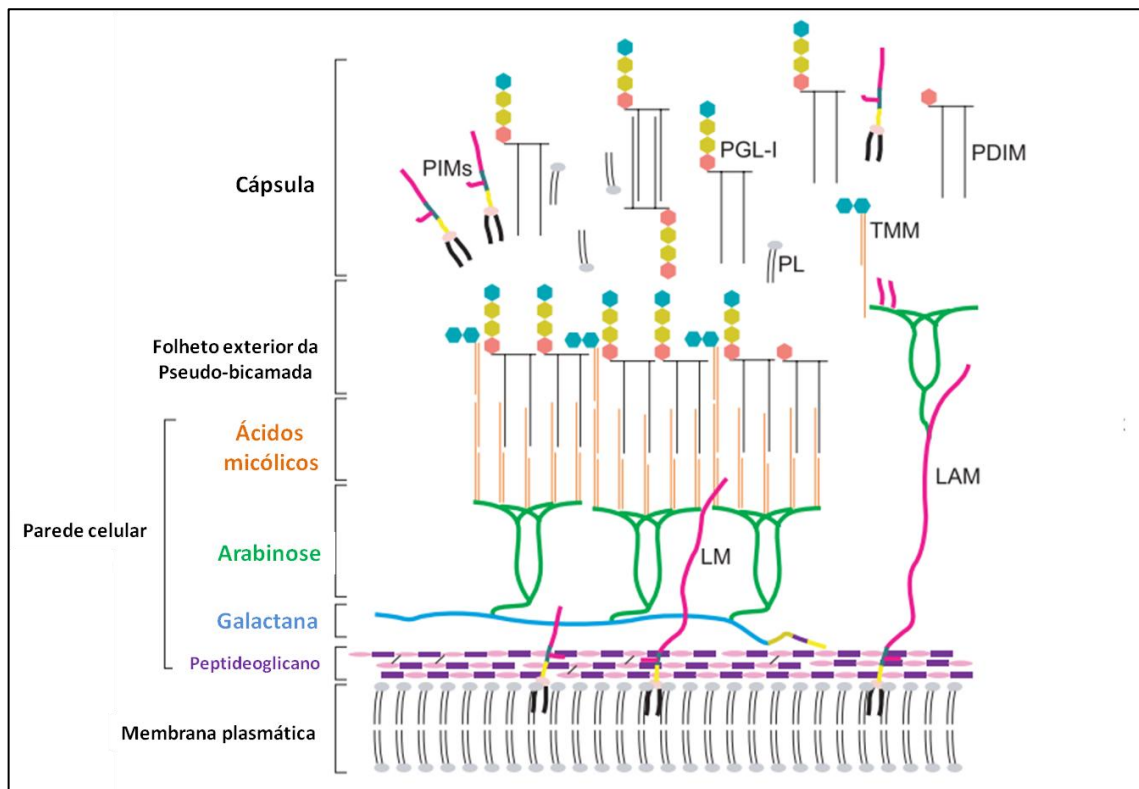
### 1.1.3 - Agente etiológico

O *M. leprae* foi descrito pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873, sendo a primeira evidência convincente da associação de um micro-organismo com uma doença humana (Hansen, 1874). Células de Schwann nos nervos periféricos e macrófagos na pele são os principais alvos da infecção pelo *M. leprae*. Experimentações utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* confirmaram o tropismo desse patógeno por nervos periféricos, onde a interação do *M. leprae* com a célula de Schwann leva ao dano neural, desmielinização e perda da condutividade axonal (Tapinos et al., 2006). Essa predileção do patógeno é capaz de explicar as lesões observadas nos pacientes, assim como as deformações, perda de sensibilidade e atrofia, que se não tratadas adequadamente, podem evoluir para incapacidades físicas permanentes.

O gênero *Mycobacterium*, pertencente à ordem de Actinomycetales e à família Mycobacteriaceae, possui mais de 70 espécies, sendo conhecido por suas duas principais espécies patogênicas: *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*. Além desses patógenos, outros podem ser citados como oportunistas ao homem, como por exemplo, como o *Mycobacterium avium* e o *Mycobacterium intracellulare*.

O *M. leprae* é um bacilo gram-positivo, reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. Assim como outras micobactérias, é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois se cora em vermelho pela fucsina e é resistente à descoloração pela lavagem com solução álcool-ácida (método Ziehl-Nilsen). Em cortes histopatológicos, os bacilos podem se apresentar de forma isolada ou agrupada, formando globias (Ress, 1985). Uma das características do *M. leprae* é o seu padrão de alta infectividade e baixa patogenicidade. A temperatura ótima de crescimento do *M. leprae* é abaixo de 37° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos (Shepard, 1965).

A parede celular micobacteriana possui características únicas, sendo impermeável a diversos compostos, uma característica responsável pela resistência a inúmeras drogas. O envoltório celular do *M. leprae* é formado, na porção mais interna, por uma membrana plasmática seguida de uma camada de peptidoglicanos covalentemente ligada a arabinogalactana. Os ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose da arabinogalactana. A camada mais externa é composta por lipopolissacarídeos livres, glicolipídeos e fosfolipídeos. A cápsula possui glicolipídeos, onde o mais abundante é o glicolipídeo fenólico I (PGL-I), presente somente em *M. leprae*, conferindo especificidade imunológica a esse patógeno (Hunter & Brennan, 1981) (Figura 1.6). Desde sua descoberta, em 1981, o PGL-I é de extrema importância para ensaios e desenvolvimento de métodos para diagnóstico precoce de infecção (Vissa e Brennan, 2001).



**Figura 1.6: Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae*.** A membrana plasmática do *M. leprae* é envolvida por uma parede celular composta de peptidoglicano ligada covalentemente a araginogalactana. Nesse arranjo pode ser encontrado componente como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose. Na porção mais externa do envelope celular é encontrado: monomicolato trealose (TMM), glicolípido fenólico 1 (PGL-I), monossídeos fosfatidilinositol (PIMs), dimiocerosato ftiocerol (PDIM) e fosfolípidos (PL). Adaptado de Vissa e Brennan, 2001.

Mesmo após 139 anos da descrição do *M. leprae* ainda não há meios de cultivo *in vitro* para essa bactéria, o que representa o maior empecilho para o estudo de sua biologia e de seus mecanismos de patogênese. O principal motivo para isso é, provavelmente, o processo de evolução reductiva que esse patógeno sofreu, sendo extremamente dependente de um nicho de replicação especializado (discutido nos próximos parágrafos). Shepard, em 1960, descreveu sua tentativa de cultivo. Shepard demonstrou que o coxim plantar de camundongos possui uma temperatura permissiva (~32° C) ao crescimento de *M. leprae*. O método consiste em inocular pequenas quantidades do bacilo (aproximadamente  $10^4$  bacilos), provenientes de biópsias de pele de pacientes lepromatosos, no coxim plantar de camundongos BALB/c (Shepard, 1960). O *M. leprae* se multiplica muito lentamente, com tempo de geração de aproximadamente duas semanas. Alguns meses após a inoculação, o número de duplicações do bacilo chega a 6-8, sendo limitada pela resposta imunológica do camundongo (Shepard, 1962). Estudos posteriores demonstraram que a susceptibilidade aumentada de camundongos

BALB/c, quando comparados a outras cepas isogênicas como o C57BL/6, está relacionada a uma mutação não sinônima no gene *Nramp*, induzindo uma regulação negativa de vias importantes da resposta imune inata responsável por controlar a replicação do *M. leprae* em camundongos (Vidal et al., 1993).

Outro modelo animal utilizado para o cultivo de *M. leprae* é o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*). Kirchheimer e Storrs (1971) documentaram a ocorrência de tatus naturalmente infectados. Esses animais manifestam uma infecção disseminada com caráter patológico semelhante ao encontrado em tecidos e nervos de indivíduos com hanseníase. Por esse motivo, o tatu de nove bandas passou a ser considerado um modelo experimental proveitoso para o entendimento dos mecanismos de dano neural causado pelo *M. leprae*, assim como alvo de testes para intervenções terapêuticas (Sharma et al., 2013). Além disso, o conhecimento adquirido sobre a patogênese e prevenção do dano neural pode ser transpassado para o estudo de outras doenças neurodegenerativas. Apesar de se conhecer a susceptibilidade do tatu de nove bandas ao *M. leprae*, ainda não é sabido como eles se infectam. Estudos recentes, comparando o genoma de isolados de *M. leprae* de pacientes hansenianos e tatus naturalmente infectados, sugerem que o *M. leprae* pode ser transmitido entre homens e tatus selvagens no sul dos Estados Unidos (Truman et al., 2011).

Atualmente o modelo de infecção experimental em camundongos atímicos (*nude*) é o método que permite adquirir uma grande quantidade de bacilos viáveis para fins experimentais como, por exemplo, estudos de interação patógeno-hospedeiro. Por apresentarem um alto grau de imunodeficiência, esses animais são extremamente susceptíveis à infecção por *M. leprae*. Cerca de  $2 \times 10^7$  bacilos são inoculados no coxim plantar de camundongos *nude*, permitindo a obtenção de  $10^{10}$  bacilos em um período de 6 meses (Truman e Krahenbuhl., 2001; Lahiri et al., 2005).

Análises do genoma do *M. leprae*, publicado por Cole e colaboradores em 2001, têm fornecido pistas para explicar a dificuldade do cultivo *in vitro* do patógeno, ou até mesmo sugerir a impossibilidade de se cultivar o *M. leprae* em meios axênicos. O genoma completo do *M. leprae* possui 3,27 megabases (Mb) e um conteúdo médio G+C de 57%. Esses valores são muito menores do que os encontrados no genoma do *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998), que contém 4,41 Mb, 65,6% G+C e aproximadamente 4000 genes codificantes (Tabela 1). Além disso, o genoma do *M. leprae* possui características peculiares, como o baixo número de genes codificantes (somente 49,5% do genoma), o elevado número de pseudogenes (27%) e regiões não codificantes (23,5%), além da inserção de sequências repetitivas (Cole et al.,

2001). A comparação do genoma do *M. leprae* com o de outras micobactérias demonstra que esse patógeno passou por um processo de evolução reductiva, com uma possível perda de mais de 2000 genes. Esse processo é documentado em outros parasitas intracelulares obrigatórios, como *Rickettsia* e *Chlamydia* spp., em organismos endossimbiontes, e em *Mycobacterium ulcerans* (Stinear, et al., 2007), onde determinados genes se tornam inativos, uma vez que certas funções não são mais necessárias em nichos altamente especializados.

**Tabela 1.1: Comparação das características dos genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis* (adaptado de Cole, 2001).**

Características	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho (pb)	3.268.203	4.411.532
Proteínas codificadas (%)	49,5	90,8
Genes codificantes (no.)	1.604	3.959
Pseudogenes (no.)	1.116	6
Conteúdo G+C (%)	57,79	65,61

Todos os processos fisiológicos e bioquímicos desempenhados pelo *M. leprae* são considerados reduzidos quando comparado a outras micobactérias, e alguns processos desapareceram completamente (Cole et al., 2001). Apesar de todas as principais vias anabólicas estarem relativamente intactas, pode se observar, por exemplo, uma grande perda do repertório genético responsável pelo processo de lipólise, a principal rota usada por micobactérias intracelulares para a obtenção de energia a partir da degradação de ácidos graxos e lipídeos da célula hospedeira. Do mesmo modo, certas vias centrais do metabolismo energético do *M. leprae* foram perdidas, tendo implicações negativas no uso de fontes comum de carbono, como acetato e galactose, além da deficiência de se gerar ATP a partir da oxidação de NADH (Singh e Cole, 2011).

Diversos estudos têm buscado avaliar o perfil de expressão gênica do *M. leprae*. Suzuki e colaboradores (2006) mostraram que, ao contrário do que foi inicialmente proposto, os pseudogenes do patógeno são altamente expressos durante a infecção de macrófagos, sugerindo que eles podem ter um papel funcional no curso da infecção e contribuir para o sucesso do parasitismo intracelular e replicação. Interessantemente, outro estudo demonstrou

que os transcritos totais do *M. leprae* são resultantes de genes codificantes (50%), pseudogenes (25%) e de regiões não codificantes (25%), reforçando a hipótese que essas regiões genômicas podem desempenhar um importante papel na regulação da expressão gênica (Akama et al., 2009). Williams e colaboradores buscaram avaliar o potencial de transcrição e tradução dos pseudogenes do *M. leprae*. Curiosamente, esse trabalho revelou que embora os pseudogenes sejam transcritos, diversos mecanismos de regulação pós-transcricionais silenciam sua tradução. Dentre esses mecanismos podem ser citados a falta de códons de iniciação da tradução e de sequências Shine-Dalgarno (Williams et al., 2009). Por fim, o melhor entendimento sobre o genoma e a expressão gênica do *M. leprae* contribui não só para a compreensão da fisiologia do patógeno, mas significa um importante caminho para o desenvolvimento de testes moleculares, ou baseados em imunodiagnóstico, vacinas e para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

#### **1.1.4 - Transmissão**

Talvez uma das maiores incertezas sobre a hanseníase seja o seu modo de transmissão, se fazendo necessários estudos comprobatórios sobre a dinâmica da transmissão da doença. Acredita-se que a propagação da doença ocorra pelo contato direto entre pessoas. O trato respiratório superior é considerado a principal porta de entrada e saída do *M. leprae* (Patrocínio et al., 2005) e indivíduos com a doença ativa, em particular pacientes multibacilares, são considerados a principal fonte de infecção (Job et al., 2005).

Sabe-se também que indivíduos com infecções subclínicas possuem um papel importante na dinâmica de transmissão do *M. leprae* (Hatta et al., 1995; Beyene et al., 2003). Dessa forma, o contato prolongado com pacientes é um fator determinante e de grande importância para a transmissão do patógeno. Logo, indivíduos que residem no mesmo local que pacientes (contatos domiciliares) possuem um risco elevado de contrair a doença (Van Beers et al., 1999). Um tipo especial de contato é entre parceiros conjugais. Estes costumam compartilhar a mesma cama, além de um contato íntimo e prolongado, permitindo a transferência de organismos entre os parceiros. Como um indivíduo multibacilar libera diariamente milhões de bacilos, particularmente por suas vias aéreas superiores, seu parceiro pode ficar exposto a uma maior carga bacilar quando comparado com outros membros da família que não compartilham um contato íntimo. Entretanto, a taxa de transmissão da doença entre parceiros conjugais é menor do que a taxa determinada para as outras pessoas que vivem na mesma residência. Isso pode ser explicado pelo “background” genético dos parceiros. Em

sua maioria, indivíduos casados não são geneticamente relacionados, ao contrário de outros membros familiares, como filhos e pais. Por outro lado, casamento entre parceiros consanguíneos aumenta a chance de infecção entre os mesmos (Joyce, 2012).

Recentemente um estudo buscou detectar material genético do patógeno em raspados bucais de pacientes hansenianos e contatos dos mesmos na tentativa de determinar o envolvimento da mucosa oral na transmissão da doença. Interessantemente, quando os pacientes foram estratificados segundo a fonte de coleta da amostra (raspados nasal, bucal, ou ambos) aqueles considerados paucibacilares apresentaram uma maior frequência de DNA de *M. leprae* em swabs bucais, enquanto aqueles considerados multibacilares a detecção do DNA do bacilo foi mais frequente em swabs nasais. Essa foi a primeira evidência que a mucosa oral, principalmente em indivíduos paucibacilares, pode ter uma importante implicação para a transmissão do bacilo. Entre os contatos domiciliares analisados no estudo, aproximadamente 7% apresentaram positividade para a detecção do DNA de *M. leprae*. Isso reforça a evidência que contatos domiciliares podem ser carreadores do bacilo e representar uma segunda fonte ativa de transmissão, contribuindo para a disseminação da hanseníase (Martinez et al., 2010).

Acreditava-se que o ser humano era o único hospedeiro natural do *M. leprae*. Porém desde a década de 1970 já foram descritas ocorrências de tatus naturalmente infectados no Estado de Louisiana, nos Estados Unidos da América (Kirchheimer & Storrs, 1971). Recentemente, foi demonstrado por comparações genômicas que o *M. leprae* isolado de pacientes hansenianos naturais deste mesmo local e o que ocorrem naturalmente em tatus desta região possuem sequências genômicas idênticas, sendo considerada uma única cepa responsável pelas infecções nos dois hospedeiros. Os resultados deste trabalho implicam fortemente os tatus como fonte de infecção, sugerindo que a hanseníase seria uma zoonose nesta região (Truman et al., 2011).

Embora o *M. leprae* seja um patógeno intracelular obrigatório, alguns estudos buscaram identificar a presença do patógeno em reservatórios “não-humanos”, como por exemplo amostras ambientais (Desikan, 1977; Desikan & Sreevasta, 1995). Matsuoka e colaboradores relataram a presença de DNA de *M. leprae* em amostras de água de locais com altos índices de prevalência de hanseníase na Indonésia (Matsuoka et al., 1999). Outro estudo, também utilizando uma abordagem molecular, identificou material genético do patógeno em amostras de solo em áreas endêmicas na Índia (Lavania et al., 2008). Entretanto, ainda se faz necessário melhores estudos para compreender a relevância do ambiente e outros reservatórios na dinâmica de transmissão da hanseníase.



### 1.1.5 - Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é primariamente clínico e laboratorial. Na ausência de recursos laboratoriais, o diagnóstico passa a ser essencialmente clínico, baseando-se em sinais e sintomatologia, exames da pele e nervos periféricos e na história epidemiológica. Os principais sinais cardinais da doença são lesões cutâneas, espessamento dos nervos e anestesia.

Em certos casos se faz necessário o uso de ferramentas complementares, como exames baciloscópicos e histopatológicos, para auxiliar a confirmação do diagnóstico. Devido a sua fácil execução e baixo custo, o exame baciloscópico de esfregaços cutâneos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões) é considerado o exame complementar de maior utilidade no diagnóstico. Esse exame consiste na contagem de bacilos em microscópio óptico após a coloração do esfregaço pelo método de Ziehl-Nilsen. Para os exames histopatológicos são utilizadas biópsias cutâneas ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos. Nesse caso, os bacilos presentes nas biópsias podem ser detectados através da coloração pelo método de Wade (Cocito e Delville, 1985).

O PGL-I, um glicolípido presente em abundância no envoltório do *M. leprae*, é um antígeno específico do patógeno que pode ser facilmente encontrado nos tecidos infectados, sendo responsável por desencadear uma resposta imune humoral precoce. Devido a essa especificidade imunológica, foi possível desenvolver imunoenaios, principalmente utilizando a técnica de ELISA, capazes de detectar anticorpos contra o antígeno PGL-I, no qual os níveis de produção do IgM anti-PGL-I indicam exposição ao *M. leprae* e correlaciona-se com a baciloscopia. Dessa forma, esse ensaio pode contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na classificação dos pacientes, e por fim no monitoramento da eficácia do tratamento (revisto por Moura et al., 2008). Ainda nesse contexto, Bühner-Sékula e colaboradores desenvolveram um teste para detecção de PGL-I, chamado ML-Flow, em apenas 10 minutos. A correlação entre esse teste e a técnica de ELISA mostrou alta sensibilidade na classificação de pacientes com a forma severa da doença (97,4%) e alta especificidade em comparação com grupos controle (90,2%) (Bühner-Sékula et al., 2003).

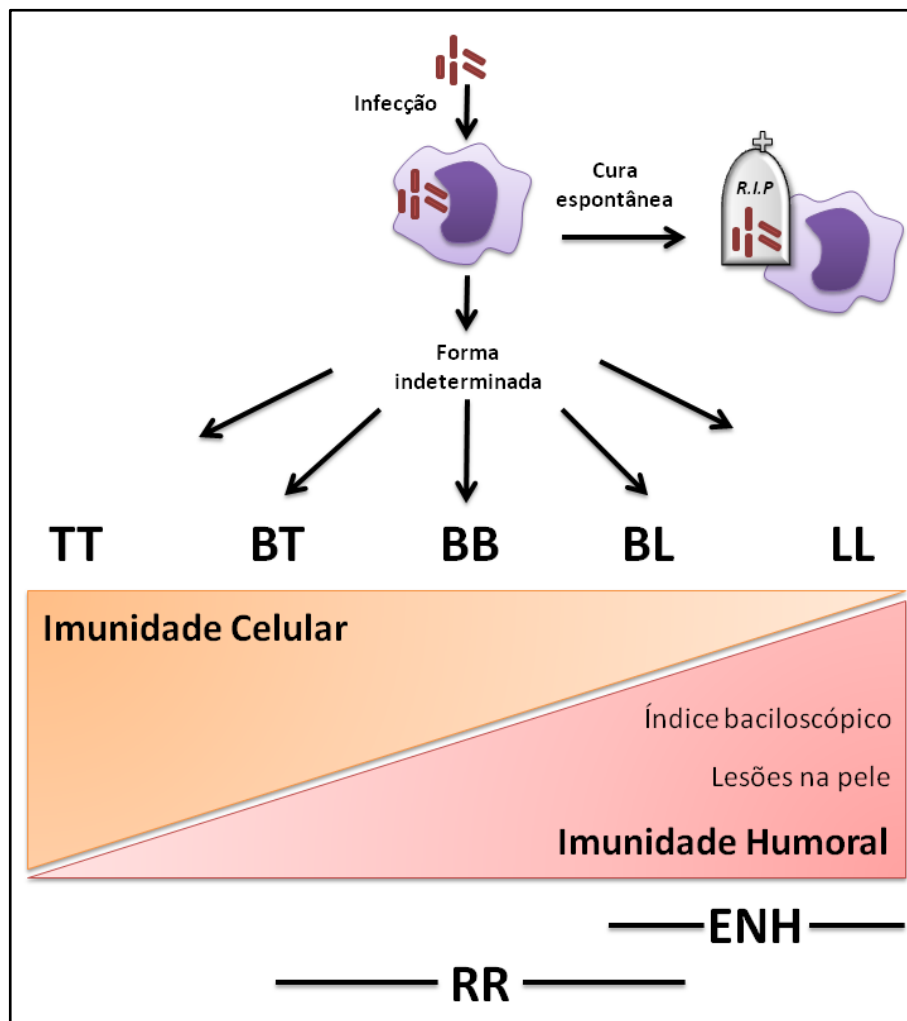
Um dos maiores avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase foi o desenvolvimento de ensaios moleculares para a detecção do bacilo, principalmente baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A alta especificidade e sensibilidade dessa técnica permite sua utilização a partir de uma variedade de amostras clínicas, tais como linfa, sangue, secreção nasal e biópsias. A identificação molecular do *M. leprae* consiste na

amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Para isso, diferentes genes-alvo do patógeno têm sido utilizados e comparados, tais como o elemento repetitivo *RLEP*, *Ag85B* e o *16S* RNA ribossomal (Martinez et al., 2006; Martinez et al., 2009; Martinez et al., 2011). Com isso, a detecção molecular do bacilo é uma valiosa ferramenta para auxiliar casos de difícil diagnóstico, como por exemplo, a forma neural pura (PNL) da doença, uma vez que esta se manifesta sem a presença de lesões na pele. Outra aplicação importante da técnica de PCR é a determinação da viabilidade do *M. leprae* em amostras biológicas (Martinez et al., 2009).

### **1.1.6 - Classificação**

A infecção causada pelo *M. leprae* pode apresentar um longo período de latência até a manifestação da doença, e o tempo médio de incubação pode variar de quatro até trinta anos (Noordeen, 1994).

A hanseníase apresenta um amplo espectro clínico e imunológico. Na década de 1960, Ridley e Jopling propuseram, principalmente para fins científicos, uma classificação baseada nos aspectos clínico-evolutivos, imunológicos, baciloscópicos e histológicos (Ridley e Jopling, 1966). O princípio dessa classificação é fundamentado na resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*, que é medida pela reação cutânea à lepromina (teste de Mitsuda), e na avaliação histopatológica e bacteriológica. Assim como proposto inicialmente por Rabello e colaboradores (Rabello et al., 1938), a classificação de Ridley & Jopling manteve o conceito de polaridade. De acordo com esta classificação, a hanseníase apresenta dois polos opostos e três formas intermediárias (Figura 1.7). Com isso, em um dos polos, denominado de hanseníase Tuberculóide (TT), encontram-se indivíduos resistentes, com lesões localizadas e bem demarcadas, raramente positivos para exames bacteriológicos, exibindo uma robusta resposta imune celular (tipo Th1) e reação positiva à lepromina. No polo oposto, denominado de hanseníase Lepromatosa (LL), encontram-se aqueles que exibem uma forma disseminada, com múltiplas lesões altamente bacilíferas, devido a ineficiente resposta imune celular e predomínio da resposta imune humoral (tipo Th2), e reação negativa à lepromina. As formas clínicas intermediárias, denominadas “borderline” (BT, BB e BL), são definidas de acordo com suas respectivas proximidades ao polo resistente ou ao polo susceptível. A maior parte dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolve a doença. A forma indeterminada (I) foi proposta como um estágio inicial e transitório que posteriormente pode evoluir para umas das cinco formas clinicamente estáveis (Jopling e Mc Dougall, 1988).



**Figura 1.7: Formas clínicas da hanseníase. Esquema demonstra o perfil espectral da doença. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966:** TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais, denominados RR (reação reversa) e ENH (eritema nodoso hansênico), os quais acometem principalmente indivíduos das formas clínicas indicadas para cada tipo de episódio reacional.

A classificação de Ridley & Jopling mostra uma significativa concordância entre as características clínicas, imunológicas e patológicas, e suas subdivisões possuem correlação direta com o número de bacilos detectados nas lesões, o qual é geralmente expresso como uma escala logarítmica que varia de 0 a 6+ (índice baciloscópico, IB).

Independente das formas clínicas apresentadas existe, ainda, uma denominação específica designada como forma neural pura (PNL), para casos que apresentam uma

neuropatia periférica isolada, caracterizada por disfunção motora, sensoriais ou ambas. Para o diagnóstico deste tipo de manifestação clínica se faz necessário a utilização de biópsias de nervo periférico, uma vez que esta forma da doença não apresenta lesões cutâneas.

### **1.1.7 - Tratamento**

Com a implantação de uma consistente classificação das formas clínicas da doença foi possível buscar melhores estratégias para determinar a intensidade do tratamento proferido aos pacientes. Em 1982, a OMS adotou o uso de dois esquemas diferenciados de terapia multidroga. Para isso, dois grandes grupos de pacientes foram definidos: multibacilares (MB) e paucibacilares (PB). Dessa forma, pacientes com baciloscopia positiva (geralmente aqueles pertencentes aos grupos BB, BL e LL) foram definidos como MB, enquanto que pacientes com baciloscopia negativa (geralmente TT e BT) foram incluídos no grupo PB (OMS, 1982). Outro esquema de classificação foi proposto baseando-se exclusivamente no número de lesões, visando uma rápida identificação de pacientes por profissionais de saúde com pouco treinamento. Assim, indivíduos com 1-5 lesões recebem a classificação de PB, enquanto aqueles com mais de cinco lesões são considerados MB.

O tratamento da hanseníase, indicado pelo Ministério da Saúde, é a poliquimioterapia (PQT) padronizada pela OMS, devendo ser realizado nas unidades de saúde. A PQT constitui a administração associada dos seguintes medicamentos: rifampicina, dapsona e clofazimina. Essa associação evita a resistência medicamentosa do bacilo, que ocorre quando se utiliza apenas um medicamento. A administração ocorre através de um esquema-padrão, de acordo com a classificação operacional do paciente em PB ou MB. Para pacientes PB a duração do tratamento é de seis meses, enquanto que para pacientes MB a duração é de um ano.

O tratamento do paciente com hanseníase é fundamental para bloquear a fonte de infecção interrompendo a cadeia de transmissão da doença, sendo, portanto estratégico no controle da endemia e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública.

### **1.1.8 - Episódios reacionais**

Ao longo do curso da hanseníase, e em maior frequência após o início da PQT, cerca de metade dos pacientes desenvolvem os chamados episódios reacionais. Estes se caracterizam por uma exacerbação do quadro clínico de forma súbita e aguda, com

surgimento de novas lesões na pele, reativação de lesões antigas, agravamento dos sintomas neurológicos (Jopling, 1970). Existem dois tipos de reações bem definidos: a reação reversa (RR) e o eritema nodoso hansênico (ENH). A maior parte da morbidade relacionada à hanseníase resulta dos episódios reacionais, representando predominantemente causa do dano neural, levando a incapacidades e deformidades físicas. A causa dessas súbitas alterações é devido a oscilações da resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*. Porém, ainda se faz necessário maiores estudos para compreender a patogênese dessas alterações e determinar quais pacientes possuem risco de desenvolver um episódio reacional (Sehgal et al., 1988; Rea et al., 1991).

A RR é causada por um aumento súbito da resposta imune celular ao *M. leprae*, gerando uma resposta inflamatória que é extremamente danosa ao tecido afetado. Esse tipo de reação é mais comum em pacientes classificados como “borderline” (BT, BB e BL) (Nery et al., 1998). O tratamento da RR é realizado por meio do corticóide sintético prednisona, com o objetivo de reduzir a reação inflamatória.

O ENH é um processo imunopatológico de caráter desconhecido que ocorre em pacientes com a forma multibacilar da doença. Essa reação é caracterizada pelo desenvolvimento de agregados de nódulos inflamatórios na pele. Em casos mais graves esses nódulos podem sofrer ulceração, além do paciente apresentar sintomas sistêmicos como febre e anorexia, e sintomas específicos como neurite. Histologicamente os nódulos são caracterizados por um infiltrado misto de neutrófilos e células mononucleares. A talidomida é a droga de escolha para o tratamento do ENH devido ao seu potente efeito imunomodulador, apesar de seu mecanismo de ação ainda ser desconhecido (Haslett et al., 2005).

Recentemente tem sido investigado o papel de coinfeções nas reações da hanseníase. Uma vez que ambos os tipos de episódios reacionais possuem uma exacerbação da resposta inflamatória, é possível que essas reações possam estar relacionadas com outros processos infecciosos, como infecções virais sistêmicas, infecções no trato urinário ou ainda por infecções orais. Logo, essas coinfeções podem disparar inúmeros mediadores inflamatórios e contribuir para o desenvolvimento dos episódios reacionais (revisto por Motta et al., 2012).

### **1.1.9 - Prevenção**

A cepa vacinal BCG foi desenvolvida no século XX como resultado da atenuação da cepa virulenta *Mycobacterium bovis*, bactéria causadora da tuberculose bovina. A vacina

BCG foi inicialmente desenvolvida para conferir proteção contra a tuberculose, porém, desde 1939, tem sido sugerido que a imunização por BCG possa ter um papel protetor também contra a hanseníase. Fernandez foi o primeiro pesquisador a demonstrar indução positiva do teste de Mitsuda após vacinação por BCG (Fernandez, 1939). Posteriormente, diferentes grupos de pesquisa confirmaram essa hipótese (Convit e Rassi, 1954; Shepard, 1966), o que levou a diversos estudos avaliar a eficácia da vacina BCG no contexto de proteção contra a hanseníase. Entretanto, a taxa de proteção observada nesses estudos foi altamente variável (~20-90%) (Setia, 2006). As razões da alta variação das taxas de proteção ainda não são bem esclarecidas, porém alguns fatores que contribuem para tal podem ser citados: cepa vacinal utilizada, dose e agenda de vacinação, características genéticas e fisiológicas da população estudada, micobactérias ambientais. Além disso, outras questões sobre a vacina BCG e hanseníase, assim como na tuberculose, ainda permanecem inconclusivas, tais como, duração da imunidade protetora conferida pela vacinação, a eficácia de proteção em diferentes formas da doença e a influência da idade no papel protetor da vacina (Merle, 2010).

No Brasil, recomenda-se a revacinação por BCG em contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase que não apresentem sinais e sintomas da doença no momento da avaliação, independentemente de serem contatos de pacientes classificados como PB ou MB (Cunha et al., 2004). Com isso, foi demonstrado que a administração da vacina BCG subsequente ao diagnóstico de um caso de hanseníase multibacilar é extremamente eficaz na redução do risco de doença entre os familiares e outros contatos próximos a esses pacientes com hanseníase (Duppre et al., 2008). De fato, o monitoramento dos contatos domiciliares, em busca de diagnóstico precoce desses indivíduos ainda em estágios iniciais da hanseníase, é determinante para a prevenção e diminuição da severidade da doença (Hacker et al., 2012).

#### **1.1.10 - Resposta imune na hanseníase**

Historicamente a hanseníase tem sido considerada um modelo de estudo da regulação da resposta imune a infecções. Isso é devido ao seu amplo espectro clínico, onde as manifestações clínicas são correlacionadas com o tipo de resposta imune ao patógeno, proporcionando assim uma oportunidade única para o estudo e entendimento de padrões de resistência *versus* susceptibilidade a micobactérias ou outros patógenos intracelulares<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Nesse contexto, diversas estratégias têm sido utilizadas para identificar novos genes/vias associados com a hanseníase, como por exemplo, estudos do tipo caso-controle, desenho baseado em famílias e abordagens em

### 1.1.10.1 - Resposta imune inata

As células mediadoras da resposta imune inata, conhecidas como fagócitos, são prontamente capazes de interagir, reconhecer e, eventualmente, fagocitar inespecificamente tanto células próprias quanto patógenos. Muitas dessas interações são mediadas por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) capazes de reconhecer estruturas moleculares comuns associadas a patógenos (PAMPs), normalmente componentes os quais são compartilhados entre grupos de micro-organismos.

Estudos de interação patógeno-hospedeiro utilizando *M. tuberculosis* e outras micobactérias foram cruciais para o entendimento dos receptores que intercedem a resposta à micobactérias. Macrófagos representam uma das células hospedeiras mais abundantes a entrar em contato com micobactérias. As primeiras interações do *M. leprae* com a célula hospedeira envolve PRRs como receptores do tipo Toll (TLR) e NOD2 e a fagocitose do bacilo é mediada pelos receptores de complemento CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) (Schlesinger et al., 1991) e pelo receptor de manose (MR). Mais recentemente foi demonstrado que a infecção por *M. leprae* aumenta a expressão do gangliosídeo GD3, o qual foi demonstrado participar da adesão e internalização do patógeno (Ribeiro-Resende et al., 2010).

Já é bem conhecido que lipoproteínas microbianas são capazes de ativar respostas imunológicas do hospedeiro via TLR2 (Aliprantis et al., 1999). Estudos demonstraram que a ativação do heterodímero TLR2/1 é responsável por mediar mecanismos que contribuem para a eliminação do *M. leprae*. Peptídeos sintéticos, representando lipoproteínas do *M. leprae* (19 kDa e 33 kDa), foram capazes de induzir uma robusta ativação de monócitos e células dendríticas (Krutzik et al., 2003). Consequentemente, a ativação de TLR2/1 pelos peptídeos do patógeno levou a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-12, as quais

---

larga escala de expressão gênica e estudos de associação do tipo 'genome-wide'. Nas últimas décadas ficou clara associação de genes chaves na resposta imune inata e adaptativa com a susceptibilidade e resistência a hanseníase. Ainda, variações conhecidas como polimorfismos de base única (SNP) em diferentes regiões desses genes (regiões promotoras, codificantes ou não) tem influência direta em diversos desfechos (fenótipos), contribuindo para a alteração de níveis de expressão gênica, atividades enzimáticas ou até mesmo em padrões de conformação proteica. Isso é capaz de explicar a variedade de resposta dos hospedeiros frente à infecção (Cardoso et al., 2011).

participam da formação de uma resposta adaptativa do tipo Th1. Adicionalmente foi demonstrado que a expressão de TLR2 e TLR1 é elevada em biópsias de pacientes hansenianos do pólo TT quando comparado com o pólo LL (Krutzik et al., 2003). Isso reforça a hipótese de que a regulação da expressão e ativação de TLRs é essencial para a composição de uma resposta imune eficiente para a eliminação de patógenos. Em contrapartida, têm sido demonstrados alguns mecanismos capazes de regular a resposta induzida por TLR. A produção de IL-4 é capaz regular negativamente a expressão de TLR2/1, além de inibir a produção de citocinas induzidas pela ativação desse heterodímero. Apesar de não alterar a expressão de TLR2/1, a citocina IL-10 também contribui em inibir a liberação de citocinas induzidas pela ativação de TLR2/1 (Krutzik et al., 2003)<sup>2</sup>. Outros TLRs também são cruciais para se iniciar uma resposta protetora contra a infecção micobacteriana. O receptor TLR4 medeia essa resposta através de proteínas micobacterianas de choque térmico (Means et al., 1999), enquanto que TLR9 é responsável pelo reconhecimento de CpG bacteriano, participando também na resposta anti-micobacteriana (Bafica et al., 2005).

O receptor NOD2 está presente no citoplasma e é responsável por reconhecer peptídeos glicanos, incluindo derivados de micobactérias, onde o principal ligante conhecido é o muramilo dipeptídeo (MDP) (Giardin et al., 2003). O reconhecimento de MDP por NOD2 é capaz de ativar o fator transcricional NF- $\kappa$ B, através da molécula adaptadora RIP2, e iniciar a produção de mediadores pró-inflamatórios. Adicionalmente, o MDP pode ativar inflamassomas, através do recrutamento de caspase-1, a qual é responsável pela clivagem e ativação de IL-1 $\beta$  (Delbridge et al., 2007). Cooney e colaboradores demonstraram que a ativação de NOD2 induz autofagia em células dendríticas e é responsável por mediar o processamento e apresentação de antígenos (Cooney et al., 2010). Além disso, a diferenciação de células dendríticas através da produção de IL-32 é dependente da ativação de NOD2 e contribui como um mecanismo de defesa contra infecções. Ainda, monócitos de pacientes do pólo LL não respondem ao estímulo de NOD2, o que consequentemente afeta a produção de IL-32 e diferenciação de células dendríticas. Essa alteração na resposta a NOD2 foi associada com os altos níveis de IL-10 presente nas lesões de pacientes LL (Schenk et al., 2012). Por

---

<sup>2</sup> Variações em genes responsáveis pela adesão e entrada da micobactéria na célula, como TLRs, são cruciais na determinação da resistência natural do hospedeiro, simplesmente pela modulação das taxas de entrada do bacilo na célula hospedeira (Cardoso et al., 2011). Por exemplo, um SNP frequente no gene TLR1 (alelo 602S), relacionado com uma reduzida ativação e funcionalidade do receptor, parece ter um papel protetor na hanseníase (Johnson et al., 2007). Recentemente nosso grupo reportou, através de uma abordagem do tipo caso-controle, que o SNP 248S em TLR1 está associado com susceptibilidade à hanseníase (de Sales Marques et al., 2013).



fim, camundongos com deficiência no receptor NOD2<sup>3</sup> são mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (Gandotra et al., 2007).

Um dos mecanismos microbicida chave, em monócitos humanos, induzido pela ativação de TLR2/1, envolve: 1) a indução da enzima CYP27b1, a qual é responsável por converter a forma 25-hidroxivitamina D para sua forma biologicamente ativa, 1,25-hidroxivitamina; 2) Regulação positiva do receptor de vitamina D (VDR); e 3) indução de catelecidina, um importante peptídeo microbicida (Wang et al., 2004; Liu et al., 2006; Liu et al.; 2007; Martineau et al., 2007). Importaneamente, tanto a regulação positiva de CYP27b1 quanto de VDR ocorre de forma dependente da citocina IL-15 (Krutzik et al., 2005). Ao mesmo tempo, a ativação de VDR, juntamente com a produção de IL-1 $\beta$ , é capaz de induzir DEFB4, outro peptídeo necessário para a atividade microbicida da célula hospedeira (Liu et al., 2009). Recentemente, um estudo de expressão gênica em larga escala de microRNAs (miRNA) identificou 13 desses diferencialmente expressos em lesões de pacientes LL quando comparado com pacientes TT. O miRNA-21, considerado o mais diferencialmente expresso em lesões LL, também foi regulado positivamente em infecções de monócitos humanos com *M. leprae* vivo. Adicionalmente, a indução do miRNA-21 pelo *M. leprae* levou a inibição da expressão de importantes genes da via microbicida dependente de vitamina D, demonstrando que a indução desse miRNA é um dos mecanismos que o patógeno utiliza para evadir a resposta microbicida (Liu et al., 2012).

Macrófagos são fagócitos altamente heterogêneos e podem ser classificados segundo sua polarização: M $\phi$ -1 ou M $\phi$ -2. A dicotomia e heterogeneidade dessas células têm sido alvos de diversos estudos, sendo de grande relevância no entendimento das vias pró- e anti-inflamatórias e da interação patógeno-hospedeiro. Essa polarização ocorre em resposta a citocinas e/ou produtos microbianos. Dessa forma, o perfil M $\phi$ -1 é classicamente induzido por citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF e GM-CSF ou ainda por estímulos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS). Por outro lado, tem sido demonstrado que IL-4 e IL-13, além de inibirem a ativação de M $\phi$ -1, são capazes de induzir a polarização para M $\phi$ -2 (revisto por

---

<sup>3</sup> Recentemente um estudo de associação do tipo ‘genome-wide’ contribuiu significativamente na identificação de polimorfismos em diversos genes e a relação com a susceptibilidade à doença (Zhang et al, 2009). Os genes associados foram: *CCDC122*, *C13orf31*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR*, *LRRK2* e *RIPK2*. Talvez um dos genes mais relevante apontado nesse estudo foi o NOD2, fazendo uma conexão da sinalização mediada pelo receptor NOD2 na susceptibilidade à hanseníase. Um estudo adicional, de Berrington e colaboradores, também apontou variantes em *NOD2* associadas com susceptibilidade e desenvolvimento dos estados reacionais da doença (Berrington et al., 2010).

Mantovani et al., 2007). Ambos os perfis macrofágicos, M $\phi$ -1 ou M $\phi$ -2, são susceptíveis à infecção micobacteriana, porém diferem em suas respostas à infecção (Verreck et al., 2004). Somente macrófagos polarizados para o perfil M $\phi$ -1 são capazes de secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios como IL-12, IL-23, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 e TNF. Além disso, esse mesmo perfil é responsável por participar de respostas do tipo Th1. De fato, M $\phi$ -1 compartilham um perfil de mediadores pró-inflamatórios de células dendríticas maduras. Por outro lado, M $\phi$ -2 são associados com a supressão da resposta Th1 através da secreção de IL-10. Adicionalmente, M $\phi$ -2 secretam níveis consideráveis de IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  e RANTES, o que sugere um potencial papel ativo dessas células em recrutar e interagir com outros tipos celulares e participar na regulação da imunidade celular. Como características fenotípicas, M $\phi$ -2 possuem capacidade reduzida de apresentação de antígeno, regulação negativa de suas moléculas co-estimulatórias e altos níveis de receptor do tipo ‘scavenger’ CD163. Juntas, as características de M $\phi$ -2 sugerem que esse perfil tem um papel relevante em atrair e suprimir a resposta de células da imunidade adaptativa após a infecção micobacteriana (Verreck et al., 2006).

Dentre as citocinas características da resposta imune inata conhecidas por modular a função de macrófagos, IL-15 está altamente expressa em lesões de pacientes TT (Jullien et al., 1997), enquanto que as lesões de pacientes LL são caracterizadas pela expressão de IL-10 (Yamamura et al., 1991). Mais recentemente foi demonstrado que essas citocinas induzem diferentes programas de diferenciação de macrófagos, os quais estão correlacionados com suas funções. IL-10 induz um programa de diferenciação fagocítico, resultando na regulação positiva de CD163 e uma capacidade aumentada de fagocitose tanto de micobactérias quanto LDL oxidado. Macrófagos com esse programa de diferenciação podem ser encontrados abundantemente em lesões de pacientes com hanseníase classificados como LL. Por outro lado, IL-15 leva a ativação de um programa microbicida dependente de vitamina D junto a uma capacidade reduzida de fagocitose. Macrófagos com perfil microbicida são predominantemente encontrados em lesões de pacientes hansenianos classificados como TT (Montoya et al., 2009). Corroborando com essas observações, Moura e colaboradores (2012) observaram uma alta expressão de CD163 em macrófagos de lesões de pacientes classificados como LL, correlacionado com a alta produção de IL-10. Nesse mesmo estudo, a infecção de monócitos com *M. leprae* demonstrou uma expressão de CD163 de maneira dependente da carga bacilar. Ainda, o bloqueio da produção de IL-10 reduziu a expressão de CD163 durante a infecção, bem como reduziu a capacidade fagocítica dos monócitos.

Outro componente importante nas interações iniciais entre patógeno-hospedeiro é a molécula DC-SIGN (CD209). Esse receptor é uma lectina do tipo C presente em células dendríticas e macrófagos e tem sido associada com a indução de resposta adaptativa do tipo Th2 (Soilleux et al., 2002). A ligação da micobactéria ao receptor CD209 ocorre através da lipoarabinomanana, um componente da parede celular micobacteriana. Análises da expressão de CD209 em biópsias de pacientes com hanseníase demonstrou um predomínio desse receptor em lesões de pacientes do polo lepromatoso quando comparado com pacientes do polo tuberculóide (Krutzik et al., 2005).

Através de estudos de ligação e associação, Mira e colaboradores revelaram a participação de uma via dependente de ubiquitinação na resposta imune a infecção por *M. leprae*. Esse estudo mostrou que variantes na região promotora compartilhada pelos genes *PARK2* (o qual codifica a Parkina, uma E3-ubiquitina ligase) e *PACRG* atuam como um fator de risco (Mira et al., 2004).

Por fim, a regulação da produção da enzima leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase (LTA4H), a qual controla o balanço de eicosanoides pro- ou anti-inflamatórios, é de grande importância para o controle da infecção micobacteriana e determina padrões de susceptibilidade ou resistência à infecção (Tobin et al., 2010). LTA4H catalisa o passo final na síntese de leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), um eicosanoide pró-inflamatório com uma potente função quimioatraente. Certas mutações no locus que codifica a LTA4H podem conferir um padrão de alta susceptibilidade, redirecionando a síntese de eicosanoides pró-inflamatórios para a produção de lipoxinas anti-inflamatórias. Como consequência, o estado anti-inflamatório permite o aumento da proliferação micobacteriana através da inibição da produção de TNF (Tobin et al., 2010). Por outro lado, o balanço inadequado da síntese de LTB<sub>4</sub> pode convergir para uma produção exacerbada de TNF, levando a um estado inadequado de inflamação (Tobin et al., 2012).

#### **1.1.10.2 - Resposta imune adaptativa**

A capacidade do sistema imune inato em instruir uma resposta imune celular é crucial para a eliminação de patógenos intracelulares como o *M. leprae*. Essa conexão entre imunidade inata e adaptativa é mediada principalmente por células dendríticas, as quais são células especializadas na apresentação de antígenos e altamente eficientes na ativação da imunidade mediada por células. Lesões de pacientes LL são caracterizadas por ausência de células dendríticas, revelando um potencial mecanismo para a reduzida resposta celular

encontrada nessas lesões (Sieling et al., 1999). A ausência desse tipo celular nessas lesões pode ser explicada, em parte, pela inibição da diferenciação das células dendríticas a partir de seus precursores mielóides através de fosfolípidos oxidados derivados do hospedeiro (Lee et al., 2007). Adicionalmente, em lesões de pacientes LL, monócitos periféricos não se diferenciam em células dendríticas após a ativação de TLR (Krutzik et al., 2005), além da reduzida expressão da proteína coestimuladora B7.1 (Santos et al., 2007). Em conjunto, esses estudos demonstram que o *M. leprae* contribui ativamente para o comprometimento da formação da resposta imune mediada por célula.

Na busca do melhor entendimento da participação das citocinas nos diferentes padrões imunológicos observados na hanseníase, Yamamura e colaboradores analisaram a expressão gênica de diversos desses mediadores em lesões de pacientes dos diferentes pólos da doença. Com isso, ficou determinado que o perfil dicotômico de resistência e susceptibilidade à hanseníase é relacionado ao padrão de produção de citocinas (Yamamura et al., 1991). Em lesões do pólo resistente da doença (TT) há o predomínio de citocinas produzidas por macrófagos (IL-1 $\beta$ , TNF, GM-CSF, IL-6), além daquelas pertencentes ao perfil de células Th1 (imunidade celular), como por exemplo, IL-2 e IFN $\gamma$ . Em contraste, lesões do pólo susceptível (LL) são caracterizadas pela ausência da produção de citocinas pró-inflamatórias e elevada produção de citocinas correlacionadas com o perfil de células Th2 (imunidade humoral), como, por exemplo, IL-4, IL-5 e IL-10. Esse perfil é consistente com os padrões apresentados anteriormente relativos a resposta imune inata do hospedeiro frente a infecção com *M. leprae*. De fato, pacientes TT são mais eficazes em controlar a infecção e eliminar o patógeno através da produção de citocinas que contribuem para a formação de uma resposta imune celular e maturação e ativação de respostas microbidas nos macrófagos. Por outro lado, o perfil de citocinas produzidas por pacientes LL induz a formação de uma resposta imune humoral, a qual é ineficiente para a eliminação de bactérias intracelulares como o *M. leprae*, contribuindo assim para o sucesso da infecção.

A IL-12 é uma das citocinas mais influentes no direcionamento para o perfil Th1. Essa citocina é produzida por macrófagos e células dendríticas. Uma vez diferenciadas, células Th1 expressam o ligante CD40 e secretam IFN- $\gamma$ , onde esses estímulos ativam macrófagos e levam a produção de substâncias microbidas, como espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossomais, culminando na eliminação de patógenos intracelulares. Adicionalmente, o IFN- $\gamma$  atua na formação do granuloma, um eficiente mecanismo para isolamento e contenção da infecção. A importância do eixo IL-12/IFN- $\gamma$  na imunidade à infecção micobacteriana foi demonstrada por Cooper e colaboradores. Nesse estudo, foi

avaliada a capacidade de camundongos *knockout* para a subunidade p40 da IL-12 (IL-12 p40<sup>-/-</sup>) em controlar a infecção por *M. tuberculosis*. Como resultado foi observado ausência da produção de IFN- $\gamma$  por camundongos IL-12 p40<sup>-/-</sup>, o que levou a uma drástica redução na capacidade de conter a infecção micobacteriana e destruição do patógeno (Cooper et al., 1997). Logo, a sinergia entre IL-12 e IFN- $\gamma$  é crucial para a formação de uma resposta imune protetora contra infecções por micobactérias ou por outros patógenos intracelulares. De fato, a importância do eixo IFN- $\gamma$ /IL12 em humanos pode ser observada pelo papel que mutações de perda de função em genes como o *IFNGR*, *IL12*, *IL12RB1*, *IL12RB2* entre outros. Quando esses indivíduos têm infecções por patógenos intracelulares, a ausência de sinalização dessa via e a incapacidade de ativar resposta imune celular e produzir IFN- $\gamma$  leva a uma suscetibilidade grave, onde bactérias avirulentas são capazes de apresentar uma infecção com um perfil semelhante a uma bactéria virulenta. Em muitos casos, a infecção por *M. bovis* BCG, *M. avium* ou até salmonelas podem levar a óbito os indivíduos infectados (Quintana-Murci et al., 2007).

Recentemente novos padrões de diferenciação de células Th têm sido descritos e logo inseridos no contexto de resistência *versus* susceptibilidade a micobactérias. Células Th produtoras de IL-17 (Th17) tem sido descritas por ter um importante papel na resposta antimicobacteriana. A produção de IL-17 por essas células tem uma potente função pró-inflamatória capaz de induzir a produção de quimiocinas essenciais no recrutamento celular e manutenção do granuloma durante a infecção por *M. tuberculosis*. Entretanto, a produção excessiva de IL-17 pode sustentar um extenso recrutamento de neutrófilos, levando ao dano tecidual. Isso demonstra que a regulação da resposta Th17 durante a infecção é essencial para eliminar o patógeno e evitar consequências imunopatológicas (Torrado e Cooper, 2010). Chatterjee e colaboradores demonstraram que micobactérias avirulentas, como o *M. bovis* BCG, são incapazes de induzir a resposta Th17. Ainda, esse estudo mostrou que a ativação dessa resposta é dependente do fator de virulência micobacteriano ESAT-6. Interessantemente, a cepa micobacteriana BCG:RD1 (a qual expressa o antígeno ESAT-6) ativa a resposta Th17 e melhora a proteção do hospedeiro contra um processo de reinfecção por *M. tuberculosis* (Chatterjee et al., 2011).

O papel das células T reguladoras (Treg) durante a infecção e persistência de micobactérias ainda é pouco estudado. Porém, um estudo demonstrou que há uma frequência elevada desse tipo celular no sangue e no sítio de infecção de pacientes com tuberculose ativa. Adicionalmente, foi mostrado que o cocultivo de células Treg com PBMC infectados com BCG foi capaz de reduzir a produção de IFN- $\gamma$  das células infectadas. Isso sugere que as

células Treg podem contribuir para a patogênese da tuberculose, anulando mecanismos essenciais para a eliminação do *M. tuberculosis* (Chen et al., 2007).

## 1.2 - Mecanismos de sobrevivência de micobactérias virulentas na célula hospedeira

Micobactérias virulentas, tais como o *M. leprae* e *M. tuberculosis*, possuem mecanismos muito eficientes de sobrevivência no hostil ambiente da célula hospedeira. É sabido que, uma vez estabelecida a infecção, essas micobactérias são capazes de interferir e modular ativamente a maquinaria da célula hospedeira, garantindo assim um nicho seguro para sua multiplicação e disseminação.

A apoptose é um mecanismo de morte celular essencial para a regulação da homeostase celular e possui um papel importante na restrição de organismos intracelulares e também na formação da resposta imune adaptativa do hospedeiro. Apesar de controversos, muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade de micobactérias virulentas em inibir a apoptose, como uma estratégia para garantir um nicho para sobrevivência e replicação. Através de moléculas como LAM (Vergne et al., 2003) e fosfatidilinositol (Fratti et al., 2003) o *M. tuberculosis* é capaz de prevenir a maturação do fagossomo e também a apoptose da célula hospedeira (Velmurugan et al., 2007). Adicionalmente, esse patógeno é capaz de induzir a liberação de receptor solúvel de TNF (TNF-R2), resultando na inativação de TNF e consequente diminuição dos níveis de apoptose da célula hospedeira (Balcewicz-Sablinska et al., 1998). Utilizando o modelo de infecção de células THP-1, Hasan e colaboradores (2006) mostraram que o *M. leprae* é capaz de inibir a apoptose dessas células através da modulação de genes importantes na regulação da apoptose: genes pró-apoptóticos como *Bad* e *Bak* foram regulados negativamente, enquanto genes da família Bcl-2 foram induzidos. Em confirmação desse mecanismo desempenhado pelo patógeno, Lahiri e colaboradores observaram que a infecção de macrófagos com *M. leprae* viável (purificado de camundongos *nude*) não induz a apoptose dessas células (Lahiri et al., 2010). Por outro lado, a infecção com micobactérias avirulentas, como o *M. bovis*-BCG, é capaz de induzir altos níveis de apoptose da célula hospedeira, de forma dependente de TNF, mostrando um eficiente mecanismo para a contenção da infecção e eliminação do bacilo intracelular (Riendeau et al., 2003).

Em 2010, Rodrigues e colaboradores sugeriram um novo mecanismo, induzido por *M. leprae*, envolvido no sucesso da infecção da célula de Schwann. Nesse estudo foi demonstrado que, além de inibir a apoptose das células infectadas, o *M. leprae* é capaz de

induzir a secreção de IGF-I, um hormônio conhecido pela sua contribuição para a sobrevivência da célula Schwann (Rodrigues et al., 2010). Essa é uma estratégia de colonização bastante eficiente, principalmente para um patógeno de crescimento lento como o *M. leprae*. Outro estudo, do mesmo grupo, demonstrou importantes alterações nos níveis séricos de IGF-I em pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase: aqueles classificados como LL apresentaram níveis reduzidos de IGF-I circulante quando comparados com pacientes de outras formas clínicas. Adicionalmente, os níveis séricos de IGF-I no momento do diagnóstico da hanseníase foram encontrados reduzidos em pacientes LL que, mais tarde desenvolveram ENH, diferentemente de pacientes com a mesma forma clínica que não desenvolveram episódios reacionais ao longo do tratamento. Estes dados sugerem que os níveis circulantes de IGF-I podem servir como biomarcador preditivo para os episódios reacionais (Rodrigues et al., 2011).

Em 1863, o patologista alemão Rudolf Virchow documentou o acúmulo de lipídeos em macrófagos de biópsias de pacientes LL. Esses macrófagos então foram chamados de células esponjosas (Virchow, 1863). Mais tarde, verificou-se que o *M. leprae* reside e replica em fagossomos com alto conteúdo lipídico, mostrando que a infecção é capaz de alterar o metabolismo de lipídeos do hospedeiro (Chatterjee et al., 1959). Inicialmente acreditava-se que os lipídeos encontrados nas células esponjosas eram derivados do patógeno, e não do hospedeiro (Sakurai & Skinsnes, 1970). Entretanto, diversos estudos, de forma independente, mostraram que o aspecto esponjoso encontrado nas células infectadas é devido, em parte, ao acúmulo de lipídeos do próprio hospedeiro, como, por exemplo, fosfolipídeos oxidados e ésteres de colesterol (Kurup & Mahadevan, 1982; Cruz et al., 2008; Mattos et al., 2010). Adicionalmente, D'Avila e colaboradores apontaram que corpúsculos lipídicos seriam responsáveis pelo aspecto esponjoso da célula infectada (D'Avila et al., 2006). Recentes evidências sugerem que a regulação do metabolismo lipídico e/ou corpúsculos lipídicos possui um papel importante na resposta do hospedeiro a patógenos intracelulares. Dessa forma, tem sido mostrado que a infecção por *M. leprae* é capaz de regular positivamente a formação de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira, onde isso tem sido associado com a patogênese da hanseníase e uma possível fonte de nutrientes para o patógeno, contribuindo para a persistência da infecção (Mattos et al., 2012).

### 1.3 - Células THP-1 como modelo no estudo da interação patógeno-hospedeiro

A linhagem monocítica de células THP-1 foi obtida no início da década de 1980 a partir do sangue de um menino com leucemia monocítica aguda, sendo caracterizada por alta capacidade de fagocitose e produção de lisossomos (Tsuchiya et al., 1980). Subsequentemente, foi demonstrado que as células THP-1, após o tratamento com acetato de forbol-miristila (PMA), adquirem a capacidade de aderência ao vidro e exibem notável similaridade morfológica com macrófagos (Tsuchiya et al., 1982). Outros tratamentos, com o objetivo de diferenciação dessa linhagem em macrófagos, têm sido utilizados: 1,25 hidroxivitamina D3 (Humeniuk-Polaczek et al., 2004), ácido retinóico (Chen et al., 2004) ou citocinas (ex.: TNF e IFN- $\gamma$ ) (Chen et al., 1996). Entretanto, o estado de diferenciação das células THP-1, frente a diferentes estímulos, pode ser variável (Daigneault et al., 2010). O tratamento das células THP-1 utilizando PMA leva a um grande estado de diferenciação e expressão de moléculas de superfície associadas a diferenciação de macrófagos. Isso ocorre devido a ativação, mediada pelo tratamento com PMA, de proteína quinase C (PKC), o que mimetiza uma ativação fisiológica mediada por diacilglicerol. PKC compreende uma família de serina/treonina quinases com implicações na regulação da proliferação celular, diferenciação, entre outras funções celulares.

O modelo de macrófagos obtidos a partir da diferenciação de células THP-1 tem sido utilizado extensivamente como modelo *in vitro* de macrófagos humanos em diversos estudos de doenças inflamatórias. Esse modelo também tem sido usado com sucesso para estudos envolvendo interação patógeno-hospedeiro durante infecções por diferentes micobactérias. Recentemente essas células foram utilizadas como modelo para o estudo de mecanismos de persistência de *M. tuberculosis* em macrófagos (Estrella et al., 2011). Além disso, células THP-1 se mostraram um bom modelo no estudo da apoptose durante infecções micobacterianas (Riendeau et al., 2002; Hasan et al., 2006). Do mesmo modo, a modulação negativa da autofagia induzida por IFN- $\gamma$  foi observada durante a infecção por *M. tuberculosis* (Dutta et al., 2012).

As células THP-1 diferenciadas foram empregadas como modelo em diversos estudos de interação micobactéria-célula hospedeira, utilizando uma abordagem de expressão gênica em larga escala, na busca da identificação de novos mecanismos de patogênese (Ragno et al., 2001; Fontán et al., 2008; Ward et al., 2010; Wu et al., 2012). Recentemente, um estudo de nosso grupo utilizou o modelo de células THP-1 diferenciadas como um dos modelos de validação de genes encontrados diferencialmente expressos em um microarranjo conduzido a



partir de células de Schwann infectadas com *M. leprae* vivo (Guerreiro et al., 2013 artigo no prelo; Anexo II).

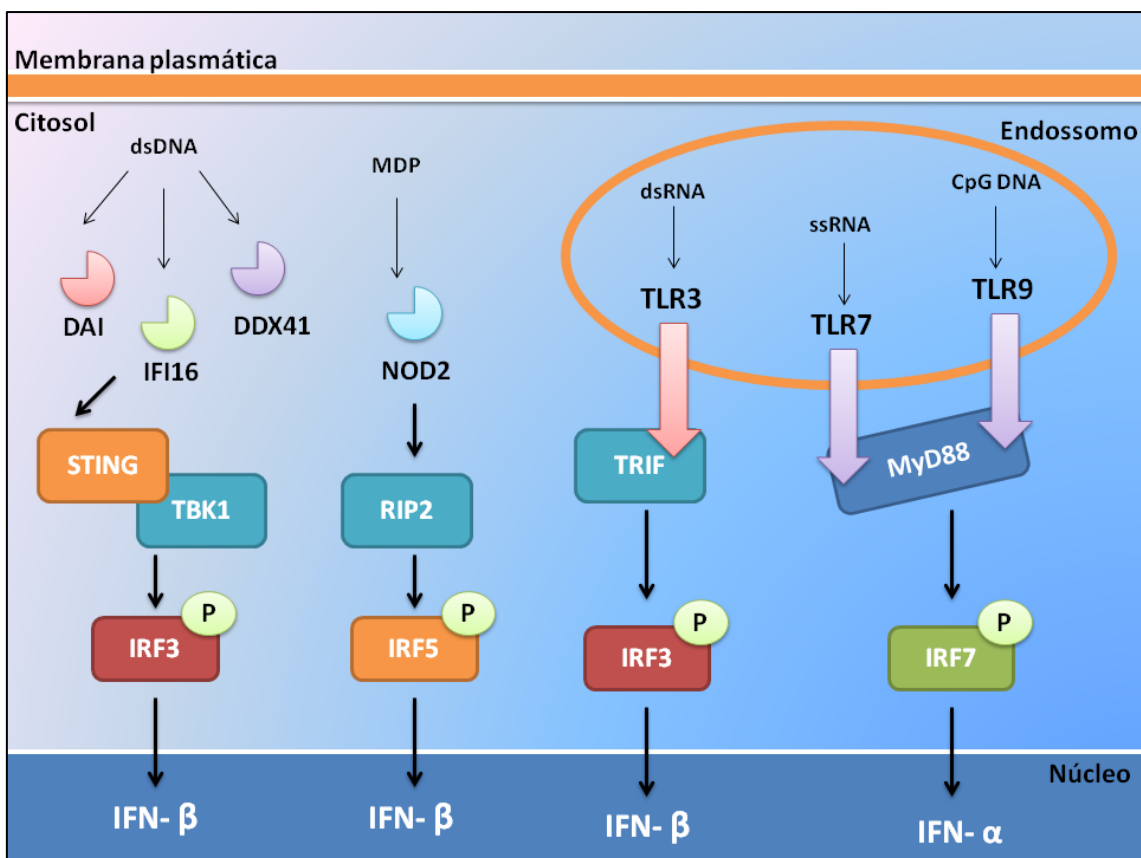
#### **1.4 - IFN tipo I na infecção por patógenos intracelulares**

A classe de IFN tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) compreende citocinas bem conhecidas por seus efeitos antivirais e imunomoduladores, representando assim a primeira barreira na contenção de uma infecção viral. Por outro lado, classicamente essas citocinas se mostram ineficientes no contexto de uma resposta antibacteriana.

Entretanto, um corpo emergente de trabalhos tem apontado a importância de IFNs tipo I durante infecções bacterianas, com o foco voltado para o papel dessas citocinas na patogênese e virulência de diversos grupos de bactérias. *Listeria monocytogenes*, uma bactéria gram-positiva e frequentemente usada como modelo para infecções de bactérias intracelulares, induz a produção de IFN tipo I em macrófagos (O’Riordan et al., 2002). Importaneamente, camundongos *knockout* para o receptor de IFN tipo I (*IFNARI*<sup>-/-</sup>) são altamente sensíveis a infecções virais, porém resistentes à infecção com *L. monocytogenes*, demonstrando que a indução dessas citocinas é um mecanismo patogênico dessa bactéria para inibir a resposta do hospedeiro contra infecções bacterianas (O’Connell et al., 2004). O mecanismo de indução de IFN tipo I por *L. monocytogenes* ocorre de maneira dependente da ruptura do fagossomo e entrada de conteúdo fagossomal no citoplasma da célula hospedeira (O’Riordan et al., 2002), o que leva a ativação de TBK1, que por sua vez fosforila e ativa o fator transcricional IRF3, levando à produção de IFN- $\beta$  (O’Connell et al., 2004).

A ativação da via de IFN tipo I pode ocorrer através de diferentes PRRs, como TLRs e NOD2, ou ainda receptores citoplasmáticos sensores de DNA (CDS). Dentre essa última categoria, alguns foram propostos como iniciadores da sinalização de IFN tipo I: DAI (Takaoka et al., 2007), IFI16 (Unterholzner et al., 2010) e DDX41 (Parvatiyar et al., 2012). Recentemente, a molécula adaptadora STING foi descrita como um regulador chave da ativação de TBK1/IRF3 mediada por CDS (Figura 1.9) (Bowie, 2012). Estudos mostraram que monofosfato cíclico de adenosina (c-di-AMP) é um importante mensageiro secundário bacteriano capaz de induzir uma robusta produção de IFN tipo I de maneira dependente de STING (Woodward et al., 2010; Jin et al., 2011). Ainda nesse contexto, Pandey e colaboradores mostraram que, paralelamente à indução de TBK1/IRF3, a ativação de NOD2

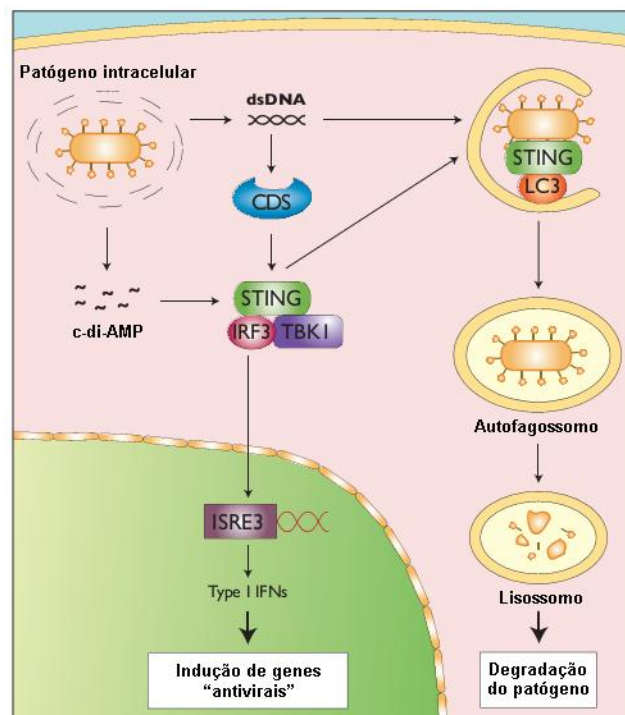
também leva a produção de IFN- $\beta$  de maneira dependente de RIP2/IRF5 (Pandey et al., 2009).



**Figura 1.8 – Representação resumida das principais vias de sinalização (receptores de reconhecimento de padrão (PRR) e sensores citoplasmáticos de DNA (CDS)) envolvidas na produção de IFN tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) em humanos.**

Classicamente, é documentado que micobactérias patogênicas, como o *M. tuberculosis*, residem enclausuradas em fagossomos da célula hospedeira. Entretanto, van der Wel e colaboradores mostraram que, tanto *M. tuberculosis* quanto *M. leprae*, são capazes de se deslocarem para o citosol da célula hospedeira, onde esse evento é dependente do sistema de virulência ESX-1 (van der Wel et al. 2007). Uma vez que ESAT-6, a proteína mais importante do sistema ESX-1, em altas concentrações possui uma propriedade lítica (de Jonge et al., 2007), tem sido sugerido que essa proteína é responsável pela perfuração do fagossomo

e consequente entrada do conteúdo fagossomal ao citosol da célula hospedeira. Recentemente, foi demonstrado que *M. tuberculosis* induz a produção de IFN tipo I durante a infecção de macrófagos, de forma dependente de CDS e do eixo de sinalização STING/TBK1/IRF3. Além disso, esse estudo evidenciou que o DNA micobacteriano é responsável pela ativação de CDS, onde o sistema ESX-1 permite a entrada desse DNA no citosol da célula hospedeira através da permeabilização fagossomal. Adicionalmente, camundongos *knockout* para o fator de transcrição IRF3 (*IRF3*<sup>-/-</sup>) são extremamente resistentes à infecção por *M. tuberculosis* (Manzanillo et. al, 2012). Curiosamente, Watson e colaboradores demonstraram, utilizando baixa carga bacilar de *M. tuberculosis*, que a permeabilização fagossomal mediada por ESX-1 é uma via de mão dupla, permitindo, por outro lado, componentes citosólicos de autofagia mediada por ubiquitinação acessar o fagossomo, marcar o bacilo e direcioná-lo para autofagossomos, de forma dependente do reconhecimento de DNA micobacteriano e ativação de STING (Watson et al., 2012). Um esquema resumido da participação de STING na resposta do hospedeiro a patógenos intracelulares pode ser encontrado na figura abaixo (Figura 1.10).



**Figura 1.9 – Esquema representativo da participação da molécula STING na resposta do hospedeiro a patógenos intracelulares e sua ligação entre indução de IFN tipo I e autofagia.** Adaptado de [http://www.invivogen.com/docs/Insight\\_201211.pdf](http://www.invivogen.com/docs/Insight_201211.pdf).

Manca e colaboradores mostraram que a produção IFN tipo I pode regular negativamente a resistência do hospedeiro durante a infecção por *M. tuberculosis*, inibindo a formação de uma resposta do tipo Th1 (Manca et al., 2001). Outro estudo evidenciou a dicotomia das respostas baseadas em IFN tipo I e IFN tipo II: tanto IFN- $\alpha$  quanto IFN- $\beta$  foram capazes de inibir significativamente a capacidade de monócitos em produzir citocinas da resposta Th1 e alterar negativamente a responsividade a IFN- $\gamma$  de diferentes formas, como por exemplo, alterações na sinalização acionada por essa citocina e diminuição da expressão do receptor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R1) (de Paus et al., 2013). Em 2010, Berry e colaboradores, utilizando uma abordagem de expressão gênica em larga escala, identificaram a via de IFN tipo I como diferencialmente expressa em sangue total de indivíduos infectados e pacientes com tuberculose, apontando a indução dessa via como um fator crucial para a progressão da infecção latente para a doença ativa (Berry et al., 2010). Em concordância com essas evidências, um estudo recente demonstrou uma correlação inversa entre respostas mediadas por IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  nos diferentes polos clínicos da hanseníase: IFN- $\gamma$  e seus genes a jusantes (ex.: genes que codificam proteínas microbicidas dependente de vitamina D) são preferencialmente expressos em lesões de pacientes do pólo TT; em contraste, IFN- $\beta$  e seus genes a jusantes (ex.: *IL10*) são preferencialmente expressos em lesões de pacientes do polo LL. Além disso, esse estudo demonstrou que a resposta microbicida induzida por IFN- $\gamma$  pode ser inibida por IFN- $\beta$  e por IL-10, sugerindo fortemente que a produção diferencial dos diferentes tipos de IFNs contribui para proteção *versus* patogênese em infecções bacterianas (Teles et al., 2013).

De forma oposta a bactérias intracelulares, para garantir o sucesso da infecção, alguns vírus possuem mecanismos de evasão capazes de inibir a resposta baseada em IFN tipo I. Recentemente foi descrito que o vírus da dengue (DENV) é capaz de inibir essa resposta através da atividade proteolítica do complexo DENV NS2B3, o qual tem como alvo a molécula adaptadora STING (Aguirre et al., 2012). O mesmo mecanismo foi observado em vírus da hepatite C (HCV), onde a proteína HCV NS4B reduz a produção de IFN- $\beta$  de maneira dependente do bloqueio da atividade de STING (Nitta et al., 2013).

## **2. JUSTIFICATIVA**

A incapacidade de se cultivar o *M. leprae in vitro* é um dos principais motivos da carência de dados sobre os efeitos do patógeno sobre a expressão gênica e processos metabólicos da célula hospedeira. Nesse contexto, estudos de expressão gênica em larga escala, como por exemplo, a utilização da técnica de microarranjo, representam poderosas ferramentas para o entendimento e identificação de novos mecanismos de patogênese. Uma das características desse tipo de abordagem é a eliminação de hipóteses *a priori*, onde essas são substituídas por hipóteses *a posteriori*. Logo, com o objetivo de caracterizar a interação inicial entre o *M. leprae* e células de Schwann, um estudo conduzido por nosso grupo empregou a análise de transcriptoma global por microarranjo, utilizando, de forma inédita, o modelo de células de Schwann primárias infectadas com *M. leprae* vivo proveniente do modelo de cultivo em camundongos *nude*. Através dessa abordagem, foi identificado o enriquecimento de genes estimulados por IFN tipo I (ISG), dentre estes, o *OASL* (2' 5' oligoadenilato sintetase) foi descrito como o mais diferencialmente expresso. Em uma segunda etapa do mesmo estudo, foi utilizada uma abordagem do tipo caso-controle a qual identificou a associação entre um polimorfismo de base única (SNP) no gene *OASL* e susceptibilidade à hanseníase. Como validação desse resultado, os níveis de mRNA de *OASL* foi avaliado em biópsias de nervo de pacientes hanseníacos diagnosticados no Ambulatório Souza Araújo (ASA) (Figura 2). Entretanto, os mecanismos utilizados pelo *M. leprae* na indução da via de IFN tipo I, bem como o papel do gene *OASL* durante a infecção, permaneceram inconclusivos naquele momento. Como seguimento, o presente trabalho buscou estender esse estudo e validar a modulação positiva da via de IFN tipo I durante a infecção por *M. leprae* vivo, bem como o papel do *OASL*, utilizando o modelo de macrófagos derivados de células THP-1. Adicionalmente, buscamos também caracterizar a principal via envolvida na produção de IFN tipo I durante a infecção *in vitro* de macrófagos pelo *M. leprae*. Para isso foram utilizadas ferramentas robustas de biologia celular e molecular, tais como, qRT-PCR, *western blot*, microscopia de fluorescência confocal, silenciamento gênico e intervenções farmacológicas para a compreensão dos mecanismos envolvidos no sucesso da infecção mediada pela indução de *OASL*. Com isso, os dados gerados a partir desse estudo podem contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e intervenção da doença.



**Figura 2 – Fluxograma das etapas do estudo da interação patógeno-hospedeiro na hanseníase realizado por nosso grupo.** As etapas em laranja representam aquelas conduzidas por Anna Beatriz R. Ferreira (tese de doutoramento defendida em 2011, pelo programa de pós-graduação em Biologia Computacional e Sistemas/Fiocruz), ao passo que as etapas em azul representam aquelas desenvolvidas na presente dissertação de mestrado.

### **3. OBJETIVOS**



### 3.1 - Objetivo geral

Avaliar o papel dos genes da via IFN tipo I, especialmente o *OASL*, utilizando o modelo de infecção de macrófagos humanos derivados de células THP-1 com *M. leprae* vivo.

### 3.2 - Objetivos específicos

1. Validar a expressão diferencial de genes da via de IFN tipo I durante a infecção de macrófagos humanos derivados de células THP-1 com *M. leprae* vivo;
2. Caracterizar a expressão de mRNA e proteína de OASL após a infecção por *M. leprae* (vivo ou irradiado) ou *M. bovis* BCG;
3. Caracterizar a via de ativação de IFN tipo I e OASL a partir da transfecção de DNA ou RNA de *M. leprae*;
4. Avaliar o papel do OASL na modulação da produção de citocinas/quimiocinas na infecção pelo *M. leprae*, bem como sua contribuição na viabilidade intracelular do bacilo;
5. Avaliar o efeito da transfecção de DNA de *M. leprae* durante a infecção de macrófagos humanos derivados de células THP-1 pela cepa vacinal *M. bovis* BCG, determinando a viabilidade intracelular do bacilo e a produção de citocinas/quimiocinas.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4.1 - Cultivo de micobactérias

### 4.1.1 - *M. bovis* BCG

As cepas vacinais BCG Moreau (doadas por Carolina Zavareze – Fundação Ataufo de Paiva) e BCG Pasteur GFP (doadas pelo Dr. Erwin Schurr – Laboratório de Genética Humana de Doenças infecciosas da Universidade MacGill no Canadá) foram cultivadas em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO laboratories, EUA) contendo 0,02% glicerol, 0,05% Tween-80 (DIFCO laboratories, EUA) e suplementado com 10% Middlebrook ADC (albumina bovina, dextrose e catalase). O tempo de cultivo foi de aproximadamente duas semanas, sob constante agitação, à temperatura de 37° C. Nesse período, a cultura foi centrifugada a 500 rpm por 5 min para evitar grumos micobacterianos e o sobrenadante foi utilizado para aferir a densidade óptica (DO<sub>600</sub>). Ao atingir aproximadamente 0,8 (DO<sub>600</sub> 0,8 = 2 x 10<sup>8</sup> bactérias / mL), correspondente à fase exponencial do crescimento micobacteriano, o cultivo foi interrompido e aliquoteado em 20% glicerol e estocado em freezer -70 ° C para posterior uso em ensaios de infecção. Para a utilização nos ensaios de infecção, as alíquotas congeladas de *M. bovis* BCG em 20% glicerol foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 min e ressuspensas em meio RPMI-1640 sem adição de antibióticos.

A pureza do cultivo foi avaliada pelo método de Kinyoun. Brevemente, foram adicionados 10 µL da cultura em lâmina de vidro e realizado um esfregaço. Depois de seco, o esfregaço foi fixado por calor, utilizando-se um bico de Bunsen. Posteriormente a lâmina de vidro foi coberta com fucsina fenicada por cerca de 5 min. O excesso de fucsina foi retirado por lavagem delicada em água corrente e em seguida adicionado solução álcool-ácido para descoloração. Após lavagem em água corrente, foi adicionado azul de metileno por cerca de 30 segundos. Após essa etapa, a lâmina foi novamente lavada, e após secagem em temperatura ambiente, foi levada para avaliação em microscópio óptico com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em aumento de 100 x. A cultura foi determinada livre de contaminação, quando observados apenas bacilos corados com fucsina (em rosa). Uma vez determinada a pureza, a quantificação da cultura foi determinada por contagem direta das lâminas como descrito por Shepard e McRae (1968).

A viabilidade foi determinada por coloração fluorescente utilizando o método Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Life Technologies, EUA). Para isso, as bactérias foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 min, o sedimento ressuspendido em 300 µL de tampão fosfato salino (PBS) 1X, e então adicionado 6 µM de SYTO 9 (componente A) e 30 µM de iodeto de propídio (componente B) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a

coloração, foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro. Através da microscopia de fluorescência, bactérias vivas e mortas foram quantificadas por contagem dos bacilos verdes e vermelhos, respectivamente.

#### **4.1.2 - *M. leprae***

O *M. leprae* Thai-53 vivo utilizado nesse estudo, cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), foi proveniente do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*). Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, as patas foram colhidas e enviadas ao laboratório de hanseníase (FIOCRUZ, RJ) para purificação. De modo estéril, as patas foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI-1640 (LGC biotecnologia, SP). A suspensão de bacilos foi tratada com hidróxido de sódio 0,1 M, posteriormente ressuspensa em meio de cultura RPMI-1640 (LGC biotecnologia, SP) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA) e incubadas a 33° C por 3h. Os bacilos foram quantificados por contagem direta em conforme descrito por Shepard e McRae (1968) e a viabilidade medida pelo método Live/Dead BacLight, como descrito anteriormente.

A marcação do *M. leprae* irradiado para ensaios de imunofluorescência foi realizada através do kit PKH2 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com instruções do fabricante. Para isso, aproximadamente 10<sup>7</sup> bacilos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL do diluente A. Posteriormente, foi adicionado 1 mL do corante PKH2 diluído no diluente A e homogeneizado. A mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, foi adicionado igual volume de SFB e incubados por 1 minuto, para a neutralização. A suspensão de bacilos foi, então, diluída em igual volume de meio RPMI-1640 completo e centrifugada por 10 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram lavadas por três vezes com meio RPMI-1640 para a retirada do excesso de fluorocromo. Ao final, as bactérias foram ressuspensas no volume inicial com meio RPMI-1640.

## 4.2 - Cultura de células e ensaios de infecção

### 4.2.1 - Células THP-1

As células THP-1 foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, EUA) e cultivadas em meio RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, Brasil) contendo 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; HyClone laboratories, Canadá). As células foram mantidas em frascos de cultura à 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> através de repiques semanais.

Para os ensaios de infecção, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade aferida pelo método de exclusão por coloração pelo azul Tripán (Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente, foram estimuladas com 80 nM (50 ng/mL) de acetato de forbol-miristila (PMA, Sigma-Aldrich) para diferenciação em macrófagos (mdTHP-1). Após 24h de estímulo, as células foram lavadas com o meio para a retirada de PMA, e então adicionado meio fresco sem antibióticos. Os mdTHP-1 foram então infectados com *M. bovis* BCG em multiplicidades de infecção (MOI) de 10 ou 100:1 e com *M. leprae* vivo ou irradiado utilizando MOI de 10, 20 ou 100:1 por 3, 24 e 48h. Todos os ensaios realizados com *M. leprae* vivo foram incubados em estufa a 33°C e 5% CO<sub>2</sub>.

## 4.3 - Silenciamento gênico

Para o silenciamento da expressão gênica de OASL, mdTHP-1 foram transfectados com RNA silenciador contra OASL, pré-desenhado (Silencer Select siRNA s16432, Life Technologies, EUA), utilizando o reagente Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente foram plaqueadas 4 x 10<sup>5</sup> células por poço, em placas de 6 poços (Corning, EUA), onde foram diferenciadas em macrófagos conforme o protocolo descrito anteriormente. A mistura de transfecção contendo o reagente Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 e o RNA silenciador foi preparada para um volume final de 300 µL. Primeiramente, 9 µL de Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 foi diluído em meio Opti-MEM<sup>®</sup> (Life Technologies, EUA) para volume final de 150 µL, seguido de incubação por 5 min à temperatura ambiente. Em paralelo, o RNA silenciador e o RNA “scramble” (controle negativo) foram diluídos a 100 nM em meio Opti-MEM<sup>®</sup> para volume final de 150 µL e incubados por 5 min à temperatura ambiente. Após a incubação, as diluições dos RNAs e Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 foram misturadas (razão 1:1), seguido de incubação por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura (complexo RNA-reagente) foi adicionada às

culturas de macrófagos por 24h. No dia seguinte, as células foram infectadas com *M. leprae* vivo por 24 ou 48h e tiveram seu DNA e RNA total extraído pelos métodos descritos no item *Purificação de ácidos nucleicos*.

#### **4.4 - Transfecção de ácidos nucleicos**

A transfecção de DNA e RNA de *M. leprae* foi realizada através do reagente Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 conforme descrito anteriormente. O DNA e RNA de *M. leprae* foram purificados através dos métodos descritos no item 4.5 - *Purificação de ácidos nucleicos*. Para a transfecção foi utilizado 1 µg de DNA, tratado ou não com DNase, e 1 µg de RNA. Além disso, as células foram tratadas com os ácidos nucleicos sem o agente de transfecção. Após 24h as células tiveram seu RNA extraído pelo método descrito no item a seguir.

#### **4.5 - Purificação de ácidos nucleicos**

##### **4.5.1 - Extração de RNA**

O RNA total das culturas de mdTHP-1 foi extraído utilizando o reagente TRIzol<sup>®</sup> (Life technologies, EUA) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após os períodos de infecção, o sobrenadante das culturas foi retirado e aliquoteado, e então adicionado 1 mL de TRIzol<sup>®</sup> em cada poço, para lise das células aderentes. Após raspagem com ponteira, o conteúdo lisado foi transferido para tubos de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e incubada a -70° C por no mínimo um dia. As fases intermediária e orgânica foram armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA e proteína. Após o período de incubação, foi adicionado 2 µL de GlycoBlue<sup>®</sup> (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do sedimento, e então centrifugados a 14000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4° C. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 10 min e em seguida

ressuspensos em 20  $\mu\text{L}$  de água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC, Life Technologies, EUA).

#### **4.5.2 - Extração de DNA**

A fase intermediária armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi utilizada para a extração de DNA para a realização dos experimentos de viabilidade bacteriana. Em cada tubo foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE (5mM Tris; 0,1 mM EDTA) e 150  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada no aparelho FastPrep<sup>®</sup> 120 (MP biomedical, EUA) na configuração de velocidade a 6,5 metros por segundo (m/s) por 45 seg. Os tubos foram incubados no gelo por 5 min e centrifugados a 12000 x g por 10 min à temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL contendo 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  por no mínimo um dia. A fase orgânica resultante foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de proteínas. Após a incubação, foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  GlycoBlue<sup>®</sup> (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do pellet, e então centrifugados a 12000 x g por 30 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% por centrifugação a 12000 x g por 15 min em temperatura ambiente. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por 15 min e ressuspensos em 20  $\mu\text{L}$  de água de ampola.

#### **4.5.3 - Quantificação de ácidos nucleicos**

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Inicialmente foi lido 1  $\mu\text{L}$  de água DEPC/água de ampola para determinar o “branco”. Em seguida, 1  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi lido contra o “branco” no comprimento de onda de 260 nm. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância ( $A$ ) em dois comprimentos de onda:  $A_{260/280}$  indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto  $A_{260/230}$  indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  apresentaram valores  $> 1,8$ .

#### **4.5.4 - Análise da integridade do RNA**

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de agarose (Life technologies, EUA) 1,2% em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se 200 ng de RNA a 35% formamida, MOPS 1X, 0,125% corante azul de bromofenol e 1  $\mu$ L de SYBR Green II 100X (Life technologies, EUA). Em seguida as amostras foram incubadas em banho seco a 65° C por 15 minutos e depois aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de fotodocumentação (L-Pix touch, Loccus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

#### **4.5.5 - Tratamento do RNA com DNase**

Após a quantificação e confirmada a integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> (Life technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30  $\mu$ L. Inicialmente, em tubos de 0,6 mL, foi adicionado 3  $\mu$ g de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10X e 1  $\mu$ L da enzima Turbo DNase, seguido por incubação a 37° C durante 30 min. Após o período de incubação, foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação enzimática. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 min, agitando os tubos manualmente 2-3 vezes durante esse período para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 2 min, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado como descrito no item 4.5.3.

### **4.6 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real**

#### **4.6.1 - Síntese de cDNA**

O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas de mdTHP-1 mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III<sup>®</sup> (Life technologies, EUA) em uma reação com volume final de 20  $\mu$ L. Inicialmente, 500 ng de RNA e de Oligo (dT) (para a análise da expressão gênica de mdTHP-1) ou RandomPrimer (para análise da expressão gênica de micobactérias) foram incubados a 65° C por 5 min para a linearização da molécula de RNA.



Após a incubação foi adicionado o tampão da enzima em concentração de 1X, dNTP 0,125 mM, DTT 10 mM, 40 U de RNase Out<sup>®</sup> e 200 U da enzima Superscript III<sup>®</sup>. Essa mistura foi incubada a 50° C por 1 hora para transcrição, seguida de incubação a 70° C por 5 min para inativação da enzima. Após a incubação as amostras foram armazenadas a -20° C.

#### **4.6.2 - RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR)**

Para análise da expressão gênica a reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foi realizada uma reação de 20 µL, onde foram adicionados 5 µL de cada cDNA, transcrito com Oligo (dT), previamente diluído (1:5), 0,25 µM de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems). Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse e o gene constitutivo RPL13a. As reações foram incubadas no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems, EUA), seguindo as condições da reação: 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Ao final da reação de amplificação, as amostras foram submetidas a uma nova incubação para geração da curva de dissociação, onde se determina o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos oligonucleotídeos de suas sequências alvo.

Todos os oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR (Tabela 2) foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene obtidas no UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/>), utilizando o software *Primer3* v.0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Uma série de características para o desenho foi seguida conforme descrito por Robottom-Ferreira (2011).

**Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR.**

<b>Gene</b>	<b>Fita</b>	<b>Sequência (5' - 3')</b>
<b>RPL13a</b>	senso	GACAAGAAAAAGCGGATGGT
	antisenso	GTACTTCCAGCCAACCTCGT
<b>IFNB</b>	senso	GTCACTGTGCCTGGACCATA
	antisenso	ACAGCATCTGCTGGTTGAAGA
<b>IFNAR</b>	senso	TGCTGCGAAAGTCTTCTTGA
	antisenso	CGATTTGTTCCCTCAGAAGTTGA
<b>IFI16</b>	senso	GCTGGACCCAAAGGGAGTAA
	antisenso	CTGTTTTTCGGGTTCTCAGTTGAA
<b>IFIT1</b>	senso	GGCTGCTGTTTAGCTCCCTT
	antisenso	CCATTTGTA CT CATGGTTGCTGTAA
<b>OAS1</b>	senso	GGCTGAATTACCCATGCTTTA
	antisenso	ATCGTCGGTCTCATCGTCTG
<b>OASL</b>	senso	AAATTTCTGCCATCCTTCAG
	antisenso	TGGCTTTCACATACTGCTGGTA

#### **4.6.3 - RT-PCR em tempo real para determinação da viabilidade micobacteriana**

Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi utilizado o sistema de PCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S do bacilo, com algumas modificações, como descrito por Martinez *et al.* (2009). A partir das células infectadas com o bacilo viável foi extraído o DNA e o RNA, onde este último foi reversamente transcrito em cDNA com a utilização de Random Primer, conforme descrito anteriormente. Os níveis de RNAr 16S foram normalizados pela detecção de DNA 16S. Os oligonucleotídeos utilizados como em Martinez et al 2009..

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com 500 ng de DNA e cDNA em volume final de 20 µL contendo TaqMan PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 0,1 µM da sonda e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo. As reações foram incubadas a 50° C por 2 min, 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 min no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus®.

A viabilidade intracelular do *M. bovis* BCG também foi determinada se baseando nos níveis de RNAr 16S normalizados pela detecção de DNA 16S, como citado acima. Entretanto, as reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o sistema SYBR Green I seguindo as mesmas especificações descritas no item 4.6.2.

Os oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de viabilidade micobacteriana podem ser encontrados na Tabela 3.

**Tabela 3. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR para a determinação da viabilidade micobacteriana.**

Gene	Fita	Sequência (5' - 3')
<b>16S <i>M. leprae</i></b>	senso	GCATGTCTTGTGGTGAA
	antisenso	CACCCACCAACAAGCTGAT
<b>16S <i>M. bovis</i> BCG</b>	senso	GTAACACGTGGGTGATCTGC
	antisenso	CGCTTTCCACCACAAGACAT

#### 4.6.4 - Análise dos dados obtidos a partir de RT-PCR em tempo real

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Livak e Schmittgen, 2001). Inicialmente foi calculado o  $\Delta C_T$ , subtraindo-se os valores de  $C_T$  (do inglês *threshold cycle*, limiar do ciclo) do gene alvo dos valores de  $C_T$  do gene normalizador (RPL13a). Uma vez determinado o  $\Delta C_T$  das amostras, foi escolhido como amostra normalizadora o cDNA referente à condição experimental de células THP-1 não infectadas. Para se calcular o  $\Delta\Delta C_T$  foi utilizada a seguinte fórmula: [ $\Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (amostra normalizadora)]. Por fim, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi utilizado o método descrito acima. Entretanto, para o cálculo do  $\Delta C_T$  subtraiu-se os valores de  $C_T$  referentes ao cDNA de 16S dos valores de DNA 16S. A condição experimental de células mdTHP-1 infectadas com *M. leprae* e transfectadas com RNA “scramble” (controle negativo) foi selecionada como amostra normalizadora. Após se obter o  $\Delta\Delta C_T$ , os valores expressão relativa de 16S foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Adicionalmente, a partir desses valores, foram determinados os percentuais de aumento da “atividade microbicida” em relação a condição RNA “scramble” (controle negativo).

A viabilidade intracelular do *M. bovis* BCG foi determinada do mesmo modo como descrito no parágrafo acima. Porém, para esses ensaios, a condição experimental de células

mdTHP-1 infectadas com *M. bovis* BCG na ausência de DNA de *M. leprae* foi selecionada como amostra normalizadora para a obtenção do  $\Delta\Delta C_T$ .

#### **4.7 - Purificação de proteínas**

A fase orgânica resultante da extração de DNA pelo reagente TRIzol<sup>®</sup> foi utilizada para purificação de proteínas. Para tal, foi adicionado 300  $\mu$ L de etanol 100% em cada tubo. Os mesmos foram homogeneizados por inversão e deixados à temperatura ambiente por 3 minutos. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 2000 x g por 5 min a 4° C e o conteúdo (fase fenol-etanol) transferido para novos tubos de 2,0 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de isopronanol (Sigma-Aldrich, EUA) em cada tubo seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 min. Para sedimentação das proteínas, os tubos foram centrifugados a 12000 x g for 10 min a 4° C e o sobrenadante descartado. Para a lavagem dos sedimentos foi adicionado 2 mL de hidrocloreto de guanidina 0,3 M (preparado em etanol 95%) seguido de incubação à temperatura ambiente por 20 min. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 7500 x g por 5 min a 4° C. O três procedimentos anteriores (adição de hidrocloreto de guanidina 0,3 M, incubação à temperatura ambiente e centrifugação) foram repetidos por mais duas vezes. Em seguida, foi adicionado 2 mL de etanol 100% seguido de incubação à temperatura ambiente por 20 min. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 7500 x g por 5 min a 4° C e o sobrenadante descartado. Os sedimentos foram secos à temperatura ambiente por cerca de 10 min e ressuspensos em 100  $\mu$ L de SDS 1%. Para uma melhor solubilização as amostras foram incubadas em banho seco (modelo DB- Heat & Cool, Loccus Biotechnologia, Brasil) à 50° C por cerca de 3 horas.

##### **4.7.1 - Quantificação de proteínas**

A quantificação das proteínas extraídas foi realizada pelo método colorimétrico Pierce<sup>®</sup> BCA protein assay (Thermo scientific, EUA) segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente foram misturadas 50 partes do reagente A (BCA em tampão bicarbonato) com uma parte do reagente B (sulfato de cobre 4%). Em uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-one, Brasil) foi aplicada a curva padrão, o “branco” (SDS 1%) e as amostras (10  $\mu$ L / poço). Em seguida, em cada poço, foram adicionados 200  $\mu$ L da mistura dos reagentes A e B, seguido de incubação a 37° C por 30 min. A leitura da placa foi

realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm e os resultados analisados pelo software SoftMax® data acquisition and analysis (Molecular Devices, EUA).

#### **4.8 - Análise dos níveis de OASL por Western Blot**

Após as dosagens, 30 µg das proteínas extraídas pelo método do TRIzol® foram diluídas em tampão de amostra 4 vezes concentrado (para 10 ml de solução: 1,25 ml de Tris pH 6,8 a 0,5 M; 4 ml de Glicerol; 0,2 g de SDS; 0,5 ml de β-Mercaptoetanol, 0,25 ml de azul de bromofenol a 0,05%, completado com água deionizada) e fervidas por 10 min. As amostras e proteínas com massa molecular conhecida (padrão de massa molecular) foram aplicadas em gel de poliacrilamida composto por um gel de empilhamento a 6% (1,08 ml de água deionizada; 0,5 ml de Tris 0,5 M pH 6,8; 0,4 ml de Bis-Acrilamida/Acrilamida a 0,8/30%; 20 µl de SDS a 10%; 2,8 µl de TEMED; 14 µl de persulfato de amônio a 10%) e um gel de separação a 8,5% (2,32 ml de água deionizada; 1,26 ml de Tris 1,5 M pH 8,8; 1,42 ml de Bis-Acrilamida/Acrilamida a 0,8/30%; 50 µl de SDS a 10%; 2,5 µl de TEMED; 25 µl de persulfato de amônio a 10%). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0,1% de SDS), sob amperagem constante de 20 mA em cuba de eletroforese (S600 – Amersham).

O gel contendo as proteínas que migraram durante a corrida e uma membrana de nitrocelulose (GE, São Paulo, Brasil) foram montadas no suporte da cuba de transferência. O sanduíche montado contendo: esponja, papel filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel filtro e esponja, foi então colocado na cuba de transferência (Bio-Rad, EUA), juntamente com o tampão de transferência (25 mM de Tris; 192 mM de glicina; metanol 20%). A transferência foi realizada utilizando corrente de 100 V durante 1 h.

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de Amido Black (metanol 40%, ácido acético 10%, Amido Black 0,1%) para a confirmação da transferência e identificação do padrão de massa molecular e, posteriormente, descoradas por lavagens com solução de TBS/T (10 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; Tween-20 0,05%). Em seguida, as membranas foram bloqueadas com solução de TBS/T com leite desnatado 4% por 40 min e incubadas por 2 h com anticorpo primário policlonal anti-OASL (Santa Cruz Biotechnology, EUA) na diluição de 1:1000 em TBS/T com 2% de BSA. Após esta incubação, as membranas foram lavadas por três vezes com TBS/T durante 10 a 15 min e logo em seguida, foram incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase (Bio-

Rad, EUA) diluído 1:40.000 em TBS/T com leite desnatado 3%. As membranas foram lavadas três vezes com TBS/T por 10 min e reveladas em cassete de revelação.

A revelação foi realizada adicionando-se sobre a membrana 400 µl do substrato quimioluminescente (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, GE, São Paulo, Brasil). Em uma câmara escura, um filme (Hyperfilm ECL; GE, São Paulo, Brasil) foi colocado sobre cada membrana por aproximadamente 30 segundos e em seguida revelado utilizando-se revelador e fixador (Kodak).

Após a revelação, a membrana foi incubada com NaOH 0,2 M, sob agitação por 5 min, para a remoção dos anticorpos. A membrana foi então novamente bloqueada com TBS/T/ com 4% de leite desnatado por 40 min e então um novo Western Blot foi realizado para GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, EUA) numa diluição de 1:400 de TBS/T/ com 2% de BSA (albumina sérica bovina), seguindo um protocolo semelhante ao utilizado para OASL, porém com uma adaptação: o anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma, EUA) na diluição de 1:40.000.

Os gráficos de análise densitométrica apresentados foram realizados utilizando o programa ImageJ (NIH, EUA). Os resultados foram gerados a partir do cálculo da razão entre valores de densitometria do perfil de bandas de expressão de OASL e GAPDH e expressos em unidades arbitrárias.

#### **4.9 - Imunofluorescência**

Para os ensaios de imunofluorescência foram utilizadas  $1,5 \times 10^5$  células por poço, em placas de 24 poços (Corning, EUA), onde as células foram diferenciadas sobre lamínulas de vidro. Ao final dos ensaios de infecção, o meio de cultura foi removido, as células lavadas duas vezes com PBS 1X (LGC biotecnologia, Brasil) e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min à temperatura ambiente. Após o período de fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas com solução de bloqueio/permeabilização (SFB 5% e Triton X-100 0,01% em PBS) por 20 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas por 2h, à temperatura ambiente, com o anticorpo policlonal anti-OASL (Santa Cruz biotechnology, EUA) diluído a 5 µg/mL em solução de bloqueio/permeabilização. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS 1X por 5 min e incubação com o anticorpo secundário Alexa 633 (Life Technologies, EUA) diluído (1:250) em solução de bloqueio/permeabilização por 2h em temperatura ambiente. Por fim, os núcleos foram corados

com DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindole, Sigma-Aldrich), as lâminas lavadas três vezes com PBS 1X por 5 min e montadas em lâminas de vidro contendo 3 µL de solução ProLong<sup>®</sup> Gold Antifade (Life Technologies, EUA) e seladas com Entellan<sup>®</sup> (Merck, Alemanha).

Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se o microscópio invertido de fluorescência Zeiss AxioObserver com sistema de iluminação Colibri com objetiva Plan-neofluar 40X com 1.4 de abertura numérica (Zeiss). O sinal vermelho do anticorpo secundário marcado com Alexa 633 foi fotografado utilizando-se o led 625nm e o filtro Zeiss 50 e o sinal verde do *M. leprae* marcado com PKH2 ou do *M. bovis* BCG GFP foi capturado utilizando-se o led 445nm e o filtro Zeiss 61. O sinal azul do DAPI foi registrado utilizando-se led 365nm e filtro Zeiss 60. As imagens foram registradas em câmera monocromática HMR (Zeiss) e as quantificações da fluorescência realizada pelo software ImageJ.

#### **4.10 - Dosagem de citocinas**

Os sobrenadantes dos experimentos de silenciamento de *OASL* e transfecção de DNA durante a infecção com *M. bovis* BCG foram coletados e estocados a -20°C até o momento da utilização. Os níveis de produção de citocinas foram determinados através de ensaio multiplex contendo microesferas marcadas fluorescentemente e conjugadas a anticorpos monoclonais específicos para cada alvo (citocina). O ensaio foi conduzido seguindo as recomendações do fabricante (Bio-Plex Human Cytokine Assay; Bio-Rad Inc., Hercules, CA, EUA). As citocinas analisadas foram: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, CXCL-8 (IL-8), IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, MCP-1/CCL2, MIP-1β/CCL-4, IFN-γ e TNF-α. Os níveis de produção das citocinas mencionadas foram determinados pelo equipamento leitor de ensaios multiplex Luminex<sup>™</sup> Instrumentation System (Plex Workstation from Bio-Rad Laboratories, Inc.). As amostras de sobrenadantes de cada condição experimental foram analisadas em duplicata e a concentração de cada citocina calculada através do software Bio-Plex Manager.

#### **4.11 - Análises estatísticas**

Os resultados foram representados como média ± erro padrão. O número de replicatas experimentais independentes está especificado em cada legenda das figuras, bem como a

significância e o teste estatístico utilizado no determinado experimento. A análise estatística dos dados apresentados foram realizadas através do software GraphPad Prism 5.

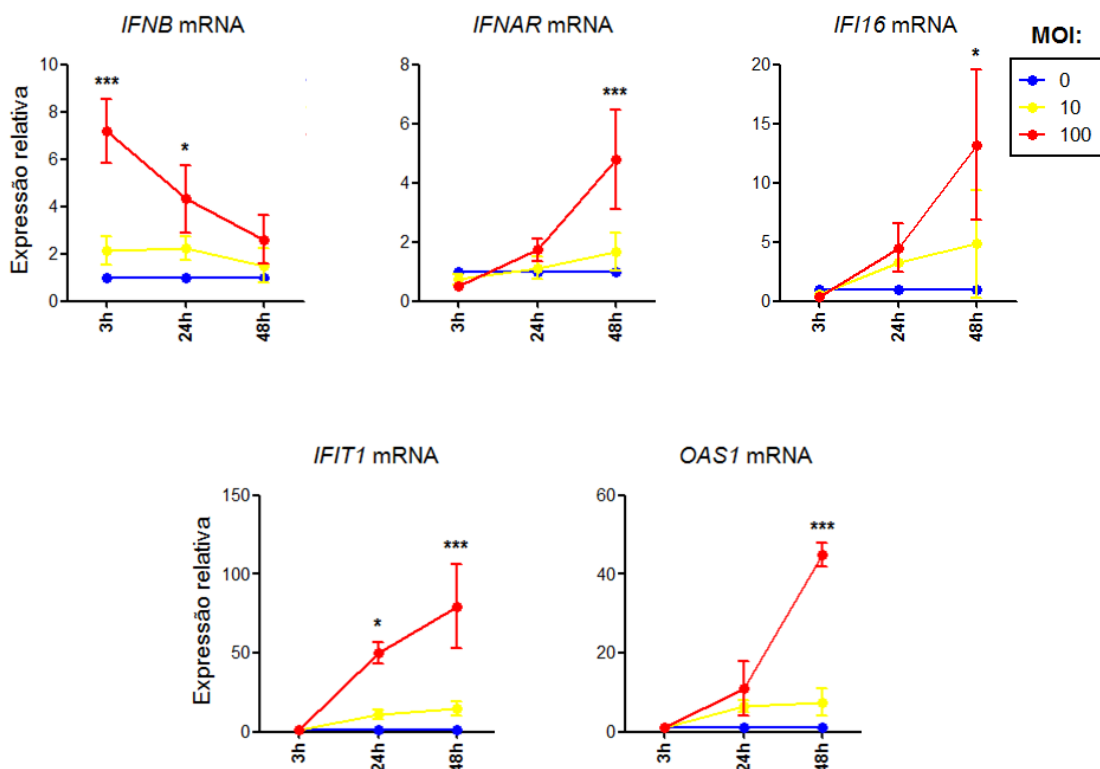


## **5. RESULTADOS**

### **5.1 – *M. leprae* induz *IFNB* e genes estimulados por IFN tipo I (ISG) em macrófagos derivados de células THP-1 (mdTHP-1)**

Conforme já mencionado, genes estimulados por IFN tipo I (ISG) foram encontrados diferencialmente expressos durante a infecção de células de Schwann primárias por *M. leprae* em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100:1 (bactérias/células) por 48 horas (Robottom-Ferreira, 2011). De maneira a estender e validar este resultado, utilizamos o modelo macrófagos derivados de células THP-1 após tratamento com PMA (mdTHP-1). Esse modelo tem sido empregado em nosso laboratório em estudos da interação micobactéria-célula hospedeira e validação de estudos de expressão gênica em larga escala (Guerreiro, 2012; Guerreiro et al., 2013). Guerreiro (2012) demonstrou que mdTHP-1 possuem uma alta capacidade fagocítica de micobactérias, independentemente da virulência e/ou viabilidade bacteriana (~90% após 24h de infecção). Adicionalmente, a expressão de diferentes moléculas associadas com padrões funcionais de diferenciação (CD14, CD163, CD209) foi também avaliada (dados não mostrados).

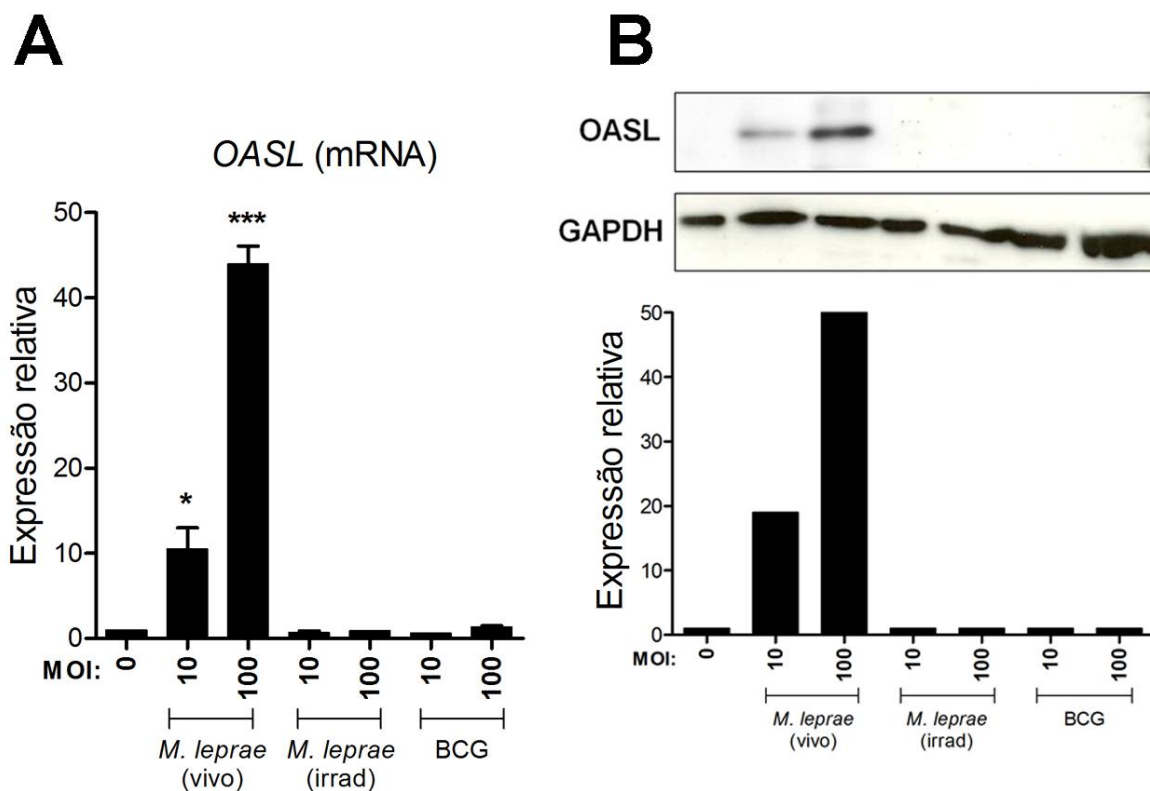
Inicialmente, buscamos avaliar a expressão de RNAm para ISGs no modelo utilizado neste estudo. Para isto, mdTHP-1 foram infectados com *M. leprae* vivo com MOI de 10:1 e 100:1 em uma série temporal de 3, 24 e 48 horas, e a expressão gênica analisada por qRT-PCR em tempo real. Estas condições nos permitiram observar uma rápida regulação positiva de *IFNB* já nos momentos iniciais de infecção (3h). Isto foi acompanhado do aumento da expressão gênica de ISG característicos como *OAS1* e *IFIT1*, bem como do receptor de IFN tipo I, *IFNAR*, além de *IFI16*, um receptor citoplasmático sensor de DNA dupla fita (Figura 5.1).



**Figura 5.1 – mdTHP-1 expressam *IFNB* e ISG após a infecção com *M. leprae* vivo.** Valores de expressão gênica normalizados (deltadeltaCt) dos genes descritos, a partir da infecção de mdTHP-1 por *M. leprae* vivo (MOI de 10:1 e 100:1) por 3, 24 e 48 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; \*  $p < 0.05$ ).

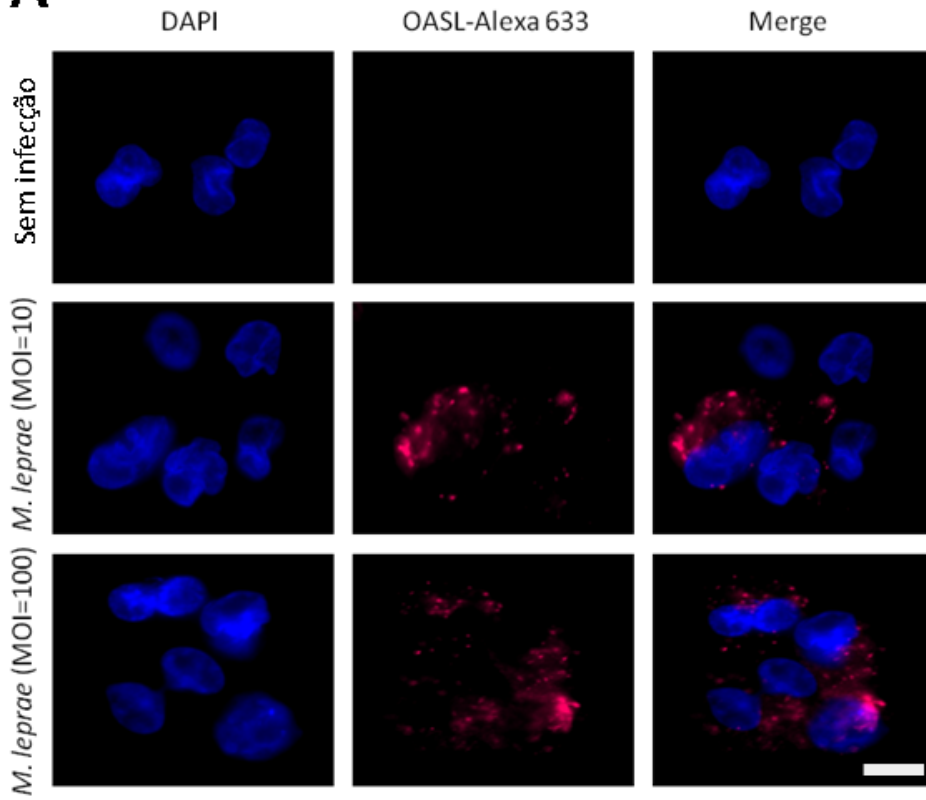
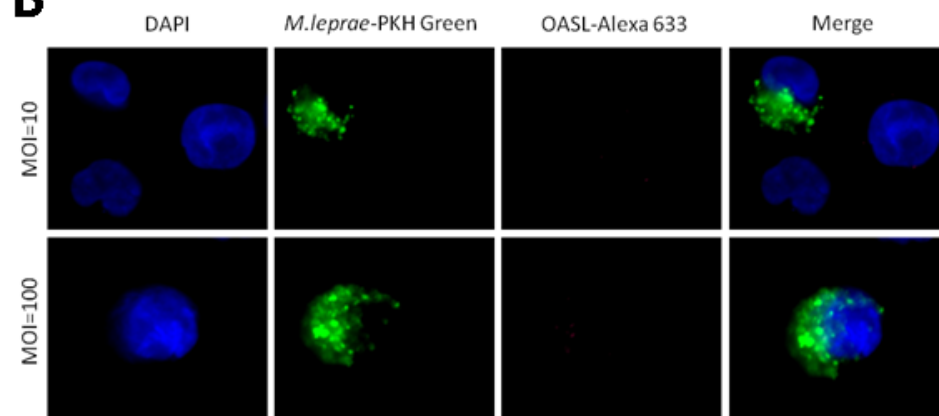
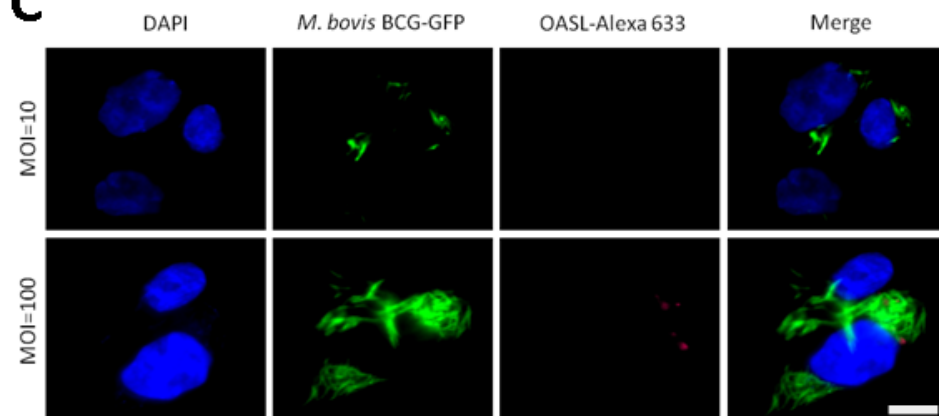
## 5.2 – *M. leprae* vivo, mas não *M. leprae* irradiado ou *M. bovis* BCG, induz a produção de OASL

Dentre os ISG diferencialmente expressos no ensaio de microarranjos utilizando o modelo de células de Schwann infectadas com *M. leprae* vivo, o gene *OASL*, o qual codifica a proteína 2' 5' oligoadenilato sintetase like, foi considerado o mais expresso (Robotton-Ferreira, 2011). Para caracterizar o efeito da infecção micobacteriana na produção de OASL no modelo de macrófagos humanos, mdTHP-1 foram infectados com *M. leprae* (vivo ou irradiado) ou com a cepa vacinal avirulenta *M. bovis* BCG, em MOI de 10:1 e 100:1, por 48 horas. Após o período de infecção, foi observado que somente o *M. leprae* vivo, mas não *M. leprae* irradiado ou *M. bovis* BCG, foi capaz de induzir, de forma dose-dependente, um aumento significativo da expressão gênica (Figura 5.2.1A) e dos níveis proteicos (Figura 5.2.1B) de OASL.

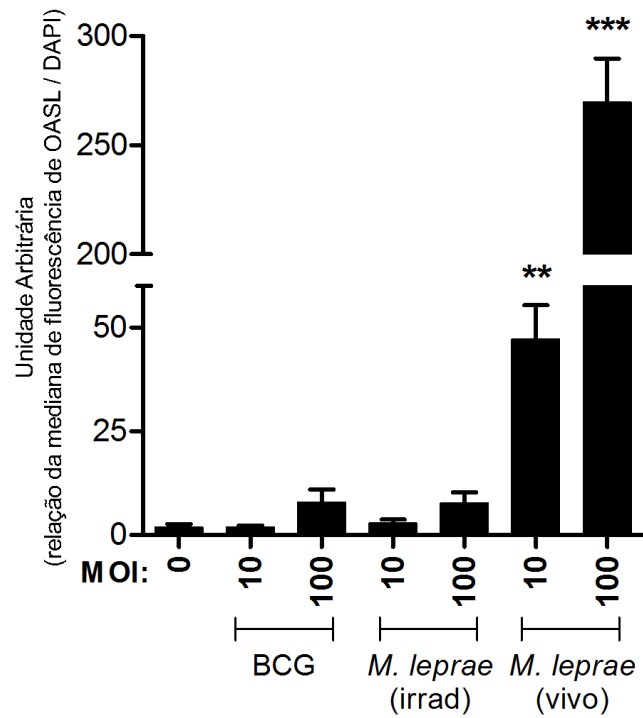


**Figura 5.2.1 – mdTHP-1 produzem OASL após a infecção por *M. leprae* vivo, mas não por *M. leprae* irradiado ou *M. bovis*-BCG.** (A) Valores de expressão gênica normalizados de *OASL* (deltadeltaCt) em mdTHP-1 infectadas com *M. leprae* (vivo ou irradiado) ou *M. bovis* BCG (MOI 10:1 ou 100:1) por 24 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3-5 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; \*  $p < 0.05$ ). (B) Análise da expressão de OASL pela técnica Western blot em células mdTHP-1 infectadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Adicionalmente é mostrada a análise densitométrica da intensidade de expressão das bandas, normalizada pela expressão de GAPDH. Experimento representativo.

Adicionalmente, a realização de imunofluorescência confirmou o efeito da infecção com *M. leprae* vivo na indução de OASL em mdTHP-1 (Figura 5.2.2A). Assim como observado anteriormente por expressão gênica (qRT-PCR) e níveis proteicos (Western blot), *M. leprae* irradiado e *M. bovis* BCG não induziram a produção de OASL (Figura 5.2.2B e C). Por fim, a quantificação da fluorescência confirmou que a indução de altos níveis de OASL é totalmente dependente da virulência e viabilidade micobacteriana (Figura 5.2.2D).

**A****B****C**

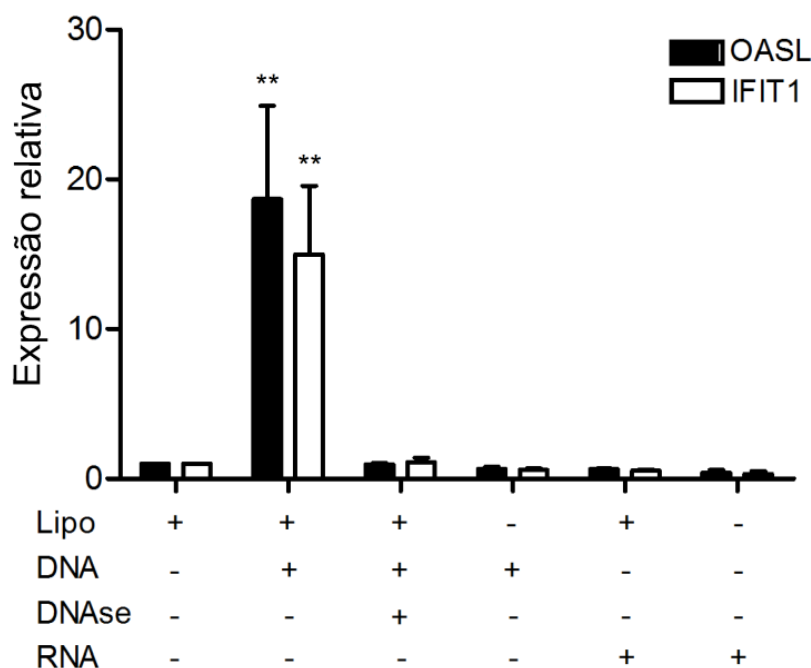
D



**Figura 5.2.2 - mdTHP-1 produzem OASL após a infecção por *M. leprae* vivo, mas não por *M. leprae* irradiado ou *M. bovis*-BCG.** Imunofluorescência detectando OASL marcado com Alexa 633 (vermelho) em mdTHP-1 infectados com *M. leprae* vivo (A), *M. leprae* irradiado previamente marcado com PKH67 (verde) (B) ou *M. bovis* BCG GFP (verde) (C) em MOI de 10:1 e 100:1 por 48 horas. A marcação nuclear foi realizada com DAPI (azul). Barra de escala: 10  $\mu$ m. (D) Análise quantitativa dos resultados de imunofluorescência. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3-5 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ; \*\*  $p < 0.001$ ).

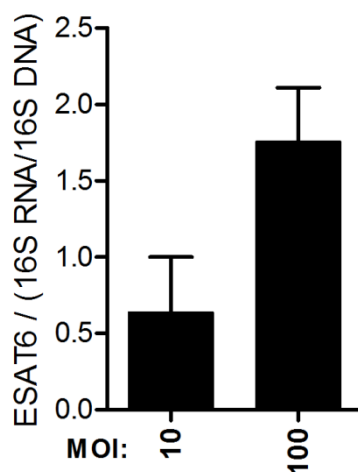
### 5.3 – *M. leprae* perfura o fagossomo da célula hospedeira e induz a expressão de *OASL* de maneira dependente do sensoriamento de DNA citoplasmático e ativação da sinalização STING/TBK1/IRF3

Recentemente, um estudo demonstrou que determinados sensores citoplasmáticos da célula hospedeira são capazes de reconhecer o DNA micobacteriano e dessa maneira iniciar uma resposta baseada em IFN tipo I (Manzanillo et al., 2012). Uma vez que *M. leprae* irradiado e *M. bovis* BCG não induzem a produção de *OASL*, buscamos testar a capacidade de DNA, ou RNA, de *M. leprae* em disparar uma resposta de IFN tipo I e consequentemente a produção de *OASL*. Para isso, mdTHP-1 foram expostas/transfectadas com DNA ou RNA de *M. leprae* (1 µg/4x10<sup>5</sup> células) por 24 horas. Após esse período, somente a transfecção de DNA de *M. leprae*, mas não de RNA, foi capaz de induzir altos níveis de *OASL*, juntamente com *IFIT1*, um ISG característico (Figura 5.3.1).



**Figura 5.3.1 – Transfecção de DNA de *M. leprae*, mas não de RNA, induz *OASL* em mdTHP-1.** Valores de expressão gênica normalizados (deltadeltaCt) de *OASL* e *IFIT1* após 24 horas de transfecção utilizando lipofectamina (Lipo; agente de transfecção: controle), DNA ou RNA de *M. leprae* (1 µg/4x10<sup>5</sup> células) ou DNA de *M. leprae* tratado com DNase. Adicionalmente, as células foram tratadas com DNA ou RNA de *M. leprae* na ausência do agente de transfecção. Os resultados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\* p<0.001).

É sabido que tanto o *M. tuberculosis* quanto o *M. leprae* são capazes de perfurar o fagossomo da célula hospedeira através de um mecanismo dependente da expressão de ESAT-6, um importante fator de virulência micobacteriano (van der Wel et al., 2007). Dessa forma, componentes bacterianos, como o DNA, são prontamente capazes de penetrar no citoplasma da célula hospedeira e assim ativar sensores citoplasmáticos de DNA responsáveis por iniciar uma cascata de sinalização que leva a indução de IFN tipo I (Manzanillo et al., 2012). De fato, a análise da expressão gênica de *ESAT6* nas culturas de mdTHP-1 infectados com *M. leprae* vivo (MOI 10:1 e 100:1) após 24 horas de infecção indicaram a produção dessa proteína micobacteriana durante a infecção (Figura 5.3.2).

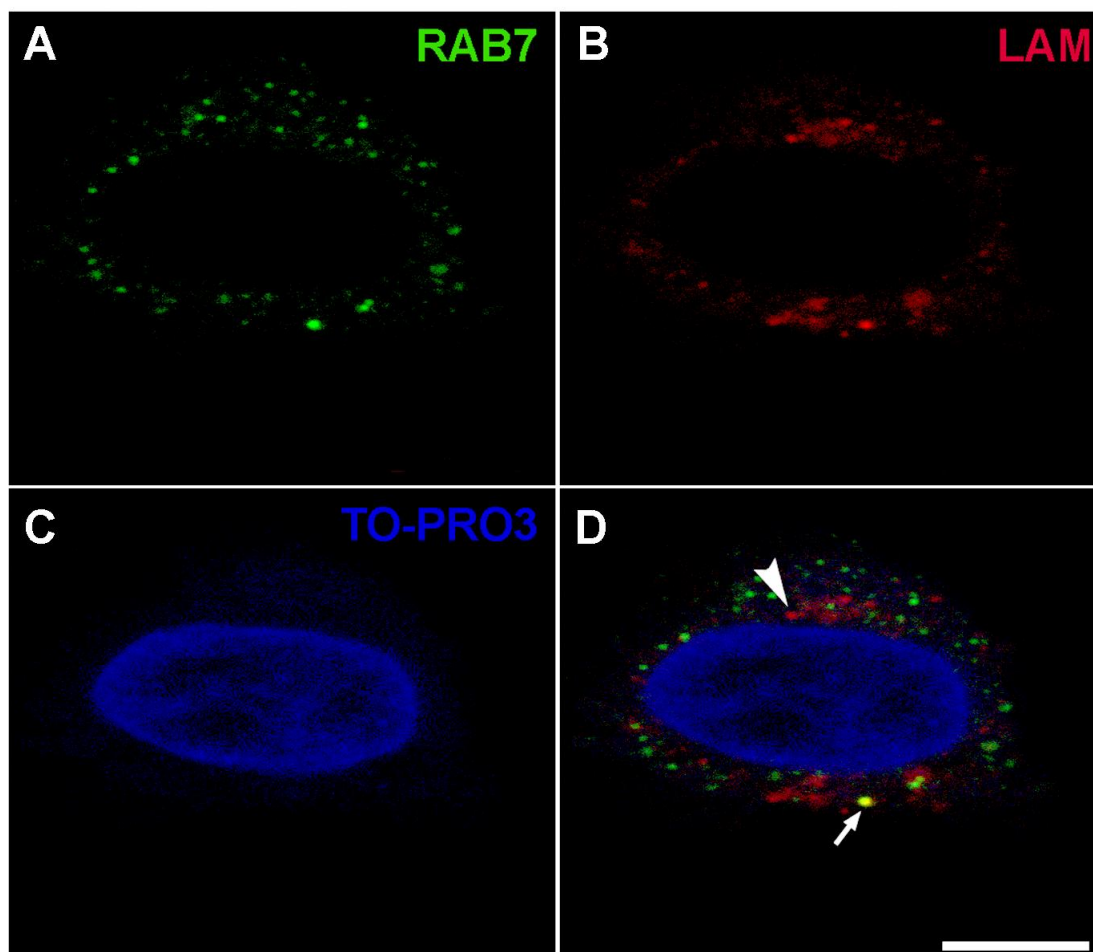


**Figura 5.3.2 – *M. leprae* expressa *ESAT6* durante a infecção de mdTHP-1.** Valores de expressão gênica normalizados de *ESAT6* (deltaCt) em células mdTHP-1 infectadas com *M. leprae* (MOI 10:1 e 100:1) por 24 horas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes.

Para testar a capacidade do *M. leprae* em perfurar o fagossomo durante a infecção de mdTHP-1, foi realizada microscopia confocal para a detecção de lipoarabinomanana (LAM), um abundante componente da parede celular micobacteriana, e RAB7, uma proteína encontrada especificamente em fagossomos tardios. Para isso, mdTHP-1 foram infectados com *M. leprae* vivo (MOI 100:1) durante 24 horas. De fato, o citosol apresentou marcação positiva para LAM (LAM<sup>+</sup>/RAB7) (Figura 5.3.3), confirmando, assim, a perfuração



fagossomal e o possível mecanismo responsável pela ativação de receptores citoplasmáticos que levam a indução da resposta celular baseada em IFN tipo I.

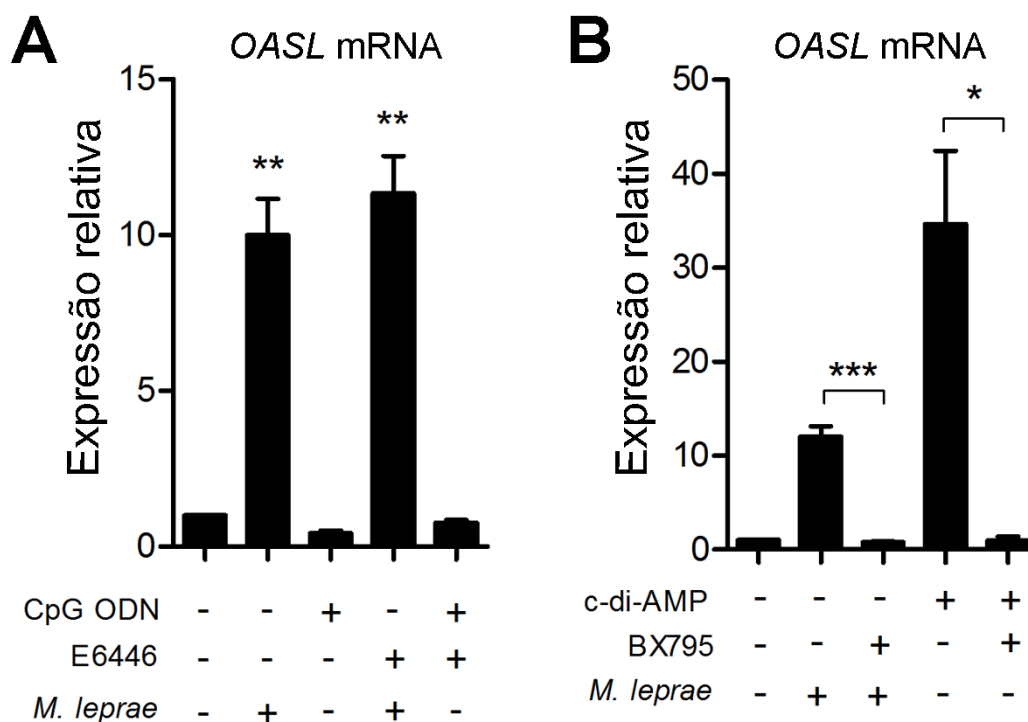


**Figura 5.3.3 – Componentes do *M. leprae* são encontrados no citosol de mdTHP-1 durante a infecção.** Microscopia confocal demonstrando componentes da parede celular do *M. leprae* (LAM; vermelho; A) presentes em fagossomos (RAB7; verde; B) de mdTHP-1 (LAM<sup>+</sup>/RAB7<sup>+</sup>; seta; D) ou no citosol (LAM<sup>+</sup>/RAB7<sup>-</sup>; ponta de seta; D). Os núcleos foram corados com TO-PRO3 (azul; C). Barra de escala: 10 µm.

A produção de IFN tipo I pode ser mediada por diferentes receptores de reconhecimento de padrão como TLRs, receptor NOD2 (Pandey et al., 2009) ou sensores citoplasmáticos de DNA (Takaoka et al., 2007; Unterholzner et al., 2010; Parvatiyar et al., 2012). Com o objetivo de caracterizar a sinalização envolvida na indução de IFN tipo I e OASL durante a infecção por *M. leprae*, primeiramente, eliminamos a possibilidade da participação de outras vias de reconhecimento de ácidos nucleicos, como o reconhecimento de DNA mediado por TLR9. Inicialmente, verificamos que o tratamento de mdTHP-1 com CpG

(1  $\mu$ M; agonista de TLR9) não foi capaz de induzir a expressão gênica de *OASL* (Figura 5.3.4A). Adicionalmente, testamos a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão gênica de *OASL* em mdTHP-1 na presença de E6446, um antagonista farmacológico de TLR sensores de ácidos nucleicos (Franklin et al., 2011). Para tal, mdTHP-1 foram tratados com o E6446 (2  $\mu$ M) por 6 horas e depois infectados com *M. leprae* vivo (MOI 10:1) por 24 horas. Como pode ser observado na figura 5.3.4A, a presença de E6446 durante o período de infecção não afetou a indução de *OASL* mediada por *M. leprae*. Recentemente, um estudo demonstrou que *OASL* está envolvido na regulação de IFN do tipo I através do bloqueio do fator de transcrição IRF7. Este por sua vez, é responsável pela produção de IFN- $\alpha$ , uma importante citocina da classe dos IFN do tipo I com um papel crucial na resposta antiviral (Lee et al., 2013). Dosagens realizadas a partir de sobrenadantes de cultura de mdTHP-1 infectados com *M. leprae* (vivo e irradiado) ou *M. bovis* BCG não detectaram a produção de IFN- $\alpha$  durante a infecção (dados não mostrados).

Manzanillo e colaboradores (2012) mostraram que, durante a infecção por *M. tuberculosis*, a ativação de receptores citoplasmáticos de DNA induz o eixo de sinalização STING/TBK1/IRF3, o qual participa diretamente na indução de IFN- $\beta$  e ISG, como *OASL*. Além disso, STING foi demonstrado ser um sensor de dinucleotídeos cíclicos (Burdette et al., 2011). Como próximo passo, buscamos determinar a participação do eixo STING/TBK1/IRF3 na indução de *OASL* durante a infecção por *M. leprae*. Para isso, mdTHP-1 foram tratadas com BX795 (6  $\mu$ M), um inibidor farmacológico da atividade de TBK1 (Clark et al., 2009), por 1 hora e depois infectadas com *M. leprae* vivo (MOI 10:1) por 24h. Além disso, como controle positivo, as células foram estimuladas com c-di-AMP (1  $\mu$ g/ml), um dinucleotídeo cíclico ligante de STING (Woodward et al., 2010; Jin et al., 2011). Dessa forma, o tratamento de mdTHP-1 com BX795 foi capaz de inibir significativamente a indução de *OASL* durante a infecção por *M. leprae* vivo, bem como durante o estímulo com c-di-AMP, confirmando, assim, a participação da sinalização STING/TBK1/IRF3 e do ligante bacteriano c-di-AMP na indução de *OASL* (Figura 5.3.4B).



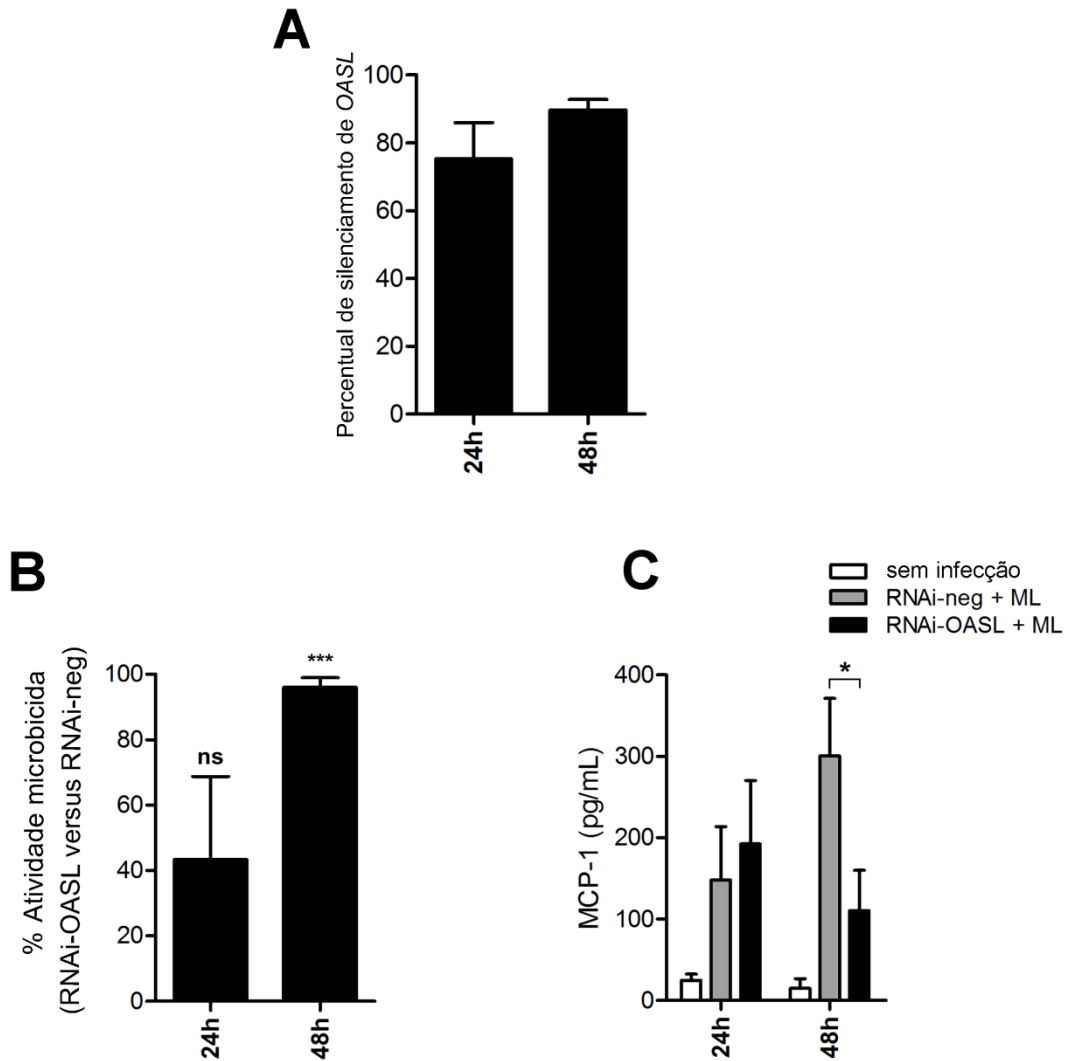
**Figura 5.3.4 – *M. leprae* induz *OASL* em mdTHP-1 via sinalização STING/TBK1/IRF3.** (A) Valores normalizados de expressão gênica (deltadeltaCt) de *OASL* em mdTHP-1 estimuladas com CpG (1  $\mu$ M) ou infectadas com *M. leprae* vivo (MOI 10:1) por 24 horas na presença, ou não, de E6446 (2  $\mu$ M). (B) Valores normalizados de expressão gênica (deltadeltaCt) de *OASL* em mdTHP-1 estimuladas com c-di-AMP (1  $\mu$ g/ml) ou infectadas com *M. leprae* vivo (MOI 10:1) por 24 horas na presença, ou não, de BX795 (6  $\mu$ M). Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por teste *t* de Student (\*  $p=0.01$ ; \*\*  $p=0.001$ ; \*\*\*  $p=0.0006$ ).

#### 5.4 – Silenciamento gênico de *OASL* afeta a produção de CCL2/MCP-1 e diminui a viabilidade intracelular do *M. leprae*

Para determinar a importância do *OASL* durante a infecção micobacteriana, avaliamos o efeito do silenciamento da expressão deste gene em mdTHP-1 (através de RNA de interferência; RNAi) na produção de citocinas/quimiocinas, bem como seu papel na viabilidade intracelular do *M. leprae*. Primeiramente, mdTHP-1 foram transfectados com RNAi específico para *OASL*, e com RNAi *scramble* (controle negativo da transfecção), por 24 horas e, em seguida, infectados com *M. leprae* vivo (MOI 20:1) por 24 e 48 horas. Análise da expressão gênica de *OASL* após os períodos de infecção demonstrou uma alta eficiência na redução da expressão de mRNA de *OASL* com a utilização do RNAi específico (Figura 5.4A).

Uma vez que o *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro*, a estimativa da viabilidade do patógeno foi determinada por ensaio de RT-PCR baseado na razão *M. leprae* 16S RNA por *M. leprae* 16S DNA (Martinez et al., 2009). Dessa forma, o silenciamento de *OASL* reduziu significativamente a sobrevivência intracelular do *M. leprae* após 48 horas de infecção (Figura 5.4B). Com isso, nossos dados sugerem que a indução de IFN tipo I, bem como *OASL*, na infecção por *M. leprae* pode ser considerado um mecanismo de evasão da resposta do hospedeiro responsável pela eliminação da micobactéria.

Em seguida, avaliamos o efeito do silenciamento de *OASL* na liberação de importantes citocinas/quimiocinas durante a infecção de mdTHP-1 por *M. leprae* vivo. Para tal, os sobrenadantes dos experimentos de silenciamento foram submetidos a uma análise multiplex de 17 citocinas/quimiocinas pelo sistema Luminex®. Como observado na Figura 5.4C, o silenciamento de *OASL* reduziu significativamente a produção de CCL2/MCP-1 induzida pela a infecção por *M. leprae* vivo. Nenhuma outra citocina/quimiocina foi encontrada diferencialmente secretada nas condições analisadas (dados não mostrados).

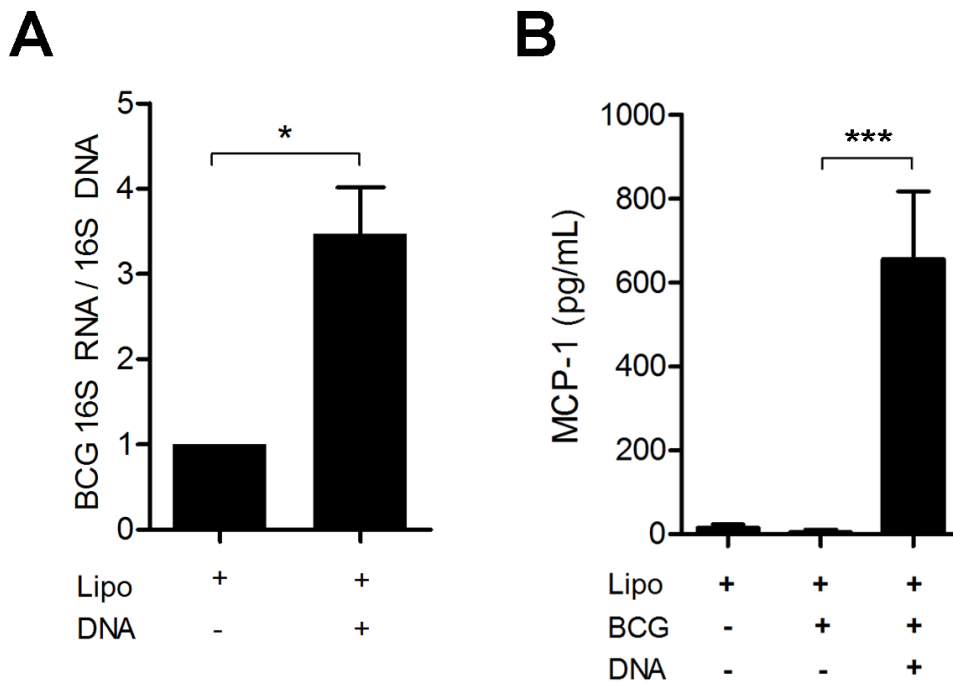


**Figura 5.4 – Silenciamento de *OASL* afeta a produção de CCL-2/MCP-1, bem como a viabilidade intracelular do *M. leprae* durante a infecção de mdTHP-1.** (A) A expressão gênica de *OASL* foi calculada pelo método  $\Delta\Delta Ct$  e o percentual de silenciamento determinado a partir da condição de mdTHP-1 transfectados com RNAi específico para *OASL* em relação a condição RNAi scramble. (B) A viabilidade intracelular do *M. leprae* após os períodos de infecção (24 e 48 horas) foi estimada a partir da razão entre 16S RNA e 16S DNA detectado por qRT-PCR e o percentual de aumento ou diminuição determinado a partir da condição de mdTHP-1 transfectados com RNAi específico para *OASL* em relação a condição RNAi *scramble*. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por teste *t* de Student (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ). (C) Detecção de CCL-2/MCP-1 em sobrenadantes de mdTHP-1 sob as condições descritas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*  $p < 0.05$ ).

## **5.5 – A transfecção de DNA de *M. leprae* reverte o fenótipo avirulento de *M. bovis* BCG durante a infecção em mdTHP-1**

Rindeau e Kornfeld (2003) demonstraram que mdTHP-1 são capazes de conter a infecção por micobactérias avirulentas, como o *M. bovis* BCG, ao passo que micobactérias virulentas, como o *M. tuberculosis*, podem estabelecer um nicho de replicação nessas células. Uma vez que a indução de IFN tipo I e, conseqüentemente, ISG como o *OASL*, está fortemente relacionada com o sucesso da infecção de micobactérias virulentas, decidimos testar o quanto a indução de IFN tipo I influenciaria na infecção por uma micobactéria avirulenta.

Como demonstrado anteriormente, a transfecção de DNA micobacteriano é prontamente capaz de induzir ISG (Figura 5.3.1). Nesse contexto, mdTHP-1 foram transfectados com DNA de *M. leprae* por 24 horas e em seguida infectados com a cepa vacinal avirulenta *M. bovis* BCG por 72 horas. Interessantemente, a transfecção de DNA de *M. leprae* resultou no aumento significativo da viabilidade intracelular do *M. bovis* BCG após 72 horas de infecção quando comparado a condição controle (células infectadas e incubadas somente com o agente de transfecção). Em seguida, a avaliação da secreção de citocinas/quimiocinas dos sobrenadantes dessas condições demonstrou que o aumento da viabilidade foi acompanhado de um aumento significativo na secreção CCL-2/MCP-1. Curiosamente, esse é o mesmo fenótipo observado durante a infecção por *M. leprae*. Dessa maneira, esses resultados sugerem que a indução de IFN tipo I e ISG mediada pelo DNA micobacteriano é crucial para reverter o fenótipo microbicida de célula hospedeira e garantir, dessa forma, um nicho seguro para a replicação micobacteriana.



**Figura 5.5 – Transfecção de DNA de *M. leprae* aumenta a sobrevivência intracelular do *M. bovis*-BCG juntamente com a indução de CCL2/MCP-1 em mdTHP-1.** (A) A viabilidade intracelular do *M.bovis*-BCG após o período de infecção (72 horas) nas diferentes condições foi estimada a partir da razão entre 16S RNA e 16S DNA detectado por qRT-PCR. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por teste *t* de Student (\* $p=0.05$ ). (B) Detecção de CCL2/MCP-1 em sobrenadantes de mdTHP-1 sob as condições descritas em A. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\* $p<0.0001$ ).

## **6. DISCUSSÃO**



## 6.1 - Investigação do papel do IFN tipo I e OASL na patogênese da hanseníase

Abordagens de expressão gênica global representam valiosas ferramentas para a compreensão dos processos biológicos envolvidos na interação patógeno-hospedeiro, patogênese ou ainda progressão para doença. Nos últimos anos diversos estudos, de forma independente, apontaram uma associação crítica entre a indução da resposta imune baseada em IFN tipo I e a patogênese de doenças micobacterianas como tuberculose e hanseníase (Berry et al., 2010; Maertzdorf et al., 2011; Ottenhoff et al., 2012; Robottom-Ferreira, 2011; Teles et al., 2013). Adicionalmente, Manzanillo e colaboradores demonstraram que a indução de IFN tipo I na infecção por *M. tuberculosis* é dependente da sinalização celular baseada em receptores citoplasmáticos sensores de DNA (CDS), onde, uma vez ativados levam a indução de IFN- $\beta$  e cria, dessa forma, um ambiente favorável à replicação micobacteriana (Manzanillo et al., 2012). Nesse contexto, o presente estudo é o primeiro a sugerir que a infecção *in vitro* por *M. leprae* vivo leva a ativação de CDS e consequente indução de IFN- $\beta$ , mas não IFN- $\alpha$ . Além disso, nossas análises tiveram o foco voltado na participação de um novo gene, *OASL*, o qual é induzido por IFN tipo I em tempos tardios de infecção *in vitro* (a partir de 24 horas). Nossos resultados demonstraram que o *OASL* tem uma participação crucial na regulação negativa da resposta imune do hospedeiro contra a infecção micobacteriana, identificando, assim, um novo mecanismo antimicrobicida.

A investigação de processos biológicos nos tempos iniciais de infecção é crucial para observar e entender os mecanismos utilizados pelo patógeno a fim de garantir o estabelecimento da infecção, como por exemplo, a modulação da expressão gênica do hospedeiro. Inicialmente, nosso grupo buscou identificar novos mecanismos envolvidos com a patogênese da hanseníase. Para isso, foi utilizado o modelo de células de Schwann primárias humanas infectadas com *M. leprae* vivo, em MOI de 100:1 por 24 e 48 horas e a expressão gênica global das células infectadas avaliada por ensaio de microarranjos. Este estudo identificou a classe de genes induzidos por IFN do tipo I como enriquecidos entre os genes encontrados diferencialmente expressos (Robottom-Ferreira, 2011). Esses resultados corroboram com estudos recentes de expressão gênica global que identificaram IFN tipo I e genes dessa classe induzidos em pacientes com tuberculose ativa quando comparados aqueles com a forma latente da doença (Berry et al., 2010; Maertzdorf et al., 2011; Ottenhoff et al., 2012). Um estudo do nosso laboratório, o qual consistiu na reanálise de estudos de microarranjos depositados no banco de dados “Gene Expression Omnibus” (GEO), também confirmou a participação da via de IFN tipo I como enriquecida na infecção por *M. tuberculosis* (Ferreira, 2011). Outro estudo recente demonstrou que IFN- $\beta$  é

preferencialmente expresso na forma lepromatosa, que é conhecida por ser a forma disseminada da hanseníase (Teles et al., 2013). A indução de IFN- $\gamma$  é crucial para a eliminação de patógenos intracelulares (Cooper et al., 1997), como o *M. tuberculosis*, ao passo que a produção de IFN tipo I se mostra ineficiente contra infecções bacterianas. Por outro lado, os IFNs tipo I são classicamente conhecidos por induzirem um estado celular antiviral – levando a expressão de genes envolvidos no controle da infecção viral – além de possuírem efeitos imunomoduladores (Perry et al., 2005). Em infecções por bactérias intracelulares patogênicas como *Lysteria monocytogenes* e *M. tuberculosis*, a produção de IFN tipo I possui efeitos imunomoduladores responsáveis por subverter a resposta celular do hospedeiro contra esses patógenos (Manca et al., 2001; O’Connell et al., 2004).

Dentre os genes induzidos por IFN tipo I encontrados diferencialmente expressos no microarranjo realizado por nosso grupo, o *OASL* apresentou a maior expressão diferencial (esses resultados podem ser encontrados no Anexo II). O gene *OASL* codifica a proteína 2’ 5’ oligoadenilato sintetase *like*. Esta proteína foi descrita em 1998 por Hartmann e colaboradores e faz parte família das oligoadenilato sintetases, uma família de proteínas conservadas induzidas por IFN tipo I. A *OASL* compartilha com as outras proteínas dessa classe (*OAS1*, 2 e 3) um domínio N-terminal altamente conservado, porém difere completamente em sua porção C-terminal, a qual é formada por dois domínios de sequências “ubiquitina-like” (Hartmann et al., 1998). A ativação de *OAS1-3* leva a ligação dessas proteínas a RNase L, a qual consequentemente é ativada. Uma vez ativa, RNase L é capaz de degradar RNAs de origem viral e celular, diminuindo assim a síntese proteica e o crescimento viral (Dong et al., 1995). Entretanto, diferentemente das outras proteínas da classe, a *OASL* não é capaz de ativar RNase L, além de não ter sido detectada nenhuma atividade enzimática (Hartmann et al., 1998; Eskildsen et al., 2003). Apesar disso, diferentes estudos demonstraram que a *OASL* é altamente induzida por diferentes tipos de infecções virais, como por vírus da hepatite C (HCV) (Ishibashi et al., 2010), vírus da dengue (DV) (Warke et al., 2003) e vírus Influenza A (Melchjorsen et al., 2009). Adicionalmente, foi demonstrado que a *OASL* possui um consistente papel antiviral, porém com uma atuação diferenciada das outras proteínas *OAS*, de forma independente da ativação de RNase L, e, aparentemente dependente do domínio “ubiquitina-like” presente na porção C-terminal (Marques et al., 2008). Mais recentemente foi demonstrado que o *OASL* possui um papel regulador da produção de IFN tipo I através da ativação do fator de transcrição IRF7 (Lee et al., 2013).

Como seguimento, o presente estudo inicialmente estendeu e validou a indução de IFN tipo I e *OASL* na infecção por *M. leprae* vivo, utilizando o modelo de macrófagos derivados

de células THP-1 (mdTHP-1) através do tratamento por PMA. Esse modelo tem sido empregado de forma eficiente para o estudo da interação entre micobactéria e célula hospedeira e recentemente foi demonstrado que células THP-1 infectadas com *M. tuberculosis* apresentam um perfil de expressão de IFN tipo I e genes induzidos por IFN (ISG) semelhante ao perfil encontrado em pacientes com tuberculose ativa (Wu et al., 2012). No presente estudo, mdTHP-1 foram infectados com *M. leprae* vivo em uma série temporal (3, 24 e 48 horas) em MOI de 10:1 e 100:1 e a expressão de *IFNB* e ISGs avaliada. Com isso, observamos uma indução precoce de *IFNB* e consequente ativação de ISGs característicos (*OAS1*, *IFIT1*), além do aumento da expressão do receptor de IFN tipo I (*IFNAR*). Em seguida, para avaliar as condições que levam a indução de OASL, mdTHP-1 foram infectados com *M. leprae* (vivo e irradiado) e *M. bovis* BCG, uma cepa micobacteriana vacinal avirulenta, em MOI de 10:1 e 100:1. Utilizando esse modelo, mostramos que somente *M. leprae* vivo, mas não irradiado e nem *M. bovis* BCG, foi capaz de induzir, de maneira dose-dependente, a expressão de mRNA de OASL, bem como a produção da proteína. Recentemente, foi demonstrado que a indução de IFN tipo I e ISGs na infecção por *M. tuberculosis* é dependente do sistema de virulência ESX-1, onde ESAT-6 representa a principal proteína desse sistema (Manzanillo et al., 2012). Isso é capaz de explicar o motivo pelo qual *M. leprae* irradiado (não produz ESAT-6) e do *M. bovis*-BCG (o qual teve a região RD1, onde está localizado o gene ESAT-6, deletada durante o processo de atenuação) não induzem a produção de OASL em nosso modelo. Em conjunto, esses resultados demonstram que a ativação da via de IFN tipo I e ISGs é específica a espécies virulentas de micobactérias, sendo dependente, ainda, da viabilidade do patógeno.

Em nosso estudo, análises da expressão gênica do *M. leprae* durante a infecção de mdTHP-1 apontaram a expressão de ESAT-6. Em adição, através de microscopia confocal, detectamos a presença de componentes da parede micobacteriana no citosol da célula hospedeira, sugerindo, dessa maneira, que o *M. leprae* pode permeabilizar o fagossomo em que reside. Recentemente, van der Wel e colaboradores demonstraram que tanto *M. leprae*, quanto o *M. tuberculosis*, são capazes de escapar do fagossomo, e assim, penetrar no citosol da célula hospedeira de maneira dependente de ESX-1 (van der Wel et al., 2007). Outro estudo demonstrou que *Mycobacterium marinum*, uma micobactéria capaz de causar infecções oportunistas em humanos, também possui um mecanismo de evasão do fagossomo, dependente de ESX-1 (Smith et al., 2008). Uma vez que ESAT-6 possui propriedades líticas (de Jonge et al., 2007), sugere-se que essa proteína é o componente principal de ESX-1

responsável por induzir a perfuração do fagossomo e mediar o acesso ao citosol. Portanto, nossos dados confirmam os observados anteriormente na literatura.

A indução de IFN tipo I pode ocorrer por meio de diferentes vias de sinalização, mediadas pela ligação de ácidos nucleicos a PRRs como TLRs ou receptores citosólicos sensores de DNA (CDS). Entretanto, as vias de sinalização que levam a transcrição de IFN tipo I no contexto da infecção por micobactérias ainda permanecem controversas. Wu e colaboradores (2012), através de análises de predição da ligação de fatores de transcrição a genes induzidos por IFN tipo I, mostraram a potencial participação dos fatores de transcrição IRF1 e IRF7 como ativadores centrais dessa resposta. Outro trabalho sugere a participação do eixo de sinalização NOD2/RIP2/IRF5, bem como a cooperação de TBK1/IRF3 para a produção de IFN tipo I (Pandey et al., 2009). Ainda nesse contexto, Manzanillo e colaboradores (2012) demonstraram que a permeabilização do fagossomo, via ESX-1 na infecção por *M. tuberculosis*, permite o acesso de DNA extracelular micobacteriano a CDS da célula hospedeira, resultando na produção de IFN tipo I através do eixo de sinalização STING/TBK1/IRF3. Interessantemente, em nosso estudo verificamos que a transfecção de DNA de *M. leprae*, mas não de RNA, foi capaz de induzir a expressão de *OASL*, juntamente com *IFIT1*, o que caracteriza a ativação da via de IFN tipo I. De fato, estudos recentes sugerem que os sensores de DNA IFI16 e DDX41 possuem um papel crucial em disparar a resposta baseada em IFN tipo I e ISGs através da molécula adaptadora/sensorial STING, a qual é responsável por mediar a fosforilação do fator de transcrição IRF3 através de TBK1 (Unterholzner et al., 2010; Parvatiyar et al., 2012). Adicionalmente, têm sido demonstrados que mensageiros secundários bacterianos, tais como c-di-AMP e c-di-GMP, são capazes de induzir uma robusta produção de IFN tipo I através da sinalização STING/TBK1/IRF3 (Parvatiyar et al., 2012). Essas moléculas possuem um papel importante na regulação da fisiologia bacteriana, e uma vez que mamíferos não produzem esses mensageiros, o reconhecimento dessas moléculas pelo sistema imune indica a presença de patógenos. Dessa forma, essas evidências sugerem que o acesso do DNA micobacteriano ao citosol da célula hospedeira, mediado pela permeabilização fagossomal via ESX-1, é o principal mecanismo responsável pela ativação da via IFN tipo I e ISGs.

Baseados em estudos publicados já mencionados e em conjunto com nossos dados, temos fortes evidências que a infecção por *M. leprae* em nosso modelo induz IFN tipo I e, conseqüentemente *OASL*, de maneira dependente da ativação do eixo STING/TBK1/IRF3. Para confirmar essas evidências, primeiramente excluimos a participação de sensoriamento de DNA através de TLR9, o qual é responsável por iniciar a produção de IFN- $\alpha$  após a detecção

de DNA CpG encontrado em bactérias e vírus. Inicialmente, o tratamento de mdTHP-1 com DNA CpG não induziu a expressão de *OASL*, ao passo que o tratamento dessas células com E6446, um conhecido antagonista farmacológico de TLRs sensores de ácidos nucleicos, não afetou a expressão de *OASL* mediada pela infecção com *M. leprae*. Além disso, não foi detectada a produção de IFN- $\alpha$  nos sobrenadantes de mdTHP-1 infectadas com *M. leprae*. Com isso, esses resultados sugerem que a indução de *OASL* mediada por DNA é independente da sinalização de TLR9. Em seguida, a transfecção de c-di-AMP induziu uma robusta produção de *OASL*, indicando a ativação de IFN tipo I. Finalmente, o tratamento de mdTHP-1 com BX795, um inibidor farmacológico da atividade catalítica de TBK1, inibiu significativamente a expressão de *OASL* induzida pela infecção com *M. leprae*. Dessa maneira, nossos resultados corroboram com as evidências recentes que demonstram que micobactérias virulentas, como *M. tuberculosis*, induzem IFN tipo I e ISGs de maneira dependente da sinalização STING/TBK1/IRF3, o que contribui para o sucesso da infecção. De fato, camundongos *knockout* para o fator de transcrição IRF3 (*IRF3*<sup>-/-</sup>) são extremamente resistentes à infecção por *M. tuberculosis* (Manzanillo et. al, 2012).

Micobactérias virulentas, como o *M. leprae*, são capazes de modular diferentes processos celulares a favor de sua sobrevivência. Apesar de se conhecer os efeitos promicobactéria do IFN tipo I, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares modulados por essas citocinas que levam, de fato, ao sucesso da infecção micobacteriana. Teles e colaboradores mostraram que a resposta microbicida dependente de IFN- $\gamma$  e vitamina D pode ser inibida pela produção de IFN- $\beta$  (Teles et al., 2013). Outro estudo apontou que a infecção por *M. tuberculosis* é capaz de regular negativamente a produção de IL-1 $\beta$  de maneira depende da indução da via de IFN tipo I (Novikov et al., 2011). O presente estudo é o primeiro a demonstrar a participação direta de um ISG, o *OASL*, na regulação da resposta microbicida da célula hospedeira durante a infecção com uma micobactéria patogênica. Demonstramos, ainda, que o silenciamento específico de *OASL* durante a infecção por *M. leprae* levou à diminuição da viabilidade intracelular do patógeno, juntamente com a redução de liberação da quimiocina CCL2/MCP-1.

Um estudo recente demonstrou que o silenciamento de Parkina, uma ubiquitina ligase, onde estudos genéticos mostraram uma consistente associação com a hanseníase, apresentou um efeito semelhante ao observado no silenciamento de *OASL*, reduzindo a produção de CCL2/MCP-1 durante a infecção com *M. leprae* (de Léséleuc et al., 2013). A indução desta quimiocina está associada com a inibição da resposta imune celular e possui participação ativa na diferenciação e polarização de linfócitos Th2. Camundongos *knockout* para CCL2/MCP-1

(*MCPI*<sup>-/-</sup>) não são capazes de induzir uma resposta adaptativa do tipo Th2 e são resistentes à infecção por *Leishmania major* (Gu et al., 2000). Outro estudo demonstrou que a infecção com *M. leprae* tem papel regulatório ativo na liberação de citocinas e quimiocinas em monócitos, regulando negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e induzindo altos níveis de CCL2/MCP-1 e do antagonista do receptor de IL-1(IL-1Ra) (Sinsimer et al., 2010). De fato, análises dos níveis de CCL2/MCP-1 no soro de pacientes com hanseníase apontam alta produção desta quimiocina naqueles pacientes classificados como LL (Lew et al., 2002). A produção elevada de CCL2/MCP-1 também é observada em pacientes com tuberculose pulmonar ativa e está associada à severidade da doença (Hasan et al., 2009). Além disso, a indução de CCL2/MCP-1 é capaz de inibir a produção de IL-12 em monócitos infectados com *M. tuberculosis*. Esse mesmo estudo mostrou, através de uma abordagem genética, que indivíduos com certos polimorfismos na região promotora do gene *MCPI*, responsáveis por induzir maiores níveis de CCL2/MCP-1, possuem o risco aumentado em cinco vezes de desenvolver tuberculose, apontando, ainda, uma relação inversa entre a produção de CCL2/MCP-1 e IL-12 (Flores-Villanueva et al., 2005). Interessantemente, camundongos *MCPI*<sup>-/-</sup> possuem uma baixa deposição de lipídeos mesmo sob uma dieta rica em colesterol, mostrando um papel crucial de CCL2/MCP-1 no metabolismo de lipídeos e no desenvolvimento de aterosclerose (Gu et al., 1998). Isso possui relação direta com a indução de CCL2/MCP-1 durante a infecção por *M. leprae*, onde, provavelmente, a produção dessa quimiocina mediada pelo patógeno tenha uma papel relevante na regulação positiva do metabolismo de lipídeos e na formação corpúsculos lipídicos, processos favoráveis à replicação do bacilo. Nesse contexto, nosso estudo demonstra uma relação direta entre a resposta baseada em IFN tipo I e a produção de CCL2/MCP-1 durante a infecção, onde o OASL é a molécula chave nesse processo. Dessa maneira, a indução de OASL nos momentos iniciais da infecção por *M. leprae* tem um papel crucial na modulação negativa da resposta protetora do hospedeiro contra micobactérias, através da indução de CCL2/MCP-1, representando assim uma estratégia eficiente do bacilo para garantir o sucesso da infecção e manter um nicho apropriado para sua replicação.

Ainda nesse contexto, demonstramos que a indução de *OASL*, mediada pela transfecção de DNA *M. leprae*, durante a infecção com a micobactéria avirulenta *M. bovis* BCG aumenta significativamente a viabilidade intracelular da bactéria, juntamente com o produção de altos níveis de CCL2/MCP-1, de forma oposta a infecção sem a transfecção de DNA. Esses resultados demonstram que a presença do DNA citoplasmático é capaz reverter o fenótipo avirulento do *M. bovis* BCG, mimetizando dessa forma uma infecção por uma

patógeno virulento, como o *M. leprae*, o que pode ser evidenciado pela alta produção de CCL2/MCP-1 característica da infecção por esse patógeno. Isso está de acordo com o estudo de Sinsimer e colaboradores, onde foi observada uma correlação inversa nos níveis de CCL2/MCP-1 induzidos pela infecção de monócitos com *M. bovis* BCG (baixos níveis de CCL2/MCP-1) e *M. leprae* (alta produção de CCL2/MCP-1) (Sinsimer et al., 2010). Por fim, esses dados corroboram com nossos resultados discutidos anteriormente e confirma, de forma robusta, a relação entre a indução de OASL com a produção de CCL2/MCP-1, e consequentemente a criação de um ambiente intracelular pro-micobactéria.

Recentemente a sinalização CDS foi associada com a indução do processo de autofagia, o qual pode restringir a replicação de bactérias intracelulares. Com isso, foi demonstrado que a permeabilização fagossomal durante a infecção *in vitro* por *M. tuberculosis*, utilizando baixa carga bacilar, permite o acesso de componentes de autofagia mediada por ubiquitinação. Dessa forma, o reconhecimento do DNA bacteriano é capaz de induzir a ubiquitinação da micobactéria presente no fagossomo e direcioná-la para autofagossomos de maneira dependente da sinalização STING/TBK1 (Watson et al., 2012). Curiosamente, Parkina está envolvida na regulação negativa da autofagia, aumentando a estabilidade de BCL-2, uma importante proteína anti-apoptótica e inibidora de autofagia (Chen et al., 2010). Um estudo recente do nosso grupo observou que fragmentos de nervo de pacientes hansenianos apresentaram uma expressão gênica aumentada de outra E3-ubiquitina ligase (Guerreiro et al., 2013; Anexo II).

As evidências apresentadas demonstram que a resposta baseada em IFN tipo I é capaz de modular diferentes vias celulares, como autofagia, apoptose e resposta protetora contra patógenos intracelulares, as quais geralmente estão alteradas durante processos patológicos. Desde a década de 1980 já é documentado que indivíduos com doenças autoimunes sistêmicas, como por exemplo, lúpus eritematoso sistêmico, apresentam contínua produção de IFN tipo I. Adicionalmente, esses indivíduos apresentam altos níveis de proteínas da classe 2' 5' oligoadenilato sintetase, confirmando a atividade de IFN tipo I nesses pacientes (Preble et al., 1983). De fato, estudos emergentes têm apontado uma 'assinatura molecular' de IFN tipo I na patogênese de outras doenças autoimunes como diabetes tipo I, artrite reumatoide e psoríase, fazendo, dessa maneira, uma associação de desse tipo de doença com patologias virais, micobacterianas e inflamatórias.

Outra abordagem utilizada por nosso grupo para a confirmação da participação do OASL na patogênese da hanseníase foi a realização de um estudo genético do tipo caso-

controle. Determinadas variantes genéticas responsáveis por alterar a expressão e/ou a atividade de OASL podem determinar padrões de susceptibilidade/resistência em doenças envolvendo a resposta de IFN tipo I. Como esperado, SNPs no gene *OASL* tem sido associados com infecções virais. Su e colaboradores identificaram 3 SNPs (rs3213545, rs1169279 e rs2859398) no gene *OASL* associados com a resposta viral de pacientes em tratamento com IFN tipo I durante a infecção crônica HCV (Su et al., 2008). O SNP rs3213545 também foi associado com a forma severa da febre do Nilo (*West Nilo virus*) (Yakub et al., 2005). A presença desse SNP em uma região genômica predita como indutora de *splicing* sugere um papel funcional para esse SNP. Interessantemente, os genótipos GA e AA para esse SNP mostraram uma associação de resistência à hanseníase. De fato, indivíduos carreadores do alelo A (GA ou AA) produzem menores níveis de mRNA de *OASL* quando comparados com aqueles não-carreadores (esses resultados podem ser encontrados no Anexo II). Isso está de acordo com nossos resultados que mostram que a diminuição da expressão de *OASL* durante a infecção por *M. leprae* possui um efeito microbicida.

As evidências da participação da via de IFN tipo I e OASL, mediada pela sinalização de receptores de DNA, na patogênese da hanseníase fazem dessa via/gene alvos potenciais para estratégias de interferência. Um corpo emergente de trabalhos com modelos de infecções virais *in vitro* têm apontado mecanismos de evasão da resposta de IFN tipo I. Esses mecanismos são baseados em complexos proteolíticos virais (Aguirre et al., 2012) ou em determinadas proteínas virais nãoestruturais (Nitta et al., 2013) os quais tem como alvo a molécula adaptadora STING, bloqueando sua atividade, e, conseqüentemente, a produção de IFN- $\beta$  e ISGs. Dessa maneira, estudos sobre atuação dessas proteínas no contexto da infecção por micobactérias patogênicas podem fornecer novos mecanismos de interferência/tratamento para as doenças causadas por esses patógenos.

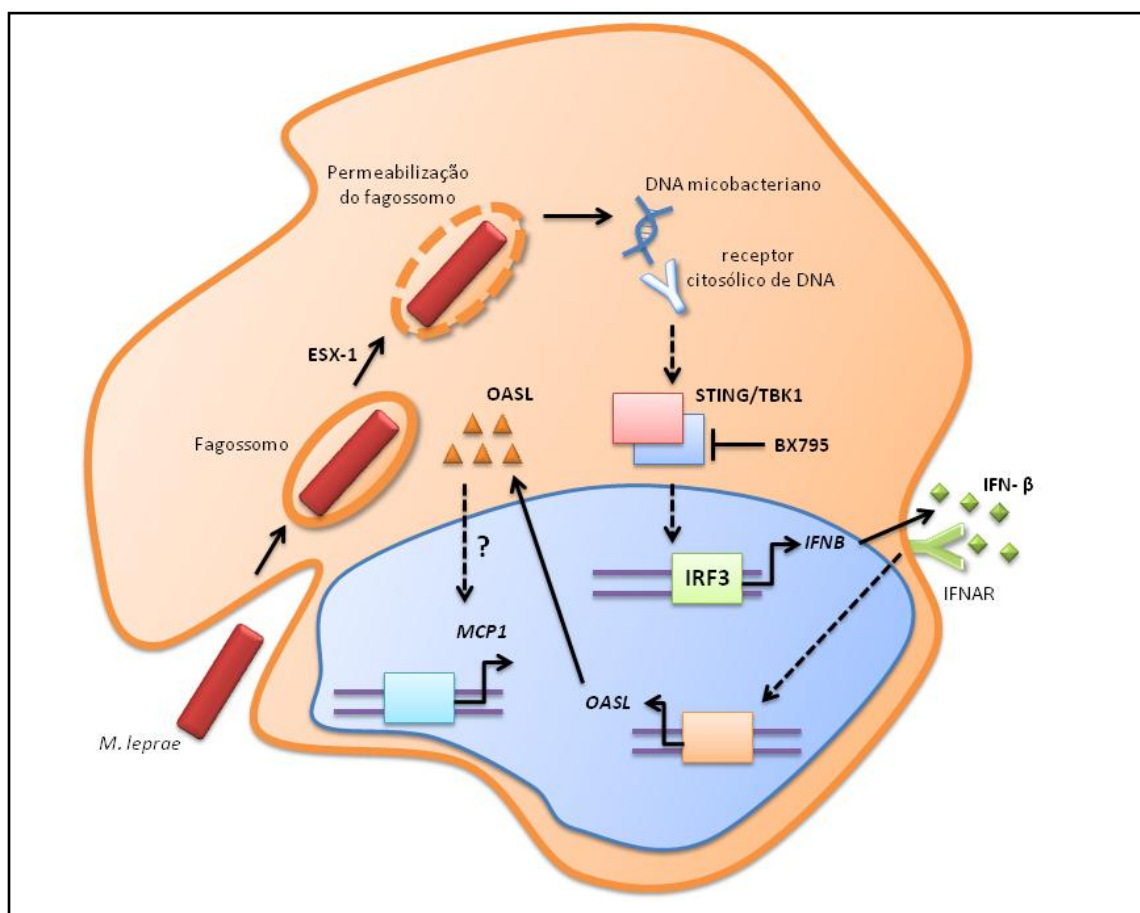
## **6.2 - Considerações finais e perspectivas**

Os eventos iniciais consequentes da interação do *M. leprae* com a célula hospedeira são decisivos para o estabelecimento, ou não, da infecção. O presente estudo apresenta, pela primeira vez, evidências da regulação positiva da expressão gênica de *OASL* durante a infecção por *M. leprae*. Nesse contexto, mostramos que os altos níveis expressão desse gene durante a infecção é capaz de regular negativamente a resposta protetora da célula hospedeira contra o *M. leprae* e garantir um nicho seguro para a replicação do patógeno. Dessa forma, nosso estudo demonstra que OASL possui um papel importante na patogênese da hanseníase,



fazendo desse gene um alvo relevante para o desenvolvimento de estratégias de tratamento e prevenção da doença. Na figura 6.1 pode ser encontrado o modelo proposto da interação do *M. leprae* com o macrófago hospedeiro com base nos resultados abordados neste trabalho.

Como seguimento desse estudo, é pretendido caracterizar, mais especificamente, o papel de OASL na persistência e replicação intracelular de *M. leprae*. Investigaremos as etapas a jusante da ativação de OASL, para, dessa maneira, identificar novas estratégias baseadas na customização do método vacinal por BCG e entender melhor os mecanismos envolvendo OASL na regulação da resposta a micobactérias.



**Figura 6.1: Modelo esquemático das etapas iniciais envolvidas na infecção de macrófagos pelo *M. leprae*, baseado nos resultados abordados no presente estudo.** Após ser fagocitado pelo macrófago, o *M. leprae* é capaz de expressar ESAT-6, um antígeno do sistema ESX-1, capaz de perfurar o fagossomo, criando um canal de comunicação do conteúdo fagossomal com o citoplasma da célula hospedeira. Com isso, o DNA micobacteriano é prontamente capaz de se ligar a receptores citosólicos de DNA e induzir a produção de IFN- $\beta$  de maneira dependente da via de sinalização STING/TBK1/IRF3. A atuação do IFN- $\beta$ , de forma autócrina, induz a expressão de OASL, que por sua vez, de modo ainda desconhecido, medeia a produção da quimiocina CCL2/MCP-1. Dessa maneira, a indução da via de IFN tipo I, na infecção pelo *M. leprae*, é capaz de regular negativamente a resposta protetora da célula hospedeira contra o patógeno, garantindo um ambiente seguro para sua replicação.

## **7. CONCLUSÕES**

Com base nos resultados demonstrados nesse estudo, podemos concluir que:

- A infecção de macrófagos derivados de células THP-1 com *M. leprae* induz *IFNB* e genes estimulados por IFN tipo I, tais como *IFIT1*, *OAS1* e *OASL*;
- A expressão e produção de OASL em mdTHP-1 é dependente da patogenicidade e viabilidade micobacteriana, uma vez que *M. leprae* irradiado ou *M. bovis* BCG não foram capazes de induzir OASL (mRNA e proteína);
- O *M. leprae* é capaz de perfurar o fagossomo da célula hospedeira e induzir a expressão de *OASL* de maneira dependente do sensoriamento de DNA citoplasmático e ativação da via de sinalização STING/TBK1/IRF3;
- O silenciamento gênico de *OASL* afeta a produção de CCL2/MCP-1 induzida por *M. leprae* e diminui a viabilidade intracelular do patógeno;
- A transfecção de DNA de *M. leprae* reverte o fenótipo avirulento de *M. bovis* BCG durante a infecção em mdTHP-1 juntamente com o aumento da produção de CCL2/MCP-1.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, Patel JR, Savage T, Gutman D, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING. *PLoS Pathog* 2012;8(10):e1002934.

Akama T, Suzuki K, Tanigawa K, Kawashima A, Wu H, Nakata N, et al. Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. *J Bacteriol* 2009;191(10):3321-7.

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* 1999;285:73 6-39.

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 2005;202:1715-24.

Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998;161(5):2636-41.

Berrington, WR, Macdonald, M, Khadge, S, Sapkota, BR, Janer, M, Hagge, DA, Kaplan, G & Hawn, TR, 2010b, Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states. *Journal of Infectious Diseases* 2010;201(9):1422.

Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 2010;466(7309):973-7

Beyene D, Aseffa A, Harboe M, Kidane D, Macdonald M, Klatser et al. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. *Epidemiol Infect* 2003;131(2):841-8.

Bowie A. The STING in the tail for cytosolic DNA-dependent activation of IRF3. *Sci Signal* 2012;5(214):9.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):1991-5.

Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 2011;478(7370):515-8.

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

Chatterjee KR, Das Gupta NN, De ML. Electron microscopic observations on the morphology of *Mycobacterium leprae*. *Exp Cell Res* 1959;18: 521-27.

Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van Kaer L, et al. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. *PLoS Pathog* 2011;7(11):e1002378.

Chen D, Gao F, Li B, Wang H, Xu Y, Zhu C, et al. Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J Biol Chem* 2010;285(49):38214-23.

Chen Q & Ross AC. Retinoic acid regulates cell cycle progression and cell differentiation in human monocytic THP-1 cells. *Exp Cell Res* 2004;297(1):68-81.

Chen Q, DeFrances MC, Zarnegar R. Induction of met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ* 1996;7(6):821-32.

Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, et al. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clin Immunol 2007;123(1):50-9.

Clark K, Plater L, Peggie M, Cohen P. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. J Biol Chem 2009;284(21):14136-46.

Cocito C & Delville J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. Eur J Epidemiol 1985;1(3):202-31.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence Nature 1998;393 (6685):537-44.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001;409(6823):1007-11

Convit J & Rassi E. Lepromin and tuberculin tests in Venezuelan leprosy foci: Induction of lepromin reaction by BCG vaccination. Int J Lepr 1954;22:303-10.

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;16(1):90-7.

Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. J Exp Med 1997;186(1):39-45.

Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy J Clin Invest 2008;118: 2917-28.

Cunha SS, Dourado I, Barreto ML. Design of the leprosy component of the Brazilian BCG revaccination trial for assessing BCG effectiveness against leprosy in school children. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2004;72: 8–15.

D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of LBs: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 2006;176:3087-97.

Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS One* 2010;5(1):e8668.

de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, Brodin P, et al. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol* 2007;189(16):6028-34.

de Léséleuc L, Orlova M, Cobat A, Girard M, Huong NT, Ba NN, et al. PARK2 mediates interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein 1 production by human macrophages *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7(1):e2015.

de Sales Marques C, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection. *J Infect Dis* 2013;208(1):120-9.

Delbridge LM & O'Riordan MX. Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* 2007;19:10-16.

Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body *Lep Rev* 1977;48:231–5

Desikan KV. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lep Rev* 1995;66:287–95.



Dong B & Silverman RH. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. *J Biol Chem* 1995;270:4133-7.

Duppre NC. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2008;102(7):631-8.

Dutta RK, Kathania M, Raje M, Majumdar S. IL-6 inhibits IFN- $\gamma$  induced autophagy in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv infected macrophages. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(6):942-54.

Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH, Hartmann R. Characterization of the 2-5-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic acids research* 2003;31(12):3166.

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.

Fernandez J. Estudio comparativo de la reaccion de Mitsuda con las reacciones tuberculínicas. *Revista Argentina Dermatosifilis* 1939;23:425-53.

Ferreira CDA. Integração de dados de expressão gênica global em tuberculose. Rio de Janeiro. Dissertação [mestrado em Biologia Computacional e Sistemas] - Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, Flores LM, Jo EK, Montaña M, et al. A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 2005;202(12):1649-58.

Fontán P, Aris V, Ghanny S, Soteropoulos P, Smith I. Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* 2008;76(2):717-25.

Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, et al. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(9):3689-94.

Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *PNAS* 2003;100:5437-42.

Gandotra S, Jang S, Murray PJ, Salgame P, Ehrt S. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2007;75:5127-34.

Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from NOD2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003;24(12):652-8.

Gu L, Okaka Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molec Cell* 1998;2:275-81.

Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 2000;404(6776):407-11.

Guerreiro, LTA. Análise do perfil de expressão gênica da resposta imuno-inflamatória na infecção por Mycobacterium bovis BCG e Mycobacterium leprae. [doutorado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2012.

Guerreiro LTA, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Brito TR, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS ONE* 2013;8(6):e64748.

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

Hansen GA. Investigations concerning the etiology of leprosy. Norsk Mag Laegervidenskaben 1874;4:1-88.

Hartmann R, Olsen HS, Widder S, Jorgensen R, Justesen J. p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family. Nucleic Acids Research 1998;26(18):4121-7.

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

Hasan Z, Cliff JM, Dockrell HM, Jamil B, Irfan M, Ashraf M, et al. CCL2 responses to Mycobacterium tuberculosis are associated with disease severity in tuberculosis. PLoS One 2009;4(12):e8459.

Haslett PA, Roche P, Butlin CR, Macdonald M, Shrestha N, Manandhar R, et al. 2005, Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. J Infect Dis 2005;192(12):2045-53.

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

Humeniuk-Polaczek R & Marcinkowska E. Impaired nuclear localization of vitamin D receptor in leukemia cells resistant to calcitriol-induced differentiation. J Steroid Biochem Mol Biol 2004;88(4-5):361-6.

Hunter SW & Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity, Journal of bacteriology 1981;147(3):728.

Ishibashi M, Wakita T, Esumi M. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication in vitro. *Biochemical and biophysical research communications* 2010;392(3):397-402.

Jin L, Hill KK, Filak H, Mogan J, Knowles H, Zhang B, et al. MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP. *J Immunol* 2011;187(5):2595-601.

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

Johnson CM, Lyle EA, Omueti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsy E, et al. Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* 2007;178:7520-4.

Jopling WH & McDougall AC. *Handbook of leprosy*. 2. ed. 1988.

Jopling WH. Reactions in leprosy. *Lepr Rev* 1970;(1):62-3.

Joyce MP. Historic aspects of human susceptibility to leprosy and the risk of conjugal transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;107(Suppl D):17-21.

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;158:800-6.

Kirchheimer W & Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn) as a model for the study of leprosy I Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr* 1971;39:693-702.

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. *Nature medicine* 2003;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;11(6):653-60.

Kurup G & Mahadevan PR. Cholesterol metabolism of macrophages in relation to the presence of *Mycobacterium leprae*. *J Biosci* 1982;4:307-16.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *Journal of medical microbiology* 2005;54(3)235.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. Infection of mouse macrophages with viable *Mycobacterium leprae* does not induce apoptosis. *J Infect Dis* 2010;201(11):1736-42.

Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infection Genetics and Evolution* 2008;8(5):627-31.

Lee DJ, Sieling PA, Ochoa MT, Krutzik SR, Guo B, Hernandez M, et al. LILRA2 activation inhibits dendritic cell differentiation and antigen presentation to T cells. *J Immunol* 2007;179:8128-36.

Lee MS, Kim B, Oh GT, Kim YJ. OASL1 inhibits translation of the type I interferon-regulating transcription factor IRF7. *Nat Immunol* 2013;14(4):346-55.

Lew W, Chang SK, Kwahck H, Tada Y, Nakamura K, Tamaki K. Serum monocyte chemoattractant protein-1 is elevated in lepromatous leprosy patients with high bacterial indices. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2002;70(2):129-31.

Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, et al. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One* 2009;4(6):e5810.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;311:1770-3.

Liu PT, Stenger S, Tang DH, Modlin RL. Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on the induction of cathelicidin. *J Immunol* 2007;179:2060-3.

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.

Maertzdorf J, Repsilber D, Parida SK, Stanley K, Roberts T, Black G, et al. Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis. *Genes and immunity* 2011;12(1):15-22.

Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(10):5752-7.

Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007;37(1):14-6.

Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe* 2012;11(5):469-80.

Marques J, Anwar J, Eskildsen-Larsen S, Rebouillat D, Paludan SR, Sen G, et al. The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain. *J Gen Virol* 2008;89:2767-72.

Martineau AR, Wilkinson KA, Newton SM, Floto RA, Norman AW, Skolimowska K, et al. IFN- $\gamma$ - and TNF-independent vitamin D-inducible human suppression of Mycobacteria: the role of cathelicidin LL-37. *J Immunol* 2007;178:7190-8.

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

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

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

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

Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr* 1999;71:61-7.

Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, 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;87:371-84.

Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012;Suppl 1:156-66.

Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human Toll-Like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999;163:3920-7.

Melchjorsen J, Kristiansen H, Christiansen R, Rintahaka J, Matikainen S, Paludan, SR et al. Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. *Journal of interferon & cytokine research* 2009;29(4):199-207.

Merle CS, Cunha SS, Rodrigues LC. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(2):209-22.

Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VH, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004;427(6975):636-40.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science* 2005;308(5724):1040-2.

Montoya D, Cruz D, Teles R, Lee DJ, Ochoa MT, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell host & microbe* 2009;6(4):343-53.

Motta AC, Pereira KJ, Tarquínio DC, Vieira MB, Miyake K, Foss NT. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics* 2012;67(10):1145-8.

Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol* 2012;42(11):2925-36.



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

Nery JAC, Vieira LMM, Matos HJ, Gallo MEN, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1998;40(6).

Nitta S, Sakamoto N, Nakagawa M, Kakinuma S, Mishima K, Kusano-Kitazume A, et al. Hepatitis C virus NS4B protein targets STING and abrogates RIG-I-mediated type I interferon-dependent innate immunity. *Hepatology* 2013;57(1):46-58.

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

Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, Mayer-Barber KD, et al. Mycobacterium tuberculosis triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 $\beta$  production in human macrophages. *J Immunol* 2011;187(5):2540-7.

O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, Zarnegar B, et al. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 2004;200(4):437-45.

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

Organização Mundial da Saúde. *Global leprosy situation 2012*. *Wkly Epidemiol Rec* 2012;87:317-28.

O'Riordan M, Yi CH, Gonzales R, Lee KD, Portnoy DA. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13861–6.

Osana Y, Sakakibara Y, Ishii N. Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. *Journal of bacteriology* 2009;191(10):3321-7.

Ottenhoff TH, Dass RH, Yang N, Zhang MM, Wong HE, Sahiratmadja E, et al. Genome-wide expression profiling identifies type 1 interferon response pathways in active tuberculosis. *PLoS One* 2012;7(9):e45839.

Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, Fortune SM, Coulombe F, Behr MA, et al. NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 2009;5(7):e1000500.

Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, Ouyang S, Jiang Y, Iyer SS, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol* 2012;13(12):1155-61.

Pascual V, Banchereau J, Chaussabel D, O'Garra A. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis, *Nature* 2012;466(7309):973-7.

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

Perry AK, Gang C, Zheng D, Hong T, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell research* 2005;15(6):407-22.

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

Preble OT, Rothko K, Klippel JH, Friedman RM, Johnston MI. Interferon-induced 2'-5' adenylylase synthetase in vivo and interferon production in vitro by lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients with and without circulating interferon. *J Exp Med* 1983;157(6):2140-6.

Quintana-Murci L, Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases *Nat Immunol* 2007;8(11):1165-71.

Rabello E, Rabello Jr F, 1938, Une classification clinico-epidemiologique des formes de la lèpre. *Ver Bras Leprae* 1938;6(3):229-43.

Ragno S, Romano M, Howell S, Pappin DJ, Jenner PJ, Colston MJ. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* 2001;104(1):99-108.

Rea TH & Modlin RL. Immunopathology of leprosy skin lesions. *Seminars in dermatology* 1991;10(3):188-93.

Ress RFW. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC (ed) *Leprosy*, 1st edition, Churchill Livingstone Inc, New York. 1985.

Ribeiro-Resende VT, Ribeiro-Guimarães ML, Lemes RM, Nascimento IC, Alves L, Mendez-Otero R, et al. Involvement of 9-O-Acetyl GD3 ganglioside in *Mycobacterium leprae* infection of Schwann cells. *J Biol Chem* 2010;285(44):34086-96.

Ridley DS & Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr* 1966;34.

Riendeau CJ & Kornfeld H. THP-1 cell apoptosis in response to *Mycobacterial* infection. *Infect Immun* 2003;71(1):254-9.

Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 BC). *PLoS one* 2009;4(5):e5669.

Robottom-Ferreira AB. Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica. Tese [doutorado em Biologia Computacional e Sistemas] - Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Rodrigues LS, da Silva Maeda E, Moreira ME, Tempone AJ, Lobato LS, Ribeiro-Resende VT, et al. Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell Microbiol* 2010;12(1):42-54.

Rodrigues LS, Hacker MA, Illarramendi X, Pinheiro MF, Nery JA, Sarno EN, et al. Circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) correlate with disease status in leprosy. *BMC Infect Dis* 2011;11:339.

Sakurai I, Skinsnes OK. Lipids in leprosy 2 Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1970;38:389-403.

Santos DO, Castro HC, Bourguignon SC, Bastos OM, Rodrigues CR, Van HH, et al. Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:75-80.

Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* 2012;18(4):555-63.

Schlesinger LS & Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of Mycobacterium leprae binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *The Journal of experimental medicine* 1991;174(5)1031.

Sehgal VN, Sharma V. Reactions in leprosy—a prospective study of clinical, bacteriological, immunological and histopathological parameters in thirty-five Indians. *The Journal of dermatology* 1988;15(5):412-9.

Setia MS, Steinmaus C, Ho CS, Rutherford GW. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2006;6(3):162-70.

Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 2013;6(1):19-24.

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *Journal of Experimental Medicine* 1960;112(3):445-54.

Shepard CC. 1962, Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *International journal of Leprosy* 1962;30:291.

Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol* 1965;90(5):1271-5.

Shepard CC. Vaccination against human leprosy bacillus infections of mice: protection by BCG given during the incubation period. *J Immunol* 1966;96:279-83.

Shepard CC & McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1968;36(1):78-82.

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;162:1851-8.

Singh P & Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol* 2011;6(1):57-71.

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

Smith J, Manoranjan J, Pan M, Bohsali A, Xu J, et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect Immun* 2008;76(12):5478-87.

Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, et al. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *J Leukoc Biol* 2002;71(3):445-57.

Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, Garnier T, et al. Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res* 2007;17(2):192-200.

Su X, Yee LJ, Im K, Rhodes SL, Tang Y, Tong X, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* 2008;49(2):184-91.

Suzuki K, Nakata N, Bang PD, Ishii N, Makino M. High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;259(2):208-214.

Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, et al. DAI (DLM-1/Z BP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response *Nature* 2007;448:501-5.

Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nature medicine* 2006;12(8)961-6.

Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science* 2013;339(6126):1448-53.

Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, McFarland R, Vickery TW, Ray JP, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* 2012;148(3):434-46.

Tobin DM, Vary JC Jr, Ray JP, Walsh GS, Dunstan SJ, Bang ND, et al. The *Ita4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell* 2010;140(5):717-30.

Torrado E & Cooper AM. IL-17 and Th17 cells in tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(6):455-62.

- Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bull, NY Acad Med* 1984;60:689-95.
- Truman RW & Krahenbuhl JL. Viable *M leprae* as a research reagent, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases* 2001;69(1):1-12.
- Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States, New England. *Journal of Medicine* 2011;364(17):1626-33.
- Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 1982;42(4):1530-6.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980;26(2):171-6.
- Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 2010;11:997–1004.
- Van Beers S, Hatta M, Klatser PR. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid I among schoolchildren as an indicator of leprosy endemicity. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1999;67:243–9.
- 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(7):1287-98.
- Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, Hsu T. *Mycobacterium tuberculosis* *nuoG* is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog* 2007;3:e110.

Vergne I, Chua J, Deretic V. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-PI 3-K hVPS34 cascade. *J Exp Med* 2003;4:653-9.

Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(13):4560-5.

Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 2006;79(2):285-93.

Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for BCG Cell 1993;73(3):469–485.

Virchow R. *Die krankhaften Geschwulste*, August Hirschwald, Berlin, 1863.

Vissa, VD & Brennan, PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome biology*, 2001;2(8).

Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol* 2004;173:2909-12.

Ward SK, Abomoelak B, Marcus SA, Talaat AM. Transcriptional profiling of mycobacterium tuberculosis during infection: lessons learned. *Front Microbiol* 2010;1:121.

Warke RV, Xhaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, Brizuela N, et al. Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol* 2003;77(21):11822-32.

Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* 2012;150(4):803-15.



Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, et al. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC genomics* 2009;10:397.

Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* 2010;328(5986):1703-5.

Wu K, Dong D, Fang H, Levillain F, Jin W, Mei J, et al. An interferon-related signature in the transcriptional core response of human macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS One* 2012;7(6):e38367.

Yakub I, Lillibridge KM, Moran A, Gonzalez OY, Belmont J, Gibbs RA et al. Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection, *The Journal of infectious diseases* 2005;192(10):1741-8.

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;254(5029):277.

Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *New England Journal of Medicine* 2009;361(27):2609-18.

## **9. ANEXOS**