

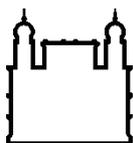
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biologia Parasitária

MECANISMOS INATOS ASSOCIADOS À IMUNOPATOGÊNESE DA
FORMA MULTIBACILAR E AO ESTABELECIMENTO DA REAÇÃO
REVERSA EM PACIENTES COM HANSENÍASE

MAYARA GARCIA DE MATTOS BARBOSA

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MAYARA GARCIA DE MATTOS BARBOSA

Mecanismos inatos associados à imunopatogênese da forma multibacilar e ao estabelecimento da reação reversa em pacientes com hanseníase

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Parasitária

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2017

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

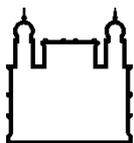
B238 Barbosa, Mayara Garcia de Mattos

Mecanismos inatos associados à imunopatogênese da forma multibacilar e ao estabelecimento da reação reversa em pacientes com hanseníase / Mayara Garcia de Mattos Barbosa. – Rio de Janeiro, 2017. xxii, 134 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.
Bibliografia: f. 99-124

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Macrófagos. 4. Ferro. 5. Autofagia. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: MAYARA GARCIA DE MATTOS BARBOSA

**MECANISMOS INATOS ASSOCIADOS À IMUNOPATOGÊNESE DA FORMA
MULTIBACILAR E AO ESTABELECIMENTO DA REAÇÃO REVERSA EM
PACIENTES COM HANSENÍASE**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani – Presidente Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Flávio Alves Lara Instituto Oswaldo Cruz

Prof^a. Dr^a. Alessandra D’Almeida Filardy Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 9 de Fevereiro de 2017

À minha família, sem a qual nunca teria conseguido realizar mais esse sonho. *In memoriam* ao meu padrinho, Alexandre José Gomes Barbosa, cuja função no universo sempre foi distribuir risos, brincadeiras e felicidade aonde quer que fosse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rogério Gomes Barbosa e Maria Cristina Garcia de Mattos Barbosa, ao meu irmão, Caio Garcia de Mattos Barbosa, ao meu marido e melhor amigo, Rodrigo Espíndola Godoy, e ao restante da minha família, que sempre deram o melhor que puderam para me oferecer amor, apoio e todas as oportunidades que estavam ou não ao nosso alcance. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, me darem forças para conquistar cada dia e por confiarem e acreditarem em mim. Amo muito vocês!

Agradeço aos doutores Sérgio Luiz Gomes Antunes e Euzenir Nunes Sarno, que me introduziram ao mundo colorido da ciência, por todos os ensinamentos, o tempo e o carinho dedicados à mim, ao meu trabalho e à minha formação.

Agradeço à doutora Roberta Olmo Pinheiro por ser a melhor orientadora que eu poderia ter, uma pessoa doce, inteligente, dedicada, sempre disposta a ajudar e apoiar os seus alunos em todos os momentos da nossa trajetória. Obrigada, você tem e sempre terá um lugar todo especial no meu coração.

Agradeço à, agora doutoranda da Biologia Parasitária, Helen Ferreira por me deixar me aproximar, aprender sobre tantas técnicas e assuntos diferentes, por me escutar, me proteger, apoiar e defender sempre. Você é mais que uma amiga, é uma mãe para mim. Te amo demais! Serei grata para sempre por você ter surgido na minha vida.

Agradeço aos meus amigos mais que especiais do setor de Patologia, Vânia da Costa Valentim, Adelaide Lopes Amorim, Daniel Chaves Mesquita de Souza, Andreia Moraes de Souza, por todos os ensinamentos, a ajuda, amizade, carinho e atenção que sempre me dedicaram. Foi sempre maravilhoso saber que eu tinha para onde fugir e respirar por alguns momentos quando as coisas ficassem difíceis demais. Desculpe por perturbar tanto vocês!

Agradeço aos meus irmãos científicos Bruno Jorge de Andrade Silva (o mais velho), Rhana Berto da Silva Prata (a do meio, minha gêmea adotada) e Mayara Abud Mendes (a caçulinha) por toda a amizade, o apoio e emocional e experimental, todas as discussões, os momentos de união, todas as celebrações. Na alegria e na tristeza, na saúde e na doença vocês estiveram comigo. Queria aproveitar esse

momento para deixar claro três coisas importantes aqui: 1) Sempre fui e sempre serei a filha favorita e mais amada ;p ; 2) Mesmo a gente tendo te encontrado no lixo da UFRJ e sendo você adotada a gente te ama muito, Rhana Prata <3 ; 3) A família tá crescendo e a Mayara Mendes perdeu o posto de caçula. Sejam muito bem vindas a nossa família muito ouriçada, Helen Ferreira e Beatriz Junqueira de Souza! XD

Agradeço às doutoras Priscila Ribeiro Andrade e Veronica Schmitz Pereira pela amizade, por todos os ensinamentos, auxílio intelectual e experimental, pelas discussões sobre livros, séries e filmes e pelas tão frequentes sessões de terapia. Amo vocês!

Agradeço ao doutor Rafael Braga Petito, que além de ter me ensinado, apoiado e compartilhado comigo diversos momentos de alegria, me recebeu de braços abertos como estagiária de docência por dois semestres na sua excelente disciplina de “Patologia Geral” da “Universidade Federal Fluminense”. Obrigada por tudo! Eu e seus alunos amamos você!

Agradeço a minha filhinha, Tayná Quintella Assis por todo o carinho, a amizade, o auxílio experimental e o apoio a mim dedicados. Mamãe e mamãe amam muito você!

Agradeço aos doutores, Thaís Porto Amadeu, Bruno Siqueira Mietto e Tatiana Pereira da Silva, à doutoranda Luciana Nahar dos Santos, aos mestrandos Andressa Cristina da França Gomes, Eduardo Alves Freire da Costa, Jéssica Araújo da Paixão Oliveira, Tamiris Lameira Bittencourt, Mariana Martins de Athaíde, Daniel Pedrosa Marques, Paula Rangel de Sá Ribeiro, aos especialistas Eliane Barbosa de Oliveira e Edson Claudio Araripe de Albuquerque, aos alunos de iniciação científica Michele Siqueira Muzy, Camila Lopes Moreira, Fabiana dos Santos Pacheco, Jéssica Brandão dos Santos, Milena Nunes Novaes, Jocelmo Alves de Lima, Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues e aos demais amigos e colegas de laboratório por toda a paciência, ajuda, apoio e conhecimento que me passaram e continuam a passar todos os dias. Obrigada!

Agradeço aos amigos Solange e Paulo, da sala de lavagem e esterilização, Augusto, Cristiane, da administração, Andréa, Jean Pierre e Joel, da secretaria, Lúcia e Eliza, da equipe de limpeza, Roberto, Paulo Salles, Andrezza e André, da portaria, e

demais colegas e amigos da limpeza, portaria e apoio predial. Obrigada por toda a atenção, palavras gentis, disposição para ajudar e amizade. O trabalho de vocês é primordial, sem vocês nunca poderíamos fazer a nossa parte.

Agradeço à doutora Patrícia Sammarco Rosa, do Instituto Lauro de Souza Lima, e aos amigos do LAMICEL, em especial ao João Pedro Sousa Santos e ao doutor Flávio Alves Lara, por todo o auxílio e fornecimento de *Mycobacterium leprae* vivo para os experimentos aqui apresentados.

Agradeço ao doutor José Augusto da Costa Nery e aos demais médicos, farmacêuticos, assistentes sociais, arquivista, enfermeiros, secretários e porteiros do Ambulatório Souza Araújo que tão gentilmente auxiliaram na seleção dos pacientes, coleta de material e de dados, e todas as outras coisas que precisei.

Agradeço aos pacientes do Ambulatório Souza Araújo, sem os quais não haveria trabalho algum. Muito obrigada pela gentileza e pelo material cedido.

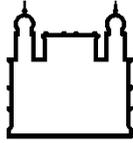
Agradeço aos doadores de sangue, que além de ajudarem a salvar as vidas de muitas pessoas, ainda proveram os leucócitos utilizados neste e em muitos outros estudos impulsionando também a ciência. Parabéns pelo gesto, vocês são muito especiais!

Agradeço aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária por toda ajuda e apoio, em especial a Rita, a quem recorri nos momentos de desespero e sempre foi gentil, compreensiva e solícita em todos os momentos. Você é maravilhosa, obrigada!

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao POM do Instituto Oswaldo Cruz, à FAPERJ e ao CNPq pelo apoio financeiro durante toda essa incrível jornada.

“Ave atque vale... Hail and farewell. He had never given much thought to the words before, he had never thought about why they were not just a farewell but also a greeting. Every meeting led to a parting, and so it would, as long as it was mortal. In every meeting there was some of the sorrow of parting, but in every parting there was some joy of the meeting as well. He would not forget the joy.”

⌘ Cassandra Clare ⌘



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

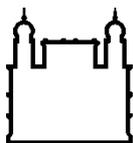
MECANISMOS INATOS ASSOCIADOS À IMUNOPATOGÊNESE DA FORMA MULTIBACILAR E AO ESTABELECIMENTO DA REAÇÃO REVERSA EM PACIENTES COM HANSENÍASE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Mayara Garcia de Mattos Barbosa

Os macrófagos lepromatosos têm um fenótipo regulatório semelhante a M2 que contribui para a imunossupressão observada na hanseníase multibacilar. Nosso estudo anterior demonstrou que a IL-10 pode modular tanto a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) quanto a de CD163 em células de pacientes lepromatosos, favorecendo a persistência de *Mycobacterium leprae* através da indução de vias regulatórias e armazenamento de ferro. Aqui investigamos o fenótipo celular relacionado à patogênese da hanseníase lepromatosa (LL). O aumento da expressão gênica dos genes MSRA, PPARG e CD163, relacionados ao fenótipo M2, foi observado em células de lesão LL, acompanhada da expressão aumentada de hemoglobina (Hb), haptoglobina, heme oxigenase 1 e receptor de transferrina 1 quando comparada à hanseníase tuberculóide (BT). Também encontramos aumento dos depósitos de ferro e diminuição da expressão da ferroportina 1 exportadora de ferro, ambas características-chave dos macrófagos M1. As concentrações de hemoglobina estavam diminuídas no soro de pacientes LL. O estímulo com *M. leprae* induziu um aumento na expressão gênica de *TFRC* e *IL10* em monócitos humanos. O estímulo com hemina foi capaz de aumentar a viabilidade de *M. leprae* por um mecanismo que envolve IDO. Em resumo este estudo demonstra que o ferro não somente regula a expressão de IDO, mas também a sua função como um importante elemento para a sobrevivência de *M. leprae* no hospedeiro. Adicionalmente, o estudo das lesões de pele dos pacientes lepromatosos que desenvolveram ou não episódios reacionais, demonstrou diferenças significativas de expressão de genes das vias de autofagia e inflamassoma ainda no momento do diagnóstico da hanseníase. Pacientes multibacilares que não desenvolveram reação reversa (RR) (grupo SR) apresentaram uma superexpressão dos genes da via da autofagia e um acúmulo de pro-Caspase 1 (p45), enquanto os pacientes que desenvolveram RR (grupo RR) apresentaram uma superexpressão dos genes da via dos inflamassomas e de Caspase 1 ativa (p10). A análise das vias estudadas pode revelar candidatos a biomarcadores de RR capazes de identificar o risco do desenvolvimento de reação meses antes dela ocorrer, permitindo uma maior vigilância desses doentes e talvez, futuramente, um tratamento profilático para evitar a ocorrência de RR em pacientes com hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INNATE MECHANISMS ASSOCIATED WITH THE IMMUNOPATHOGENESIS OF THE MULTIBACILLARY FORM AND THE ESTABLISHMENT OF REVERSAL REACTION IN LEPROSY PATIENTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITARY BIOLOGY

Mayara Garcia de Mattos Barbosa

Lepromatous macrophages have a regulatory M2-like phenotype that contributes to the immunosuppression observed in multibacillary leprosy. Our previous study has demonstrated that IL-10 may modulate both indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and CD163 expression in lepromatous leprosy (LL) cells, favoring *Mycobacterium leprae* persistence through induction of regulatory pathways and iron storage. Here, we investigated cell phenotype related to lepromatous leprosy pathogenesis. Increased gene expression of the M2-related genes *MSRA*, *PPARG*, and *CD163* were observed in LL lesion cells, accompanied by an augmented expression of hemoglobin (Hb), haptoglobin, heme oxygenase 1 and transferrin receptor 1 when compared to tuberculoid leprosy (BT) cells. We also found increased iron deposits and diminished expression of the iron exporter ferroportin 1, both key characteristics of M1 macrophages. The Hb levels were decreased in LL patient's sera. *M. leprae* stimuli induced an increase in *TFRC* and *IL10* gene expression in human monocytes. Hemin, but not FeSO₄ stimulation, was able to enhance *M. leprae* viability by a mechanism that involves IDO. In summary, this study demonstrates that iron may not only regulate IDO expression but also functions as an important element for *M. leprae* survival in the host. Additionally, the study of skin lesions in lepromatous patients who developed or not reactional episodes demonstrated significant differences in gene expression of the autophagy and inflammasome pathways at the time of leprosy diagnosis. Multibacillary patients who did not develop reversal reaction (RR) (SR group) presented an overexpression of the genes of the autophagy pathway and an accumulation of Pro-Caspase 1 (p45), whereas patients who developed RR (RR group) presented an overexpression of the genes of the inflammasome pathway and of active Caspase 1 (p10). The analysis of the pathways studied may reveal candidates for RR biomarkers capable of identifying the risk of reaction development months before it occurs, allowing a greater vigilance of these patients and perhaps, in the future, a prophylactic treatment to avoid the occurrence of RR in leprosy patients.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais da hanseníase.....	1
1.2 Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i>	2
1.3 Epidemiologia	5
1.4 Diagnóstico	10
1.5 Classificação.....	11
1.6 Tratamento	18
1.7 Resposta imune na hanseníase	20
1.7.1 Polarização de macrófagos na hanseníase	27
1.7.2 O ferro e seu papel na modulação da resposta imune e na infecção	30
1.7.3 Autofagia.....	40
1.7.4 Inflamassomas.....	47
1.8 Justificativa.....	53
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo Geral	55
2.2 Objetivos Específicos	55
3 MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1 Biossegurança e permissão ética.....	57
3.2 Pacientes e espécimes clínicos	57
3.3 Processamento de sangue para obtenção de soro.....	60
3.4 Ensaio colorimétrico para determinação das concentrações de hemoglobina e ferro sérico	60
3.5 Extração de ácido ribonucleico (RNA), transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR).....	60
3.5.1 Análise da via de autofagia.....	62
3.5.2 Análise de interação gênica e enriquecimento	62
3.6 Diálise de proteínas e “Western blotting”	63
3.7 Corte das biópsias congeladas e marcação imunohistoquímica	64

3.8	Isolamento de monócitos do sangue periférico	65
3.9	Cultura de células, estímulos e infecção	66
3.10	Marcação intracelular para indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO).....	67
3.11	Determinação molecular da viabilidade de <i>M. leprae</i>	67
3.12	Dosagem de citocinas e mediadores por ensaio imunoenzimático (ELISA)	68
3.13	Determinação da atividade de indoleamina 2,3-dioxigenase por cromatografia líquida de alta performance	68
3.14	Análise estatística	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	Os genes de polarização de macrófagos estão diferencialmente regulados em pacientes BT versus LL	69
4.2	Captação de hemoglobina aumentada em lesões de pele de pacientes LL.....	71
4.3	O metabolismo do ferro é alterado durante a hanseníase.....	72
4.4	A suplementação com heme aumenta a viabilidade de <i>Mycobacterium leprae</i>	75
4.5	A PQT não altera o fenótipo de macrófagos em lesão de pele de MBs.....	80
4.6	Genes da via de autofagia estão superexpressos em lesões de pele de pacientes lepromatosos que não desenvolveram episódios reacionais RR ao longo do tratamento.	82
4.7	Genes da via de inflamassoma estão superexpressos em lesões de pele de pacientes lepromatosos que desenvolverão episódios reacionais futuramente já no momento do diagnóstico de hanseníase.....	94
4.8	As subunidades de Caspase 1 estão diferencialmente reguladas em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.....	96
5	CONCLUSÕES	98
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
7	APÊNDICES E ANEXOS	125
7.1	Artigo 1: Carta de submissão.....	125

7.2	Artigo 1: Indoleamine 2,3-dioxygenase and Iron are required for <i>Mycobacterium leprae</i> survival	127
7.3	Artigos em colaboração.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias de <i>Mycobacterium leprae</i>	3
Figura 2. Modelo esquemático do envelope celular de <i>Mycobacterium leprae</i> ...	4
Figura 3. Prevalência mundial da hanseníase em 2015.	6
Figura 4. Incidência mundial da hanseníase em 2015.	7
Figura 5. Prevalência da hanseníase por 10.000 habitantes no Brasil em 2015. .	8
Figura 6. Incidência da hanseníase por 100.000 habitantes no Brasil em 2015. .	9
Figura 7. Incidência da hanseníase em menores de 15 anos por 100.000 habitantes no Brasil em 2015.....	9
Figura 8. Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling, 1966.	12
Figura 9. Representação esquemática das formas clínicas da hanseníase segundo o aspecto e distribuição das lesões, comprometimento nervoso, resultado da baciloscopia e resposta ao teste de Mitsuda.	13
Figura 10. Lesões características da hanseníase lepromatosa.	14
Figura 11. Lesões características da hanseníase tuberculóide.	16
Figura 12. Poliquimioterapia utilizada no tratamento da hanseníase.....	19
Figura 13. Modelo de divergência dos programas antimicrobiano e fagocítico na hanseníase.....	26
Figura 14. Metabolismo celular do ferro.....	32
Figura 15. A molécula de heme.....	34
Figura 16. Regulação da homeostase do ferro pela interação das proteínas reguladoras do ferro (IRPs) com os elementos responsivos ao ferro (IREs). ...	35
Figura 17. Mecanismos de absorção e metabolismo do ferro.	36
Figura 18. Representação esquemática da autofagia.	41
Figura 19. Autofagossomo.	42
Figura 20. Proteínas Atg e a formação do autofagossomo em células de mamíferos.	45
Figura 21. Composição molecular do inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRP12, AIM2, NAIP1/NLRC4, NAIP2/NLRC4, NAIP5/NLRC4 e do inflamassoma não canônico Caspase-11.....	49
Figura 22. Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3.....	50
Figura 23. Interações entre as via da autofagia e dos inflamassomas.....	52

Figura 24. Perfil de expressão gênica de lesões de pele de pacientes BT e LL.	70
Figura 25. Lesões de pele de pacientes lepromatosos apresentam uma maior expressão de CD163, hemoglobina, haptoglobina e heme oxigenase 1.....	72
Figura 26. As proteínas do metabolismo do ferro estão diferencialmente reguladas nas formas clínicas da hanseníase.....	73
Figura 27. Tratamento com hemina aumenta a viabilidade de <i>M. leprae</i>	76
Figura 28. Metabolismo do ferro em macrófagos lepromatosos.	79
Figura 29. Expressão gênica de genes relacionados à polarização de macrófagos em pacientes multibacilares no momento do diagnóstico e na alta da poliquimioterapia.	80
Figura 30. Expressão proteica de Arginase 1 em lesões de pele de pacientes multibacilares no momento do diagnóstico e da alta clínica.	81
Figura 31. “Screening” de genes das vias de imunidade inata e adaptativa e autofagia diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de Reação Reversa.....	84
Figura 32. Genes das vias de imunidade inata e adaptativa diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.....	85
Figura 33. Genes da via de autofagia diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.	87
Figura 34. Rede de interação dos genes de autofagia nas lesões de pele de indivíduos multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.	93
Figura 35. Rede de interação dos genes de autofagia nas lesões de pele de indivíduos multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.	94
Figura 36. Genes da via de inflamassoma diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.	95
Figura 37. As subunidades da Caspase-1 estão diferencialmente reguladas em pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes recrutados para o estudo de fenótipo de macrófagos e metabolismo do ferro na hanseníase.....	58
Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos pacientes recrutados para o estudo de fenótipo de macrófagos no diagnóstico e na alta da poliquimioterapia.	59
Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos pacientes recrutados para o estudo das vias de autofagia e inflamassoma em pacientes que desenvolveram ou não Reação Reversa.....	59
Tabela 4. Análise da expressão gênica da via de autofagia nas lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.....	88

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1-MT	1-metil-D-triptofano
AIM2	Ausente em melanoma 2, do inglês “Absent in melanoma 2”
ALAS2	Delta aminolevulínico sintetase 2
<i>APOL1</i>	Apolipoproteína L1
<i>ARG</i>	Arginase
ASC	Proteína adaptadora associada à apoptose semelhante à partícula contendo CARD, do inglês “Adaptor protein apoptosis-associated speck-like protein containing CARD”
<i>ATG4</i>	Cisteíno peptidase relacionada com autofagia 4, do inglês “Autophagy related 4 cysteine peptidase”
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>B2M</i>	β -2-microglobulina
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	“Borderline” média
<i>BCL2</i>	BCL2, regulador de apoptose, do inglês “BCL2, apoptosis regulator”
<i>BCL2L1</i>	Semelhante a BCL2 1, do inglês “BCL2 like 1”
BL	“Borderline” lepromatosa
BT	“Borderline” tuberculóide
CARD	Domínio de ativação e recrutamento de Caspase, do inglês “Caspase activation and recruitment domain”
<i>CASP1</i>	Caspase-1
CD	Grupo de diferenciação, do inglês “Cluster of differentiation”
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CORO1A	Coronina 1A
<i>CSF</i>	Fator estimulador de colônia
CT	Ciclo limiar, do inglês “Cycle threshold”
<i>CYP27B1</i>	Citocromo P450, família 27, subfamília B, membro 1
DAMPs	Padrões moleculares associados a perigo
<i>DDIT3</i>	Transcrito induzível no dano de DNA 3, do inglês “DNA damage inducible transcript 3”
DMT1	Transportador de metais divalente
DNA	Ácido desoxirribonucleico

<i>EIF4G1</i>	Fator 4 de iniciação da tradução eucariótica gama 1, do inglês “Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1”
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENH	Eritema nodoso hansênico
FDR	Taxa de descoberta falsa, do inglês “False discovery rate”
Fe ²⁺	Ferro ferroso
Fe ³⁺	Ferro férrico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>FKBP15</i>	Proteína ligante de FK506 15, do inglês “FK506 binding protein 15”
Fpn-1	Ferroportina 1
<i>FRS3</i>	Substrato 3 do receptor de fator de crescimento de fibroblasto, do inglês “Fibroblast growth factor receptor substrate 3”
FT	Ferritina
FTH	Ferritina de cadeia pesada
FTL	Ferritina de cadeia leve
GAPDH	Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulatório de colônia de granulócitos e macrófagos
<i>GPSM3</i>	Modulador 3 da sinalização de proteína G, do inglês “G-protein signaling modulator 3”
Hb	Hemoglobina
HD	Hanseníase dimorfa
HI	Hanseníase indeterminada
<i>HMOX1</i>	Heme oxigenase 1
Hp	Haptoglobina
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforribosiltransferase 1
HRG1	Transportador gene responsivo à heme 1
HRP	Peroxidase de rabanete, do inglês “Horseradish peroxidase”
<i>HSPA5</i>	Proteína de choque térmico, família A (Hsp70), membro 5, do inglês “Heat shock protein family A (Hsp70) member 5”
HT	Hanseníase tuberculóide
HV	Hanseníase vichoviana
IB	Índice baciloscópico
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon gama

<i>IFNG</i>	Interferon gama
IFN- β	Interferon beta
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
<i>IL1B</i>	Interleucina 1 beta
<i>IL1RAP</i>	Proteína acessória do receptor de interleucina 1, do inglês “Interleukin 1 receptor accessory protein”
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IREs	Elementos reguladores do ferro
IRPs	Proteínas reguladoras do ferro
JAG1	“Jagged 1”
JNK1	Quinase N-terminal C-Jun 1, do inglês “C-Jun N-terminal kinase 1”
LAM	Lipoarabinomanana
LAMP2	Proteína associada a membrana lisossomal 2, do inglês “Lysosomal associated membrane protein 2”
LC3	Cadeia leve 3 complexada com as proteínas associadas aos microtúbulos 1A e 1B
<i>LETM1</i>	Proteína transmembrana 1 contendo mão EF e zíper de leucina, do inglês “Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1”
LL	Lepromatosa polar
LPS	Lipopolissacarídeo
<i>LY96</i>	Antígeno linfocitário 16, do inglês “ <i>Lymphocyte antigen 96</i> ”
M1	Macrófago classicamente ativado ou do tipo 1
M2	Macrófago ativado pela via alternativa ou do tipo 2
<i>MAP1LC3B</i>	Proteína 1 associada à microtúbulos, cadeia 3 beta, do inglês “Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta”
MB	Multibacilar
M-CSF	Fator estimulador de colônia de monócitos
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
<i>MLST8</i>	Proteína associada ao mTOR, homólogo LST8, do inglês “mTOR associated protein, LST8 homolog”
MMP-II	Proteína principal de membrana II
MOI	Multiplicidade de infecção
mRNA	RNA mensageiro

MSR1	Receptor “scavenger” de macrófago 1
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
<i>MTOR</i>	Alvo mecanístico da rapamicina, do inglês “mechanistic target of rapamycin”
mTORC	Complexo do mTOR
NBR1	Proteína 1 vizinha ao gene BRCA1, do inglês “Neighbor of BRCA1 gene 1 protein”
<i>NCF4</i>	Fator citosólico de neutrófilo 4, do inglês “Neutrophil cytosolic factor 4”
NCOA4	Coativador 4 do receptor nuclear, do inglês “Nuclear receptor coactivator 4”
NDP52	Proteína 52 do domínio nuclear 10, do inglês “Nuclear domain 10 protein 52”
<i>NFKB1</i>	Fator nuclear kappa B, subunidade 1, do inglês “Nuclear factor kappa B subunit 1”
<i>NFKBIA</i>	Inibidor alfa de NFKB, do inglês “NFKB inhibitor alpha”
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Assassina natural, do inglês “natural killer”
NLRP3	Família de receptores semelhante ao NOD contendo domínio de pirina 3, do inglês “NOD like receptor family pyrin domain containing 3”
NOD	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
<i>NOS2</i>	Óxido nítrico sintase 2
NRAMP	Proteína macrofágica associada à resistência natural
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Fosfatidiletanolamina
<i>PGE₂</i>	Prostaglandina E2
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase

PI3KC	Complexo PI3K de classe III
<i>PIK3C3</i>	Fosfatidilinositol 3-quinase catalítica, subunidade tipo 3, do inglês “Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3”
<i>PPARG</i>	Receptor ativador de proliferação de peroxissoma gama
PQT	Poliqimioterapia
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PYD	Domínio de pirina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RalB	Proto-oncogene B semelhante à RAS, do inglês “RAS like proto-oncogene B”
RE	Retículo endoplasmático
<i>RICTOR</i>	Companheiro independente de RPTOR do complexo 2 de MTOR, do inglês “RPTOR independent companion of MTOR complex 2”
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RR	Reação reversa
rRNA	RNA ribossomal
RT	Transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
<i>SEC24C</i>	Homólogo C de SEC24, componente do complexo de revestimento de COPII, do inglês “SEC24 homolog C, COPII coat complex component”
<i>SLC11A1</i>	Carreador de soluto, família 11, membro 1
<i>SLC40A1</i>	Carreador de soluto, família 40, membro 1
<i>SLC46A1</i>	Carreador de soluto, família 46, membro 1
SLR	Receptores do tipo sequestrassoma
SR	Grupo sem reação
<i>STAT</i>	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
STRING	Ferramenta de busca para a recuperação de interação de genes/proteínas, do inglês “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins”
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de transferrina
<i>TFRC</i>	Receptor de transferrina

TGFB1	Fator transformador do crescimento beta 1, do inglês “Transforming growth factor beta 1”
TGF-β1	Fator transformador do crescimento beta 1
Th	Linfócito T auxiliar
TLR	Receptores semelhantes à Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
<i>TOLLIP</i>	Proteína de interação com Toll, do inglês “Toll interacting protein”
TT	Tuberculóide polar
UA	Unidade arbitrária
ULK	Quinase ativadora de autofagia semelhante a Unc-51, do inglês “Unc-51 like autophagy activating kinase”
<i>ULK2</i>	Quinase 2 ativadora de autofagia semelhante a Unc-51, do inglês “Unc-51 like autophagy activating kinase 2”
<i>ULK4</i>	Quinase 4 ativadora de autofagia semelhante a Unc-51, do inglês “Unc-51 like autophagy activating kinase 4”
WIPI	Domínio de repetição WD-interação a fosfoinosítídeo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais da hanseníase

A hanseníase é a principal doença infecciosa causadora de incapacidades no mundo (1), e afeta principalmente a pele, a mucosa respiratória superior e os nervos periféricos (2). Atinge a humanidade desde tempos imemoriáveis, causando medo, mutilação e exclusão da sociedade por milhares de anos (2). O número cumulativo de indivíduos que sofreram o curso crônico de desfiguração e deficiência física durante o milênio nunca poderá ser calculado. É estimado que existam entre um e dois milhões de pessoas visivelmente e irremediavelmente incapacitadas devido à hanseníase atual ou passada que necessitam ser cuidadas pela sociedade em que vivem (2).

Seu agente etiológico, o bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) *Mycobacterium leprae*, foi o primeiro patógeno bacteriano identificado como causador de uma doença humana. A doença é conhecida desde as antigas civilizações do Egito, China e Índia, tendo suas primeiras menções escritas datadas do ano 600 antes de Cristo, e existem referências do acometimento de nervos periféricos desde 1847 (2,3).

Apesar disso, até hoje persistem diversos questionamentos acerca da hanseníase (2,3), o que se deve em grande parte à impossibilidade de cultivo de *M. leprae* em meio de cultura artificial e à ausência de um modelo experimental que reproduza a doença em humanos, dificultando a realização de diversos estudos necessários para elucidar vários aspectos de sua patogenia (2,3).

A doença apresenta um período de incubação longo, em média de 3 a 10 anos (4). O contágio conhecido ocorre de pessoa a pessoa através do convívio de doentes multibacilares (MBs) sem tratamento e pessoas suscetíveis (3). O mecanismo preciso de transmissão da hanseníase ainda não foi completamente elucidado (5). Admite-se que o contato com *M. leprae* ocorra através das vias aéreas superiores via gotículas do nariz e da boca durante convívio próximo e prolongado com doentes MBs não tratados, seguindo-se pela dispersão hematológica para a pele e os nervos (4,5). Não se pode deixar de mencionar a possibilidade de transmissão por contato direto da pele com lesões de doentes MBs não tratados

(3,5). Um trabalho recente levantou a possibilidade de transmissão através da transfusão de sangue proveniente de indivíduos com infecção subclínica (6).

As principais células alvo da infecção são macrófagos, histiócitos da pele, células endoteliais e células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes dos nervos periféricos, levando à disfunção axonal e desmielinização (3,5). A lesão nervosa tem um papel central na patogênese da hanseníase, causando deformidades e perda de função (5).

A maior parte dos indivíduos expostos ao bacilo oferece resistência à invasão, desenvolvendo uma infecção subclínica (3,5). Uma minoria desses indivíduos infectados, cerca de 5%, desenvolve a doença em diferentes formas clínicas de acordo com o tipo de resposta imunológica aos antígenos do bacilo e as características genéticas do hospedeiro (3,5). Essas diferenças na resposta imunológica criam um amplo espectro clínico de apresentação da doença (5).

M. leprae apresenta uma baixa virulência nas infecções de seu hospedeiro humano, porém, a evolução longa e lenta da doença acaba por destruir os nervos periféricos dos pacientes, provocando alta morbidade (7,8).

1.2 Biologia do *Mycobacterium leprae*

M. leprae foi identificado como agente causador da hanseníase em 1873, na Noruega, por Gerhard Henrik Armauer Hansen. Apresenta-se como um parasito intracelular obrigatório (3,7,9). *M. leprae* e *M. lepromatosis*, um parente próximo (91% de similaridade) identificado recentemente que causa uma infecção correspondente ao espectro de formas clínicas da hanseníase, com o mesmo prognóstico e responde ao mesmo tratamento, são as únicas espécies de micobactérias capazes de infectar os nervos periféricos (10,11).

Taxonomicamente, *Mycobacterium leprae* pertence a ordem Actinomycetales e a família Mycobacteriaceae. Morfologicamente é um bastonete reto, ligeiramente encurvado com extremidades arredondadas medindo cerca de 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro (Figura 1A) (9). *M. leprae* cora-se em rosa pela fucsina e não se descora ao ser mergulhado em álcool ou acetona, sendo caracterizado como um BAAR (3). Nos esfregaços de linfa cutânea e nos cortes histológicos, os bacilos podem ser vistos isolados, em agrupamentos variados ou em

arranjos especiais denominados globias, peculiares de *M. leprae*, que resultam em uma sólida união de bacilos através de uma substância chamada gléia (Figura 1.2) (3,9).



Figura 1. Fotomicrografias de *Mycobacterium leprae*

(A) Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura de *M. leprae* se dividindo. Fonte: Opromolla, 2000 (9). (B) Fotomicrografia de microscopia óptica de uma lâmina de lesão de pele de um paciente lepromatoso corada pelo método de Wade, *M. leprae* marcado em vermelho (setas). Fonte: Barbosa, 2012 (12).

O tempo de geração de *M. leprae* varia entre 11 e 13 dias na fase logarítmica, multiplicando-se por divisão binária (Figura 1B). Essa característica de reprodução lenta e sua localização intracelular obrigatória no sistema monocítico fagocitário conferem à hanseníase a característica de doença crônica. *M. leprae* não é cultivável em meio de cultura artificial, resultando na impossibilidade de realização de diversos estudos que seriam necessários para elucidar vários aspectos de sua patogenia, persistindo até hoje inúmeros questionamentos acerca da hanseníase (3,9). Durante muito tempo os estudos imunológicos com *M. leprae* utilizaram o bacilo morto, em sua forma irradiada ou sonicada. A possibilidade da utilização do bacilo vivo tem sido fundamental para elucidar várias questões referentes aos mecanismos de interação patógeno-hospedeiro. *M. leprae* viável utilizado nos estudos pode ser obtido de três fontes: lesões de tatus infectados, patas de camundongos “nude” e lesões de pele de pacientes lepromatosos (9,13).

A localização das lesões da hanseníase no corpo dos pacientes afetados, pele, mucosas das vias aéreas superiores e nervos periféricos, sugere que o bacilo tenha preferência por temperaturas menores que 37°C (9). Fora do organismo

humano, em fragmentos de biópsia ou suspensão, o bacilo pode manter-se viável por até 10 dias na temperatura de 4°C e por até 7 dias na temperatura de 20,6°C e umidade de 43,7% em secreção nasal. O aumento da temperatura e umidade tende a reduzir a viabilidade da micobactéria (9), razão pela qual os estudos utilizando a micobactéria viva são conduzidos em incubadora de CO₂ a 33°C.

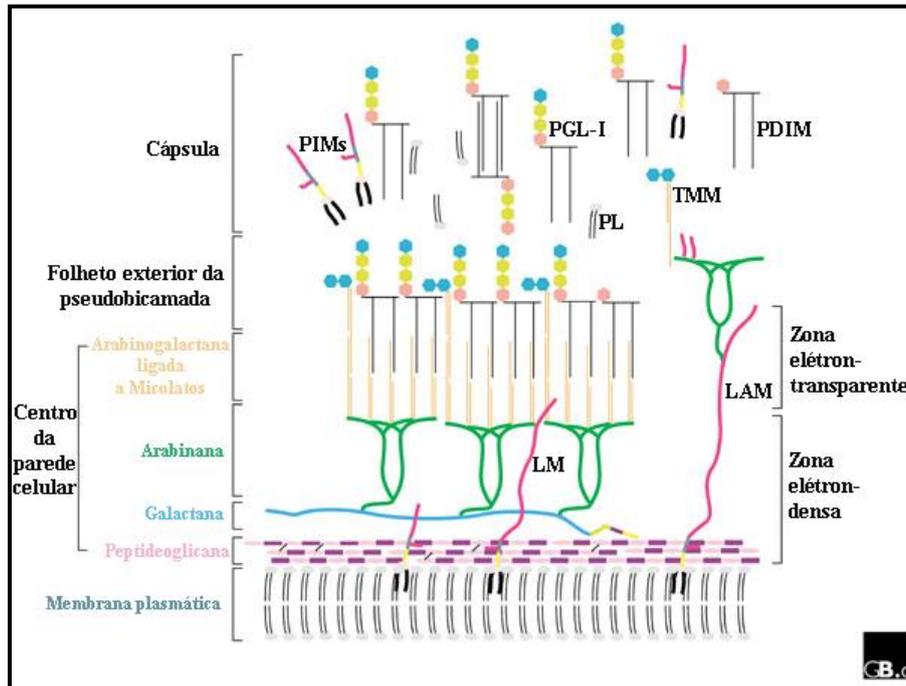


Figura 2. Modelo esquemático do envelope celular de *Mycobacterium leprae*.

Mycobacterium leprae apresenta uma parede celular sobreposta à membrana plasmática. Esta parede é constituída por uma região eletrondensa, composta por peptidoglicana, galactana, arabinomana, lipomanana, lipoarabinomana, uma região eletrotransparente, constituída por arabinogalactana ligada a micolatos, lipomanana, lipoarabinomanana, e uma cápsula formada por fosfatidilinositol manosídeos, glicolípido fenólico 1, fosfolípido, monomicolato de trealose e ftiocerol dimicocerosato. Abreviaturas: LM, lipomanana; LAM, lipoarabinomanana; PL, fosfolípido; TMM, monomicolato de trealose; PIMs, fosfatidilinositol manosídeos; PGL-1, glicolípido fenólico 1; PDIM, ftiocerol dimicocerosato. Fonte: Adaptado de Vissa & Brennan, 2001 (14).

A parede celular de *M. leprae* tem cerca de 20 nm de espessura e possui uma estrutura química semelhante a de outras micobactérias, sendo composta por peptidoglicana entrelaçada e ligada a cadeias polissacarídicas que servem de suporte para os ácidos micólicos que abrangem cerca de metade do peso da parede celular e conferem característica hidrofóbica ao bacilo. A lipoarabinomanana (LAM) é um importante componente da parede celular micobacteriana (Figura 2). O bacilo apresenta uma cápsula contendo grande quantidade de componentes lipídicos, onde é encontrado um lipídeo quimicamente distinto dos encontrados em outras espécies de micobactérias, o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), que contém um trissacarídeo

característico e único para *M. leprae* (Figura 2). Este lipídeo pode ser detectado em tecidos infectados, persistindo por um longo tempo mesmo após o bacilo ter sido degradado e eliminado (9,14).

O genoma de *M. leprae* apresenta uma extensiva redução evolutiva, apresentando uma perda funcional de cerca de 2.000 genes comparado ao *M. tuberculosis*, o que resulta na perda de quase metade de suas funções metabólicas e ausência de vias metabólicas inteiras presentes em *M. tuberculosis*. Menos de 50% do genoma de *M. leprae*, que consiste de 3.268.203 pares de base, codifica proteínas. O bacilo apresenta um total de 2.770 genes, um número excepcionalmente grande de pseudogenes, 1.116, e 1.604 sequências codificadoras de proteínas (15).

1.3 Epidemiologia

Os desafios atuais para o controle da hanseníase são muitos, como a necessidade de detecção precoce, antes do surgimento das incapacidades, realização do tratamento completo para que ocorra a quebra da cadeia de transmissão, exame dos contatos, prevenção e cuidado com incapacidades e a necessidade de estudos visando o desenvolvimento de novos fármacos, novas ferramentas diagnósticas e aumentando o conhecimento limitado que existe sobre as áreas de transmissão (16).

Em 1991, a quadragésima quarta Assembleia Mundial da Saúde definiu como meta até o ano de 2000, através da resolução WHA44.9, eliminar a Hanseníase como um problema de saúde pública (17). A eliminação é definida como um coeficiente de prevalência de menos de 1 caso para cada 10.000 habitantes. Para a maioria dos países endêmicos, este objetivo foi alcançado no tempo e o uso generalizado da poliquimioterapia (PQT) reduziu drasticamente a carga da doença (18).

Após 20 anos, mais de 14 milhões de pacientes foram curados. O coeficiente de prevalência mundial da hanseníase caiu 90%, de 21,2 casos por 10.000 habitantes em 1985 para menos de 1 para 10.000 em 2000 (18). A carga global da hanseníase diminuiu de 5,2 milhões de casos em 1985 para 174.608 casos no primeiro trimestre de 2015 (18,19). A doença foi eliminada em esfera nacional na

maioria dos países entre os 122 onde foi considerada um problema de saúde pública em 1985 (2,18), restando 22 países considerados com alta carga absoluta ou relativa de hanseníase, levando-se em conta a prevalência, a detecção de casos, o índice de detecção de casos, a porcentagem de casos novos identificados em crianças, a porcentagem de grau de incapacidade 2 entre os casos novos identificados e o índice de grau de incapacidade 2 por milhões de casos (16).

Segundo o relatório de 2016 da Organização Mundial de Saúde (OMS), dados oficiais de 136 países e territórios indicam que a prevalência global da hanseníase alcançou 174.608 casos no primeiro trimestre do ano de 2015 (Figura 3). O número de novos casos detectados durante 2015 foi de 210.758; 54.903 casos a menos que em 2006, o que representa uma queda de aproximadamente 20,7% no coeficiente mundial de detecção de novos casos (Figura 4) (19).

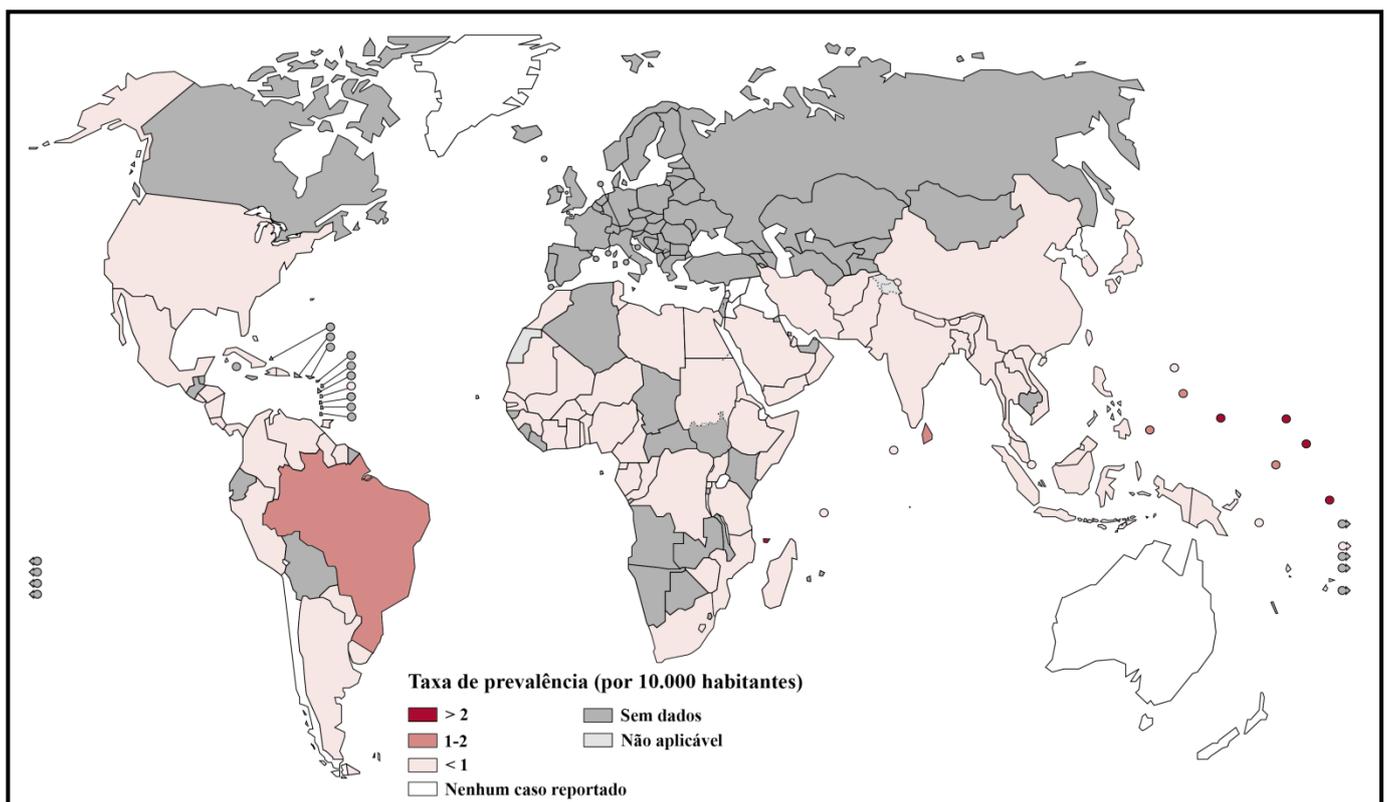


Figura 3. Prevalência mundial da hanseníase em 2015.

Fonte: Adaptado de OMS, 2016 (2).

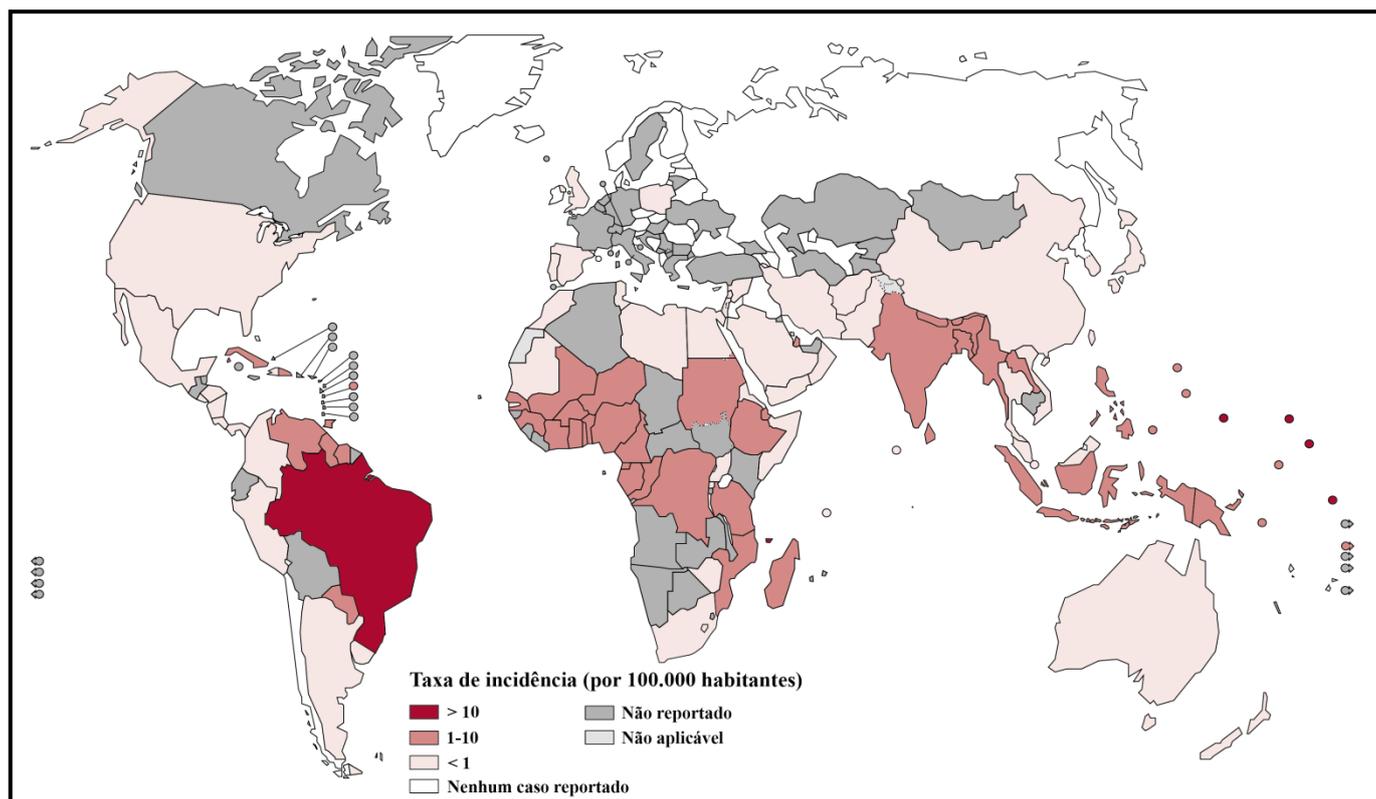


Figura 4. Incidência mundial da hanseníase em 2015.

Fonte: Adaptado de OMS, 2016 (2).

O Brasil é o segundo país mais afetado no mundo e é responsável por 85,8% dos casos nas Américas. No ano de 2015 foram detectados 28.761 casos novos de hanseníase no Brasil, cerca de 13,6% da taxa global de detecção (8), ocupando o primeiro lugar na classificação mundial de novos casos por 100.000 habitantes (19).

Apesar da redução na prevalência por 10.000 habitantes, de 19,54 para 1,01, no período compreendido entre 1990 a 2015, estando próximo da eliminação em nível de país (Figura 5), a hanseníase ainda constitui um problema de saúde pública que exige uma vigilância constante, principalmente nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte, que apresentam as maiores taxas de detecção de casos novos, com os estados do Mato Grosso, Tocantins e Maranhão apresentando valores de incidência em 2015 superiores a 40 casos por 100.000 habitantes, sendo consideradas áreas hiperendêmicas (Figura 6), e valores de prevalência superiores a 3,7 casos ativos por 10.000 habitantes (Figura 5) (8).

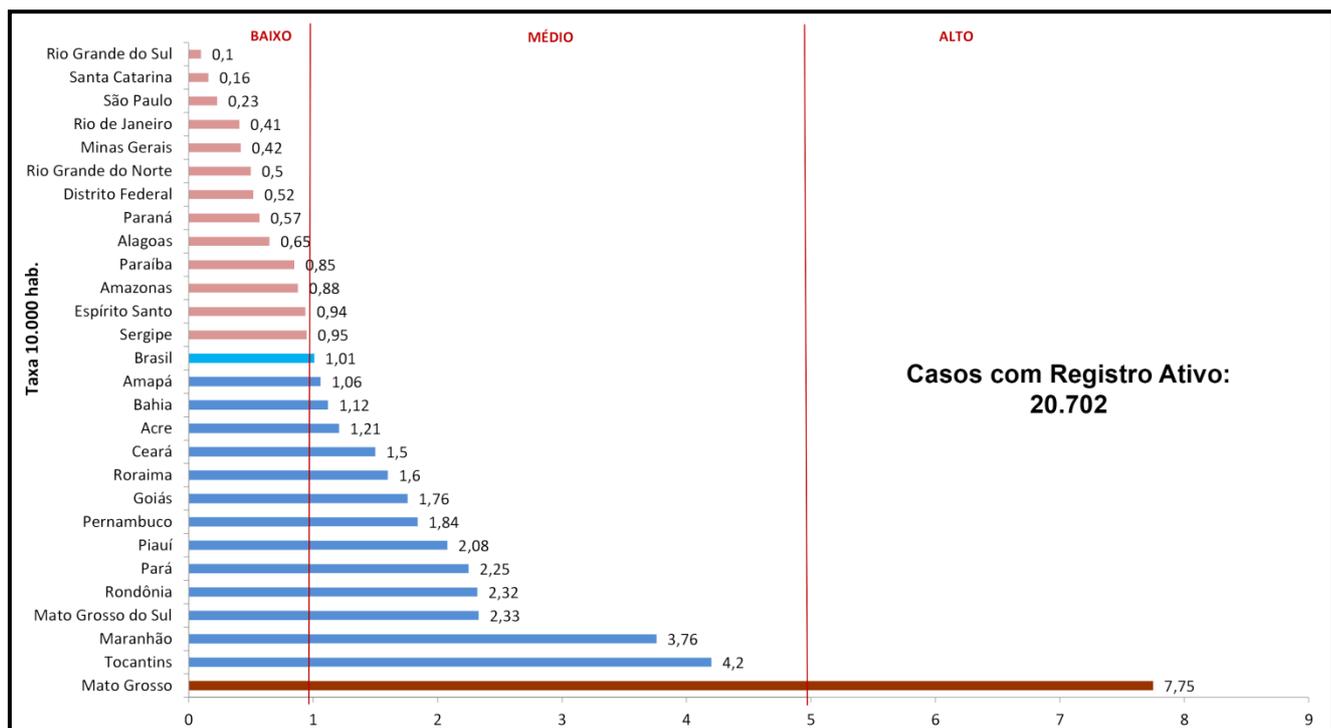


Figura 5. Prevalência da hanseníase por 10.000 habitantes no Brasil em 2015.

Fonte: Brasil, 2016 (8).

Essas regiões concentram a detecção de 82,4% dos casos em apenas 42,5% da população brasileira, residentes em grandes áreas geográficas que são sede de muitas tensões políticas, como a Amazônia Legal e a região Nordeste, o que explica o acúmulo de pessoas infectadas e dificulta intervenções efetivas (8).

A incidência da hanseníase em menores de 15 anos por 100.000 habitantes também é um importante indicador de transmissão recente e endemidade (20). No Brasil foram detectados 2.113 casos novos em menores de 15 anos em 2015, correspondendo a 4,46 casos por 100.000 (Figura 7), o que já é considerado alto segundo os parâmetros preconizados pelo Ministério da Saúde (8,20). Esse indicador apresentou um coeficiente de 10,11 na região Norte, considerada hiperendêmica, e maior que 7,6 no Centro-Oeste e Nordeste, o que é considerado muito alto (8). No estado do Rio de Janeiro, a incidência em menores de 15 anos no ano de 2015 foi de 1,39 por 100.000 habitantes, considerado médio segundo os parâmetros adotados pelo Ministério da Saúde (Figura 7) (8,20).

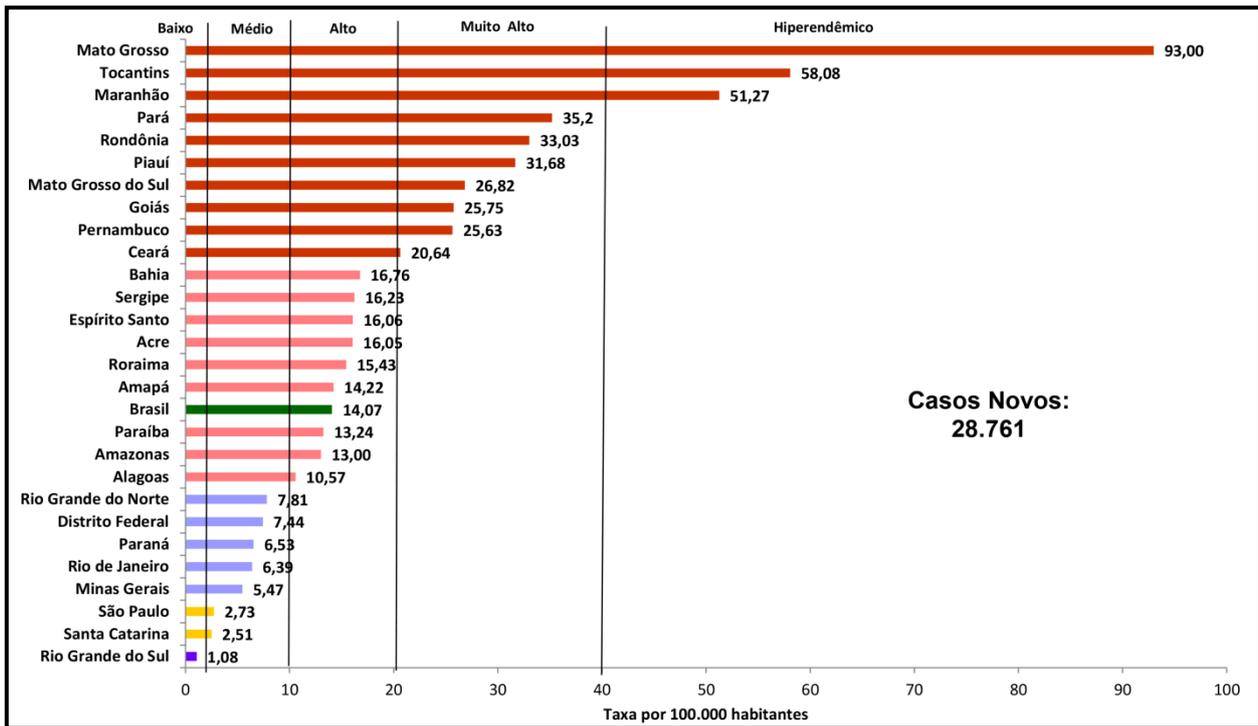


Figura 6. Incidência da hanseníase por 100.000 habitantes no Brasil em 2015.
 Fonte: Brasil, 2016 (8).

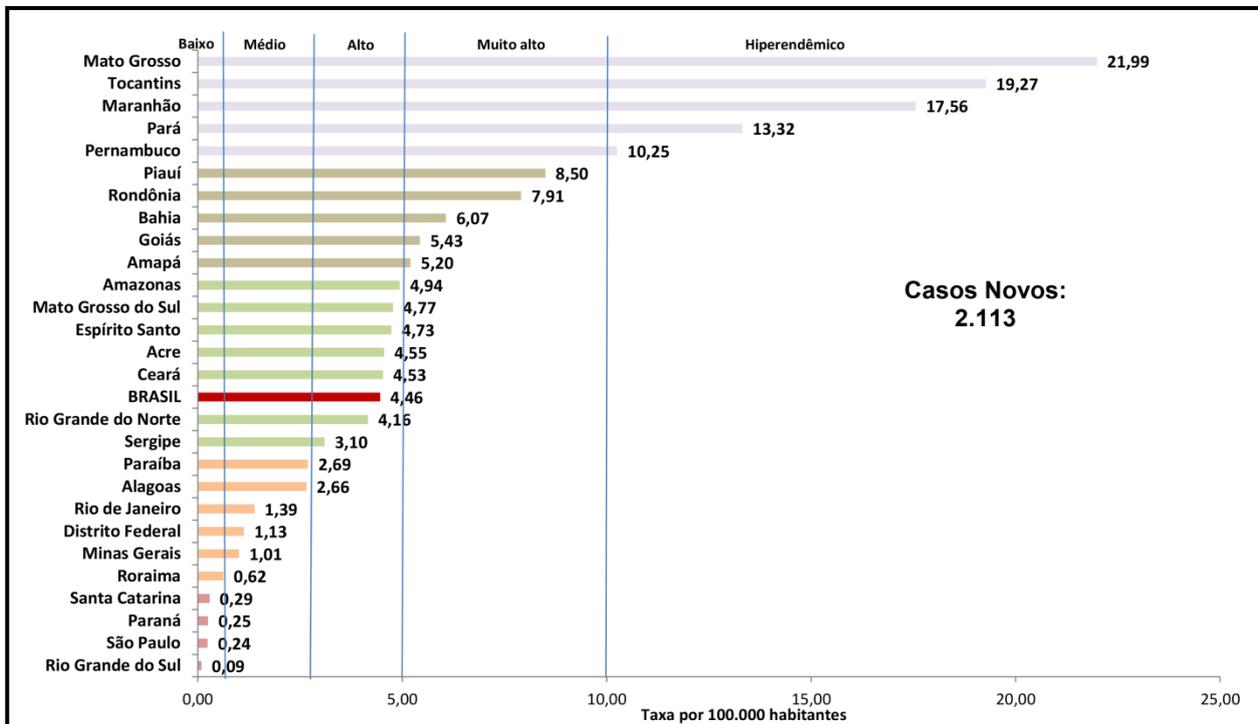


Figura 7. Incidência da hanseníase em menores de 15 anos por 100.000 habitantes no Brasil em 2015.
 Fonte: Brasil, 2016 (8).

A meta de eliminação, que deveria ter sido atingida em 2000, foi adiada para dezembro de 2005, e posteriormente para 2015. Essa meta ainda não foi cumprida, mas deve ser alcançada em breve em uma perspectiva nacional. Apesar da redução do número de casos, a hanseníase ainda é um importante problema de saúde pública no Brasil, sendo necessário o diagnóstico precoce, o tratamento supervisionado, o exame dos contatos de pacientes e a prevenção da doença, somados aos estudos e divulgação de informações sobre a doença para que se alcance a eliminação (8,20).

Segundo a OMS, a chave para o sucesso da eliminação da hanseníase depende de ações e pesquisas, integração total do tratamento nos serviços de saúde e sustentação do comprometimento político e dos recursos humanos e financeiros necessários, que devem ser assegurados para que seja possível a eliminação da doença (16).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e epidemiológico, realizado por meio da análise da história, condições de vida do paciente, sinais e sintomas clínicos e dos exames dermatológico e neurológico. Excepcionalmente é necessário o auxílio laboratorial para a confirmação diagnóstica (21).

Entre os sinais e sintomas sugestivos da doença podemos destacar lesões cutâneas únicas ou múltiplas, hipopigmentadas ou eritematosas na forma de máculas, pápulas, placas, tubérculos, nódulos, infiltração e eritema cutâneo difuso, alterações neurológicas como hiperestésias, hipoestésias, anestésias, diminuição da força muscular em extremidades com ou sem a presença de atrofia muscular e espessamento doloroso de nervos periféricos, sendo os mais frequentemente acometidos, os nervos ulnar, radial, mediano, fibular, tibial posterior, auricular e o supra-orbitário. Dentre as manifestações sistêmicas estão as artralgias, adenomegalias, rinite, rouquidão, iridociclite e edema de extremidades (3).

Os sinais cardinais da hanseníase são a apresentação de lesões de pele com perda de sensibilidade, espessamento de nervos periféricos e baciloscopia positiva (2,3). A alteração de sensibilidade está presente em cerca de 70% das lesões cutâneas da doença (3). Uma pessoa apresentando lesões de pele ou sintomas

sugestivos de dano neural sem a presença ou com presença duvidosa de um dos sinais cardinais pode ser chamada de caso suspeito. Para a confirmação diagnóstica destes casos são necessários exames complementares como o exame histopatológico de biópsias de pele e nervos periféricos, a baciloscopia de linfa cutânea, exames eletrofisiológicos e outros mais complexos, como a detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA) de *M. leprae* pelo método da reação em cadeia da polimerase (PCR), a detecção de anticorpos anti-PGL-1 e outros antígenos específicos da micobactéria (2,3,21).

Para o diagnóstico correto é importante que se entenda o conceito espectral da hanseníase, que possibilita o entendimento do curso clínico-evolutivo da doença. A partir deste entendimento são aplicadas as classificações que facilitam o diagnóstico e a terapêutica (22).

1.5 Classificação

A hanseníase apresenta um amplo espectro de formas clínicas que dependem essencialmente da resposta imune desencadeada por *M. leprae*. O grau de imunidade varia determinando a forma clínica e a evolução da doença (4). Segundo Ridley & Jopling (1966), a hanseníase é caracterizada por um espectro de formas de apresentação, cuja classificação baseia-se em aspectos clínicos, imunológicos, na baciloscopia e histopatologia das lesões. As formas clínicas encontradas no espectro da doença são: a forma tuberculóide polar (TT), “borderline” tuberculóide (BT), “borderline” média (BB), “borderline” lepromatosa (BL) e lepromatosa polar (LL) (Figura 8) (23,24).

Os pacientes tuberculóides apresentam lesões localizadas, resposta imune do tipo celular ativada e baixas concentrações séricas de anticorpos contra o bacilo. No outro lado do espectro se localizam os pacientes lepromatosos, que apresentam lesões múltiplas e difusas, resposta diminuída ao teste da lepromina (Mitsuda), são incapazes de limitar o crescimento da bactéria, que na ausência do tratamento pode se disseminar por todo o corpo, e apresentam altas concentrações séricas de anticorpos específicos anti-*M. leprae* (Figura 8) (24,25).

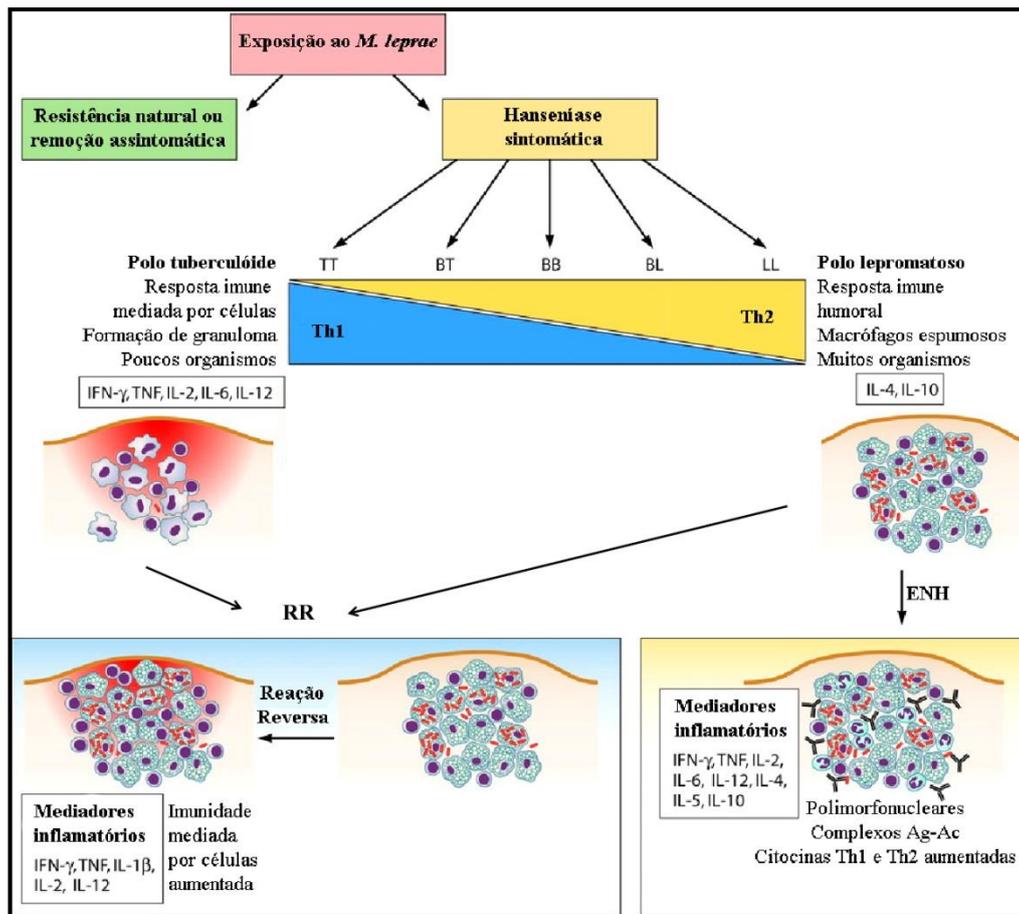


Figura 8. Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo a classificação de Ridley & Jopling, 1966.

Cerca de 95% dos indivíduos expostos à *M. leprae* são resistentes à infecção ou a removem assintomaticamente. Os cerca de 5% restantes irão desenvolver a doença em uma das formas clínicas dependendo da capacidade de resposta imune mediada por células aos antígenos de *M. leprae* apresentada pelo hospedeiro. No polo tuberculóide, o hospedeiro apresenta uma boa resposta imune celular à *M. leprae*, formando granulomas epitelióides e secretando citocinas próinflamatórias, combatendo eficientemente a infecção. Neste polo há um pequeno número de bacilos presentes e de lesões. Já os pacientes do polo lepromatoso apresentam uma resposta imune humoral e secreção de citocinas anti-inflamatórias. Neste polo há intensa proliferação bacilar e múltiplas lesões com a presença de macrófagos espumosos cheios de bacilos no seu interior. Os pacientes “borderline” apresentam características intermediárias, se aproximando mais de um polo ou outro de acordo com seu perfil de resposta imunológica à *M. leprae*. Existem ainda os episódios reacionais, que são responsáveis por grande destruição de ramos nervosos e consequentes incapacidades. Há dois tipos principais: a reação reversa (RR) ou reação do tipo 1, que ocorre principalmente nas formas “borderline”, e o eritema nodoso da hanseníase (ENH) ou reação do tipo 2, que ocorre principalmente no polo lepromatoso. Fonte: Adaptado de Misch *et al.*, 2010 (24).

A manifestação inicial da doença pode ser a forma indeterminada (HI), onde a resposta do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. A forma indeterminada pode evoluir para cura espontânea ou evoluir para uma das formas clínicas do espectro da doença. As manifestações mais frequentes da forma indeterminada são a presença de áreas hipoestésicas ou anestésicas, parestesias,

manchas hipocrômicas e/ou eritemo-hipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pelos (8).

Existe ainda outra classificação muito utilizada na prática clínica, a classificação de Madri, estabelecida durante o Congresso Internacional de hanseníase de 1953 na Espanha. Esta também leva em conta as características clínicas da doença, acrescidas dos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo assim os grupos polares tuberculóide (HT) e virchoviano (HV), a forma indeterminada (HI), e o grupo instável e intermediário chamado de forma dimorfa (HD) (9).

Para fins operacionais e terapêuticos, a classificação da hanseníase tem sido simplificada, classificando-se os pacientes nas formas paucibacilar (PB) e multibacilar (MB), baseando-se no número de lesões cutâneas e no resultado da baciloscopia de linfa (Figura 9) (3). De acordo com a OMS, os pacientes que apresentam até 5 lesões cutâneas ou onde *M. leprae* não é encontrado na baciloscopia de linfa e no exame histopatológico das biópsias são classificados como PBs. Neste grupo se incluem os pacientes TT e BT. No grupo de pacientes MBs, o bacilo é encontrado no exame baciloscópico e nas biópsias de pele e nervo periférico e o número de lesões é superior a 5. Neste grupo se encaixam os pacientes BB, BL e LL (Tabela 1) (2,3,8).

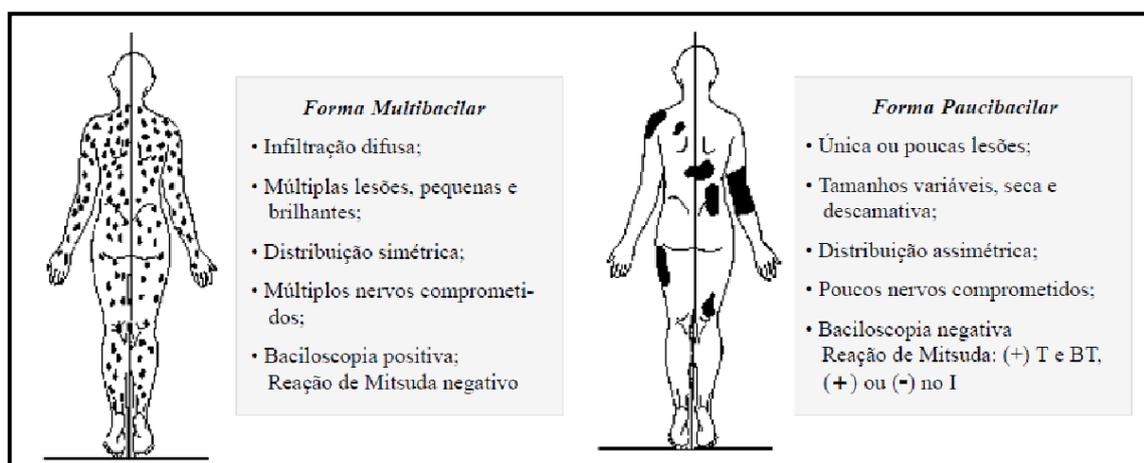


Figura 9. Representação esquemática das formas clínicas da hanseníase segundo o aspecto e distribuição das lesões, comprometimento nervoso, resultado da baciloscopia e resposta ao teste de Mitsuda.

Fonte: Souza, 1997 (22).

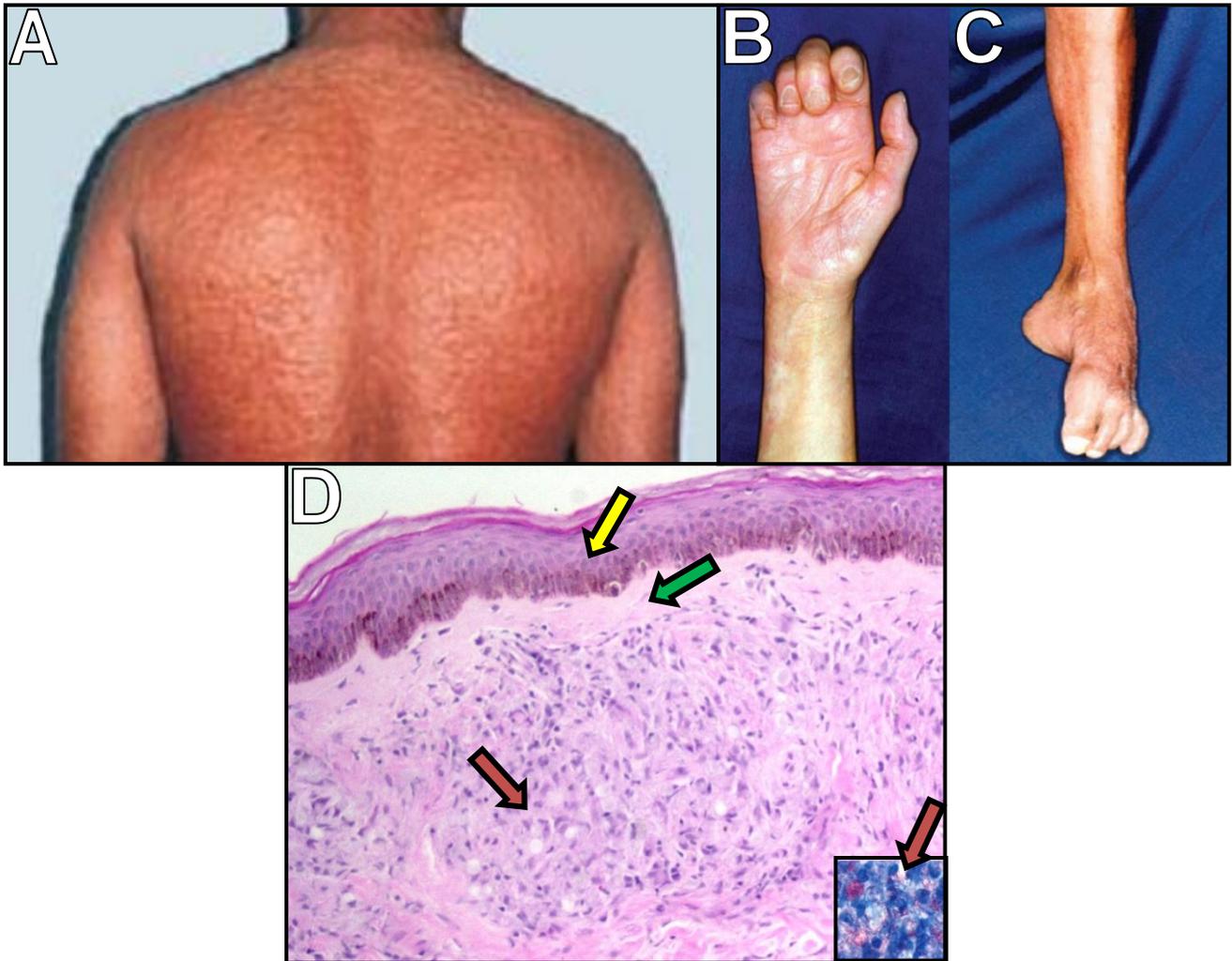


Figura 10. Lesões características da hanseníase lepromatosa.

(A) Lesões pápulo-nodulares com infiltração difusa. Fonte: Brasil, 2008 (26). (B) Mão em garra por paralisia dos nervos mediano e ulnar. Fonte: Brasil, 2008 (27). (C) Pé equino-varo. Fonte: Brasil, 2008 (27). (D) Histopatologia da lesão de pele lepromatosa. Fotomicrografia de lesão de pele de um paciente do polo lepromatoso corada com Hematoxilina-Eosina. No detalhe, coloração de Wade. Epiderme com aplainamento das cristas interpapilares (seta amarela), presença de faixa de Unna (seta verde), macrófagos vacuolados e espumosos com bacilos no interior (setas vermelhas). Fonte: Barbosa, 2012 (12).

No polo lepromatoso, a ausência de resposta imunológica celular eficiente contra *M. leprae* resulta em multiplicação bacilar e disseminação dos bacilos pelo organismo. As lesões cutâneas desse polo iniciam-se como máculas mal definidas, hipocrômicas ou eritematosas pouco visíveis ampla e simetricamente distribuídas pelo corpo, progredindo para acentuação do edema e infiltração, pele lúzida, com poros dilatados, pápulas, nódulos e tubérculos sobrepostos (Figura 10A). Com a evolução da doença, múltiplos troncos nervosos são comprometidos simetricamente, tornando-se firmes, espessados, fibrosos e endurecidos, o que se soma à perda sensitiva e motora, levando à perda da função, atrofia, deformidades e contraturas,

como mão em garra e pés equinos rígidos (pé equino-varo) (Figura 10B e C) (8,22,26,27).

Na histopatologia observa-se epiderme atrófica com aplainamento das cristas interpapilares, presença da faixa de Unna separando a epiderme da zona do infiltrado inflamatório dérmico, histiócitos em diversos graus de evolução, resultando em macrófagos vacuolados e espumosos, com muitos bacilos em seu interior, denominados células de Virchow, além de poucos linfócitos e plasmócitos (Figura 10D). O tecido subcutâneo e a derme são invadidos pelo infiltrado inflamatório, que também envolve o plexo vículo-nervoso, glândulas sudoríparas e sebáceas. A pesquisa do bacilo mostra-o íntegro, aglomerado em globias dentro do citoplasma de histiócitos em filetes nervosos, paredes de vaso e no músculo eretor do pelo (Figura 10D). A imunohistoquímica mostra um reduzido número de linfócitos com proporções similares entre células T grupo de diferenciação (CD) 4⁺ e CD8⁺ (3,25).

Nos pacientes do polo tuberculóide, as lesões mostram níveis de contenção da multiplicação bacilar. Neste polo são secretados interleucina (IL)-2, interferon gama (IFN- γ), resultando em uma intensa atividade fagocítica, induzindo a formação do granuloma e destruição bacilar. A baciloscopia de linfa é negativa e as lesões cutâneas apresentam-se com bordas pronunciadas e bem definidas, são únicas ou em pequeno número e distribuídas assimetricamente pela pele (22,25).

As lesões de pele se apresentam na forma de máculas hipocrômicas ou eritematosas delimitadas por micropápulas ou como placas eritematosas difusamente infiltradas ou com tendência central para o aplainamento e limites externos nítidos e bem definidos (Figura 11A e B). Em geral não ultrapassam 10 centímetros de diâmetro e os danos em ramos nervosos são mais precoces e mais intensos que no polo lepromatoso, levando a alterações sensitivas e autonômicas que evoluem para hipoestesia, anestesia, dor neural, espessamento neural e diminuição da força muscular, devido à perda axonal. Os troncos nervosos acometidos geralmente estão em pequeno número e usualmente próximos às lesões cutâneas (Figura 9). Neste grupo clínico podemos encontrar somente comprometimento neural com ausência de lesões cutâneas, denominando-se hanseníase neural pura (22,25).

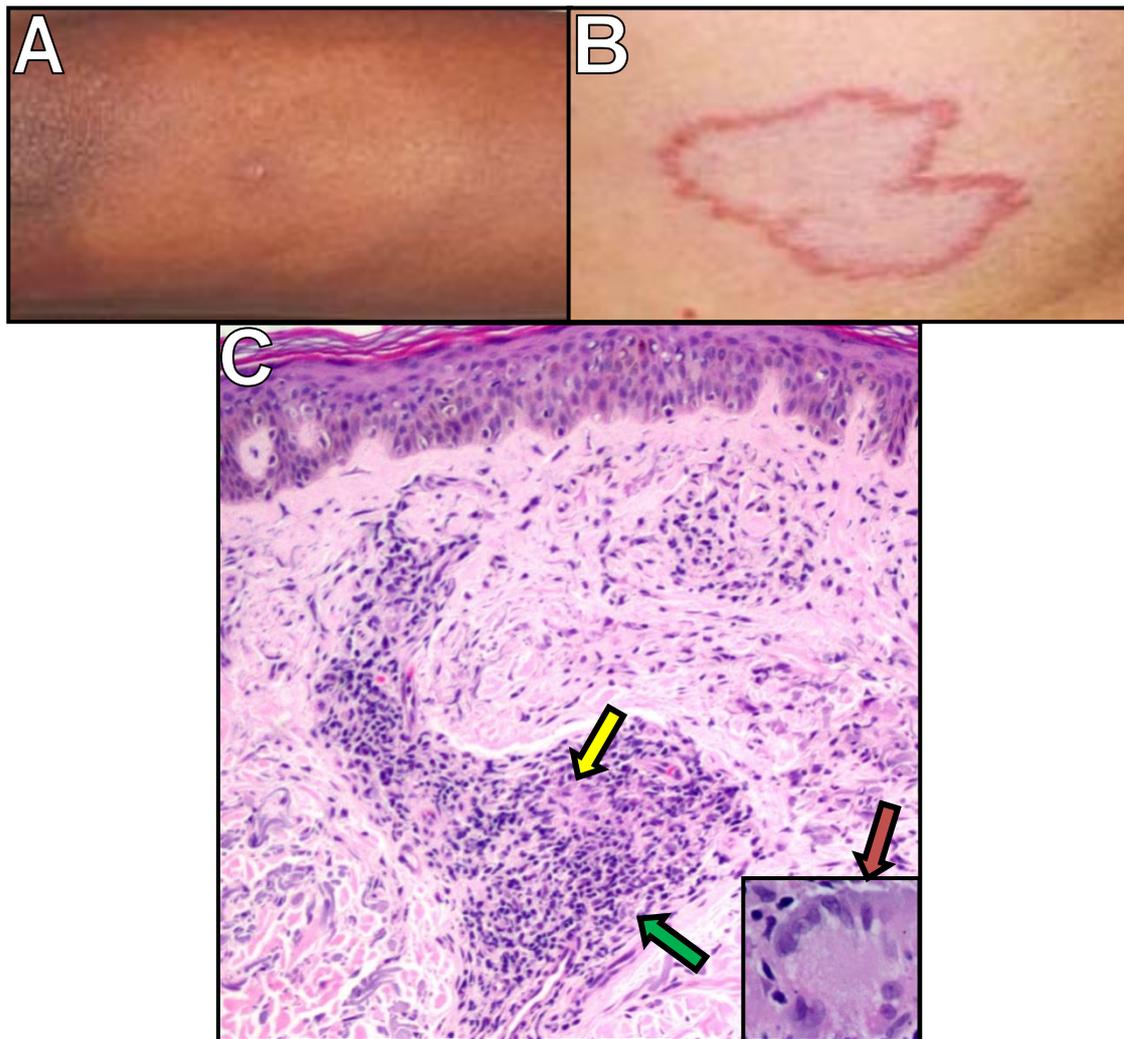


Figura 11. Lesões características da hanseníase tuberculóide.

(A) Mácula hipocrômica. Fonte: Brasil, 2008 (26). (B) Placa eritematosa delimitada por pápulas. Fonte: Brasil, 2008 (26). (C) Histopatologia da lesão de pele tuberculóide corada com Hematoxilina-Eosina. Granuloma epitelióide bem formado circundado por linfócitos (seta verde) com macrófagos diferenciados em células epitelióides (seta amarela) e, no detalhe uma célula gigante do tipo Langhans (seta vermelha). Fonte: Barbosa, 2012 (12).

Na histopatologia de biópsias de pele são observadas infiltração de células epitelióides e células gigantes do tipo Langhans circundadas por linfócitos constituindo os granulomas epitelióides bem definidos que invadem a derme e por vezes a epiderme, comprometendo filetes nervosos e anexos cutâneos (Figura 11C). A imunohistoquímica mostra predominância de células T CD4⁺, secretando IFN- γ , assim como linfócitos T CD8, e um maior número de lesões nervosas associadas (3,22,25).

Dentro do espectro de formas clínicas da hanseníase podem ocorrer os episódios reacionais, descritos como fenômenos agudos sobrepostos à evolução

crônica da doença, sendo potencialmente responsáveis pelo agravamento do prejuízo da função neural, com o conseqüente agravamento da incapacidade. Decorrem do processo inflamatório e resposta imunológica mediada por antígenos de *M. leprae*, estabelecendo relação com a carga bacilar e com a capacidade da resposta imune do hospedeiro (28,29). Quimioterapia, gravidez, infecções concorrentes e estresse físico e emocional têm sido identificados como fatores que predisõem às reações (3,4,28). São manifestações clínicas resultantes das alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante. Ocorrem em aproximadamente 50% dos pacientes e são de difícil manejo clínico, demandando o uso de corticoides por um longo período. Esses episódios agudos, que afetam principalmente a pele e os nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade das funções dos nervos periféricos (28).

Dois tipos principais de reações são conhecidos: a reação reversa (RR), que ocorre principalmente nos pacientes "borderline" (BT, BB e BL) (29,30), e o eritema nodoso hansênico (ENH), que ocorre nos pacientes MBs (BL e LL) (Figura 8) (30,31), refletindo o processo inflamatório mediado pela resposta imune, envolvendo mecanismos de hipersensibilidade distintos. A RR é um episódio de inflamação aguda na pele e nos nervos, resultado de uma hipersensibilidade tardia contra antígenos de *M. leprae*, ocorrendo em cerca de 30% dos pacientes, em todo o espectro de formas clínicas da hanseníase, exceto a forma TT (3,4,28,29). O ENH, por sua vez, ocorre em aproximadamente 50 % dos pacientes do polo lepromatoso e se apresenta como um quadro sistêmico, com manifestações febris, aparecimento de nódulos cutâneos e inflamação nos nervos, olhos e testículos (3,4,28,31).

Durante os episódios reacionais há geralmente o reaparecimento de lesões antigas e o surgimento de lesões novas, podendo ocorrer durante qualquer fase de desenvolvimento da hanseníase, antes, durante ou até 5 anos após o término do tratamento, em todas as formas clínicas, sendo raras na forma indeterminada. Em casos que ocorrem após o término do tratamento, é importante que se façam testes para diferenciar reações de recidivas e que o tratamento seja instituído prontamente a fim de evitar danos neurais (3,28).

1.6 Tratamento

Por séculos os doentes com hanseníase foram tratados com ignorância, preconceito e negação. O medo universal levou ao isolamento dos doentes, separação de casais e à retirada de crianças de suas famílias. Embora o isolamento não tenha sido completamente ineficaz na redução da transmissão da doença, era uma tragédia para os doentes, deixando-os sem esperança de cura ou de resgate, pois não havia nenhum tratamento disponível no momento (32).

Para a maioria dos doentes, o isolamento foi demonstrado ser inútil. Em 1936, em Cebu (Filipinas), Doull e colaboradores demonstraram que doentes afetados com o que seria hoje a forma PB, tinham um potencial muito baixo para a transmissão da doença, sendo a segregação irrelevante nesses casos (32).

O único medicamento disponível era o óleo de chaulmoogra, extraído do fruto de uma árvore nativa da Índia, que vinha sendo usado durante séculos. Entretanto, o óleo não era muito eficaz, demonstrando efeito aparente geralmente nos casos que provavelmente se curariam espontaneamente (32).

Em 1940, foi desenvolvida a primeira droga realmente efetiva contra a hanseníase, a dapsona. A dapsona auxiliou no controle da hanseníase, mas o tratamento durava muitos anos e, às vezes, a vida inteira, gerando um alto índice de abandono do tratamento e, à longo prazo, o aparecimento de resistência (2,32).

Em 1960, foram descritos os primeiros casos de resistência de *M. leprae* à dapsona que ainda era a única droga descrita como sendo efetiva contra a hanseníase. Nos primeiros anos da década de 1960, a rifampicina e a clofazimina foram descobertas, mas apenas no ano de 1981, um grupo de estudo da OMS recomendou o uso da poliquimioterapia (PQT) composta por dapsona, rifampicina e clofazimina para o tratamento da doença (2,32).

Desde 1995, a OMS disponibiliza o tratamento gratuitamente para todos os pacientes com hanseníase em todos os países endêmicos, inicialmente através do fundo para drogas da Fundação Nippon e, desde o ano 2000, através da doação da Novartis e da Fundação Novartis para o Desenvolvimento Sustentável (2,18).

A PQT adotada é um tratamento simples e altamente efetivo para curar todas as formas clínicas da hanseníase. A rifampicina é incluída no tratamento de ambas as formas clínicas. Para tratar os pacientes PBs, rifampicina, em dose mensal

supervisionada de 600 mg, e dapsona, em dose mensal supervisionada de 100 mg e dose diária autoadministrada de 100 mg são utilizadas (Figura 12) .(2,8,20,21).

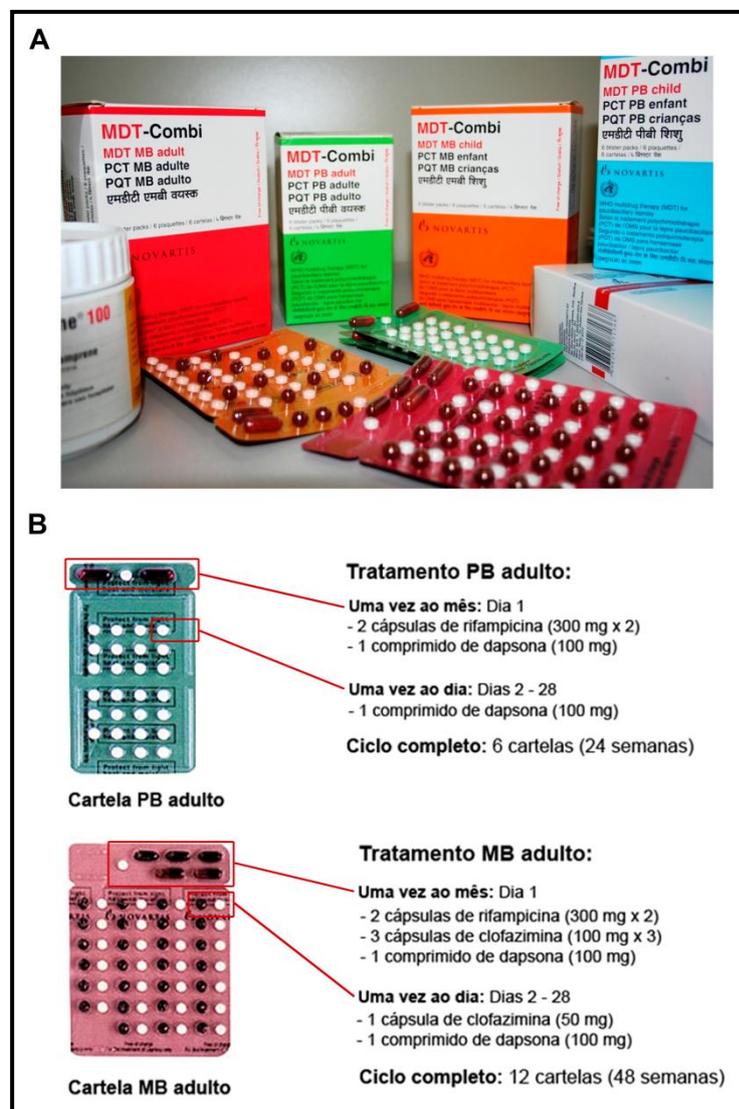


Figura 12. Poliquimioterapia utilizada no tratamento da hanseníase.

(A) Caixas e “blisters” fornecidos gratuitamente pela Fundação Novartis. (B) Esquemas terapêuticos para o tratamento dos doentes paucibacilares, composto por rifampicina e dapsona, e para multibacilares, composto por rifampicina, clofazimina e dapsona. Fonte: Adaptado de OMS, 2016 (2).

São utilizadas uma combinação de rifampicina, em dose mensal supervisionada de 600 mg; clofazimina, em dose mensal de 300 mg e dose diária autoadministrada de 50 mg, e dapsona, em dose mensal supervisionada de 100 mg e diária autoadministrada de 100 mg para tratar os pacientes MBs (Figura 12). (2,8,20,21)

A OMS recomendou que o período de tratamento de doentes MBs fosse reduzido de 24 meses para 12 meses (33). Muitos autores relatam não ter

observado diferenças no índice de recidivas entre os pacientes tratados por 12 ou 24 meses (34). Porém outros advogam pelo tratamento de 24 meses para pacientes com índice baciloscópico (IB) acima de 4 no momento do diagnóstico, grupo responsável por até 90% dos casos de recidivas relatados em alguns estudos, até que outras evidências da eficácia do tratamento de 12 meses estejam disponíveis (33,35).

O grupo considerado MB é um grupo muito heterogêneo incluindo pacientes das formas “borderlines” e a forma lepromatosa polar. Isto pode levar a um tratamento exagerado, já que mais de 60% dos pacientes que têm mais de 5 lesões, sendo portanto classificados como MBs, têm um IB negativo, necessitando apenas do esquema de tratamento com duas drogas, indicado para pacientes PBs (33).

São descritos alguns efeitos colaterais dos medicamentos utilizados na terapêutica da hanseníase. A rifampicina provoca uma coloração vermelho-alaranjada nos fluidos corporais por até 48 horas após a ingestão; a clofazimina causa uma pigmentação escura na pele, que pode ficar cinza azulada, grande ressecamento com aspecto ictiósico, descoloração na conjuntiva e alterações digestivas causadas pela deposição de cristais do medicamento na parede do intestino delgado. A dapsona causa anemia hemolítica, que pode ser severa em pacientes com deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase, meta-hemoglobinemia, dentre outras reações adversas, que devem ser comunicadas aos pacientes no momento do início da PQT para evitar preocupações desnecessárias e abandono do tratamento (21,33,36).

Em indivíduos que não podem tomar clofazimina ou dapsona, são utilizadas outras drogas como a minociclina, claritromicina, ofloxaxina e perfloxaxina, consideradas drogas de segunda linha contra a hanseníase, sendo utilizadas em esquemas alternativos de tratamento (3,21,33,36).

1.7 Resposta imune na hanseníase

A hanseníase é uma doença com um amplo espectro de formas clínicas que correlacionam com a natureza da resposta imunológica ao patógeno. Os pacientes do polo tuberculóide são relativamente resistentes à micobactéria, apresentando uma infecção localizada, com poucas lesões. Os bacilos são raramente detectados,

mas lesões de pele e nervos são frequentes. Por outro lado, pacientes do polo lepromatoso são relativamente mais suscetíveis, apresentando infecção disseminada e um grande número de lesões de pele com numerosos bacilos localizados dentro de vacúolos em macrófagos espumosos (25).

Os indivíduos sadios e do polo tuberculóide expostos à micobactéria apresentam imunidade celular para o *M. leprae*, mas indivíduos com hanseníase lepromatosa são incapazes de liberar IFN- γ , levando à incapacidade de ativar monócitos e matar o patógeno. A resposta imune celular é protetora, mas pode estar diretamente envolvida na patogênese, provocando os granulomas e as lesões nos nervos na hanseníase tuberculóide (9,37,38).

A medida padrão da imunidade mediada por células ao *M. leprae* é o teste de Mitsuda, uma reação de hipersensibilidade do tipo IV. Neste teste é aplicada uma injeção intradérmica contendo 100 μ L de uma suspensão de bacilos mortos por calor, na concentração de 40 a 140 x 10⁶ por mL e, após 21 a 28 dias, a reação é medida. Segundo o acordado no IV Congresso Internacional de Hanseníase (Madrid, 1953), o teste de Mitsuda é considerado negativo quando há ausência de resposta clínica, e positivo quando surge uma infiltração, pápula ou nódulo com mais de 3 mm de diâmetro, a qual pode ser de 3 a 5 mm (+), mais de 5 mm (++) ou uma infiltração nodular ulcerada (+++). Infiltrações discretas com menos de 3 mm são consideradas duvidosas (\pm) (24,37,39).

A reação de Mitsuda, uma consequência dos eventos ocorridos após a fagocitose dos bacilos aplicados, é tipicamente negativa em pacientes lepromatosos e fortemente positiva nos pacientes tuberculóide. Quando a reação é positiva os bacilos são digeridos pelos macrófagos que se transformam em células epitelióides, enquanto que na reação negativa, não ocorre destruição bacilar.

Por razões ainda não totalmente esclarecidas, nos pacientes tuberculóides a resposta imune celular não protege totalmente, a ponto de evitar o desenvolvimento da doença (9,24,39).

Uma correlação inversa entre a imunidade celular e a resposta imune humoral é observada na hanseníase. Verifica-se uma maior concentração de células T CD8⁺ nas lesões de pele de pacientes do polo lepromatoso, enquanto há uma maior quantidade de células T CD4⁺ em lesões tuberculóides. Linfócitos T auxiliares CD4⁺ produzem citocinas do tipo 1, como IFN- γ , enquanto células T CD8⁺ nas lesões lepromatosas produzem predominantemente citocinas do tipo Th2, como a IL-4 (37).

No polo tuberculóide há predomínio de citocinas do tipo Th1, como IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e fator estimulatório de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), uma vigorosa resposta imune celular aos antígenos do *M. leprae* e contenção da infecção em granulomas bem formados (37,40,41). As citocinas IL-2, IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) são responsáveis pela manutenção da resposta imune celular. A IL-2 ativa receptores de linfócitos T CD4⁺, estimulando a proliferação de clones celulares responsáveis pela manutenção da produção de citocinas e, paralelamente, estimula células assassinas naturais (NK), potencializando a produção de IFN- γ . Já o IFN- γ , age nos macrófagos, estimulando a fagocitose, a produção de radicais reativos de nitrogênio e oxigênio, estimulando-os a matar ou restringir a proliferação de micobactérias e outros patógenos intracelulares, e mecanismos de ativação celular que aumentam a produção de TNF, aumentando a ativação de macrófagos, atuando em um mecanismo sinérgico cíclico para manter o macrófago ativado e estimula a formação do granuloma (40). O TNF foi recentemente descrito como um importante fator envolvido na inflamação e consequente dano neural e desmielinização em pacientes apresentando neuropatias decorrentes da hanseníase (42). Adicionalmente, a IL-12 estimula as células NK, induzindo a produção de IFN- γ , potencializando a ativação de macrófagos. Não é observada uma grande imunidade humoral neste polo da doença, sendo encontradas baixas concentrações de imunoglobulinas (Ig) específicas (38,40,43).

No polo lepromatoso, os pacientes apresentam uma resposta imune do tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13, formação de complexos de anticorpos e deficiência de fatores de crescimento como a IL-2 (9,25,37,40,41,44,45). A IL-4 e a IL-10 suprimem a atividade macrofágica, bloqueando a estimulação de macrófagos (45). A IL-4 tem um efeito imunorregulatório negativo sobre a imunidade mediada por células, podendo contribuir para o aumento da proliferação bacteriana através do bloqueio da multiplicação de células T dependente de IL-2 pela inibição de seus receptores, além de também inibir a ativação de monócitos mediada pelo IFN- γ (9,37,40,46). Essa citocina também é capaz de reduzir a expressão de CD14 de monócitos assim como a produção de IL-1 β e TNF, bloqueando a geração de óxido nítrico NO (44). Adicionalmente, IL-4 estimula linfócitos B, levando a uma grande produção de anticorpos específicos anti-*M. leprae*, incluindo anticorpos da classe IgE e anticorpos

IgM anti-PGL-1, associados com a depressão da resposta imune celular (9,40). A IL-10 pode inibir a produção de TNF, GM-CSF e IFN- γ por células T CD4⁺ na relativa ausência de IFN- γ ou IL-2 (40,44,45). A IL-13 também tem sido incluída no mecanismo de supressão de células T na hanseníase por seus efeitos sobre células B e macrófagos similares aos da IL-4. Tem sido demonstrado que apenas clones de células Th2 de lesões lepromatosas produzem IL-13 (46,47). As lesões de pele dos pacientes LL também apresentam uma maior expressão de células FoxP3⁺, implicando um papel para as células T reguladoras na falta de resposta Th1 observada neste polo (48).

Apesar de a dicotomia Th1-Th2 explicar parcialmente a polarização na hanseníase, a descrição de diferentes fenótipos de macrófagos levou à observação de que os mecanismos inatos de resposta são peça chave no direcionamento da resposta e, conseqüente estabelecimento das diferentes formas clínicas da doença. Estudos anteriores nos fazem acreditar que os macrófagos tenham um papel crucial no direcionamento do perfil de resposta imunológica frente aos antígenos do *M. leprae* (41,49–51).

Os patógenos são inicialmente reconhecidos por células do sistema imune inato através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) compartilhados entre os grupos de microrganismos. Muitos pares de PRR-PAMP estão envolvidos na resposta imune inata à *M. leprae* (37).

O *M. leprae* infecta preferencialmente os macrófagos e as células de Schwann. Além disso, trabalhos mostram a interação de *M. leprae* com outras células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas (52).

A localização intracelular obrigatória de *M. leprae* constitui um dos principais mecanismos de escape do sistema imune. Estando dentro de uma célula do hospedeiro, a bactéria se protege da imunidade humoral, mas deve se preocupar com as vias intracelulares de destruição de patógenos. Inicialmente o bacilo deve inibir com sucesso a fusão do fagossoma com o lisossomo, evitando sua digestão pelas enzimas lisossomais (53).

A fagocitose de micobactérias ocorre através de receptores de manose, receptores de lectina do tipo C, como o CD209, receptores do complemento 1, 3 e 4 e receptores “scavenger”, como o CD163 (37,50,54).

Os receptores de lectina do tipo C reconhecem estruturas de carboidratos específicas da parede celular de patógenos, incluindo aquelas presentes no envelope celular de micobactérias. O CD209 e o receptor de manose se ligam a lipoarabinomanana manosilada na parede celular da bactéria (37,54).

O receptor de manose, juntamente com os receptores do complemento 1, 3 e 4, promove a fagocitose de *M. leprae* por macrófagos. O receptor do complemento 3 pode facilitar a fagocitose através de opsoninas ou da fagocitose baseada em lectina que requer colesterol (37). O CD163, um receptor “scavenger” de hemoglobina, também tem sido implicado como receptor para *M. leprae*, visto que o bloqueio deste receptor resultou na inibição da fagocitose de micobactérias em monócitos humanos, e que a fagocitose de *M. leprae* foi mais efetiva em células HEK293, uma linhagem de células embrionárias de rim humanas, transfectadas com CD163 (50).

Alguns dos principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas são os receptores semelhantes à Toll (TLR), que estão presentes na superfície de monócitos e macrófagos (55). O reconhecimento de *M. leprae* parece ocorrer principalmente através do heterodímero TLR2/1, levando a diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas, e desencadeando a produção de TNF, como parte de uma resposta inflamatória aguda, e IL-12, que desencadeia uma resposta adaptativa do tipo T auxiliar (Th) 1, com a liberação de IFN- γ , que ativa macrófagos e aumenta a secreção de citocinas próinflamatórias, a apresentação de antígenos e a atividade microbicida de macrófagos (55–59).

Análises imunohistoquímicas revelaram que TLR1 e 2 são mais expressos em macrófagos presentes nas lesões de pacientes tuberculóides, quando comparados aos presentes nas lesões de pacientes lepromatosos. O padrão de secreção de citocinas afeta diferencialmente a ativação de TLR2/1 por lipopeptídeos de *M. leprae*. Citocinas Th1, como IFN- γ , fator estimulatório de colônia de granulócitos e macrófagos GM-CSF, IL-12 e IL-18, presentes no polo tuberculóide, aumentam a ativação de TLR2/1, enquanto citocinas do Th2, como IL-4 e IL-10, inibem sua ativação. Além disso, fosfolipídeos oxidados inibem a secreção de IL-12, mas não de IL-10, induzida por TLR2/1 (37).

A Coronina 1A (CORO1A), que inibe a maturação do fagossoma favorecendo o parasitismo intracelular, tem sua expressão aumentada em macrófagos ricos em *M. leprae* na forma lepromatosa da hanseníase. Estudos sugerem que a CORO1A

diminui a sinalização via TLR2, e que a ativação via TLR2 suprime a expressão de CORO1A em macrófagos humanos (37,60).

O domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) 2 é um receptor NOD “like” que reconhece muramil dipeptídeo, molécula resultante da degradação de peptidoglicana presente na parede celular micobacteriana. Polimorfismos em NOD2 são associados com a susceptibilidade à hanseníase. A ligação de muramil dipeptídeo a seu receptor, NOD2, em monócitos levou a diferenciação em células dendríticas, com produção de IL-32. A frequência de células dendríticas é maior na forma tuberculóide em comparação com a forma lepromatosa da hanseníase. As células dendríticas apresentam uma alta expressão de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e CD86, sendo mais eficientes na apresentação de antígenos peptídicos e particulados, estimulando respostas de células T CD8⁺, ambos os tipos celulares, células dendríticas e células T CD8, sendo localizados circundando o granuloma epitelióide em lesões de pacientes tuberculóide. Os monócitos de pacientes lepromatosos são caracterizados por não responderem ao ligante de NOD2 com produção de IL-32 e diferenciação de células dendríticas, em função da elevada secreção de IL-10, que bloqueia a expressão de CD1b em monócitos de indivíduos saudáveis, com a diferenciação de células dendríticas sendo restaurada através do bloqueio desta citocina com anticorpos neutralizantes (37,61).

Montoya e colaboradores (41) descreveram que enquanto IL-10 induz a via fagocítica em macrófagos, levando à expressão de CD209 e receptores “scavenger”, resultando na fagocitose da micobactéria e lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, a IL-15 induz uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3. Neste trabalho, os autores especularam que a programação para fagocitar e as respostas antimicrobianas por macrófagos são distintas e diferencialmente reguladas, uma vez que os macrófagos de pacientes LL exibem uma capacidade fagocítica aumentada que é mediada por IL-10 (41) enquanto os macrófagos de BT apresentam uma expressão aumentada de peptídeos antimicrobianos por um mecanismo dependente da produção de IL-15 após a ativação do macrófago por ligantes de TLR2/1, e da ativação da via vitamina D3 (41,62). Curiosamente, a via autofágica converge com a via do receptor de vitamina D-catelicidina, a qual é preferencialmente observada na forma PB da hanseníase (37). A indução de autofagia pela via da vitamina D3 é dependente de catelicidina (63) e é requerida para a atividade antimicrobiana

mediada pelo IFN- γ (64). Dessa forma, o destino da infecção pelo *M. leprae* em um hospedeiro, depende de quando e como uma determinada citocina está presente em maior quantidade em relação à vários outros produtos (Figura 13) (41).

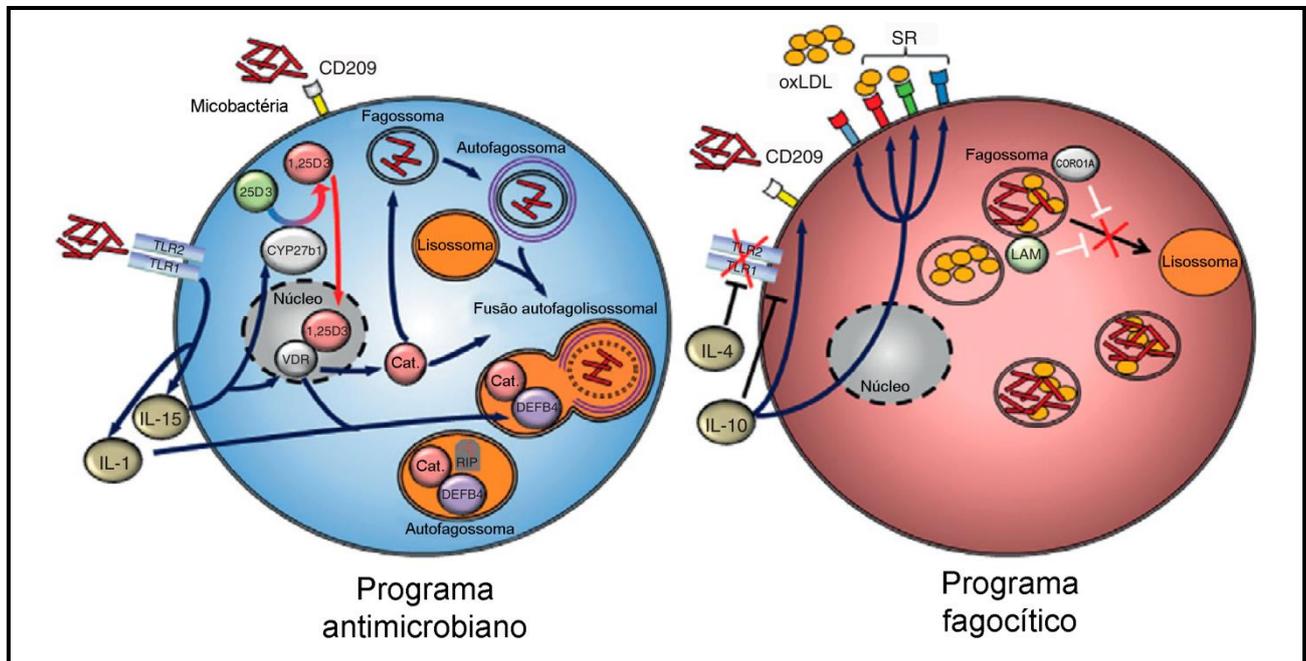


Figura 13. Modelo de divergência dos programas antimicrobiano e fagocítico na hanseníase.

Na hanseníase tuberculóide a presença de IL-15 exógena ou produzida através da indução via TLR aumenta a expressão do receptor de vitamina D (VDR) e CYP27b1, que converte a forma inativa da vitamina D, a 25D3, para a forma ativa 1,25D3, que se liga no VDR, iniciando a transcrição de catelecidina (Cat.) e, em conjunto com a IL1 resulta na produção de β -defensina (DEFB4). A catelecidina inicia a autofagia e a fusão autofagolisossomal, levando a morte da micobactéria através dos peptídeos antimicrobianos no autofagossoma. Alternativamente, no polo lepromatoso a IL-10 induz a expressão de receptores “scavenger” (SR), como o CD163, resultando em um aumento da fagocitose de *M. leprae* e de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL), favorecendo a formação de células espumosas e a persistência de *M. leprae*. Adicionalmente IL-10 e IL-4 podem suprimir a expressão de TLR e/ou sua sinalização, enquanto a lipoarabinomanana (LAM) e a Coronina 1A (CORO1A) suprimem a fusão fagolisossomal por mecanismos distintos. Fonte: Adaptado de Montoya *et al.*, 2010 (37).

Teles e colaboradores demonstraram um aumento da expressão da citocina IL-27 (65), uma citocina imunorregulatória de natureza paradoxal (66), em lesões de pele de pacientes LL, levando a ativação da via do IFN do tipo I com aumento da expressão de interferon beta (IFN- β) e consequente maior produção de IL-10, bloqueando as vias antimicrobianas nos macrófagos hospedeiros (65,67).

O fator transformador do crescimento beta 1 (TGF- β 1), um dos mais potentes fatores imunossupressores endógenos, está expresso em lesões de pacientes lepromatosos da hanseníase. Ele tem ação supressora sobre macrófagos

contrapondo os efeitos do IFN- γ na atividade antimicrobiana e inibindo a produção de TNF, contribuindo para a persistência da infecção (68,69). Esta citocina foi ainda implicada na transdiferenciação de células de Schwann em miofibroblastos, aumento da produção de matriz extracelular e conseqüente fibrose dos nervos periféricos afetados (70).

A expressão de ciclo-oxigenase 2 também está aumentada em lesões de pacientes lepromatosos (71). Este dado corrobora estudos anteriores que observaram a liberação de mediadores como prostaglandina E2 e IL-10 por monócitos de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculóides (72). Estes mediadores contribuíram para a inibição da linfoproliferação frente ao *M. leprae* em indivíduos sabidamente respondedores à bactéria. A PGE₂ inibe a produção de IL-2 e também de IFN- γ , citocinas em geral fracamente expressas nas lesões lepromatosas, mas importantes para gerar resposta imune específica (71,72). Além disso, já foi observado que o LAM e PGL-1 presentes na superfície de *M. leprae* e livres em tecidos infectados suprimem a resposta de células T por inibirem a produção de IFN- γ , além de modular a produção de TNF por monócitos *in vitro* (73–75).

1.7.1 Polarização de macrófagos na hanseníase

Os macrófagos são heterogêneos em vários aspectos e se apresentam em espectro de fenótipos distintos. Apesar de sua elevada plasticidade, para fins didáticos eles podem ser classificados em dois grupos funcionalmente distintos, macrófagos classicamente ativados ou do tipo 1 (M1) ou macrófagos ativados pela via alternativa ou do tipo 2 (M2), que diferem em termos de receptores e expressão de citocinas e quimiocinas. Os macrófagos M1 são microbicidas e inflamatórios, enquanto os M2 possuem características supressoras (76–80). Os monócitos podem ser diferenciados em macrófagos utilizando diferentes protocolos [M1: GM-CSF (ativação de IRF5), lipopolissacarídeo (LPS), TNF, IFN- γ ; M2: IL-4, IL-13, inflamação alternativa (M2a), imunocomplexos, ativação concomitante de receptores Fc γ e TLR (M2b), IL-10, TGF- β 1, glicocorticoides, desativação (M2c), fator estimulador de colônia de monócitos (M-CSF, ativação de IRF4)] (79,80). Em um dos protocolos descritos, GM-CSF é utilizado para diferenciar macrófagos com características próinflamatórias (M1) e M-CSF para diferenciar macrófagos com características anti-

inflamatórias (M2). Embora ambos os macrófagos fagocitem a micobactéria, as células diferenciadas com GM-CSF e infectadas com *M. leprae* e, em seguida tratadas com IFN- γ e ligante de CD40, estimulam as células T a produzirem IFN- γ , já células diferenciadas com M-CSF não são capazes de estimular as células T. Em conjunto, *M. leprae* é capaz de induzir alta produção de IL-10 em células diferenciadas com M-CSF e não com GM-CSF. Além disso, macrófagos diferenciados com GM-CSF e estimulados com *M. leprae* expressam a proteína principal de membrana II (MMP-II), que é uma proteína antigênica do *M. leprae* capaz de estimular as células T, sugerindo que os macrófagos diferenciados com GM-CSF podem processar *M. leprae* fagocitado. Estes resultados indicam que GM-CSF contribui para a ativação das células T em macrófagos estimulados com *M. leprae*, ao contrário de M-CSF que não é capaz de induzir ativação dessas células (76,81).

Um trabalho recente de Kibbie e colaboradores (82) identificou a proteína Jagged 1 (JAG1) como um potencial regulador da diferenciação de macrófagos na hanseníase. Esta proteína é preferencialmente expressa no endotélio vascular das lesões de pele dos pacientes tuberculóides e facilita a diferenciação de macrófagos em M1 através do eixo IFN- γ -JAG1, mais uma vez demonstrando a importância do microambiente no sucesso da infecção (82).

Após sua entrada no macrófago, *M. leprae* induz a produção de TNF, IL-12, IL-10 e TGF- β 1 por macrófagos infectados. Essas citocinas são opostas em muitas formas de ação, incluindo suas ações sobre o próprio macrófago. De um lado, o TNF promove a ativação de macrófagos para a destruição intracelular de *M. leprae* e potencializa os efeitos do IFN- γ . Por outro lado, TGF- β 1 e IL-10 desativam os próprios macrófagos, aumentando a proliferação bacilar. Tais citocinas contrapõem os efeitos do TNF e IFN- γ (83).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que *M. leprae* pode levar a apoptose de macrófagos por um mecanismo relacionado à expressão de TNF (84), além disso, Walsh e colaboradores (85) verificaram que a apoptose é mais frequente em células de pacientes paucibacilares e sugeriram que a apoptose seja um mecanismo para conter a multiplicação bacilar (86). Dados anteriores de nosso grupo demonstraram que, na presença de *M. leprae*, a fagocitose de células apoptóticas induz a mudança do fenótipo de macrófagos M1 para um fenótipo M2,

com aumento da expressão de receptores “scavenger” como CD163 e SRA-I, das citocinas imunorregulatórias IL-10 e TGF- β e redução de IL-15 e IL-6, enquanto macrófagos M2 não apresentaram alteração de fenótipo e função frente à fagocitose de células apoptóticas (51). Nossos dados sugerem que em células de pacientes paucibacilares, a fagocitose de células apoptóticas induz um fenótipo M2 o que explicaria a persistência da doença micobacteriana nestes pacientes apesar da sua capacidade de montar uma resposta imune celular efetiva (51).

Diversos estudos demonstraram o predomínio de marcadores de macrófagos M2 em células de lesão de pele de MBs. No entanto, o aumento da expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima induzida por IFN- γ , descrita como marcador M1 foi descrito no polo lepromatoso da hanseníase (66). Em conjunto, Sales e colaboradores (49) demonstraram que *M. leprae* é capaz de induzir a expressão da IDO em monócitos humanos. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, os autores sugeriram que através da indução da expressão gênica e atividade enzimática de IDO, o bacilo desencadeia a supressão da resposta antígeno-específica observada no polo lepromatoso da hanseníase e que essa enzima também atua inibindo o estresse oxidativo, o mecanismo bactericida mais eficiente na eliminação de *M. leprae*, inibindo a via do NO, provavelmente através da ativação da heme oxigenase 1 (HO-1) (87).

O CD163, uma molécula classicamente descrita como marcador de M2, foi inicialmente caracterizado como um receptor “scavenger” para hemoglobina (Hb), porém estudos recentes têm demonstrado sua funcionalidade como receptor para bactérias, tendo um importante papel na imunidade inata. Dados recentes do nosso grupo têm demonstrado um aumento da expressão de CD163 nas lesões de pacientes do polo lepromatoso da hanseníase e um possível papel desta molécula como co-receptor para o *M. leprae* (50,88,89). A Hb se liga a haptoglobina (Hp) e, é então liberada no citoplasma pelo CD163. A ligação do complexo Hb-Hp ao CD163 induz a produção de IL-10, contribuindo para a indução da enzima HO-1 (87). A HO-1 degrada o anel da protoporfirina IX em monóxido de carbono, biliverdina e ferro livre, produtos estes que apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, mediando o efeito anti-inflamatório da IL-10 através de sua atividade (87). CD163 e HO-1 se apresentam ainda como moduladores de ferro intracelular e do estado inflamatório em macrófagos. A HO-1, assim como CD163, é mais expressa em

macrófagos M2, que têm sido relacionados aos macrófagos presentes no polo lepromatoso da hanseníase (50,51,87).

Os macrófagos de lesões de pele de pacientes lepromatosos apresentam um fenótipo com maior quantidade de células CD68⁺ expressando a enzima IDO, os receptores “scavenger” CD163 e MSR1, Arginase-1 e CD86, quando comparados aos macrófagos presentes nas lesões de pacientes tuberculóide (49–51). Estudos prévios do nosso grupo sugeriram que o CD163 contribui não apenas para a internalização de *M. leprae*, como também sua sobrevivência, ao aumentar os estoques de ferro (50).

As micobactérias apresentam sistemas de aquisição de ferro semelhantes à sideróforos, como micobactinas e exoquelinas, que posteriormente são captados pelos receptores de sideróforos localizados na membrana externa destes patógenos. Estudos anteriores sugeriram que *M. leprae* produz várias proteínas envolvidas no transporte, estoque e regulação de ferro na ausência de genes reconhecíveis que codificam “scavengers” de ferro (90). Foi demonstrada a presença de uma substância semelhante à micobactina, e a aquisição de ferro mediada por exoquelinas de *M. paratuberculosis* e *M. neoaurum* em *M. leprae*, mas até hoje não foi verificada a presença de exoquelinas de *M. leprae* (91–94). Foi demonstrada a existência de uma proteína rica em ferro de 380 kD, denominada bacterioferritina, em *M. leprae*. O papel da bacterioferritina na sobrevivência intracelular de *M. leprae* tem sido especulado, mas ainda não há dados na literatura que confirmem essa hipótese (93). Além disso, Reeve e colaboradores (95) demonstraram a presença de uma proteína transportadora de metais divalente homóloga à proteína macrofágica associada à resistência natural (NRAMP1) em *M. leprae*. Esta proteína está envolvida na resistência ou susceptibilidade a diversos patógenos intracelulares, e apresenta homólogos em vários parasitos intracelulares como micobactérias (94,95).

1.7.2 O ferro e seu papel na modulação da resposta imune e na infecção

1.7.2.1 Metabolismo do ferro em homeostase

O ferro é um nutriente essencial para quase todos os organismos vivos, tendo importantes papéis em inúmeros processos celulares pela sua habilidade em aceitar e doar elétrons. É um componente essencial para a formação da molécula de heme e participa da formação de diversas proteínas. Na forma de hemoproteína é

fundamental para o transporte de oxigênio, geração de energia e detoxificação. Contudo, o ferro é altamente reativo, podendo reagir com o oxigênio gerando radicais hidroxil e ânions superóxido, através da reação de Fenton, que danifica componentes celulares e teciduais, necessitando de um grande controle de seu metabolismo nas células. Ele é absorvido através do epitélio duodenal e sua homeostase é alcançada através da regulação compensatória dos processos de absorção e estoque de ferro dependendo da disponibilidade (94,96–100).

O ferro proveniente da dieta entra no corpo através da absorção nos enterócitos do duodeno e da região proximal do jejuno. Ele pode ser absorvido na forma de ferro ferroso (Fe^{2+}), através do transportador de metais divalente (DMT1), também conhecido como NRAMP2, presente na membrana apical destas células, após a redução do ferro férrico (Fe^{3+}) pela citocromo b ferrirredutase duodenal, ou na forma de ferro ligado ao heme, uma importante fonte de ferro para muitos seres vivos (Figura 14) (100).

O heme é internalizado através da proteína transportadora de heme carreador de soluto, família 46, membro 1 (SLC46A1) e, posteriormente é degradado pela enzima HO-1, que metaboliza o anel da protoporfirina IX em um processo que libera ferro livre, CO e biliverdina, uma cadeia de quatro anéis tetrapirrólicos lineares, que quase imediatamente é transformada em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase, sendo então excretada através do fígado pela bile (100,101).

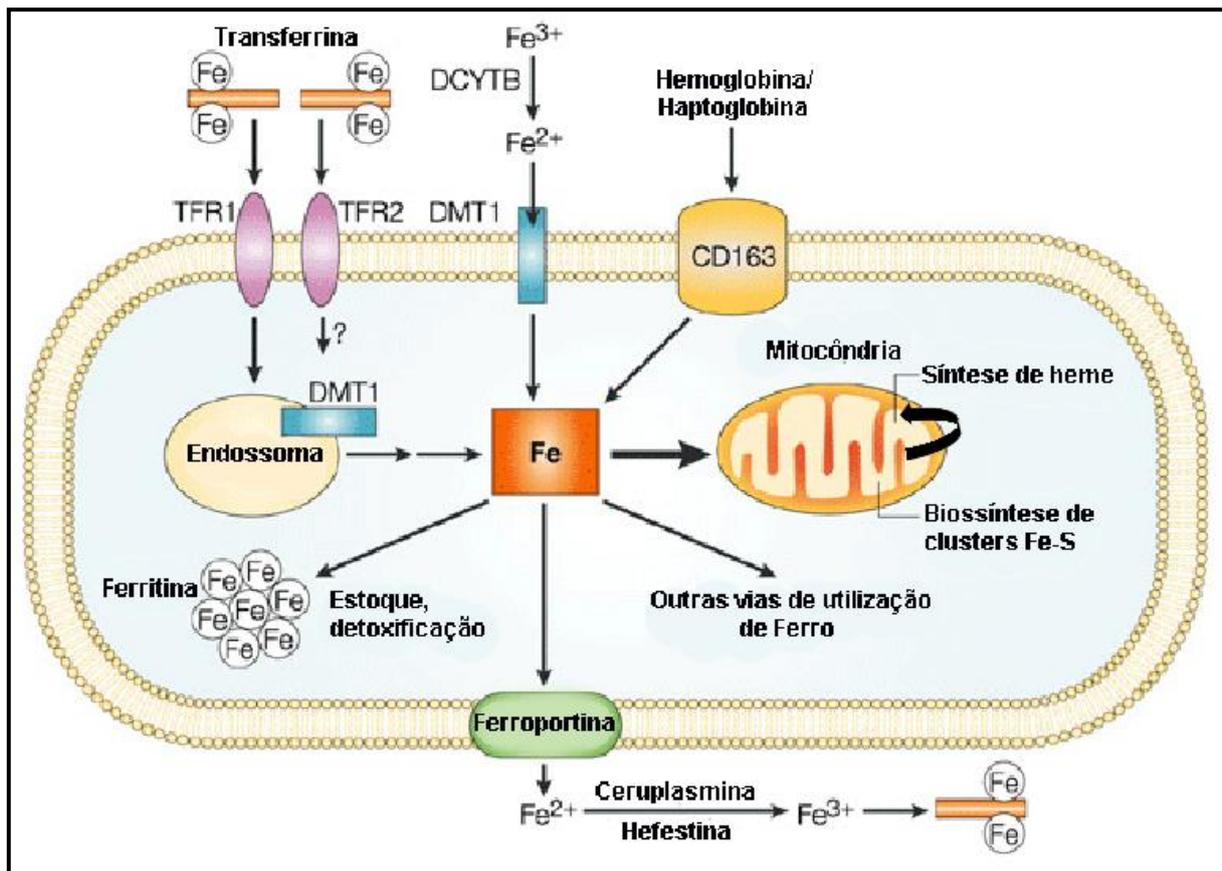


Figura 14. Metabolismo celular do ferro.

A forma saturada da transferrina (Tf), a holoTf, se liga ao receptor de transferrina (TfR), expresso na superfície celular. O ferro é então transferido para o citoplasma, provavelmente através do transportador de metais divalente 1 (DMT-1). No lúmen intestinal, o ferro (Fe) é absorvido na forma de Fe^{2+} , após a redução do Fe^{3+} pela citocromo b ferrirredutase duodenal (DCYTB). O ferro também pode ser internalizado em macrófagos na forma de heme através da internalização do complexo hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp) pelo receptor "scavenger" de hemoglobina CD163. O ferro no citoplasma celular pode ser estocado na forma de ferritina, utilizado nas vias em que ele é necessário, como, por exemplo, a síntese de heme, ou pode ser exportado pela ferroportina. O Fe^{2+} é então oxidado a Fe^{3+} pela hefeestina e pela ceruloplasmina e se liga a Tf para voltar ao plasma. Fonte: Adaptado de Schaible & Kaufmann, 2004 (94).

A HO-1 é um potente anti-inflamatório e antioxidante, que tem sido sugerida como uma importante enzima citoprotetora através da atividade antioxidativa da biliverdina e de seu metabólito, bilirrubina, assim como dos efeitos anti-inflamatórios do CO (102). Entre os efeitos anti-inflamatórios do CO, podemos destacar a capacidade de inibir a ativação e agregação de plaquetas; além disso, o CO é um importante vasodilatador. A bilirrubina é o antioxidante endógeno mais abundante em tecidos de mamíferos. Ela confere citoproteção contra o estresse oxidativo e nitrosativo em diversos modelos. Outra proteína importante no mecanismo de citoproteção da HO-1 é a ferritina (FT). A liberação de ferro livre tem capacidade de gerar radicais hidroxil prejudiciais através da reação de Fenton. O radical superóxido

é rapidamente sequestrado na forma de FT, diminuindo o estado pró-oxidante da célula através da remoção do ferro livre, tendo um efeito citoprotetor (101,103).

Embora o caminho do ferro no enterócito não esteja completamente elucidado, sabe-se que a exportação do ferro para a corrente sanguínea ocorre através da ferroportina 1 (Fpn-1), um transportador basolateral que transporta Fe^{2+} (96). Esta exportação é regulada pela oxidação do ferro a Fe^{3+} na face citosólica pela hefestina e no plasma pela ceruplasmina antes de ser liberado para a transferrina (Tf) presente no plasma (Figura 14) (94,96,100).

Duas substâncias são importantes na regulação natural da homeostase do ferro no organismo, a hepcidina e a Fpn-1, que regulam a saída do ferro intracelular. A hepcidina é um hormônio sintetizado pelo fígado que regula os estoques de ferro. Ela diminui a expressão da Fpn-1, a única proteína exportadora de ferro celular conhecida, através da supressão do ácido ribonucleico (RNA) mensageiro (mRNA) e da internalização e degradação da proteína. Concentrações aumentadas de hepcidina agem inibindo a absorção de ferro na circulação, levando ao acúmulo do ferro no intestino (96).

Para circular no corpo, o Fe^{2+} é oxidado em Fe^{3+} pelas proteínas hefestina, uma proteína associada à membrana, e ceruplasmina, uma oxidase localizada no plasma, permitindo sua interação com a apoTf. O Fe^{3+} se liga a sítios vazios na apoTf, no plasma sanguíneo, que normalmente mantém um terço da saturação. O restante do ferro circulante é proveniente da degradação de eritrócitos senescentes nos macrófagos. As células absorvem o ferro de diversas formas, dentre elas pela endocitose mediada pelo receptor de Tf (TfR) da forma saturada da Tf, que contém dois íons de Fe^{3+} e é conhecida como holoTf. Este complexo ligante-receptor é entregue ao endossoma inicial, de onde é exportado, por DMT-1 e NRAMP1 e é liberado no citoplasma (94,100). O processamento de eritrócitos senescentes nos macrófagos é associado com a liberação de heme, que é transportado do endossoma para o citoplasma através de um mecanismo assistido pelo transportador gene responsivo à heme 1 (HRG1), que é posteriormente catalizado pela HO-1 (104,105). No citoplasma, o ferro é estocado ligado a FT, e a apoTf e o TfR são reciclados na superfície celular (Figura 14) (94,100). A proteína NRAMP1, presente na membrana do endossoma tardio, tem um papel na imunidade inata contra vários patógenos fagossomais. Esta proteína funciona como um transportador de metais divalente, e, acredita-se que é responsável por depletar os

compartimentos endossomais tardios de ferro, transportando-o para o citoplasma. Mutações no gene *SLC11A1*, que codifica o NRAMP1, têm sido associadas com susceptibilidade a diversas infecções, incluindo o desenvolvimento da forma lepromatosa da hanseníase (94,106,107).

A síntese da molécula de heme, que é constituída por um anel tetrapirrólico com um íon central de ferro (Figura 15A), ocorre em parte nas mitocôndrias e parte no citosol em todas as células nucleadas, principalmente no compartimento eritróide (Figura 15B) (97). Uma das enzimas envolvidas na síntese do heme, a delta aminolevulínico sintetase 2 (ALAS2) sofre uma regulação pós-transcricional através de elementos reguladores do ferro (IREs) presentes na extremidade 5' do mRNA desta proteína, que interagem com as proteínas reguladoras do ferro (IRPs) presentes no citosol. A formação do complexo IRE-IRP no mRNA impede a tradução da proteína. A afinidade do IRP ao IRE é dependente da quantidade de ferro na célula, não ocorrendo quando há excesso de ferro, permitindo que a tradução prossiga. Na privação de ferro, há a formação do complexo IRP-IRE, bloqueando a tradução da ALAS2 e consequentemente a síntese de heme (Figura 16). Esse mesmo mecanismo regula a expressão de muitas outras proteínas envolvidas no metabolismo do ferro (96,97,99,108,109).

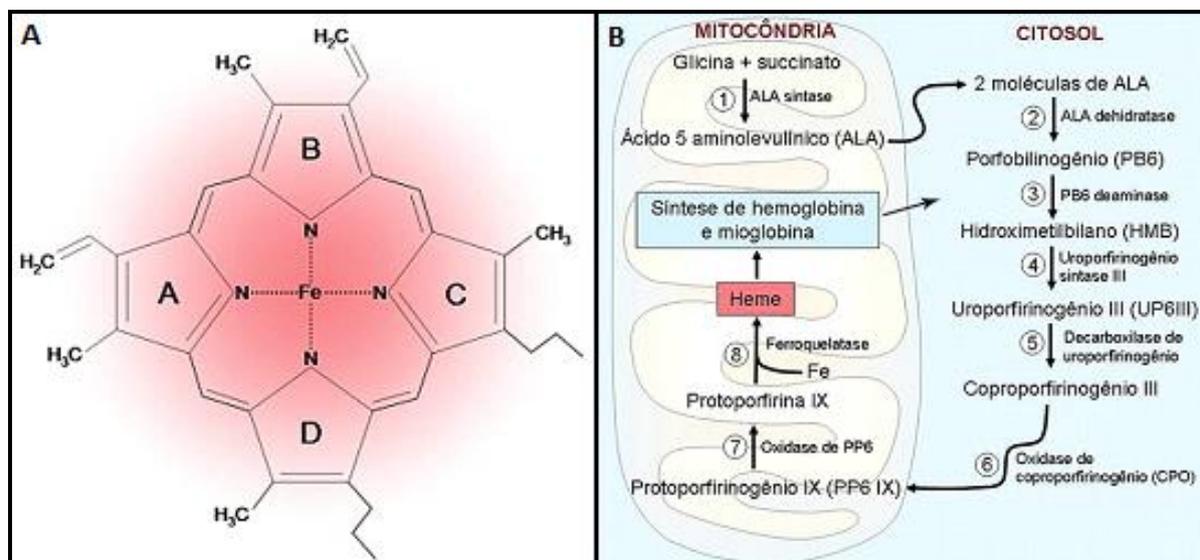


Figura 15. A molécula de heme.

(A) Estrutura. (B) Síntese. Fonte: Adaptado de Grotto, 2010 (97).

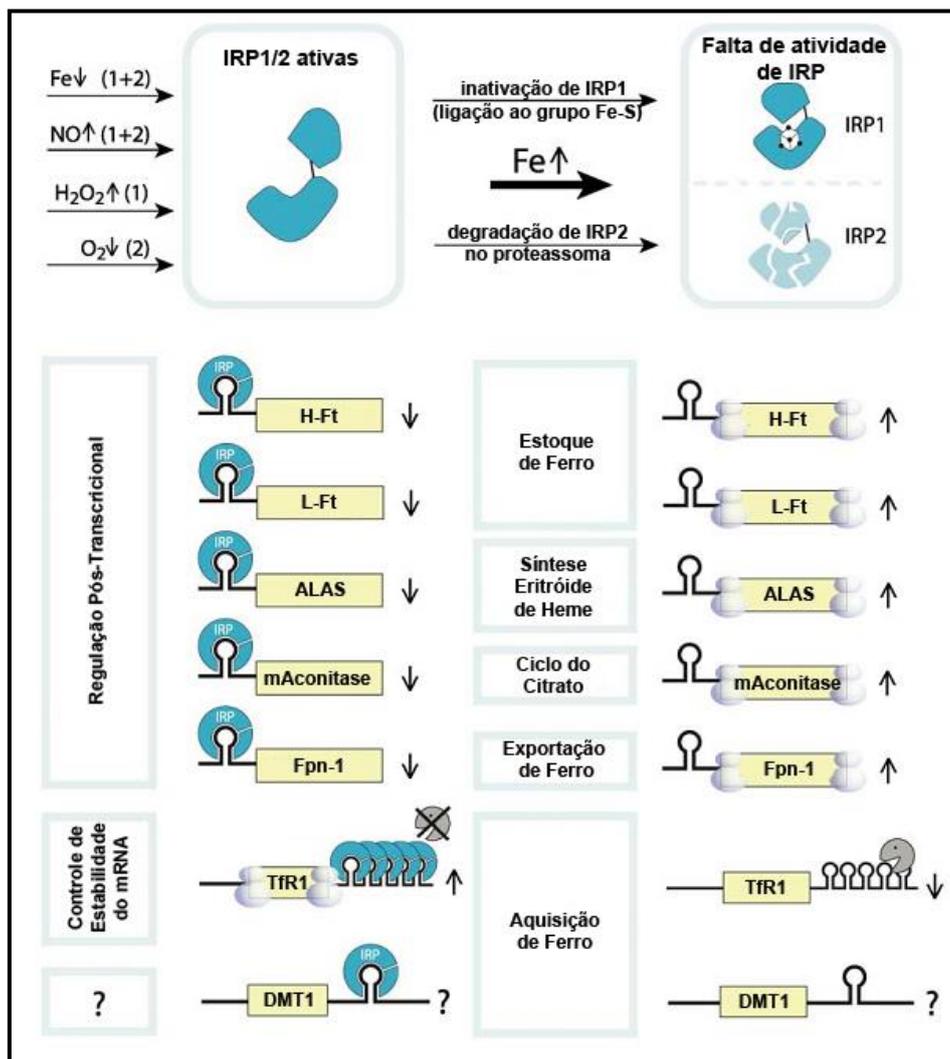


Figura 16. Regulação da homeostase do ferro pela interação das proteínas reguladoras do ferro (IRPs) com os elementos responsivos ao ferro (IREs).

Na presença de baixas concentrações de ferro as IRPs 1 e 2 ficam ativas, se ligando aos IREs nos mRNAs que codificam as proteínas responsáveis pelo metabolismo de ferro na célula, regulando-as, reduzindo a expressão de Fpn-1, a proteína exportadora de ferro intracelular, a produção de heme, através da inibição da ALAS, e o estoque de ferro na forma de ferritinas de cadeias leve e pesada, e aumentando a produção do TfR1, aumentando o ferro intracelular. Em altas concentrações de ferro intracelular, a IRP 1 é inativada e a IRP 2 é degradada. O mRNA da TfR1 perde a estabilidade conferida pela ligação às IRPs e é degradado, há um aumento da produção de ALAS (heme), de ferritina(H-Ft e L-Ft) e da exportação do ferro através da Fpn-1, reduzindo as concentrações de ferro intracelulares. IRP, proteína reguladora do ferro; H-Ft, cadeia pesada da ferritina; L-Ft, cadeia leve da ferritina; ALAS, delta aminolevulínico sintetase; mAconitase, aconitase mitocondrial; Fpn-1, ferroportina 1; TfR1, receptor de transferrina 1; DMT1, transportador de metais divalente 1. Fonte: Adaptado de Hentze *et al.*, 2004 (108).

Em condições de privação de ferro, as IRPs interagem com os IREs, bloqueando a tradução do mRNA da cadeia pesada da FT (FTH), da cadeia leve (FTL), ALAS e Fpn-1, reduzindo o estoque de ferro, a produção de heme, e exportação do ferro intracelular, e estabilizando o mRNA do TfR1, aumentando a captação de ferro na célula. Em condições de altas concentrações de ferro

intracelular as IRPs não se ligam aos IREs na extremidade 5' não traduzida do mRNA, permitindo a síntese das cadeias de FT, ALAS, Fpn-1, aumentando os estoques de ferro, a produção de heme e a exportação do ferro intracelular. Na ausência da ligação de IRPs na extremidade 3' não traduzida do mRNA do TfR1, este perde a estabilidade tendo sua tradução bloqueada, reduzindo a captação de ferro pela célula (Figura 16) (97,108,109).

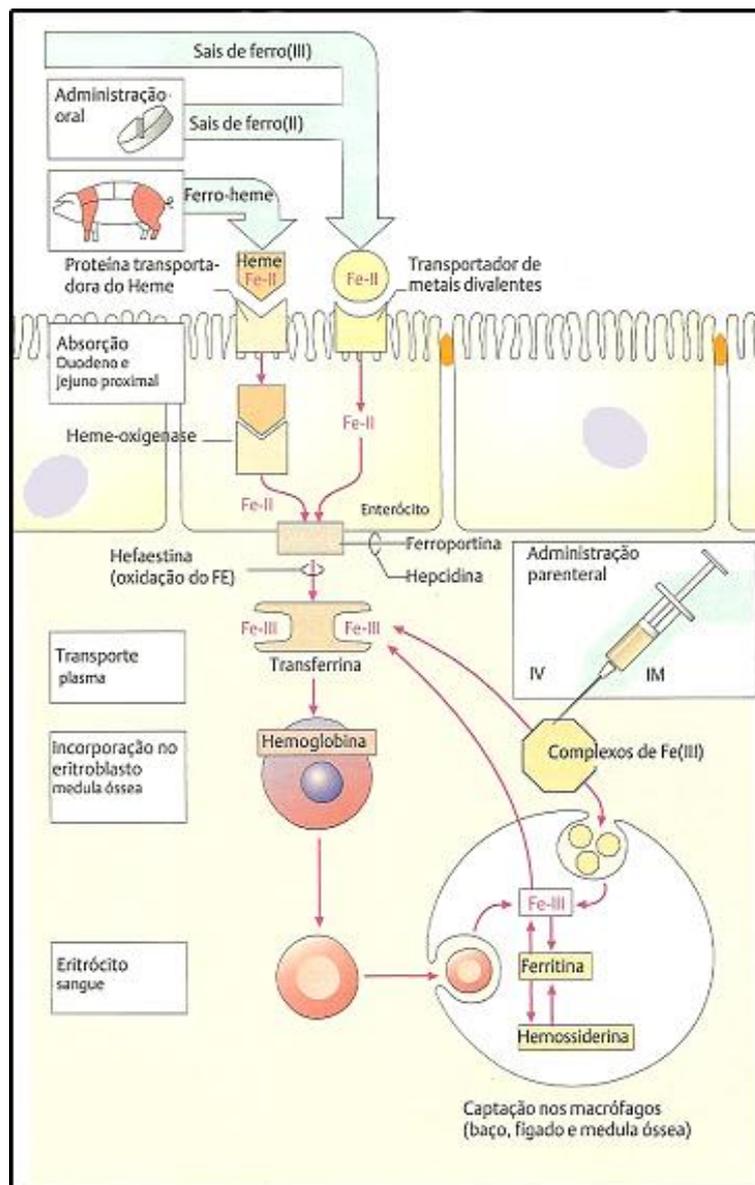


Figura 17. Mecanismos de absorção e metabolismo do ferro.

CDYTB, Citocromo B ferrirredutase duodenal. Fonte: Adaptado de Lüllmann *et al.*, 2010 (110).

O organismo não possui um mecanismo para excretar o excesso de ferro, sendo este armazenado na forma de FT e hemossiderina para minimizar sua toxicidade (111–113). Na necessidade do ferro estocado, a FT e hemossiderina são

mobilizadas. O excesso de ferro é primeiramente armazenado nos macrófagos e hepatócitos na forma de FT. A FT é a principal proteína de estoque de ferro em mamíferos, formando uma concha tridimensional, contendo 24 subunidades formadas pelas duas isoformas, FTL e FTH, que podem estocar mais de 4.500 átomos de ferro. A quantidade de cadeias leves e pesadas na FT varia entre os diferentes tecidos. A FTH contém ferroxidase, responsável pela oxidação eficiente do Fe^{2+} para mineralização do ferro no interior da proteína, enquanto acredita-se que a FTL promove a nucleação eficiente e mineralização do ferro (99,100). A hemossiderina é uma forma de estoque menos lábil, provavelmente formada por agregados de moléculas de FT em condições aumentadas de ferro intracelular (111). Os mecanismos de absorção, regulação e metabolismo do ferro descritos acima estão representados na Figura 17.

1.7.2.2 Ferro, infecção e imunidade

O ferro contribui para a virulência da maioria dos patógenos intracelulares. É sabido que a privação de ferro reduz severamente a patogenicidade de alguns agentes etiológicos como *M. tuberculosis*, *Coxiella burnettii*, *Legionella pneumophila* e *Salmonella typhimurium* (114).

As anormalidades no metabolismo de ferro podem representar um mecanismo evoluído de defesa do hospedeiro contra a invasão bacteriana, denominado de imunidade nutricional (115). Durante a infecção, os linfócitos T ativados liberam IL-2, TNF e IFN- γ , ativando macrófagos que por sua vez produzem IL-1 β , IL-6 e TNF, inibindo a proliferação de precursores eritrocitários e, portanto, a eritropoiese. Além disso, a IL-1 β leva ao aumento da síntese de lactoferrina, uma proteína semelhante a Tf secretada por neutrófilos, que apresenta maior afinidade pelo ferro, não o transfere para as células hematopoiéticas e é rapidamente captada por receptores específicos em macrófagos, promovendo a retenção de ferro no sistema monocítico fagocitário (115,116).

Todo processo inflamatório crônico é capaz de aumentar a síntese e a liberação de citocinas endógenas que, por sua vez, induzem alterações do metabolismo do ferro e diminuição da síntese da hemoglobina, um mecanismo da imunidade inata para restringir a disponibilidade de ferro para patógenos (116). Durante a infecção, cascatas de sinalização inflamatórias levam à redução do ferro

livre e armazenamento do ferro no sistema retículo-endotelial, mas o ferro também é necessário nas células do hospedeiro em funções celulares e mecanismos de primeira linha de defesa. A homeostase do ferro também afeta as vias efetoras de macrófagos e linfócitos do sistema imune inato e adaptativo (114,117).

A homeostase de ferro nos macrófagos é determinada pelos processos de captura através de lactoferrina, Tf, DMT1, fagocitose de eritrócitos senescentes e exportação através da Fpn-1 (114,117). Vários autores vêm relacionando a polarização de macrófagos com a homeostase do ferro. O acúmulo de ferro em macrófagos M1 tem sido reconhecido como um mecanismo bacteriostático e um dos mecanismos associados à anemia em doenças infecciosas crônicas, destacando um possível papel da retenção de ferro na patogênese de doenças inflamatórias crônicas e doenças autoimunes (77,78).

Os macrófagos M2, relacionados com reparo tecidual, têm sido relacionados com baixas quantidades de ferro intracelular, principalmente devido a grande liberação de ferro para o ambiente extracelular. Estes macrófagos expressam genes importantes do metabolismo do ferro, com um aumento da capacidade de captação de heme por receptores “scavenger” e de produção de mediadores anti-inflamatórios pela via da HO-1, dependente do catabolismo de heme. Macrófagos alternativamente ativados também liberam ferro através da expressão de Fpn-1. Tem sido sugerido que este achado contribui para o papel dos M2 no reparo tecidual e crescimento de tumores (77,78,87).

Moura e colaboradores (50) sugeriram que o CD163 pode contribuir para a polarização dos macrófagos de pacientes LL para um fenótipo anti-inflamatório aumentando a expressão de IL-10 e IDO, e por outro lado, também contribui para a internalização de *M. leprae* e sobrevivência e persistência bacteriana, aumentando os estoques de ferro. Acredita-se que o status de ferro do hospedeiro tenha um impacto significativo na susceptibilidade e no curso das doenças infecciosas, e que a homeostase do ferro pode ser alterada pela infecção e inflamação, sendo esses mecanismos de extrema importância nas doenças infecciosas (118).

Nakamura e colaboradores (119) demonstraram que o estímulo com ferro livre (Fe^{2+} , citrato de amônio férrico) em excesso foi capaz de ativar o inflamassoma, como o inflamassoma da família de receptores semelhante ao NOD contendo domínio de pirina 3 (NLRP3) e aumentar a produção de IL-1 β dependente de Caspase-1 em uma maneira dose dependente em monócitos derivados do sangue

periférico humano e células THP-1 primadas com LPS. Os inflamassomas são complexos multimericos de proteínas montados no citoplasma das células imunes inatas em resposta a moléculas microbianas (PAMPs) ou sinais de estresse (DAMPs – padrões moleculares associados a perigo) liberados por células danificadas ou em processo de morte celular (120,121). A produção de IL-1 β foi inibida após o tratamento com o quelante específico para Fe²⁺ 2,2'-bipiridina e em células THP1 deficientes em NLRP3. A ativação deste inflamassoma foi demonstrada como um evento “downstream” da disfunção mitocondrial e permeabilização da membrana lisossomal causada por espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas através da reação de Fenton. A IL-1 β estimula a produção de hepcidina, sugerindo que o eixo regulatório hepcidina-ferroportina pode constituir um “loop” de “feedback” positivo que aumenta a inflamação. Esses dados sugerem que os macrófagos não só sequestram o ferro durante a inflamação, mas também medeiam a inflamação em resposta ao ferro lábil (119).

Dutra e colaboradores (122) demonstraram que o estímulo com heme extracelular, um marco de hemólise ou extenso dano celular, foi capaz de induzir o processamento de IL-1 β dependente do inflamassoma NLRP3 em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 primados com LPS. A ativação do NLRP3 por heme foi independente da sua internalização e requereu “spleen tyrosine kinase”, “reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2”, ROS mitocondrial e efluxo de K⁺. Este estudo não observou processamento de IL-1 β após o estímulo com Fe²⁺ (FeSO₄) ou Fe³⁺ (FeCl₃). A patogênese e/ou morte induzida por hemólise é dependente dos componentes do inflamassoma NLRP3 visto que não foi induzida em camundongos em que NLRP3, proteína adaptadora associada à apoptose semelhante à partícula contendo domínio de ativação e recrutamento de Caspase (CARD)” (ASC) ou Caspase-1 estavam ausentes e pela resistência aumentada dos camundongos sem IL1R (122).

Estudos anteriores reportaram que a degradação da FT para liberação de ferro é feita por autofagia, sendo sua entrega aos lisossomos dependente do coativador 4 do receptor nuclear (NCOA4), identificado como um receptor de carga seletivo para a reciclagem da FT (ferritinofagia) crítico para a homeostase do ferro. Células deficientes em NCOA4 foram incapazes de degradar a FT, levando a uma biodisponibilidade reduzida de ferro intracelular (123). Recentemente, Gao e colaboradores (124) descreveram a ferroptose, uma forma regulada de necrose

dependente da liberação de ferro através da ferritinofagia. A indução da ferroptose leva à ativação da autofagia e consequente degradação da FT e do receptor de carga da ferritinofagia NCOA4. As altas concentrações de ferro lábil intracelular garantem um rápido acúmulo de ROS, que é essencial para a ferroptose. A inibição da ferritinofagia pelo bloqueio da autofagia ou da expressão de NCOA4 anulou o acúmulo de ferro lábil intracelular e consequentemente a produção de ROS, assim como a eventual morte celular ferroptótica. A ferroptose cumpre os dois principais fatores para ser chamada de morte autofágica: o processo de morte está associado com a ativação da autofagia e a autofagia cumpre um papel pró-morte no processo de morte celular (124).

1.7.3 Autofagia

A autofagia é uma via catabólica mediada por lisossomos que ocorre em todas as células eucarióticas (125), sendo responsável pela reciclagem de proteínas, assim como a eliminação de organelas danificadas e patógenos intracelulares através de degradação lisossomal. Parte do citosol e seu conteúdo são englobados pelos autofagossomos, que fundem com os lisossomos, formando os autolisossomos para que haja degradação de seus conteúdos através das hidrolases lisossomais (126,127).

A autofagia é classificada em três diferentes tipos, dependendo da rota de entrega aos lisossomas: macroautofagia, onde a entrega de componentes citosólicos para os lisossomas é feita pelos autofagossomos; microautofagia, onde é formada uma invaginação da membrana lisossomal; e a autofagia mediada por chaperonas, onde há a translocação direta através da membrana lisossomal. Há ainda várias formas de classificação da autofagia dependendo do tipo de carga e local de sequestro, podendo ser seletiva ou não (127,128).

A macroautofagia, aqui referida como simplesmente autofagia, é o foco principal de atenção visto que este processo envolve o sequestro e o transporte de regiões completas do citoplasma em vacúolos de dupla membrana para o sistema lisossomal com a finalidade de degradação (Figura 18) (129). Ela é capaz de remover por sequestro e degradação (130), secreção (131) ou extrusão (132,133), uma ampla gama de componentes celulares abrangendo desde agregados proteicos a organelas, como mitocôndrias (mitofagia).

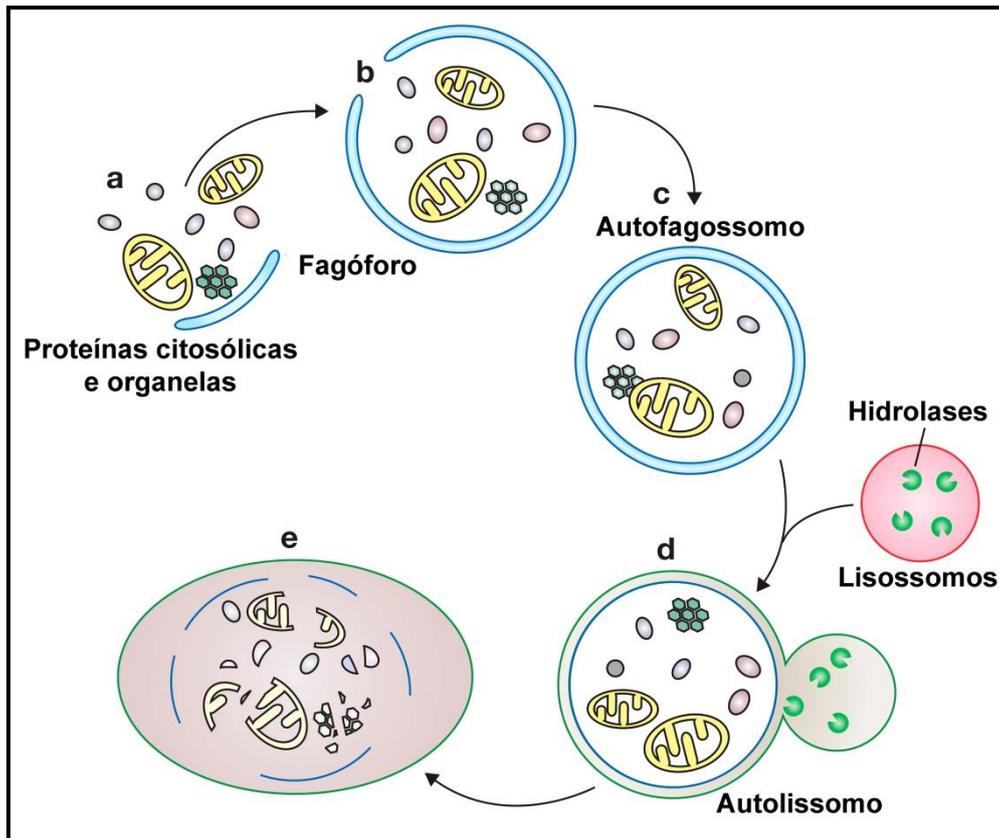


Figura 18. Representação esquemática da autofagia.

(A) O material citosólico é sequestrado pela membrana em expansão, (B) o fagóforo, (C) resultando na formação de uma vesícula de dupla membrana, o autofagossomo. (D) em sequência a membrana externa do autofagossomo funde com um lisossomo, expondo a membrana interna do autofagossomo às hidrolases lisossomais e então a membrana do compartimento contendo a carga é lisada e seus conteúdos degradados. Fonte: Adaptado de Xie & Klionsky, 2007 (129).

Os alvos citoplasmáticos da autofagia são capturados pelos autofagossomos (Figuras 18 e 19), organelas de dupla membrana de origem endomembranosa, que em sequência maturam em autolisossomos que vão degradar e/ou eliminar os componentes sequestrados. Entre as funções fisiológicas descritas para a autofagia, pode-se destacar a provisão de energia e aminoácidos para a célula em estresse metabólico ou mesmo de privação de nutrientes, prevenção de morte celular ou senescência devido ao acúmulo de agregados macromoleculares ou organelas com mau funcionamento e, por fim, o seu potencial de induzir morte celular (128,134–136).

Níveis basais de autofagia ocorrem para preservar a homeostase celular, mas sua ativação também pode ser desencadeada ou exacerbada por sinais de estresse celular, como estresse do retículo endoplasmático (RE), estresse oxidativo, dano

mitocondrial, hipóxia, ativação de células imunes, infecção, agentes biológicos e químicos e privação de nutrientes (128). Estes estímulos nocivos levam à inibição do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e a consequente ativação da cascata de eventos cruciais para a formação e maturação do autofagossomo (127).

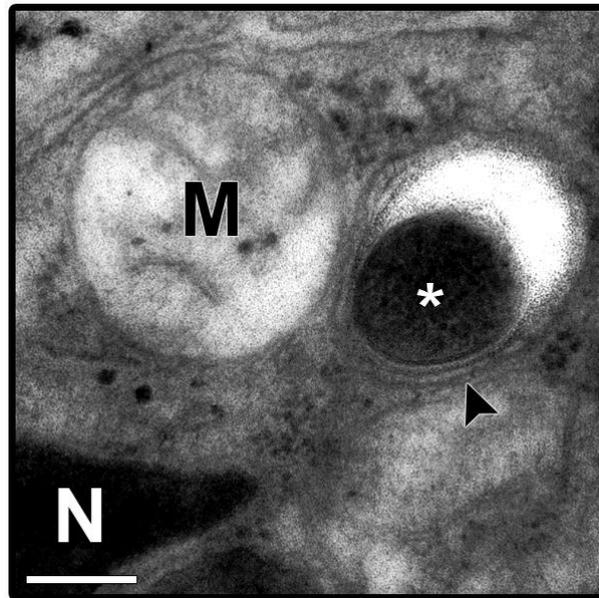


Figura 19. Autofagossomo.

Estrutura de dupla membrana (autofagossomo, cabeça de seta) contendo *M. leprae* (*) no seu interior localizada próxima ao núcleo (N) e de uma mitocôndria (M) de um macrófago de pele de um paciente do polo lepromatoso da hanseníase. Fonte: Silva *et al.*, 2017 (137).

O processo da autofagia em mamíferos é dividido em seis passos principais: iniciação ou indução, marcada pelo início do sequestro dos produtos a serem degradados; nucleação, formação da membrana de isolamento ou fagóforo; o alongamento; o fechamento, onde as membranas nascentes são então fundidas nas bordas para dar origem às vesículas de dupla membrana envolvendo a carga, levando à finalização do autofagossomo maduro; a maturação, onde a membrana externa se funde com o lisossomo para formar um autolisossomo; e a fase de degradação, que envolve a lise da membrana interna e degradação do conteúdo (Figura 18) (126,128).

Um regulador chave da autofagia é o mTOR, estando presente em 2 complexos (mTORC) 1 e 2. O mTOR é uma serino treonina quinase pertencente à superfamília de quinases relacionadas à fosfoinosítídeo 3-quinase (PI3K) que regula a proliferação celular e o metabolismo em resposta aos fatores de crescimento e

demandas nutricionais e energéticas, coordenando diferentes aspectos do crescimento celular, como a transcrição, a tradução, RNA transportador e biogênese de ribossomos, organização da actina e sinalização da proteína quinase C. A inibição da atividade de mTOR provoca várias respostas celulares, incluindo a parada da divisão celular no início da fase G1, inibição da síntese proteica, “turnover” do transporte de nutrientes, alterações transcricionais e autofagia, essa em dois níveis diferentes, transcrição e formação do autofagossomo (125,138).

Por exemplo, mTOR se mantém ativada por fatores de crescimento via Akt (proteína quinase B), resultando na inibição da autofagia (138). Ao contrário, o tratamento com rapamicina ou a privação de aminoácidos ou nutrientes leva à inibição de mTOR e a indução de autofagia. A biogênese do autofagossomo é controlada por um sistema de conjugação composto de mais de 30 genes e proteínas relacionadas com a autofagia, designados respectivamente de ATG e Atg, identificados primeiramente em estudos genéticos com leveduras (139).

Sob condições ricas de nutrientes, mTORC1 suprime o complexo quinase ativadora de autofagia semelhante a Unc-51 (ULK) (homólogo de Atg1), composto por ULK1/2, Atg13, FIP200 e Atg101. Quando a autofagia é induzida, inicia-se a etapa de nucleação e formação do autofagossomo através do complexo ULK, que é ativado e se transloca para um determinado domínio provavelmente do RE. Uma vez no RE, o complexo ULK recruta o complexo PI3K de classe III (PI3KC), formado por Beclina 1 (Atg6), mAtg14, p150 (VPS15), hVPS34, AMBRA1, UVRAG (VPS38) e Rubicon, ou complexo I para o RE. O recrutamento de Beclina 1 é necessário para que ocorra a ativação deste complexo. A Beclina1 forma um complexo com Bcl-2, ficando inibida; para a ativação do complexo, a quinase N-terminal C-Jun 1 (JNK1) fosforila Bcl-2, liberando Beclina 1 para PI3KC. Essa regulação é promovida por proto-oncogene B semelhante à RAS (RalB) e pelo complexo exocítico contendo Exo84 (140–143).

O PI3KC forma PI3-fosfato, que recruta moléculas efetoras como proteína 1 contendo duplo FYVE e domínio de repetição WD-interação a fosfoinosítideo (WIPI), promovendo a formação do omegassoma no RE, local de onde o autofagossomo parece ser gerado, e onde as outras Atgs são montadas. As WIPIs são cruciais para a maturação e desenvolvimento do omegassoma em fagóforos. Assim como as WIPIs, as proteínas VMP1 e Atg9 também estão presentes na membrana externa do

fagóforo, e parecem participar do estágio inicial de formação do autofagossomo (140–143).

Começa então a etapa de alongamento e fechamento do fagóforo, que requer dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina. Inicialmente, forma-se o conjugado Atg12-Atg5, produzido pelas enzimas Atg7 e Atg10 e, por sua vez, esse conjugado interage com Atg16L1, formando o complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 presente na membrana externa do fagóforo. O segundo sistema de conjugação inicia-se com Atg4, fazendo a conversão do pro-LC3 (cadeia leve 3 complexada com as proteínas associadas aos microtúbulos 1A e 1B) em LC3-I no citoplasma, depois a Atg7 ativa LC3-I, que é então conjugada ao lipídio fosfatidiletanolamina (PE) pela enzima Atg3 com auxílio do complexo Atg12-Atg5-Atg16L1, formando sua forma lipidada, o LC3-II ou LC3-PE, que se transloca do citoplasma principalmente para as pontas das membranas interna e externa do fagóforo (Figura 20) (140–143).

Quando a formação do autofagossomo é completada, o LC3 presente na membrana externa é clivado do PE por Atg4, sendo liberado para retornar ao citoplasma, juntamente com a maioria das outras proteínas Atg que também são dissociadas do autofagossomo. Ocorre então a fusão com o endossomo formando anfissomo e depois com o lisossomo por um processo dependente do complexo II (hVPS34, Beclin-1 e UVRAG) e de proteína associada a membrana lisossomal 2 (LAMP2) e Rab7, formando o autolisossomo, que quebra a membrana interna do autofagossomo e degrada a carga através das hidrolases lisossomais. As macromoléculas resultantes são liberadas através de permeases e recicladas no citosol (140–143).

A autofagia também pode ocorrer por vias independentes de mTOR (140,144) e das proteínas Atg (145). Nas células de mamíferos, a via pode ser inibida através da adição dos inibidores farmacológicos 3-metiladenina ou Wortmanina (146–148).

A origem correta do fagóforo até hoje permanece desconhecida, no entanto, evidências sugerem que membranas adicionais derivadas do complexo de Golgi, mitocôndria, membrana plasmática, membrana nuclear, e de Golgi-Reticulo Endoplasmático-Lisossomos, possam contribuir para a formação do autofagossomo (142,143,149).

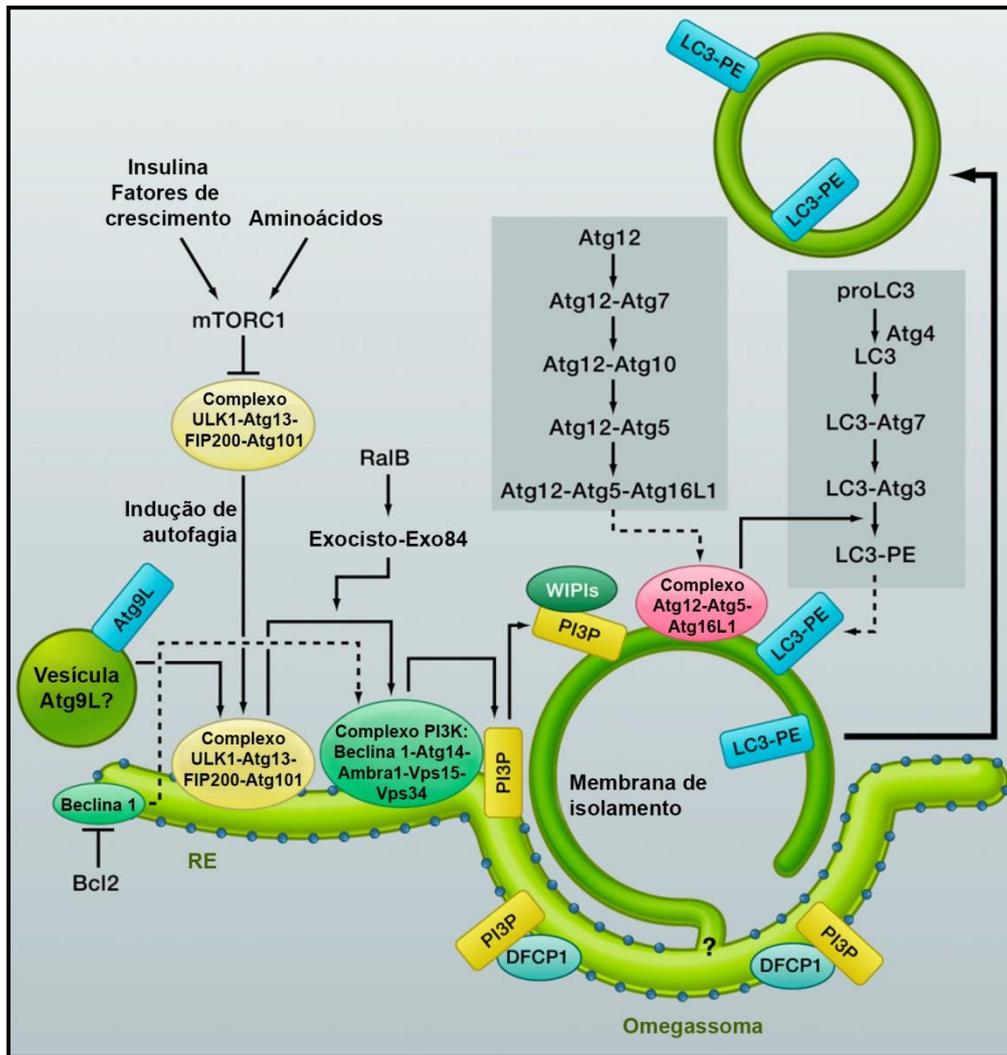


Figura 20. Proteínas Atg e a formação do autofagossomo em células de mamíferos.

O complexo mTOR 1 (mTORC1) suprime o complexo de ULK1 (homólogo de Atg1) em condições ricas em nutrientes. Na indução de autofagia o complexo ULK1 (incluindo ULK1, Atg13, FIP200 e Atg 101) é ativado e se transloca para um certo domínio no retículo endoplasmático (RE). Uma vez no RE, o complexo ULK1 regula o complexo fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) de classe III (incluindo Beclina 1, Atg14 [Barkor], Vps15, Vps34 e Ambra1) e essa regulação é feita por RalB e um complexo excocisto contendo Exo84. O recrutamento de Beclina 1 para o complexo PI3K também é sensível à privação de nutrientes; Beclina 1 forma um complexo com a Bcl-2 em condições ricas em nutrientes e é liberada após a fosforilação de Bcl-2 pela JNK1. A Atg9L, uma proteína multimembrana, também é envolvida em um estágio inicial da formação do autofagossoma (a Atg9L é recrutada provavelmente em vesículas). A formação de PI3 fosfato (PI3P) recruta proteína 1 contendo duplo FYVE (DFCP1) e promove a formação do omegassoma, do qual autofagossomos parecem ser gerados. Outras PI3P se ligam às proteínas domínio de repetição WD-interação a fosfoinositídeo (WIPI) (homologas à Atg18) também são cruciais para a maturação do omegassoma/membrana de isolamento. O complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 e o LC3 (homólogo à Atg8) conjugado à fosfatidiletanolamina (PE) desempenha um importante papel no alongamento e fechamento da membrana de isolamento. Esse complexo também é necessário para a formação da ligação covalente entre o LC3 e a PE. Fonte: Adaptado de Mizushima & Komatsu, 2011 (143).

Estudos anteriores demonstraram a autofagia como um mecanismo importante na eliminação de *M. tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*

pyogenes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Rickettsia conorii*, exotoxina de *Vibrio cholerae*, *Toxoplasma gondii*, Respirovirus (Sendai), entre outros, incluindo mais recentemente *M. leprae* (xenofagia) (137,148,150–155).

Foi descrito um grupo de receptores da imunidade inata denominados receptores do tipo sequestróssoma (p62/SQSTM1) (SLR) que funcionam como adaptadores autofágicos e reconhecem microorganismos intracelulares para a eliminação por autofagia. Os SLR p62 (156), proteína 1 vizinha ao gene BRCA1 (NBR1), e proteína 52 do domínio nuclear 10 (NDP52) desempenham um importante papel na autofagia envolvendo *Salmonella*, *Streptococcus* (157,158), *Shigella* (159) e *Listeria* (160). Uma função dos SLRs, demonstrada para o p62, é direcionar precursores citoplasmáticos para a conversão nos lisossomos em produtos antimicrobianos, como demonstrado no modelo de *M. tuberculosis* (161).

A análise funcional de 44 genes do hospedeiro associados à regulação da autofagia demonstrou que mesmo após o estabelecimento da infecção, a persistência de *M. tuberculosis* na célula hospedeira está relacionada à sua capacidade de manter as vias de ativação de autofagia controladas. O reconhecimento de que a persistência de micobactérias virulentas em macrófagos infectados se correlaciona com a capacidade de sustentar a inibição de processos de indução de autofagia tem um grande impacto sobre a nossa compreensão global sobre a infecção com *M. tuberculosis* (144,162). Tem sido descrito que a autofagia ou os fatores relacionados à autofagia não somente ajudam na indução e execução da resposta imune inata, mas também limitam essa resposta e a inflamação (163–165), atuando como um importante mecanismo homeostático (141).

Nosso estudo recente demonstrou que as concentrações aumentadas de IFN- γ encontrados nos pacientes tuberculóides induzem o mecanismo antimicrobiano da autofagia nos macrófagos infectados, contribuindo para o controle da infecção (137). Ao contrário, em pacientes MBs foi observada a ausência de fluxo autofágico e aumentada expressão de Bcl-2, que poderia ser o responsável pelo bloqueio da autofagia mediada por Beclina 1 em macrófagos de pele de indivíduos com hanseníase lepromatosa (137). O fluxo autofágico foi restaurado após o tratamento dos macrófagos de pele lepromatosos com os indutores de autofagia rapamicina e IFN- γ , não havendo um defeito na maquinaria autofágica desses pacientes (137). Além disso, análises de amostras de pele de pacientes lepromatoso que vieram a desenvolver episódios de RR, uma condição inflamatória aguda que restaura as

concentrações de IFN- γ nos tecidos, mostram um aumento na expressão de genes relacionados à autofagia e no número de autofagossomos nos macrófagos de lesão de pele (137). Nossa análise *in vitro* com células THP-1 e monócitos do sangue periférico demonstraram que o estímulo com *M. leprae* morto pode induzir autofagia, mas o mesmo não acontece com bactérias vivas, sugerindo que a micobactéria pode bloquear a maquinaria autofágica como um mecanismo de escape (137).

Uma relação direta entre autofagia e inflamação foi descrita por Kleinnijenhuis e colaboradores (166). Foi observado que o bloqueio da autofagia em monócitos derivados do sangue periférico de voluntários saudáveis, estimulados com *M. tuberculosis*, leva à redução das concentrações de TNF, com aumento de IL-1 β . Por outro lado, a indução de autofagia por privação de nutrientes ou IFN- γ teve o efeito contrário (166). Outros estudos utilizando o modelo murino identificaram que o bloqueio da via autofágica leva ao aumento de IL-1 β por um mecanismo que leva à ativação do inflamassoma NLRP3 (167).

1.7.4 Inflamassomas

Os inflamassomas, como já descrito anteriormente, são complexos multimericos de proteínas montados no citoplasma das células imunes inatas em resposta a moléculas microbianas (PAMPs) ou sinais de estresse (DAMPs) liberados por células danificadas ou em processo de morte celular, estando também envolvidos na patologia de doenças inflamatórias estéreis como artrite, gota, obesidade, aterosclerose, mal de Alzheimer, diabetes e câncer (120,121). São melhor conhecidos pela sua habilidade de controlar a ativação da enzima proteolítica Caspase-1 que por sua vez regula a maturação proteolítica da IL-1 β e da IL-18, assim como uma forma rápida, nociva e inflamatória de morte celular denominada piroptose (121).

Geralmente são compostos por um sensor citosólico, um adaptador e uma caspase inflamatória, e após sua montagem facilitam a indução de respostas inflamatórias através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, podendo levar a célula hospedeira à piroptose, uma forma de morte programada inflamatória. Esses processos favorecem o início do processo inflamatório em tecidos danificados ou infectados que pode contribuir para a morte de patógenos, indução de resposta imune adaptativa e para o retorno a homeostase tecidual (120).

Os complexos de inflamassomas clássicos ou canônicos consistem de um sensor citosólico, que pode ser um receptor contendo domínio de ligação de nucleotídeos e repetições ricas em leucina ou um receptor semelhante à ausente em melanoma 2 (AIM2), uma proteína adaptadora ASC e uma caspase efetora pro-Caspase-1 (Figura 21) (121). A ASC é uma molécula bipartida que contém um domínio N-terminal de pirina e um domínio C-terminal de recrutamento e ativação de caspase (CARD), permitindo a ligação dos sensores citoplasmáticos com a pro-Caspase-1 efetora. A Pro-Caspase-1 é então clivada levando à clivagem de pro-IL-1 β e pro-IL-18, gerando as citocinas maduras biologicamente ativas (121,168). Interessantemente, a IL-1 β também é considerada um DAMP, fazendo os inflamassomas receptores, mas também fontes de DAMP (168).

Entre os inflamassomas, o melhor caracterizado é o NLRP3, uma plataforma chave que orchestra as respostas inflamatórias ao estresse metabólico e sensores imunes inatos (120). A ativação do NLRP3 pode ocorrer em resposta a um grande número de DAMPs, levando à teoria de que agonistas diferentes podem provocar eventos “downstream” similares, resultando na ativação de NLRP3 (169).

O NLRP3 está envolvido em diversas doenças e desordens metabólicas em humanos, como a diabetes tipo 2, gota, obesidade, aterosclerose, síndrome de Muckle-Wells, síndrome crônica infantil neurológica cutânea e articular, entre outras (120,170). O NLRP3 requer a proteína adaptadora ASC para ativar e induzir a clivagem de Caspase 1. Múltiplas moléculas são capazes de desencadear a ativação do NLRP3, como PAMPs, como o muramil dipeptídeo, toxinas bacterianas, trifosfato de adenosina (ATP), redução da concentração de K⁺ intracelular e vários tipos de cristais (120).

Os mecanismos de ativação de NLRP3 descritos pela maioria dos estudos incluem o efluxo de K⁺, a geração de ROS mitocondrial, a translocação do NLRP3 para a mitocôndria, a liberação de DNA mitocondrial ou cardiolipina, e a liberação de catepsinas no citosol após a desestabilização lisossomal (Figura 22). Contudo, nem todos os agonistas induzem todos esses eventos e o mecanismo de ativação desse inflamassoma ainda é debatido. O aumento de Ca²⁺ intracelular também pode ativar o NLRP3, mas não é necessário para todos os seus agonistas. Há também algumas controvérsias acerca da ativação de NLRP3 através da liberação de catepsinas lisossomais, proteases que degradam proteínas internalizadas, mesmo havendo vários estudos indicando o seu envolvimento (169).

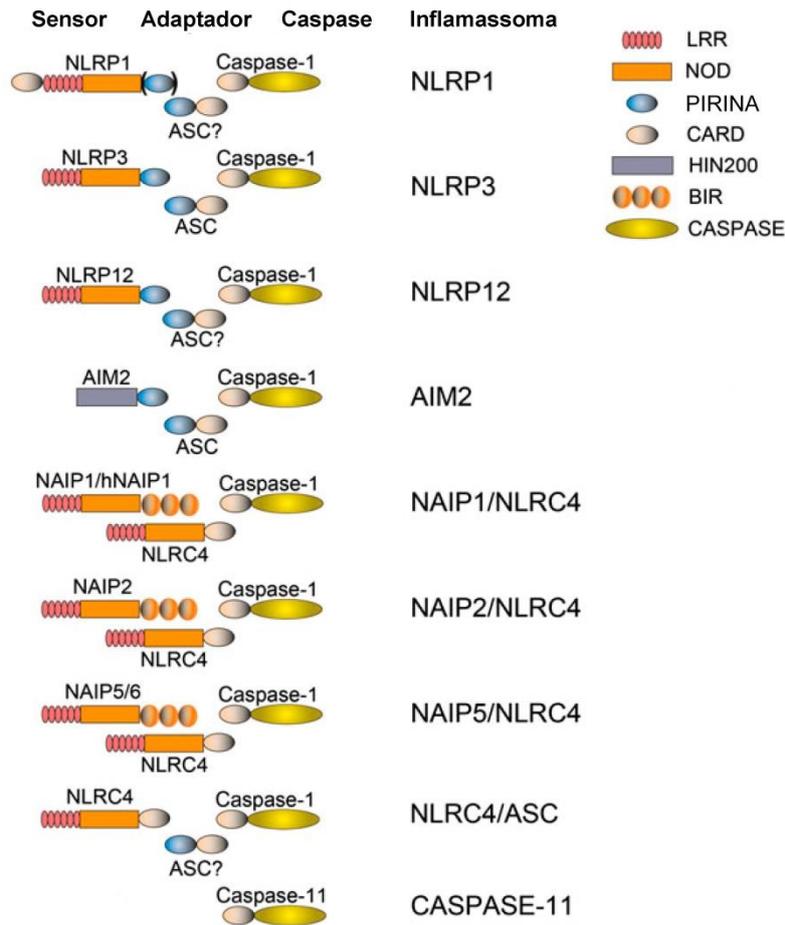


Figura 21. Composição molecular do inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRP12, AIM2, NAIP1/NLRC4, NAIP2/NLRC4, NAIP5/NLRC4 e do inflamassoma não canônico Caspase-11.

As moléculas sensoras, proteínas adaptadoras e caspases efetoras estão indicadas, assim como os domínios de repetição ricos em leucina (LRR), domínios de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NOD, NBD ou NATCH), domínios de pirina, domínios de recrutamento de caspase (CARD), domínio de ligação de DNA HIN200 (HIN200), de repetições IAP de baculovirus (BIR) e domínio de caspase. Os inflamassomas compostos dispensam a adaptadora ASC, e a sua participação no NLRC4 ainda é incerta. O LPS é capaz de se ligar diretamente na Caspase-11, ativando-a. A participação de moléculas sensoras e adaptadoras nessa plataforma ainda necessitam de investigação e sua ativação favorece a ativação não canônica do inflamassoma NLRP3. Fonte: Adaptado de Zamboni & Lima-Júnior, 2015 (120).

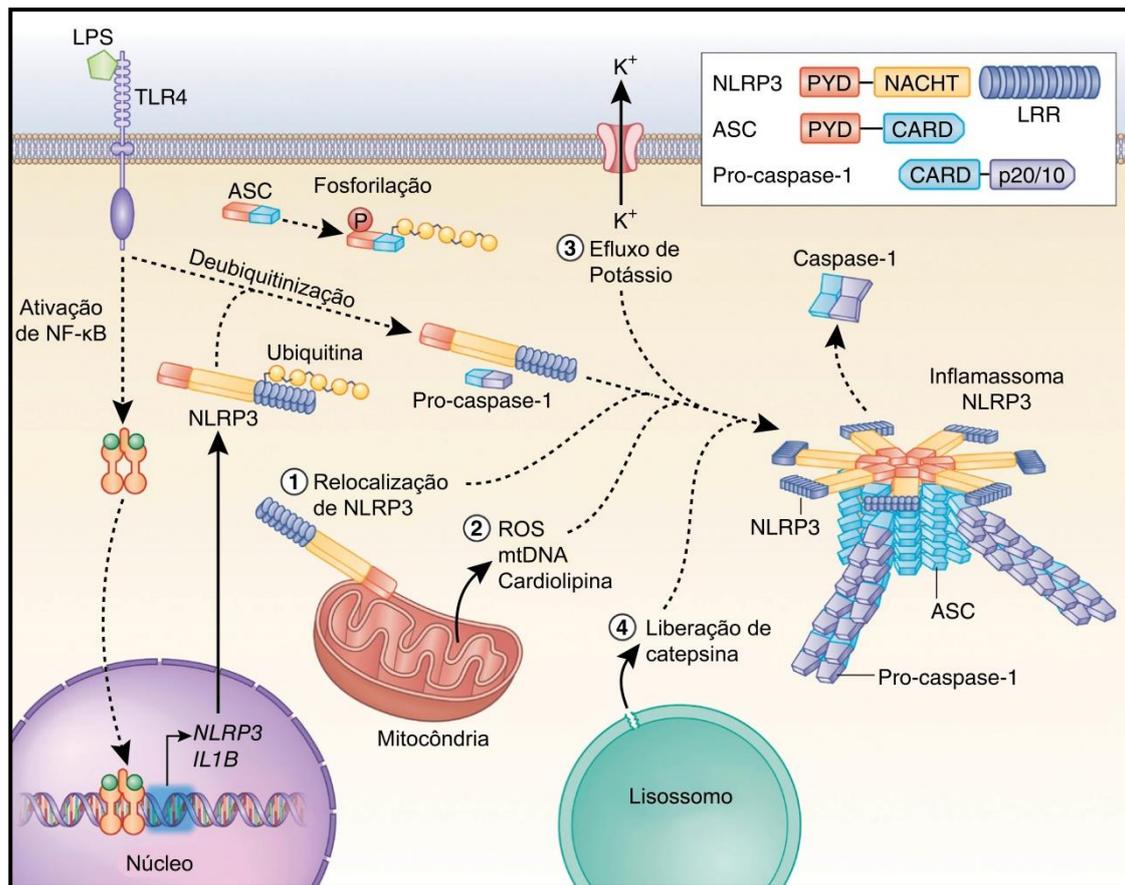


Figura 22. Mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3.

O NLRP3 deve ser primado antes de sua ativação. O “priming” envolve dois passos distintos. O primeiro é um estímulo ativador de NFκB, como a ligação de LPS em TLR4, induzindo um aumento da expressão gênica de *NLRP3* e *IL1B*, aumentando a expressão das proteínas NLRP3 e pro-IL-1β (1º sinal). O “priming” libera imediatamente a NLRP3, induzindo sua deubiquitinação. A proteína adaptadora ASC deve então ser linearmente ubiquitinada e fosforilada para que a montagem do inflamassoma ocorra. Após o “priming”, a ativação canônica do NLRP3 requer um 2º sinal (possíveis sinais estão numerados na imagem) distinto para ativar NLRP3, levando à formação da plataforma do inflamassoma NLRP3. Os estímulos mais comumente aceitos para a ativação de NLRP3 são a relocalização do NLRP3 na mitocôndria, a detecção de fatores mitocondriais liberados no citosol, como ROS mitocondrial, DNA mitocondrial (mtDNA) ou cardiolipina, o efluxo de potássio através de canais iônicos e a liberação de catepsina após a desestabilização de membranas lisossomais. Estudos recentes determinaram que o NLRP3 ativado se agrupa à ASC em filamentos “príon-like” através de interações pirina (PYD)-PYD. Em sequência, os filamentos de pro-Caspase-1 se formam por fora dos filamentos de ASC através de interações domínio de recrutamento de caspase (CARD)-CARD, permitindo a clivagem autoproteolítica da pro-Caspase-1. No detalhe é mostrado o arranjo dos domínios dos componentes do inflamassoma NLRP3. Os domínios de pro-Caspase-1 e Caspase-1 foram simplificados para facilitar o entendimento, o domínio CARD é removido por clivagem e um tetrâmero se forma com os domínios efetores p20 e p10 (p20/10). Fonte: Adaptado de Guo, Callaway & Ting, 2015 (169).

Alguns dos agonistas de NLRP3 são: sinais de perigo endógenos como ATP extracelular (ativa o receptor purinérgico P2X7 presente na superfície celular, levando ao efluxo de K⁺ através de um hemicanal de panexina-1), amiloide sérica A, cristais de ácido úrico (um processo que requer o domínio de repetição rico em leucina), ácido hialurônico de baixo peso molecular (um processo dependente de

CD44 e da internalização de ácido hialurônico), biglicana (agrupando P2X7 com TLR2/4 e histonas liberadas de células necróticas, de forma independente de P2X7), fluxo intracelular e relacionado ao RE de Ca^{2+} ; produção de ROS desencadeada por PAMPs, como componentes de membrana celular de bactérias, toxinas formadoras de poro, ácidos nucleicos, e DAMPs, como NADPH oxidase danificada e outros sistemas oxidativos mitocondriais; irritantes ambientais como sílica, amianto, amiloide- β , alúmen, que formam estruturas cristalinas ou particuladas quando fagocitados e causam a ruptura lisossomal e liberação dos conteúdos lisossomais por um mecanismo mediado por catepsina B, entre muitos outros fatores como dano ou disfunção mitocondrial causada por sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial, ruptura lisossomal, atividade de “thioredoxin-interacting protein” e disfunção autofágica (168,171,172). Todos esses sinais estão relacionados ao estresse celular, sugerindo o NLRP3 como um sensor global de dano celular (172).

A ativação do inflamassoma NLRP3 parece ocorrer em dois passos. O primeiro passo envolve um “priming” ou sinal iniciador em que vários PAMPs ou DAMPs são reconhecidos por TLRs, levando à ativação da sinalização mediada por NF κ B, que em retorno aumenta a transcrição de componentes relacionados ao inflamassoma como o NLRP3 inativo, a pro-IL-1 β e pro-IL-18. Este “priming” é frequentemente estudado *in vitro* utilizando LPS (171).

O “priming” libera imediatamente a NLRP3, induzindo sua ubiquitinação. A proteína adaptadora ASC deve então ser linearmente ubiquitinada e fosforilada para que a montagem do inflamassoma ocorra. Após o “priming”, a ativação canônica do NLRP3 requer um 2º sinal distinto para ativar NLRP3, levando à oligomerização de NLRP3, com subsequente montagem de NLRP3, ASC e pro-Caspase-1 em um complexo (169,171).

Estudos recentes determinaram que o NLRP3 ativado se agrupa à ASC em filamentos “prion-like” através de interações dos domínios de pirina (PYD)-PYD. Em sequência, os filamentos de pro-Caspase-1 se formam por fora dos filamentos de ASC através de interações CARD-CARD (169). A formação desse complexo leva à autoclivagem de pro-Caspase-1, gerando a Caspase-1 ativa, um tetrâmero de p10/p20, induzindo a conversão das citocinas próinflamatórias IL-1 β e IL-18 de suas pro-formas para suas formas ativas que são secretadas (Figura 22) (171).

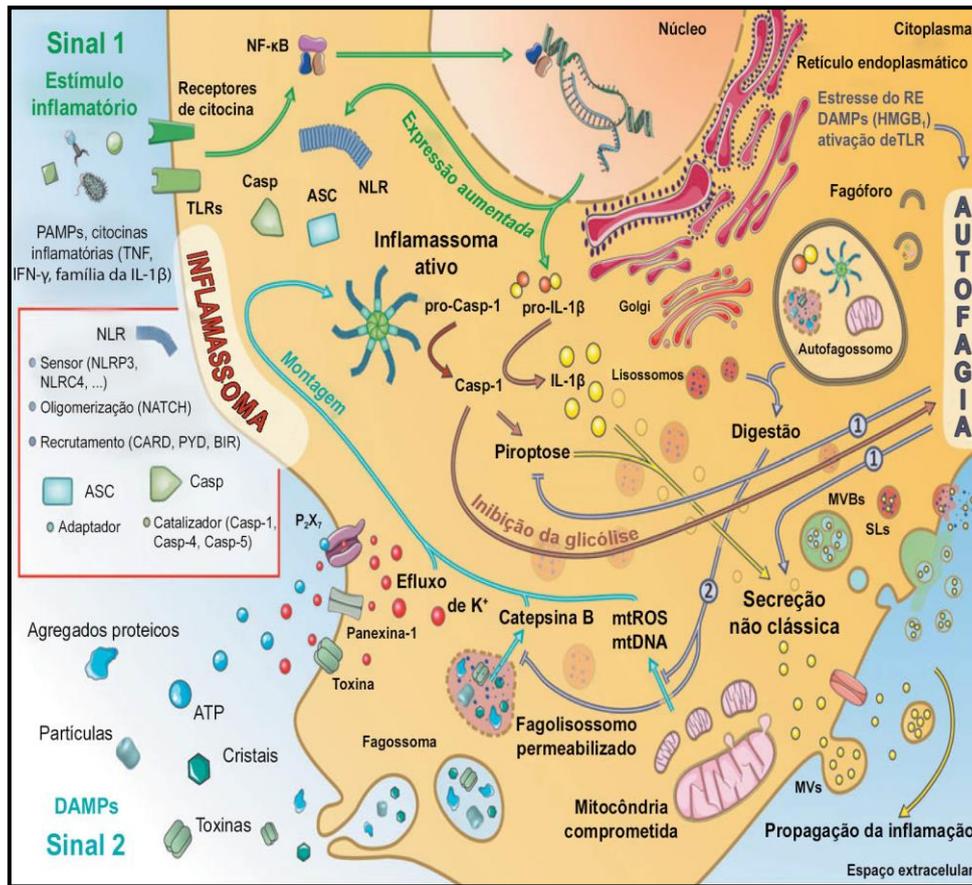


Figura 23. Interações entre as via da autofagia e dos inflamassomas.

Os inflamassomas são complexos multiméricos proteicos citoplasmáticos usualmente formados por um sensor, um adaptador e um domínio de recrutamento. A montagem e ativação do inflamassoma NLRP3 parece ser um processo de dois passos. O primeiro passo é desencadeado por padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) ou citocinas próinflamatórias que ativam receptores “toll-like” (TLRs) ou receptores específicos de citocinas, respectivamente, levando à ativação e translocação nuclear do “nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells” (NF-κB) e aumento da transcrição de NLRP3 e pro-IL-1β. O segundo sinal consiste de padrões moleculares associados à perigo (DAMPs) que através de mecanismos não completamente elucidados (ex.: efluxo de K⁺, extravasamento de catepsina de [fago]lisossomos desestabilizados, liberação de espécies reativas de oxigênio mitocondrial [mtROS] e DNA mitocondrial [mtDNA]) levam à montagem e ativação dos inflamassomas. Os inflamassomas catalisam a ativação de pro-Caspase-1 (pro-Casp-1), que ativa proteoliticamente a IL-1β e IL-18 e induz piroptose nas células do sistema imune. Esses dois eventos próinflamatórios parecem ser contrabalanceados pela ativação da autofagia mediada por Casp-1. Sob o estímulo celular com PAMPs e DAMPs, a autofagia primeiramente estimula a liberação de IL-1β, enquanto inibe a piroptose, atuando como uma via próinflamatória (1). Após este primeiro desfecho, evidências sugerem que a autofagia limita a ativação do inflamassoma através da degradação de componentes dos inflamassomas e da pro-IL-1β nos autofagossomos ou por digestão das organelas danificadas que de outro modo gerariam DAMPs (2). Microvesículas, MVs; Corpos multivesiculares (MVBs); lisossomos secretórios (SLs). Fonte: Adaptado de Martins *et al.*, 2015 (127).

A produção exacerbada de citocinas da família da IL-1 é associada com dano tecidual e inflamação crônica, devendo ser fortemente regulada (170). Estudos têm demonstrado que a autofagia pode regular a transcrição, o processamento e a secreção de IL-1β e IL-18 (Figura 23) (173). Isso ocorre através de pelo menos dois mecanismos distintos. Em macrófagos e células dendríticas, a inibição de autofagia

leva a um aumento da secreção de IL-1 α , IL-1 β e IL-18 em resposta a agonistas de TLR3 ou 4 (164,167,174,175). A liberação de IL-1 β é um processo de dois estágios, a transcrição de pro-IL-1 β , induzida por um estímulo inflamatório, e a ativação da montagem do inflamassoma por um segundo estímulo, como ROS, ATP, partículas, agregados proteicos ou rompimento lisossomal. A inibição da autofagia leva ao acúmulo do segundo sinal, o estímulo endógeno ativador do inflamassoma. O segundo mecanismo é mais direto, autofagossomas podem sequestrar e degradar componentes do inflamassoma, incluindo a molécula adaptadora ASC, AIM2 e NLRP3 (176), assim como a pro-IL-1 β (174).

A indução de autofagia leva à inibição da liberação de IL-1 β em resposta ao LPS com alúmen ou ATP (174). Além disso, a ativação da transcrição de IL-1 β com agonistas de TLR na ausência de sinais indutores de inflamassoma, leva ao sequestro e degradação da pro-IL-1 β pelos autofagossomas. Isto sugere que a autofagia atua como um mecanismo autorregulador para o controle de respostas inflamatórias inapropriadas e potencialmente deletérias (173). Shi e colaboradores (176) demonstraram que a ativação dos inflamassomas NLRP3 e AIM2 induz autofagia em macrófagos e a inibição da autofagia aumenta a ativação do inflamassoma, enquanto a indução de autofagia a limita.

No entanto, outro estudo demonstrou que a indução da autofagia com inibidores de mTOR ou privação de aminoácidos pode levar ao aumento na secreção de IL-1 β em resposta a tratamentos ativadores de inflamassoma, como LPS com nigericina, alúmen ou cristais de sílica (177). Este efeito foi parcialmente dependente de Atg5, e para isso, a autofagia foi induzida ao mesmo tempo que o estímulo para ativação de inflamassoma foi adicionado. O papel da autofagia regulando a secreção de IL-1 β pode depender do tempo e do contexto. Na ausência de um sinal ativador de inflamassoma a autofagia pode remover a pro-IL-1 β e os componentes do inflamassoma da célula, enquanto que na presença deste sinal a autofagia pode atuar como uma via secretória para liberação de IL-1 β (173,177).

1.8 Justificativa

Apesar da existência da PQT para o tratamento dos pacientes com hanseníase, ainda há a demanda por novas estratégias terapêuticas que contribuam

de forma efetiva para a redução da carga bacilar e impeçam o aparecimento de recidivas e dos episódios reacionais. A busca por essas novas possibilidades terapêuticas requer uma compreensão ainda maior sobre os mecanismos imunopatogênicos associados com a manutenção do bacilo na célula hospedeira, bem como os processos celulares e moleculares associados com o desenvolvimento dos episódios reacionais em pacientes com hanseníase. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que em células de pacientes MBs o aumento de ferro intracelular e o bloqueio de autofagia podem contribuir para a sobrevivência do bacilo na célula hospedeira. Desse modo, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de elucidarmos os mecanismos imunes inatos associados com a forma multibacilar da hanseníase, bem como identificar alvos celulares e/ou moleculares que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da doença e de seus episódios reacionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as características dos macrófagos presentes nas lesões de pele de pacientes com hanseníase, bem como o desenvolvimento dos episódios reacionais em pacientes com a forma multibacilar da doença.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar as concentrações de ferro sérico e hemoglobina no sangue periférico de pacientes com as formas clínicas polares da hanseníase no momento do diagnóstico;

Avaliar o fenótipo de macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase por imunohistoquímica antes e após a alta da PQT;

Avaliar a expressão de genes de imunidade inata e adaptativa, autofagia, inflamassoma e metabolismo de ferro em fragmentos de lesão de pele de pacientes antes e após a PQT;

Avaliar a expressão proteica dos genes diferencialmente regulados e proteínas das vias do ferro e inflamassoma antes e após a PQT em fragmentos de lesão de pele por “Western blotting”;

Avaliar o efeito da suplementação de ferro na modulação da expressão gênica de macrófagos derivados de “buffy coats” estimulados ou não com *M. leprae*.

Avaliar o efeito da suplementação de ferro na secreção de IL-10 em macrófagos de “buffy coats” estimulados ou não com *M. leprae*.

Avaliar o efeito da suplementação de ferro na modulação do fenótipo de macrófagos derivados de “buffy coats” estimulados ou não com *M. leprae*.

Avaliar o efeito da suplementação de ferro sobre a modulação da atividade de IDO em macrófagos derivados de “buffy coats”, estimulados ou não com *M. leprae*.

Avaliar o efeito da suplementação de ferro e da inibição de IDO na viabilidade de *M. leprae* em macrófagos derivados de “buffy coats”.

Identificar genes preditivos de reação hansênica em pacientes com hanseníase através da análise comparativa de amostras obtidas no diagnóstico da doença em pacientes que desenvolveram ou não episódios de RR durante o acompanhamento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biossegurança e permissão ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz, parecer número 892.009.

Os pacientes participantes do estudo foram recrutados no Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Foram selecionados pacientes entre 18 e 65 anos diagnosticados com hanseníase pela primeira vez. Foram excluídos pacientes menores de 18 anos, maiores de 65 anos, coinfectados com o vírus da imunodeficiência humana adquirida e casos de reação e recidiva da hanseníase. O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo.

Todas as coletas foram realizadas por profissionais habilitados utilizando materiais descartáveis e/ou esterilizados visando minimizar o desconforto dos pacientes, e de acordo com as normas de biossegurança. A manipulação de material biológico também foi realizada de acordo com as normas de biossegurança, visando a proteção da amostra, da estudante, dos usuários do laboratório, do ambiente e da população.

3.2 Pacientes e espécimes clínicos

Duas amostras de lesão pele de pacientes com hanseníase foram obtidas no momento do diagnóstico, antes do início do tratamento, e no momento da alta clínica (Tabelas 2, 3 e 4). Estas foram realizadas com “punch” de 3-6 mm e uma foi fixada com Millonig pH 7,4 para posterior inclusão em parafina e análise histopatológica, e a outra foi armazenada em nitrogênio líquido para posterior marcação imunohistoquímica, PCR e “Western blotting”. Os pacientes foram classificados de acordo com a escala de Ridley & Jopling (23). Amostras de sangue também foram coletadas no momento do diagnóstico para a realização de testes bioquímicos (Tabelas 2, 3 e 4).

Alternativamente foram obtidos “buffy coats” provenientes de bolsas de sangue foram obtidas através de convênio com o Serviço de Hemoterapia do

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro para a realização de experimentos *in vitro*.

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes recrutados para o estudo de fenótipo de macrófagos e metabolismo do ferro na hanseníase.

ID	Sexo	Idade	FC	ILB	IB	Experimentos
BT1	F	46	BT	0	0	PCR, WB
BT2	M	32	BT	0	0	PCR, WB
BT3	F	49	BT	0	0	PCR, Bioquímica
BT4	M	30	BT	0	0	PCR
BT5	M	52	BT	0	0	PCR
BT6	M	63	BT	0	0	PCR, Bioquímica
BT7	M	62	BT	0	0	PCR, IHQ, WB
BT8	F	45	BT	0	0	PCR
BT9	M	45	BT	0	0	PCR
BT10	F	54	BT	0	0	IHQ
BT11	F	52	BT	0	0	IHQ
BT12	F	38	BT	0	0	IHQ
BT13	F	61	BT	0	0	IHQ
BT14	F	50	BT	0	0	WB
BT15	M	15	BT	0	0	Bioquímica
BT16	F	52	BT	0	NR	Bioquímica
BT17	M	34	BT	0	0	Bioquímica
BT18	F	14	BT	0	0	Bioquímica
BL1	F	42	BL	4,85	4	PCR
BL2	M	58	BL	2,7	0,5	PCR
BL3	M	29	BL	1,6	2,85	PCR
BL4	M	32	BL	4,7	2,75	Bioquímica
BL5	M	52	BL	3,5	1,25	Bioquímica
BL6	M	53	BL	2,7	2,25	Bioquímica
BL7	M	60	BL	3,5	1,5	PCR
BL8	F	50	BL	3,5	1	PCR
LL1	M	43	LL	4,8	3,25	PCR
LL2	M	45	LL	3,85	2,75	PCR, WB
LL3	M	21	LL	5,85	5,25	PCR, IHQ, WB
LL4	M	31	LL	5,85	5,5	PCR
LL5	M	57	LL	4,85	4,25	PCR
LL6	M	58	LL	5,9	2,25	PCR, IHQ, WB
LL7	F	30	LL	5,95	4,75	PCR, Bioquímica
LL8	M	51	LL	5,9	4,75	PCR
LL9	M	49	LL	5,9	5	PCR
LL10	M	41	LL	5,9	4,25	IHQ
LL11	M	32	LL	5,95	5,75	IHQ

LL12	M	63	LL	5,85	4,75	WB
LL13	M	55	LL	4,85	5	WB
LL14	F	65	LL	4,7	5,25	Bioquímica
LL15	F	65	LL	4,85	4,5	Bioquímica
LL16	M	61	LL	4,8	6	Bioquímica
LL17	M	56	LL	5,9	5	Bioquímica
LL18	M	39	LL	4,85	5,5	Bioquímica

Abreviaturas: ID, identificação; FC, forma clínica; ILB, índice baciloscópico logarítmico da lesão de pele; IB, índice baciloscópico; F, feminino; M, masculino; BT, "borderline" tuberculóide; BL, "borderline" lepromatoso; LL, lepromatoso polar; NR, não registrado; PCR, reação em cadeia da polimerase; WB, "Western blotting"; IHQ, imunohistoquímica.

Tabela 2. Dados clínicos e demográficos dos pacientes recrutados para o estudo de fenótipo de macrófagos no diagnóstico e na alta da poliquimioterapia.

ID	Sexo	Idade	FC	ILBI	ILBF	IBI	IBF	Experimentos
Diagnóstico 1	M	51	BL	3,5	4,6	5	2,75	PCR
Diagnóstico 2	M	28	BL	3,6	NR	4,5	4	PCR
Diagnóstico 3	F	65	LL	4,85	NR	4,5	0,75	PCR
Diagnóstico 4	M	40	LL	4,9	5,8	5,5	5	IHQ
Diagnóstico 5	F	53	LL	5,86	4,7	5	5	IHQ
Alta 1	F	53	LL	5,86	4,7	5	5	PCR, IHQ
Alta 2	M	22	BL	1	0	3,5	2,5	PCR
Alta 3	M	49	BL	3,8	0	4,25	3,75	PCR
Alta 4	M	41	LL	4,9	5,8	5,5	5	IHQ

Abreviaturas: ID, identificação; FC, forma clínica; ILBI, índice baciloscópico logarítmico da lesão de pele inicial; ILBF, índice baciloscópico logarítmico da lesão de pele final; IBI, índice baciloscópico inicial; IBF, índice baciloscópico final; F, feminino; M, masculino; BL, "borderline" lepromatoso; LL, lepromatoso polar; NR, não registrado; PCR, reação em cadeia da polimerase; IHQ, imunohistoquímica.

Tabela 3. Dados clínicos e demográficos dos pacientes recrutados para o estudo das vias de autofagia e inflamação em pacientes que desenvolveram ou não Reação Reversa.

ID	Sexo	Idade	FC	Reação	ILBI	ILBR	IBI	IBR	Experimentos
MB SR1	F	32	LL	-	5,85	-	5,75	-	"Array", PCR, WB
MB SR2	F	48	LL	-	3,6	-	2,25	-	"Array", WB
MB SR3	F	65	LL	-	4,85	-	4,5	-	"Array", PCR, WB
MB SR4	F	58	BL	-	3,5	-	1,75	-	"Array", WB
MB RR1	M	50	BL	10 ^a dose	4,5	2,8	2,75	0,5	"Array", WB
MB RR2	M	45	LL	12 ^a dose	3,85	3,8	2,75	3	"Array", WB
MB RR3	F	42	BL	8 ^a dose	4,85	3,7	4	3,25	"Array", PCR, WB
MB RR4	M	51	BL	12 ^a dose	3,5	4,6	5	2,75	"Array"

MB RR5	M	31	LL	5ª dose	5,85	3,8	5,5	NR	"Array"
MB RR6	F	50	BL	2ª dose	3,5	0	1	NR	"Array", WB
MB RR7	M	58	LL	3ª dose	2,7	1,85	0,5	0,5	"Array"
MB RR8	F	30	LL	3ª dose	5,95	NR	4,75	NR	"Array"
MB RR9	M	28	BL	9ª dose	3,6	NR	4,5	NR	PCR

Abreviaturas: ID, identificação; FC, forma clínica; ILBI, índice baciloscópico logarítmico da lesão de pele inicial; ILBR, índice baciloscópico logarítmico da lesão de pele reacional; IBI, índice baciloscópico inicial; IBR, índice baciloscópico reacional; MB, multibacilar; SR, sem reação; RR, reação reversa; F, feminino; M, masculino; BL, "borderline" lepromatoso; LL, lepromatoso polar; NR, não registrado; PCR, reação em cadeia da polimerase; WB, "Western blotting".

3.3 Processamento de sangue para obtenção de soro

Foram coletados 10 mL de sangue periférico sem anticoagulantes. Após aguardar os 10 minutos necessários para a coagulação, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2000 *rpm* a temperatura ambiente. O soro foi coletado e as alíquotas de 500 µL foram armazenadas a -20° C para posterior utilização.

3.4 Ensaios colorimétricos para determinação das concentrações de hemoglobina e ferro sérico

As dosagens de Hb (Labtest, 43) e ferro sérico (Labtest, 38) foram realizadas respectivamente em sangue total e soro de acordo com o protocolo do fabricante dos kits colorimétricos utilizados.

3.5 Extração de ácido ribonucleico (RNA), transcrição reversa (RT) e reação em cadeia da polimerase (PCR)

O RNA total foi extraído de amostras de lesão de pele congeladas utilizando 1 mL de TRIzol (Life Technologies, 15596-018) conforme as instruções do fabricante. O RNA foi então submetido à análise de pureza e quantificação, e a transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando o kit "SuperScript III First-Strand Synthesis System" (Life Technologies, 18080-051) de acordo com as instruções do fabricante. A PCR em tempo real (qPCR) para avaliação da expressão gênica de *STAT1*, *TNF*, *IFNG*, *IL15*, *CYP27B1*, *NOS2*, *CSF2* – genes relacionados à polarização de macrófagos M1 –, *STAT6*, *MSR1*, *PPARG*, *ARG1*, *ARG2*, *CSF1*, *IL10*, *IDO1* –

relacionados à polarização de macrófagos M2 –, *CD163*, *HMOX1*, *TFRC*, *FTH1*, *FTL*, *SLC40A1*, *SLC11A1* – relacionados ao metabolismo do ferro –, *NLRP3*, *IL33*, *IL18*, *IL1B*, *CASP1* – relacionados a ativação de inflamassoma – foi realizada através do sistema TaqMan em um equipamento “StepOnePlus qPCR System” (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) a 95° C por 20 s, para ativação da DNA polimerase, e 40 ciclos a 95° C por 1 s, para a desnaturação da fita, e a 60° C por 20 s, para o anelamento do primer e extensão da fita de DNA complementar (cDNA), utilizando o “TaqMan Fast Universal PCR Master Mix [2x]” (Applied Biosystems, 4352042).

A expressão dos genes relacionados à via da autofagia e à imunidade inata e adaptativa foi avaliada utilizando kits de PCR “array” compostos por 88 alvos associados às vias e 8 genes de referência (Real Time Primers, HATPL-I). A qPCR “array” foi realizada a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, para ativação da DNA polimerase, e 50 ciclos a 95°C por 10 s, para a desnaturação da fita, e a 58° C por 45 s, para o anelamento do primer e extensão da fita de cDNA, utilizando o “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, 4367659) em um “StepOnePlus qPCR System”. A curva de “melting” foi feita de modo contínuo a 95° C por 15 s e 60° C por 1 minuto. Os genes de referência foram eleitos através da análise de constância da expressão entre os grupos de amostras realizada no “ExpressionSuite software” (Applied Biosystems, Massachusetts, USA).

Alternativamente, a expressão gênica das culturas de macrófagos derivados de monócitos foi avaliada para *TFRC* e *IL10* através do sistema TaqMan em um equipamento “StepOnePlus qPCR System” (Applied Biosystems, Massachusetts, USA) a 95° C por 20 s, para ativação da DNA polimerase, e 40 ciclos a 95° C por 1 s, para a desnaturação da fita, e a 60° C por 20 s, para o anelamento do primer e extensão da fita de DNA complementar (cDNA), utilizando o “TaqMan Fast Universal PCR Master Mix [2x]” (Applied Biosystems, 4352042). Todos os “primers” do sistema TaqMan foram adquiridos da “ThermoFisher Scientific” (#4331182).

A expressão gênica foi analisada através do método do $2^{-\Delta CT}$ para lesões de pele ou do $2^{-\Delta\Delta CT}$ para as culturas de células, utilizando gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*, ThermoFisher Scientific), a hipoxantina fosforribosiltransferase 1 (*HPRT1*, Real Time Primers) ou a β -2-microglobulina (*B2M*, Real Time Primers) como genes de referência para, respectivamente, a PCR TaqMan e as PCRs “array” de autofagia ou imunidade inata e adaptativa. O cálculo

da indução gênica foi feito utilizando a fórmula $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT é igual ao CT (ciclo limiar) do gene de interesse subtraído do CT do gene de referência ($2^{-\Delta CT} = 2^{-(CT \text{ gene de interesse} - CT \text{ do gene de referência})}$) para lesões de pele, e utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ é igual ao ΔCT de cada amostra subtraído do valor ΔCT da amostra controle nos experimentos de cultura ($2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(\Delta CT \text{ da amostra estimulada} - \Delta CT \text{ da amostra controle})} = 2^{-[(CT \text{ do gene de interesse} - CT \text{ do gene de referência do estimulado}) - (CT \text{ do gene de interesse} - CT \text{ do gene de referência do controle})]$).

3.5.1 Análise da via de autofagia

Os perfis de expressão gênica das lesões da hanseníase foram derivados do RT-qPCR “array” de autofagia. As funções “Linear Model for Series of Arrays” (lmFit) e “Empirical Bayes Statistics for Differential Expression” (eBayes) do “Limma (Biocodutor) R package” foram utilizadas para verificar as diferenças na expressão gênica.

Genes diferencialmente expressos nos grupos de pacientes com hanseníase foram identificados pelos valores de “Log2 fold change” (“ ≥ 1.5 -fold”) e moderados pelo limiar de P do teste T ($p < 0,05$) (41). Os genes diferencialmente expressos relacionados ao processo de autofagia foram funcionalmente subcategorizados em quatro subgrupos – autofagia, reguladores de autofagia, lisossomo e reguladores de lisossomo – de acordo com uma lista de genes humanos envolvidos nas vias lisossomal e de autofagia (178). “Heat maps” foram gerados usando a função “Enhanced Heat Map” (heatmap.2) do “gplots R package” e exibido em uma escala de “z-scores”.

3.5.2 Análise de interação gênica e enriquecimento

Para a análise de genes da via de autofagia, genes diferencialmente modulados foram avaliados na base de dados “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins” (STRING) 10.5 (<http://string-db.org/>) (179). Os mapas da rede de interação gene-gene nas lesões da hanseníase foram obtidos através das “action” e “confidence views” da STRING. As análises de ontologia gênica e “KEGG pathways functional enrichment analysis” foram geradas utilizando a ferramenta “Enrichment” da STRING com taxa de descoberta falsa (FDR) e correção de Bonferroni para anotações específicas. O limiar para significância estatística foi estabelecido como $P \leq 0,05$.

3.6 Diálise de proteínas e “Western blotting”

Após a extração de RNA e DNA pelo método do TRIzol, as fases orgânicas dos fragmentos de pele dos pacientes BT e LL foram obtidos através da diálise de proteínas como descrito por Hummon e colaboradores (180).

A fase orgânica de cada biópsia foi coletada e colocada em um tubo de diálise montado utilizando “SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 22 mm” (Thermo Scientific, 68035) e “clamps” colocados nas partes inferior e superior da amostra de forma a não deixar bolhas para evitar a flutuação dos tubos. Os tubos de diálise contendo as fases orgânicas das amostras de lesão de pele foram imersos em uma solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% por 16 horas a 4°C sob agitação. Após esse período, a solução foi trocada por mais duas vezes, deixando as amostras imersas em SDS 0,1% por períodos de 4 e 2 horas, respectivamente, a 4°C sob agitação.

Ao término da diálise, o “clamp” superior foi retirado e a fase globular (fase proteica) foi coletada e transferida para um novo tubo eppendorf. Os tubos foram centrifugados a 6000 xg por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi totalmente retirado, deixando os “pellets” de proteína. Em seguida, os “pellets” foram solubilizados em uma solução uréia 8M, Tris-HCl 1M pH 8 e dosados utilizando o “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad, #500-0006) de acordo com as instruções do fabricante.

Frações de 10 μg de proteína dos extratos de pele de BT e LL foram adicionadas a uma solução de 50 mM Tris-HCl, 100 mM ditiotreitol, 2% SDS, 0.01% azul de bromofenol e 10% glicerol pH 8.0, aquecidas por 5 minutos a 100 °C, e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose “Hybond-C Extra” (Amersham Biosciences, RPN303E) usando um sistema de transferência de bloqueio frio (Bio-Rad, California, USA). A transferência das proteínas foi confirmada pela marcação com vermelho de Ponceau (Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich, P7170). As membranas foram bloqueadas com albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, A2153) a 5% em PBS 0,1% Tween-20 e incubadas com os anticorpos IgG policlonal de coelho anti-Fpn-1 humana (1:500, Abcam, ab78066), anti-Caspase 1 p10 humana (1:200, Santa Cruz Biotechnology, sc-151) e

IgG1 de camundongo anti-GAPDH humano (1:500, Santa Cruz Biotechnology, sc-47724).

As incubações foram seguidas por três etapas de lavagem com tampão fosfato salino (PBS) 0,1% de Tween-20, e os anticorpos primários foram detectados após a incubação com os secundários conjugados a peroxidase de rabanete (HRP) apropriados, cabra anti-IgG de camundongo-HRP (1:1000; DakoCytomation, P0447) ou cabra anti- IgG de coelho-HRP (1:2000; DakoCytomation, P0448) por 1 hora a temperatura ambiente. As proteínas imunomarcadas foram detectadas em uma “Carestream Image Station 4000MM” (Carestream Health, Connecticut, USA) ou reveladas em filme fotográfico (Carestream Kodak X-Omat LS film, Amersham Biosciences) utilizando o substrato quimioluminescente “Western Blotting Luminol Reagent” (Santa Cruz Biotechnology, sc-2048). A análise densitométrica das bandas foi realizada utilizando o “Adobe Photoshop CC software” versão 14.2.1.x64 (Adobe Systems Incorporated, USA).

3.7 Corte das biópsias congeladas e marcação imunohistoquímica

As marcações imunohistoquímicas foram realizadas utilizando o método da avidina-biotina peroxidase (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories). As lâminas silanizadas com cortes de no máximo 4 µm de espessura foram fixadas em acetona, hidratadas em PBS 0,01 M livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos com peróxido de hidrogênio 0,3% em PBS 0,01 M para bloquear a atividade da peroxidase endógena.

Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados com soro normal de cabra (VECTASTAIN Elite ABC Kit Rabbit IgG, Vector Laboratories, PK-6101) ou soro normal de cavalo (VECTASTAIN Elite ABC Kit Mouse IgG, Vector Laboratories) por 30 minutos a temperatura ambiente. Os anticorpos primários monoclonais de camundongo anti-CD163 (1:25, R&D Systems, MAB1607) e anti-TfR1 (1:25, Dako, F0829), e policlonais de coelho anti-FTL (1:800, Abcam, ab69090), anti- Hp (1:500, Abcam, ab85846), anti-HO-1 (1:800, Abcam, ab13243), anti-Hb β/γ/δ humana (1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-21006), anti-arginase 1 (ARG1, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, sc-20150) e os isotipos apropriados foram diluídos em PBS 0,01 M e incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

Os cortes foram lavados três vezes com PBS 0,01 M e, posteriormente, incubados com os anticorpos secundários biotinizados de cabra anti-IgG de coelho ou de cavalo anti-IgG de camundongo (VECTASTAIN Elite ABC Kits) por 1 hora a temperatura ambiente. Após três novas etapas de lavagem, os cortes foram incubados por 40 minutos em temperatura ambiente com complexo avidina-biotina para amplificação do sinal. A reação foi desenvolvida a temperatura ambiente por 10 minutos em uma solução de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC Peroxidase HRP Substrate Kit, Vector Laboratories, SK-4200). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer (Dako, S3309) por 2 minutos e montadas com meio de montagem aquoso Faramount (Dako, S3025).

As imagens foram obtidas via microscópio Nikon Eclipse E400 equipado com uma objetiva 40x/0.65 plan-apocromática (Nikon Instruments Inc., New York, USA), uma câmera INFINITYX-32C e o “software” Infinity Capture 6.1.0 (Lumenera Corporation, Ontario, Canada). Os valores das áreas de tecido positivas foram calculados através da razão entre a área marcada e a área total de tecido de ao menos 5 campos aleatórios do infiltrado inflamatório por caso avaliado.

Os valores de área foram obtidos após a seleção da marcação e da área total do tecido utilizando a ferramenta “Count/Size” e a função “Statistics”, que fornece a “Sum area” no “software” Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, USA). Após a obtenção dos valores de “Sum area” de ambas, a razão entre a área marcada e área total de tecido foi obtida para obtenção dos valores em unidade arbitrária (UA) para cada campo avaliado. Estes valores estão apresentados nos gráficos de quantificação da imunohistoquímica.

3.8 Isolamento de monócitos do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) provenientes das “buffy coats” de doadores saudáveis foram obtidas através do isolamento por gradiente de centrifugação utilizando Ficoll-Paque PLUS method (GE Healthcare, 17-1440-03) em condições livres de endotoxinas segundo as orientações do fabricante. A viabilidade das células foi verificada através da solução de Azul de Tripán 0,4 % (Sigma-Aldrich, T8154) na diluição 9 partes de Tripán para 1 de células e a contagem foi realizada em Câmara de Neubauer.

Para a obtenção dos monócitos, as PBMCs foram plaqueadas em placas de 24 poços com meio RPMI-1640 (GIBCO, 11875093) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Penicillin-Streptomycin, Sigma-Aldrich, P4333), 2 mM L-alanil-L-glutamina (GlutaMAX I, GIBCO, 35050061) e 10 % de soro fetal bovino (GIBCO, 10437028), e incubadas em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 2 horas. Após a incubação, o sobrenadante foi retirado e os poços foram lavados três vezes com PBS, para remover as células não aderentes, e novo meio foi adicionado. Os monócitos foram mantidos em cultura por três dias antes dos estímulos e infecção.

Alternativamente, nos experimentos de avaliação da viabilidade de *M. leprae*, foi utilizado meio RPMI-1640 (GIBCO, 11875093) suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, A8351), 2 mM L-alanil-L-glutamina (GlutaMAX I, GIBCO, 35050061) e 10 % de soro fetal bovino (GIBCO, 10437028).

3.9 Cultura de células, estímulos e infecção

Os macrófagos foram estimulados com FeSO₄ (Merk Millipore, 103967) na concentração de 100 µM, 10 µM de hemina ("Frontier Scientific", H651-9) ou 200 µM do inibidor de IDO 1-metil-D-triptofano (1-MT, Sigma-Aldrich, 452483) por 30 minutos na estufa. As células foram estimuladas com *M. leprae* irradiado proveniente de tatu obtido em convênio com a BEI Resources (National Institute of Allergy and Infectious Diseases e ATCC, Manassas, VA, USA), na concentração de 10 µg/mL e incubadas a 37° C ou infectadas com *M. leprae* viável da cepa Thai-53, obtido em convênio com o Dr. Flávio Alves Lara do Laboratório de Microbiologia Celular (IOC/FIOCRUZ) e a Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Laboratório de Criação de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima, na multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 organismos/célula e incubadas a 33°C em atmosfera de 5 % de CO₂ em meio suplementado com ampicilina por 18 a 24 horas.

Os sobrenadantes de cultura foram armazenados a -20° C para posterior dosagem por ensaio imunoenzimático (ELISA) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC).

3.10 Marcação intracelular para indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO)

Os monócitos, aderidos no fundo da placa de cultura, foram lavados três vezes com PBS a 37°C. Foram acrescentados a cada poço 500 µL de PBS, as células foram raspadas delicadamente com ponteiros descartáveis de P1000, homogeneizadas, transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas a 1500 *rpm* por 10 minutos a 4°C.

As células foram fixadas e permeabilizadas com “Fixation/Permeabilization Buffer” (Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, eBioscience, 88-8824-00) e foram bloqueadas com 3% de soro fetal bovino e 2% de soro normal de cabra em PBS. As células foram marcadas com anticorpo IgG de coelho anti-IDO humana (1:50, “Santa Cruz Biotechnology”, sc-25808) por 30 minutos a 4°C ou com seu controle isotópico. As células foram lavadas duas vezes e incubadas por 30 minutos a 4°C com o anticorpo secundário de cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG de coelho (1:300, Invitrogen, A32731). As células foram lavadas com PBS-FACS, e a marcação foi analisada no Citômetro de Fluxo BD Accuri C6 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) ligado a um computador equipado com o “software” CFlow Plus versão 1.0.227.4 (BD Bioscience).

3.11 Determinação molecular da viabilidade de *M. leprae*

A viabilidade de *M. leprae* foi medida como previamente descrito por Martinez e colaboradores (181) com algumas modificações. Em resumo o RNA e o DNA de *M. leprae* foram extraídos pelo método de TRIzol (Invitrogen, 15596026) segundo as instruções do fabricante através homogeneização de tubo único utilizando um instrumento “Fast Prep FP 24” (MP Biomedicals, Santa Ana, CA). As preparações de RNA foram tratadas com DNase (TURBO DNA-free kit, Ambion, AM1907) para remover qualquer DNA remanescente e reversamente transcritas utilizando “radom primers” e o “SuperScript III First-Strand Synthesis System” (Invitrogen, 18080051) seguindo o protocolo do fabricante. A viabilidade do bacilo foi estimada pelos níveis normalizados de RNA ribossomal (rRNA) 16S pelos níveis de DNA 16S usando um ensaio de qPCR TaqMan.

3.12 Dosagem de citocinas e mediadores por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes armazenados foram dosados para avaliar as concentrações da citocina IL-10 por ELISA utilizando o kit “Human IL-10 ELISA Ready-SET-Go!” (Affymetrix, eBioscience, 88-7106-77) segundo o protocolo do fabricante.

3.13 Determinação da atividade de indoleamina 2,3-dioxigenase por cromatografia líquida de alta performance

A determinação da atividade de IDO em sobrenadantes de cultura foi realizada por HPLC para determinação das concentrações de quinurenina e triptofano. Em um tubo eppendorf, 165 µL do sobrenadante de cultura foram homogeneizados com 5 µL de tirosina e 25 µL de ácido tricloroacético. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a 15800 *xg*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e foram injetados 50 µL na coluna de fase reversa C18. A detecção da corrida foi feita em 365 nm, para detectar a quinurenina, e 285 nm, para detectar o triptofano e o normalizador interno tirosina. A atividade de IDO foi avaliada através da razão da concentração de quinurenina sobre triptofano.

3.14 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados no “GraphPad Prism 5.00.288 software” (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Foram utilizados os testes t não pareado, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com o pós teste de Dunns. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Os genes de polarização de macrófagos estão diferencialmente regulados em pacientes BT versus LL

Alguns estudos sugerem que a dicotomia M1-M2 em lesões cutâneas pode ter um papel no direcionamento dos pacientes para um polo específico da hanseníase. Foi demonstrada uma divergência entre as vias fagocítica e antimicrobiana em macrófagos de pacientes com as formas polares da doença (41). Os macrófagos de pacientes LL exibem uma capacidade fagocítica aumentada que é mediada por IL-10 enquanto os macrófagos de BT apresentam uma expressão aumentada de peptídeos antimicrobianos por um mecanismo dependente de IL-15 e da ativação da via vitamina D3 (41).

Um qPCR foi realizado para avaliar a expressão dos genes relacionados à polarização M1 e M2 em lesões de pele de pacientes BT e LL (Tabela 2). Foi observado um aumento na expressão de marcadores clássicos de macrófagos M1, como *STAT1*, *TNF*, *IFNG*, *IL15* e *CSF2* em pacientes BT em comparação às lesões de LL (Figura 24). Estudos anteriores mostraram um aumento da expressão proteica de *STAT1* (182), *TNF*, *IFN- γ* e *IL-1 β* (183) nestes pacientes. No entanto, *STAT6*, um gene classicamente relacionado à polarização de macrófagos M2, também estava superexpresso nas lesões de pacientes BT quando comparados aos espécimes de LL (Figura 24), nossos dados anteriores demonstram que nas lesões de BT existe uma minoria de células M2 que contribuem para a presença do bacilo nas células de pacientes com hanseníase tuberculóide (51), mas a presença de *STAT6* associada à expressão de *CSF2* indica uma presença aumentada de células dendríticas (184) nas lesões de pacientes tuberculóide, o que já foi demonstrado por diversos autores (61,185). A avaliação das concentrações de mRNA total das lesões de pele não permite a definição do tipo celular responsável pela expressão das moléculas avaliadas.

Por outro lado, *PPARG* e *MSR1*, marcadores conhecidos de polarização M2 estavam aumentados em lesões de pacientes LL em relação às de BT (Figura 24). O receptor ativador de proliferação de peroxissoma gama foi anteriormente demonstrado como um mediador importante na formação de corpúsculos lipídicos

em macrófagos infectados com *M. bovis* BCG (186). Mattos e colaboradores (187,188) relataram uma expressão aumentada da proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (ADRP) e do MSR1, associadas respectivamente à formação de corpúsculos lipídicos e à captação de lipoproteínas de baixa densidade, em lesões de pele LL. Apesar de não estatisticamente significativo, foi também observado um aumento do mRNA da citocina IL-10, clássico em lesões de pele de pacientes com hanseníase multibacilar (37,41,49,50). Não foi observada regulação diferencial de *NOS2A* ou *ARG1* (Figura 24).

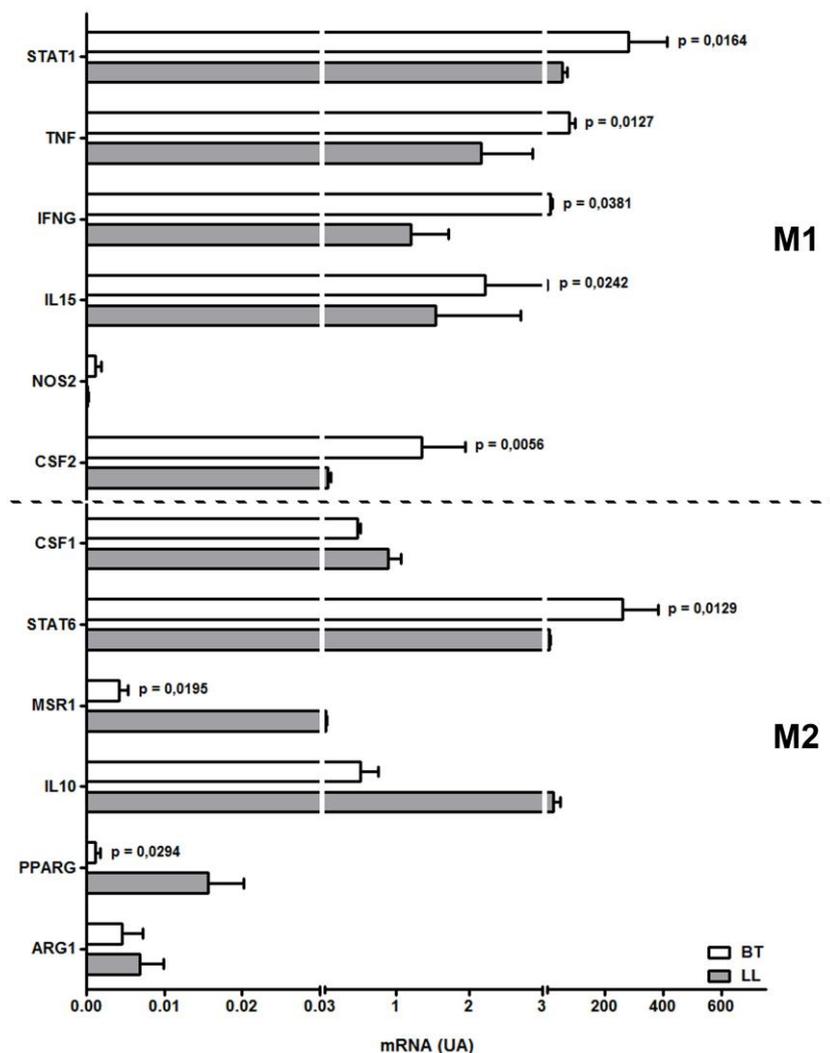


Figura 24. Perfil de expressão gênica de lesões de pele de pacientes BT e LL.

Os mRNAs purificados de amostras de pele de pacientes BT e LL foram avaliados para marcadores de polarização de macrófagos M1 e M2 por RT-qPCR. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *GAPDH* e analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os níveis de mRNA estão expressos como unidade arbitrária (UA) e as barras representam as médias \pm SEM de pelo menos cinco amostras independentes de cada grupo de pacientes.

4.2 Captação de hemoglobina aumentada em lesões de pele de pacientes LL

Nossos dados anteriores também demonstraram um aumento da expressão de CD163 em lesões cutâneas de pacientes LL (50). Visto que o CD163 é um receptor “scavenger” que reconhece o complexo Hb-Hp (88,189), sua expressão aumentada parece contribuir para o aumento da internalização e sobrevivência da micobactéria por um mecanismo associado com um aumento no estoque de ferro nos macrófagos espumosos carregados de bacilos (50,190).

A expressão de *CD163* e *HMOX1* estava aumentada em lesões de pele de pacientes LL quando opostas às de pacientes BT (Figura 25A), confirmando nossos achados anteriores que indicavam uma maior expressão de CD163 em pacientes LL (50). A expressão proteica de Hb e Hp, que formam o complexo internalizado pelo CD163 (Figura 25B), assim como a expressão gênica e proteica de HO-1 (Figuras 25A e B), uma enzima que catalisa a clivagem oxidativa do heme após a degradação lisossomal da Hb, também foram maiores em lesões de LL do que de BT, sugerindo um aumento na internalização de Hb e catálise de heme em pacientes LL.

A análise das concentrações de ferro sérico não demonstrou diferença significativa comparando os grupos BT e LL (Figura 25C). As concentrações sanguíneas de Hb estavam aumentados em pacientes BT em comparação aos LL (Figura 25C), mas nenhum dos pacientes incluídos no estudo apresentou anemia (Hb < 11,5 g/dL).

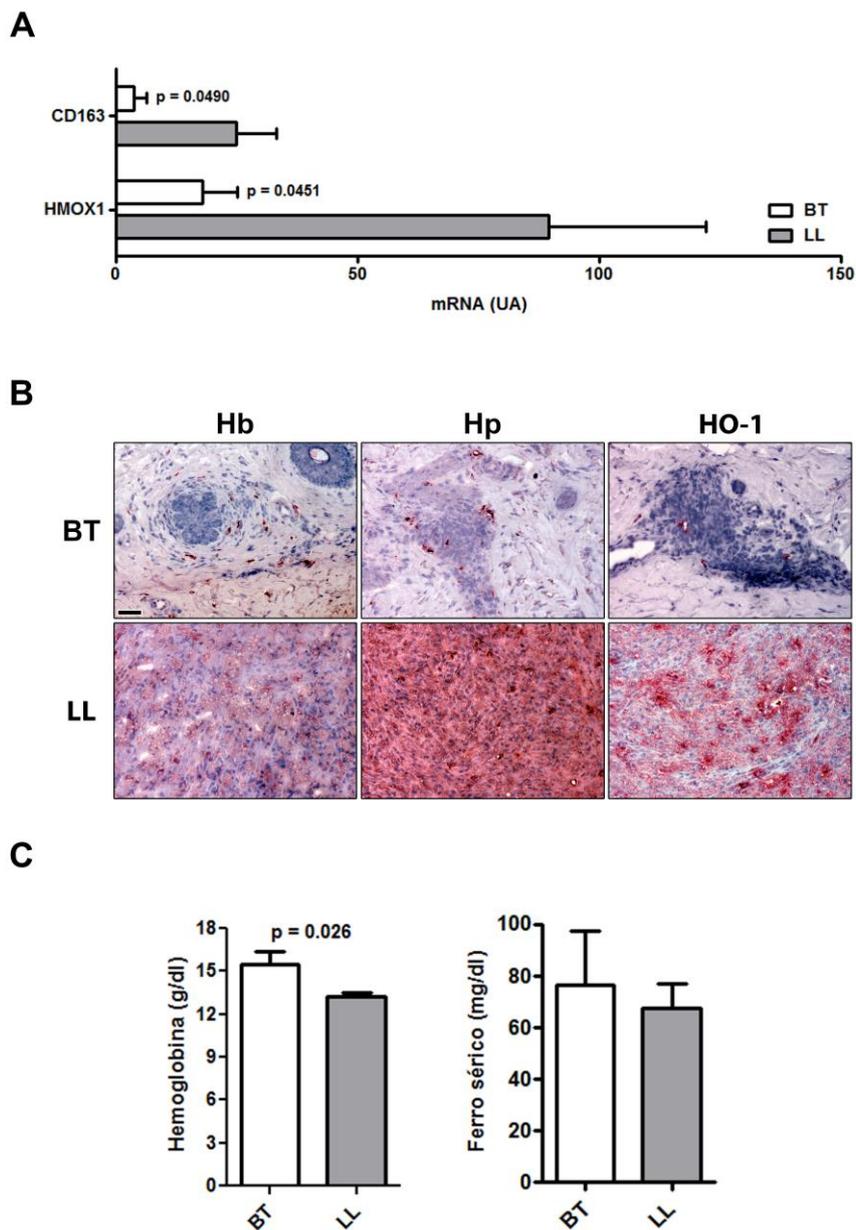


Figura 25. Lesões de pele de pacientes lepromatosos apresentam uma maior expressão de CD163, hemoglobina, haptoglobina e heme oxigenase 1.

(A) Os mRNAs purificados de amostras de pacientes BT e LL foram avaliados para a expressão de CD163 e HMOX1 por RT-qPCR. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão do GAPDH e analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$. Os níveis de mRNA estão expressos como unidade arbitrária (UA) e as barras representam as médias \pm SEM de cinco amostras independentes em cada grupo de pacientes. (B) A expressão proteica de Hb, Hp e HO-1 foi avaliada por imunohistoquímica. Imagens são representativas de cinco amostras independentes de cada grupo. Barras: 25 μ m. (C) As concentrações de hemoglobina e ferro sérico foram avaliados por ensaios colorimétricos e as barras representam as médias \pm SEM de cinco amostras independentes em cada grupo de pacientes.

4.3 O metabolismo do ferro é alterado durante a hanseníase

Visto que nosso estudo anterior associou a expressão aumentada de CD163 em macrófagos LL com aumento do armazenamento de ferro (50), nós

avaliamos as expressões gênicas e proteicas de outras moléculas relacionadas ao metabolismo do ferro em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase.

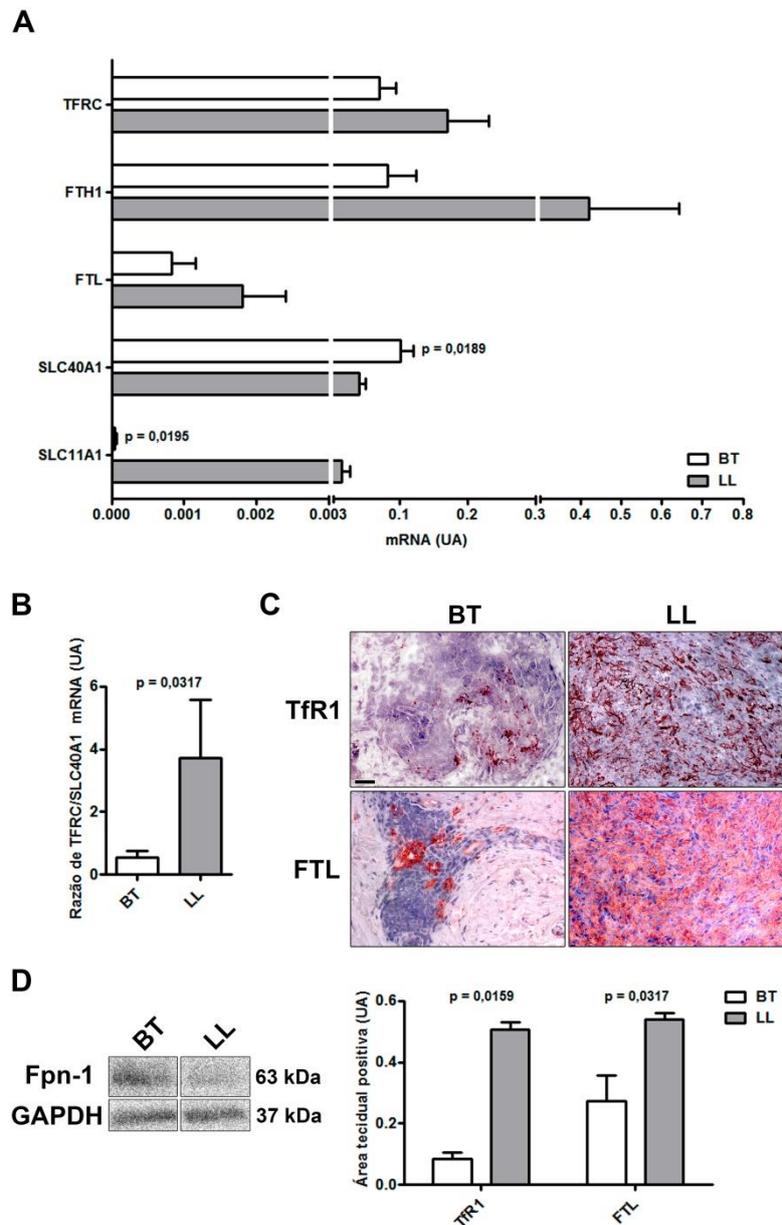


Figura 26. As proteínas do metabolismo do ferro estão diferencialmente reguladas nas formas clínicas da hanseníase.

(A) Os mRNAs purificados de amostras de pele de pacientes BT e LL foram avaliados para a expressão gênica de *TFRC*, *FTH1*, *FTL*, *SLC40A1* e *SLC11A1* por RT-qPCR. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de GAPDH e analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$. Os níveis de mRNA estão expressos como unidade arbitrária (UA) e as barras representam as médias \pm SEM de cinco amostras independentes de cada grupo de pacientes. (B) A razão de *TFRC/SLC40A1* foi obtida através da divisão da expressão de mRNA de *TFRC* de cada amostra por seu valor de expressão de mRNA de *SCL40A1*. As barras são representativas da media \pm SEM de cinco amostras independentes em cada grupo de pacientes. (C) A expressão proteica de TfR1 e FTL foi avaliada nas lesões de pele por imunohistoquímica. Imagens são representativas de cinco amostras independentes em cada grupo de pacientes. Barras: 25 μ m. As áreas teciduais positivas estão expressas como unidade arbitrária (UA) e as barras representam as médias \pm SEM de cinco amostras em cada grupo de pacientes. (D) A expressão proteica de Fpn-1 foi avaliada por "Western blotting". Imagem representativa de cinco pacientes por grupo amostral.

Apesar da falta de significância estatística, observou-se a superexpressão de *TFRC*, *FTH1* e *FTL*, que são transcritas respectivamente em TfR1, FTL e FTH, em pacientes LL em comparação com amostras BT (Figura 26A). O gene *SLC11A1* que transcreve a proteína NRAMP1 também foi superexpresso em amostras de LL e não nas de BT (Figura 26A). Por outro lado, o gene da Fpn-1, *SLC40A1*, se mostrou aumentado em lesões de BT em oposição às células LL (Figura 26A).

Quando foi realizada a razão entre a expressão dos genes *TFRC*, um importador celular de ferro, e *SLC40A1*, o exportador celular de ferro, valores significativamente mais elevados foram observados em amostras LL (Figura 26B), sugerindo que possa estar ocorrendo um acúmulo de ferro nestas células em função da expressão reduzida de Fpn-1. De fato, a técnica de imunoperoxidase confirmou o aumento de TfR1 e de ferro armazenado na forma de FT em macrófagos LL por imunomarcagem de FTL (Figura 26C).

A análise por “Western blotting” confirmou a expressão mais baixa de Fpn-1 em lesões de LL observadas por qPCR (Figuras 26A e 26D). A redução observada na expressão de Fpn-1 está de acordo com o aumento na concentração da hepcidina urinária e de sua expressão gênica em lesões de pele de pacientes LL (191), visto que o mecanismo pelo qual a hepcidina promove o sequestro de ferro é baseado na internalização e destruição da Fpn-1, o único exportador celular de ferro conhecido (192,193). Juntos, esses dados sugerem que o aumento no armazenamento de ferro observado em macrófagos de pacientes LL se deve ao aumento da captação de ferro derivado do heme e da Tf, e à redução da exportação de ferro por Fpn-1.

Estudos anteriores sugeriram que *M. leprae* produz várias proteínas envolvidas no transporte, armazenagem e regulação do ferro na ausência de genes reconhecíveis que codificam “scavengers” de ferro (90). Reeve e colaboradores (95) encontraram uma proteína transportadora de metal divalente homóloga ao NRAMP1 em *M. leprae*. O NRAMP1 está envolvido na resistência ou susceptibilidade a vários patógenos intracelulares. Seu papel primário é ainda mais atraente visto que há homólogos de NRAMP em vários parasitos intracelulares, como micobactérias (95).

Uma superexpressão do gene *SLC11A1* foi detectada em lesões de pele de pacientes LL em oposição às lesões de BT (Figura 26A), o que foi confirmado por Pereira-Suárez e colaboradores (194), que encontraram maior expressão da proteína NRAMP1 em lesões cutâneas LL.

Estes achados são curiosos, uma vez que apesar de nossos dados e de outros autores sugerindo o fenótipo dos macrófagos de pacientes LL como “M2-like”, os macrófagos mantêm a capacidade de acumular ferro e exibem uma redução da expressão da Fpn-1, sendo estas características clássicas de macrófagos M1 (78). Estes dados reforçam a ideia da existência de um espectro de macrófagos que não podem ser facilmente classificados como um subtipo específico (195).

4.4 A suplementação com heme aumenta a viabilidade de *Mycobacterium leprae*

O ferro é um nutriente essencial, e bactérias patogênicas desenvolveram vias sofisticadas para satisfazer suas necessidades de ferro. Vários estudos demonstraram que o ferro é essencial para o crescimento micobacteriano e, em *M. tuberculosis*, a aquisição, assimilação e regulação do ferro desempenham um papel crucial na proliferação, virulência e latência, indicando que os componentes envolvidos neste processo são potenciais candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças micobacterianas (196).

Para compreender melhor os mecanismos relacionados ao acúmulo de ferro nas células lepromatosas, nós estimulamos monócitos isolados de “buffy coats” com *M. leprae* irradiado na presença ou ausência de uma fonte exógena de ferro (FeSO_4).

Conforme pode ser observado na Figura 27A, *M. leprae*, na presença ou não de FeSO_4 , foi capaz de aumentar a expressão gênica tanto de *TFRC* como de *IL10*. A secreção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura também aumentou nas células estimuladas com FeSO_4 e *M. leprae* (Figura 27B).

Em seguida, investigamos se o ferro foi capaz de contribuir para a sobrevivência de *M. leprae* dentro de macrófagos humanos. Visto que *M. leprae* foi capaz de aumentar as concentrações de IL-10 na presença de FeSO_4 , nós avaliamos o efeito das fontes de ferro exógenas sobre a viabilidade de *M. leprae*. Hemina, mas não FeSO_4 , foi capaz de aumentar significativamente a viabilidade de *M. leprae* em macrófagos humanos (Figura 27C).

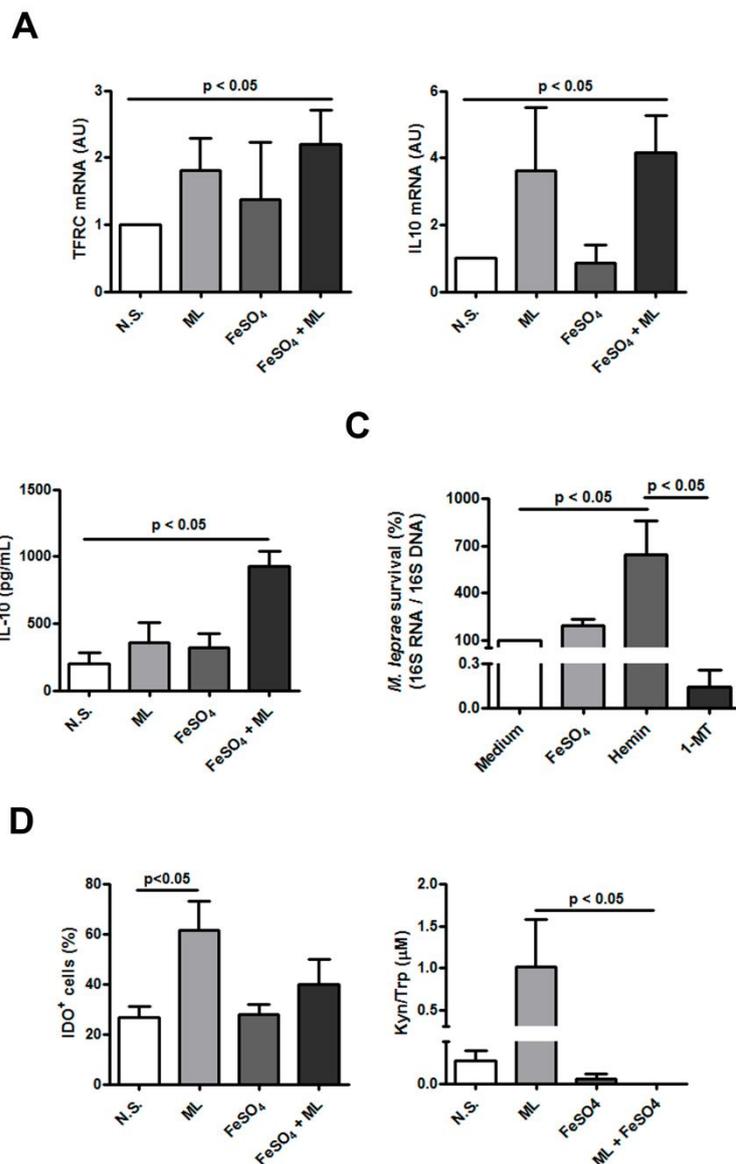


Figura 27. Tratamento com hemina aumenta a viabilidade de *M. leprae*.

Os monócitos derivados de PBMCs foram estimulados com FeSO₄, hemina ou o inibidor de IDO, 1-MT, por 30 minutos antes do estímulo ou infecção com *M. leprae* por 18 a 24 horas. O RNA e o DNA foram extraídos pelo método do TRIZOL. (A) O RNA das culturas foi avaliado para a expressão de *TFRC* e *IL10* por qPCR. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão do *GAPDH* e analisados pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os níveis de RNA estão expressos como unidades arbitrárias (UA) e as barras são representativas das médias \pm SEM de ao menos cinco experimentos independentes. (B) As concentrações de IL-10 nos sobrenadante de cultura foram dosados por ELISA. As barras são representativas das médias \pm SEM de cinco experimentos independentes. (C) A expressão de rRNA 16S e DNA 16S foi avaliada por qPCR nos RNAs e DNAs purificados. A viabilidade de *M. leprae* foi calculada através da razão de rRNA 16S /DNA 16S para cada condição. As barras são representativas das médias \pm SEM de quatro experimentos independentes. (D) As células foram raspadas, marcadas para expressão intracelular de IDO e analisadas por citofluorometria de fluxo. A atividade de IDO foi calculada através da razão das concentrações de quinurenina (Kyn) pelos de triptofano (Trp) avaliados por HPLC. As barras são representativas das médias \pm SEM de cinco experimentos independentes.

O controle da homeostase do ferro tornou-se um campo de batalha central na interação hospedeiro-patógeno (94,117). Uma pergunta que permanece é

precisamente como o ferro é internalizado pela micobactéria no interior do fagossomo.

Estudos analisando a aquisição de ferro por *M. tuberculosis* demonstraram que a bactéria é capaz de adquirir ferro tanto do “pool” endógeno como ferro ligado à Tf (197,198). Boradia e colaboradores (197) propuseram que *M. tuberculosis* pode adquirir ferro ligado a Tf através de: (1) carboximicobactinas, transferindo-o para micobactinas com subsequente entrega intracelular do ferro; (2) retirando ferro pela carboximicobactina e entregando-o a micobactéria via transportador de alta afinidade IrtA/B; ou (3) internalizado a Tf ligada ao GAPDH ou outra proteína de superfície de *M. tuberculosis* com posterior remoção do ferro pelas ferredoxinas presentes no citoplasma. As explicações acima são possíveis para *M. leprae* visto que nós observamos uma expressão aumentada de TfR1 e um “pool” intracelular de ferro aumentado.

Uma segunda alternativa seria que os corpúsculos lipídicos possam contribuir para a entrega do ferro no fagossomo. Estudos anteriores demonstraram a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos de lesão de pele de pacientes LL (187,199) e que após a infecção bacteriana, os corpúsculos lipídicos presentes nos macrófagos humanos podem se concentrar nos fagossomos e modificar seu conteúdo (200,201). É hipotetizado que micobactérias podem se beneficiar desse mecanismo para entrega de ferro durante a infecção (202). As micobactinas podem se difundir para fora dos fagossomos carregados com bactéria dentro dos macrófagos e se associar com o “pool” de ferro intracelular ou viajar para a membrana plasmática do macrófago para quelar ferro. As micobactinas carregadas de ferro podem se acumular dentro dos corpúsculos lipídicos do macrófago hospedeiro. Estes corpúsculos lipídicos associados com micobactinas carregadas de ferro podem permanecer em contato direto com os fagossomos contendo bactérias, se envolvendo na entrega do ferro carregado aos mesmos fagossomos, permitindo que o “pool” de ferro fagossomal enriquecido possa ser utilizado pela micobactéria (202). Nosso estudo anterior demonstrou que nas células lepromatosas há um acúmulo de ferro que está relacionado com o aumento da expressão de CD163 (50) e nós hipotetizamos que *M. leprae* poderia associar-se com vesículas lipídicas para transferir ferro do hospedeiro para os fagossomos ricos em *M. leprae*.

Outra possibilidade inclui a aquisição direta de heme ou Hb. Tullius e colaboradores (203) identificaram uma região genômica responsável pela captação

de heme que codifica várias proteínas específicas micobacterianas na membrana junto com uma única proteína ligadora de heme secretada que foram implicadas no sequestro de ferro ligado à heme do hospedeiro, e seu transporte através da parede celular e membrana do *M. tuberculosis*. Neste ponto o heme poderia ser então degradado pela MhuD, uma proteína citoplasmática micobacteriana catalisadora de heme, sugerindo que após atravessar a membrana, o ferro ligado à heme pode ser catalisado para fornecer ferro em condições de privação de ferro (203,204). *M. tuberculosis* extracelular pode interagir com heme ou Hb na corrente sanguínea durante a disseminação da doença ou dentro dos pulmões durante hemoptise, e micobactérias intracelulares, nos fagolisossomos durante a degradação de eritrócitos senescentes ou no fagossomo após a difusão de heme do fagolisossomo (203). A aquisição de ferro heme também é uma forte possibilidade para *M. leprae* visto que macrófagos de pacientes LL apresentam uma alta expressão de CD163 em associação com uma captação aumentada de Hb, e levando-se em conta o aumento da viabilidade da micobactéria após a suplementação das culturas com heme.

Nosso estudo anterior demonstrou que *M. leprae* induz a expressão e atividade deIDO em monócitos humanos (49). Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com heme pode induzir a expressão deIDO (205). Em contraste, um efeito inibitório de FeSO_4 na expressão deIDO foi descrito em células Hep-2 (206). No presente estudo nós avaliamos a expressão e a atividade deIDO em células estimuladas com *M. leprae* na presença de FeSO_4 . O tratamento com FeSO_4 foi capaz de reverter o aumento na expressão e da atividade deIDO induzida por *M. leprae in vitro* (Figura 27D).

Para avaliar se aIDO é importante para a viabilidade de *M. leprae*, infectamos macrófagos com *M. leprae* na presença ou não do inibidor farmacológico deIDO, 1-MT. Conforme observado na Figura 27C, houve uma redução na viabilidade de *M. leprae* em células tratadas com 1-MT, sugerindo que aIDO é necessária para a sobrevivência de *M. leprae* dentro das células hospedeiras.

Em conjunto, os dados aqui demonstrados indicam que macrófagos de pacientes LL apresentam um fenótipo misto acompanhado por um aumento de moléculas relacionadas à captação e armazenamento de ferro (Figura 28). Mais significativamente, os nossos resultados enfatizam que ferro eIDO são necessários para a sobrevivência de *M. leprae* nas células hospedeiras.

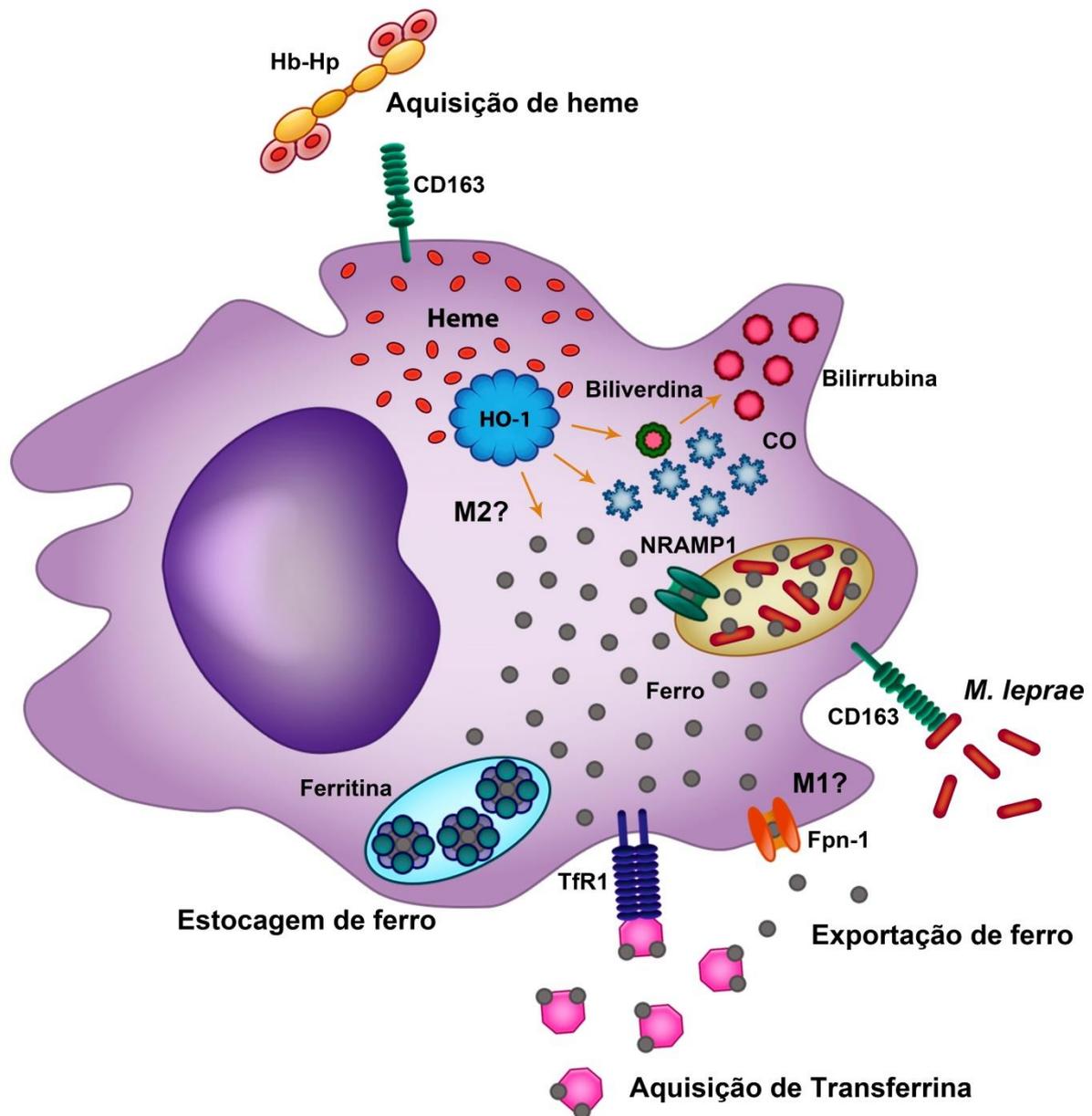


Figura 28. Metabolismo do ferro em macrófagos lepromatosos.

Os macrófagos LL apresentam uma alta expressão de marcadores M2, como CD163, um receptor "scavenger" que reconhece o complexo Hb-Hp e foi anteriormente implicado na internalização de *M. leprae*. As moléculas de heme são degradadas pela HO-1, que cataliza heme em ferro livre, CO e biliverdina, que é posteriormente convertida em bilirrubina pela enzima biliverdina redutase, classicamente superexpressos em macrófagos M2. O TfR1 também está mais expresso em macrófagos LL. Este receptor reconhece ferro ligado a Tf, que é endocitada e o ferro é posteriormente liberado no citoplasma. Macrófagos LL também apresentam uma expressão reduzida de Fpn-1, o exportador celular de ferro, característica de macrófagos M1, que contribui para o aumento do "pool" intracelular de ferro. O ferro livre presente no citoplasma é rapidamente estocado na forma de ferritina, mas também pode estar disponível para o uso e aumento do crescimento de *M. leprae* nos fagossomos como observado nesta forma clínica. A expressão de NRAMP1 também está aumentada em macrófagos LL, mas seu papel nas células infectadas com *M. leprae* ainda não foi determinado.

4.5 A PQT não altera o fenótipo de macrófagos em lesão de pele de MBs.

Um dos aspectos que nos chama a atenção é o fato de que há um elevado percentual de pacientes multibacilares que recebem alta por cura, mas que mantém a baciloscopia acima de 2 após a PQT (dados não mostrados). Uma vez que o fenótipo de macrófagos presente na lesão pode contribuir ou não para a manutenção da bactéria na célula hospedeira, nós avaliamos a expressão gênica de genes relacionados à polarização de macrófagos em fragmentos de lesões de pele de pacientes MBs coletados no momento do diagnóstico da hanseníase, sem tratamento, e no momento da alta clínica após a PQT por 12 meses (Tabela 3). Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes avaliados (Figura 29).

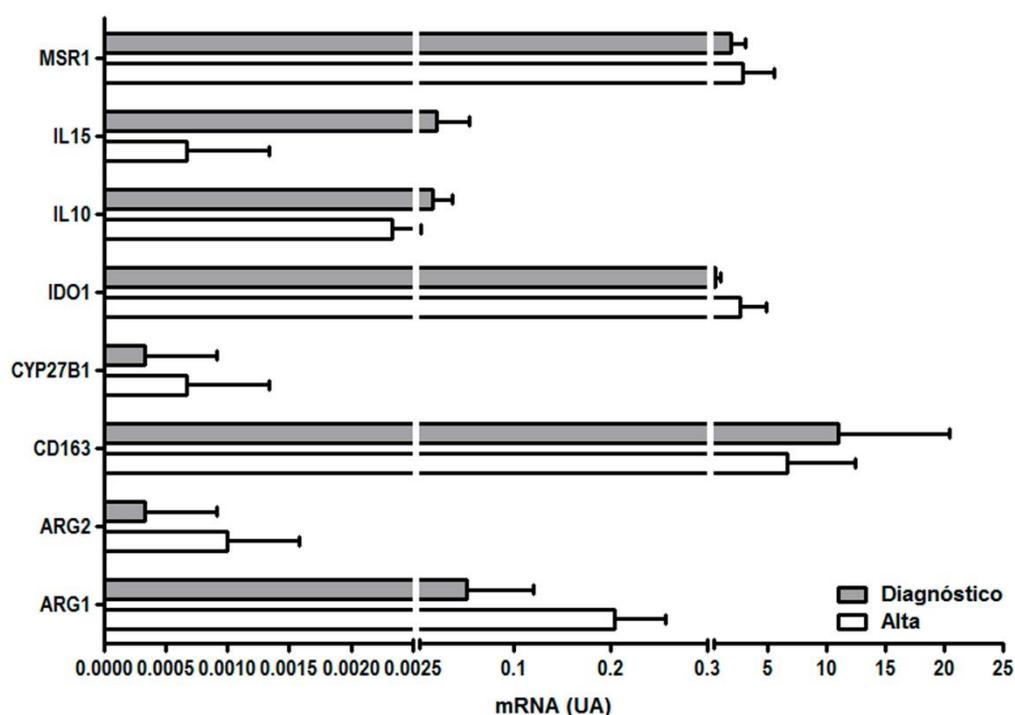


Figura 29. Expressão gênica de genes relacionados à polarização de macrófagos em pacientes multibacilares no momento do diagnóstico e na alta da poliquimioterapia.

Fragmentos de lesão de pele foram colhidos no momento do diagnóstico e armazenados em nitrogênio líquido para posterior processamento. Após um acompanhamento detalhado de ao menos um ano, as lesões de pele dos pacientes multibacilares no momento do diagnóstico e da alta do tratamento foram processadas. Os mRNAs foram purificados das amostras de pele e o qPCR para os genes relacionados à polarização de macrófagos foi realizado. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *GAPDH* e analisados pelo método do $2^{-\Delta CT}$. Os níveis de mRNA estão expressos como unidade arbitrária (UA) e as barras representam as médias \pm SEM de três amostras independentes em cada grupo de pacientes.

Em seguida nós fomos avaliar a expressão proteica do marcador de macrófagos M2 arginase 1 nas lesões de pele de pacientes MBs no momento do diagnóstico da hanseníase e na alta clínica por imunohistoquímica. É possível observar uma redução na expressão relativa de arginase 1, não pela mudança de perfil dos macrófagos, mas sim pela redução dos focos de infiltrado inflamatório *per se* (Figura 30).

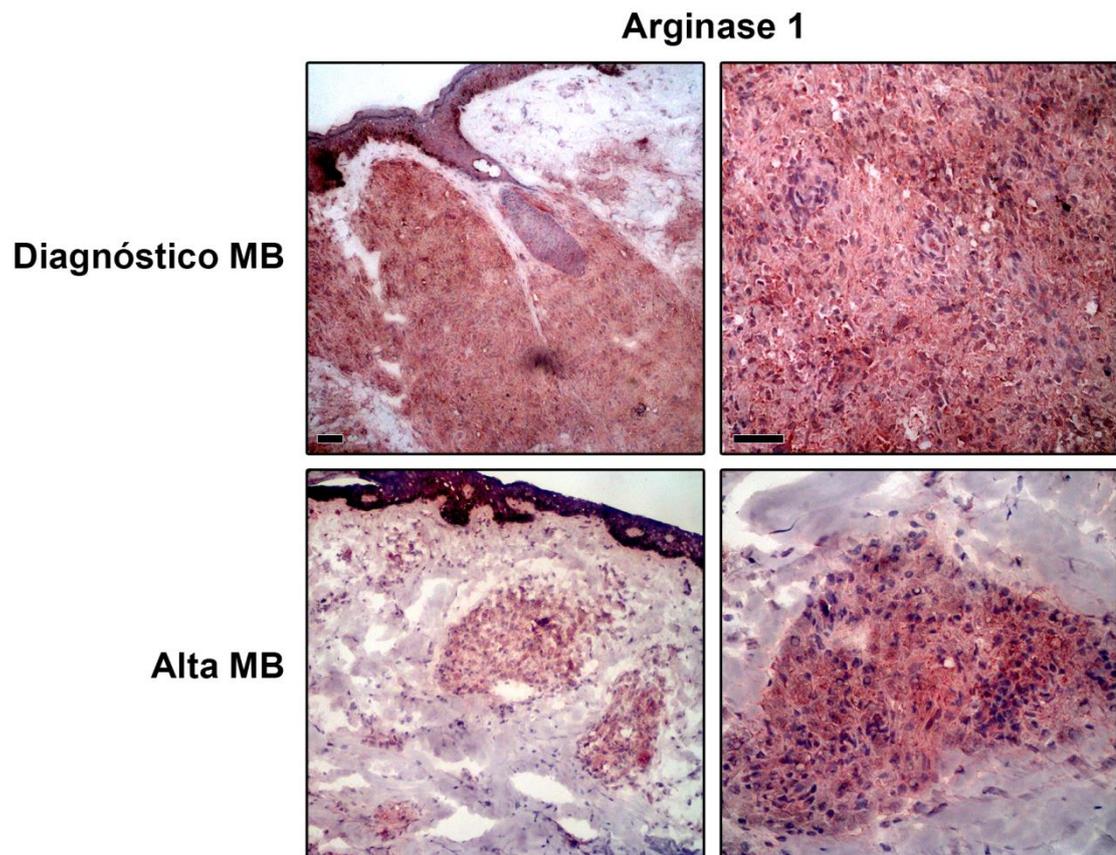


Figura 30. Expressão proteica de Arginase 1 em lesões de pele de pacientes multibacilares no momento do diagnóstico e da alta clínica.

A expressão proteica de Arginase 1 foi avaliada por imunohistoquímica. Imagens são representativas de duas amostras independentes de cada grupo. Barras: 50 μ m.

Apesar de nossos dados não terem mostrado uma diferença no perfil de expressão gênica nas células de lesão de pele de pacientes MB antes e após a PQT, iremos dar continuidade a esse estudo em função de termos avaliado uma amostra reduzida e com um painel de marcadores restrito. Nossos estudos futuros buscarão avaliar o fenótipo de macrófagos presentes nas lesões de pacientes que na alta da PQT apresentaram redução da baciloscopia (IB=0) em comparação com

os pacientes que terminaram o tratamento com IB acima de 2. Esses achados poderão determinar se o fenótipo do macrófago nas lesões é o ponto chave para o controle da carga bacilar na lesão e ainda avaliar se o uso de fármacos que modulem o fenótipo de macrófagos pode ser uma boa opção no tratamento da hanseníase MB. Em conjunto, buscaremos elucidar o impacto dos episódios reacionais durante o tratamento na carga bacilar em células de pacientes MBs. É possível que o aumento de citocinas pró-inflamatórias no ambiente da lesão contribua para o controle da carga bacilar.

Em nosso estudo recente, demonstramos que nas células de lesão de pele de pacientes MB há um bloqueio na indução de autofagia que é revertido quando esses pacientes desenvolvem RR (137). As vantagens do tratamento mais curto precisam ser balanceadas contra o risco de recidiva e muitas controvérsias persistem neste aspecto (86).

Uma análise mais criteriosa, utilizando mais marcadores e com maior número amostral, levando em conta o IB e o índice baciloscópico das lesões de pele no momento do diagnóstico e na alta clínica, com o acompanhamento de possíveis casos de recidiva, será de extrema importância para a definição dos processos ocorridos durante o tratamento, assim como de possíveis indicadores de recidiva, indicando a necessidade de acompanhamento mais extensivo do caso ou até mesmo extensão do tempo de tratamento visando evitar a recorrência da infecção e maiores danos à saúde do doente.

4.6 Genes da via de autofagia estão superexpressos em lesões de pele de pacientes lepromatosos que não desenvolveram episódios reacionais RR ao longo do tratamento.

M. leprae é capaz de modular diversas vias para favorecer a sua sobrevivência no interior dos macrófagos, aumentando a captação de ferro, lipídeos e outros nutrientes e desativando as vias antimicrobianas (41,49,50,188). É também de conhecimento geral que apesar da aparente reduzida resposta imune celular observada no polo lepromatoso, uma grande parte desses pacientes apresentam episódios reacionais, que são episódios agudos provocados pela mudança do padrão de resposta imune aos antígenos de *M. leprae* e são as principais causas de

morbidade relacionadas à hanseníase, sendo ideal a sua identificação precoce (28,29).

Para buscar um maior conhecimento acerca das vias moduladas em pacientes que desenvolvem episódios reacionais, nós avaliamos fragmentos de lesão de pele de pacientes MBs colhidos no momento do diagnóstico de hanseníase que desenvolveram (grupo RR) ou não (grupo SR) episódios de RR durante o tratamento da hanseníase ou após a alta por cura. Nós verificamos por PCR “array” e qPCR TaqMan as vias diferencialmente reguladas entre os pacientes que desenvolveram ou não episódios de RR. Os dados clínicos e demográficos destes pacientes estão disponíveis na Tabela 4.

Após o “screening” inicial dos genes diferencialmente regulados das vias de imunidade inata e imunidade adaptativa (Figuras 31 e 32) e da via de autofagia (Figuras 31 e 33) verificamos que os genes ligados às respostas próinflamatórias e vias de ativação de TLR e de inflamassoma *LY96*, *NCF4*, *TLR1*, *TOLLIP*, *IL1RAP*, *NFKB1* e *NFKBIA* estavam superexpressos nos pacientes que desenvolveram episódios de RR (grupo RR) (Figura 31 e 32).

O gene *LY96* é importante pois se liga à TLR2 e TLR4 e participa de seus complexos e da consequente ativação de NF-κB (207). Estudos vêm demonstrando que a ativação de TLR2 e sua heterodimerização com TLR1 pode levar a ativação de NLRP3 e secreção de IL-1β via ativação de NF-κB (208). A ativação de NF-κB via ROS e P₂X₇ também é capaz de levar a ativação de NLRP3 independente de TLRs (209). A superexpressão destes genes indica um possível envolvimento da via dos inflamassomas nos pacientes que desenvolveram episódios de RR.

O gene imunorregulador *TGFB1* e os genes relacionados à via de autofagia, *ATG4*, *BCL2*, *BCL2L1*, *DDIT3*, *EIF4G1*, *FKBP15*, *MTOR (FRAP1)*, *LAMP2*, *MAP1LC3B*, *PIK3C3*, *RICTOR* e *ULK2* foram encontrados superexpressos nos pacientes que não desenvolveram episódios reacionais (grupo SR) (Figuras 31 e 33).

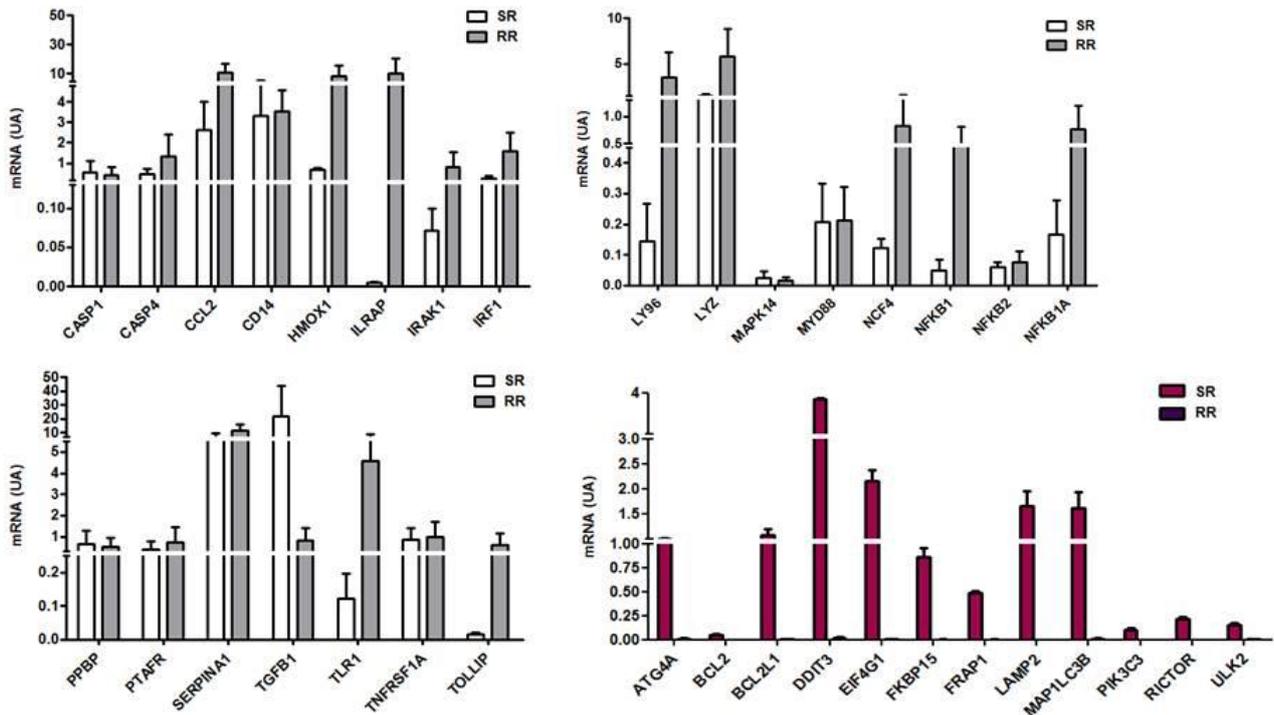


Figura 31. “Screening” de genes das vias de imunidade inata e adaptativa e autofagia diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de Reação Reversa.

Fragments de lesão de pele foram colhidos no momento do diagnóstico e armazenados em nitrogênio líquido para posterior processamento. Após um acompanhamento detalhado de ao menos um ano, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que desenvolveram RR (RR) e os que não desenvolveram (SR). Os mRNAs foram purificados das amostras de pele e os PCRs “array” para 88 genes das vias de imunidade inata e adaptativa, 88 genes da via de autofagia e 8 genes de referência foram realizados. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *B2M* para o “array” de imunidade inata e adaptativa (tons de cinza) e *HPRT1* para o “array” de autofagia (colorido) e analisados pelo método $2^{-\Delta\text{CT}}$. Os níveis de RNA estão expressos como unidades arbitrárias (UA) e as barras são representativas das médias \pm SEM de ao menos três indivíduos em cada grupo.

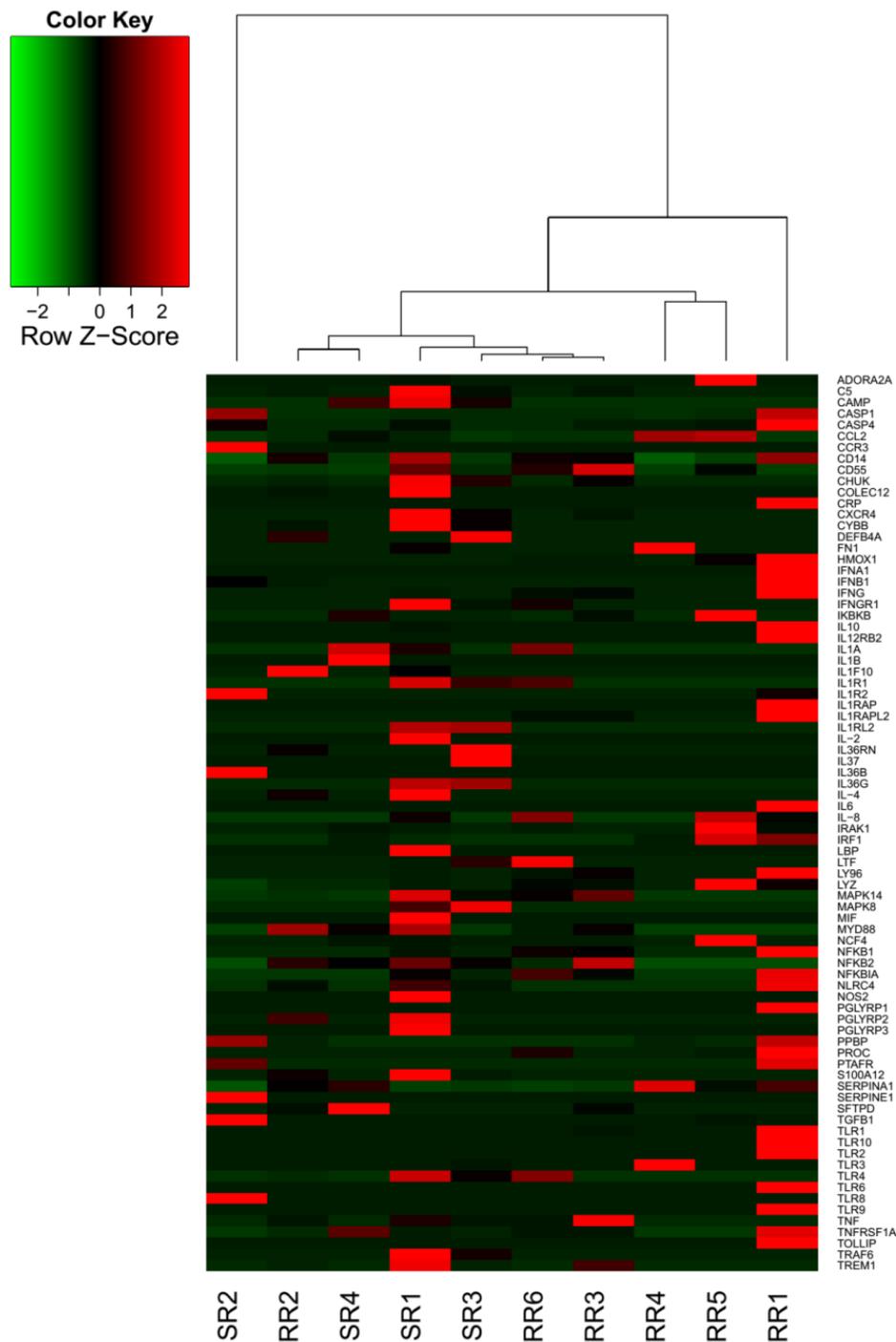


Figura 32. Genes das vias de imunidade inata e adaptativa diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Após um acompanhamento detalhado de ao menos um ano, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que desenvolveram RR (RR) e os que não desenvolveram (SR). Os mRNAs foram purificados das amostras de pele e o PCR "array" para 88 genes das vias de imunidade inata e adaptativa e 8 genes de referência foi realizado. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *B2M* e analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$. O "heat map" foi gerado utilizando desfechos padronizados, através da função `heatmap.2` na biblioteca `gplots` do programa R (R CORE TEAM, 2014). O comprimento vertical dos ramos do dendrograma representa o grau de separação entre os indivíduos.

Os perfis de expressão gênica de lesões de pele de pacientes MBs no momento do diagnóstico que vieram (Grupo RR) ou não (Grupo SR) a desenvolver episódios de RR futuramente mostraram uma forte superexpressão dos genes envolvidos com vários processos relacionados à autofagia no Grupo SR (70,45% dos genes) *versus* o Grupo RR (11,36%). Os genes superexpressos nas lesões de pele estão envolvidos com a formação do autofagossomo (23,86% no Grupo SR *versus* 6,82% no RR), regulação da autofagia (44,32% no Grupo SR *versus* 3,41% no RR), função lisossomal (2,27% no Grupo SR *versus* 0% no RR) e regulação dos lisossomos (1,14% no Grupo SR *versus* 2,27% no RR) através da classificação de genes de função lisossomal e autofagia descrita previamente por Jegga e colaboradores (178) (Figura 33 e Tabela 5).

As análises de “fold change” revelaram um aumento dos genes de autofagia em geral no grupo SR, com destaque para os genes *FRS3*, *GPSM3*, *SEC24C*, *LETM1*, *LAMP2*, *ULK4*, *APOL1* e *HSPA5* que se apresentaram significativamente superexpressos.

Nosso trabalho recente (137) demonstrou que há um aumento na expressão gênica de diversos genes do núcleo da maquinaria autofágica, como de membros do complexo Atg1/ULK, Atg9 e seu sistema de ciclagem, do complexo PI3K, componentes dos sistemas de conjugação de Atg8 e Atg12 e dos componentes lisossomais em pacientes PBs em comparação com lesões de pele de pacientes MBs, apresentando um aumento significativo da expressão dos genes *BECN1*, *GPSM3*, *ATG14*, *APOL1* e *TPR*. Enquanto nos pacientes MBs há um aumento da expressão de genes relacionados em sua maioria à supressão de autofagia, o gene anti-apoptótico *BCL2*, entre outros. Em indivíduos com hanseníase MB com RR foi visto um aumento da expressão dos reguladores de autofagia *TPR*, *GFI1B* e *GNAI* em comparação aos MBs sem reação.

Aqui nós verificamos um aumento dos genes promotores da autofagia *GPSM3* e *APOL1* em indivíduos MB que não desenvolveram RR (Grupo SR), que em nosso trabalho anterior se encontraram aumentados nos indivíduos PB em relação aos MBs. Em contraste, há também uma maior expressão de *FRS3*, um ativador de mTOR e conseqüentemente inibidor da autofagia, nesse grupo. O gene inibidor da autofagia *MLST8* se apresentou superexpresso no grupo que desenvolveu RR (grupo RR) quando comparado ao que não desenvolveu episódios reacionais (grupo SR) (Figura 33 e Tabela 5).

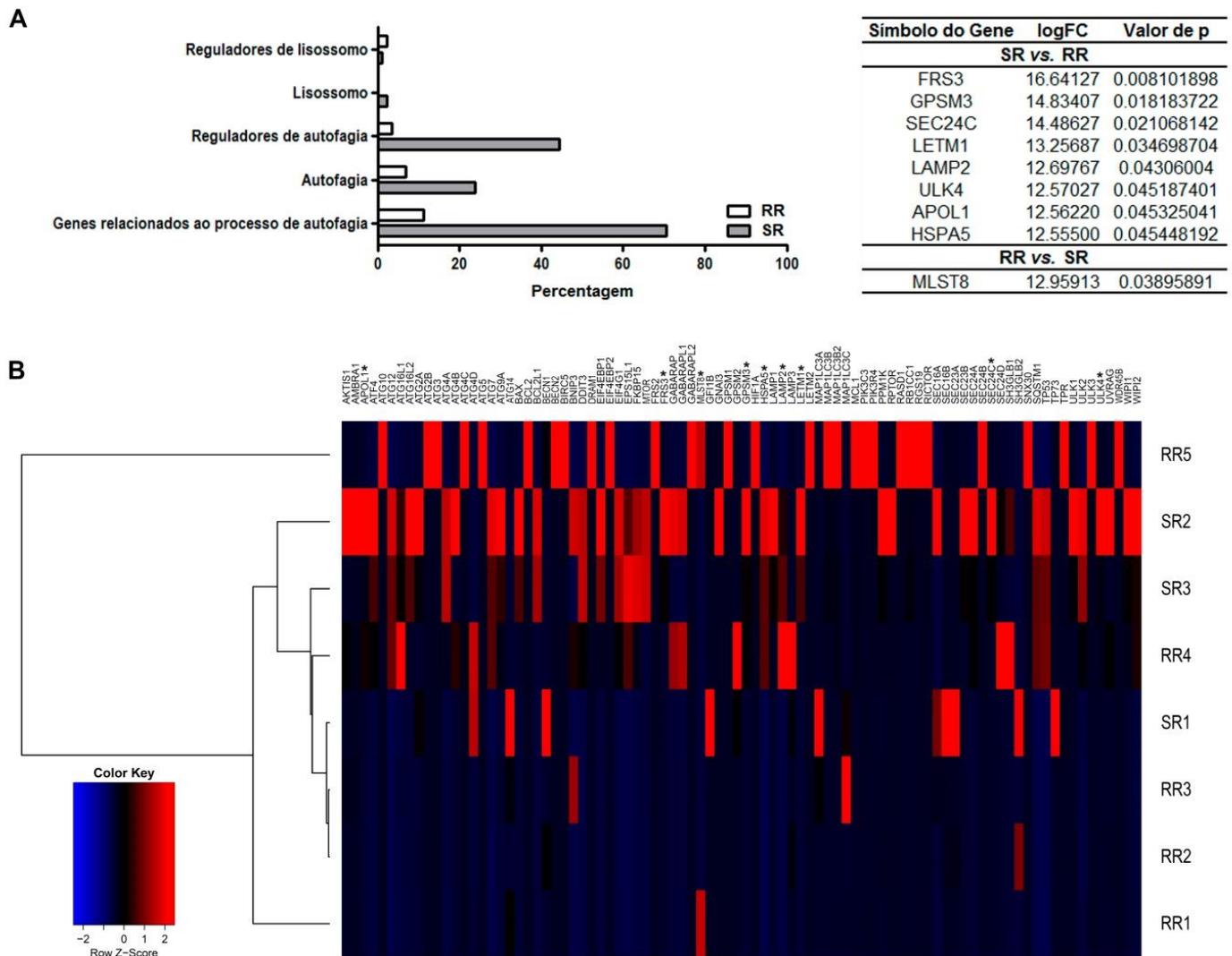


Figura 33. Genes da via de autofagia diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Após um acompanhamento detalhado de ao menos um ano, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que desenvolveram RR (RR) e os que não desenvolveram (SR). Os mRNAs foram purificados das amostras de pele e o PCR “array” para 88 genes da via de autofagia e 8 genes de referência foi realizado. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *HPRT1* e analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$. (A) Os genes relacionados ao processo de autofagia foram subcategorizados. O gráfico apresenta o percentual de genes envolvidos em cada processo nos diferentes grupos amostrais. (B) Os valores de expressão relativa dos genes significativamente superexpressos estão tabulados (dados completos na Tabela 5). O limiar estabelecido para significância estatística foi $p \leq 0,05$. (C) O “heat map” mostra as mudanças na expressão dos genes relacionados ao processo de autofagia nos pacientes com hanseníase. Cada linha representa um indivíduo recrutado para o estudo. Os asteriscos indicam os genes significativamente regulados. Os dados do “heat map” são representativos de cinco pacientes RR e três do grupo SR.

Tabela 4. Análise da expressão gênica da via de autofagia nas lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Após um acompanhamento detalhado de ao menos um ano, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que desenvolveram RR (RR) e os que não desenvolveram (SR). Os mRNAs foram purificados das amostras de pele e o PCR "array" para 88 genes da via de autofagia e 8 genes de referência foi realizado. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *HPRT1* e analisados pelo método $2^{-\Delta CT}$. Os genes da via de autofagia diferencialmente expressos entre os grupos foram identificados por "fold change" ($\geq 1,5$ vezes, acima da linha pontilhada vermelha) e estatística t moderada ($p \leq 0,05$) usando a abordagem empírica de Bayes no "software" R e então subcategorizados. Nomes completos, categorias, "fold expression" e valores de p dos genes superexpressos foram tabulados. Os dados são representativos de cinco pacientes RR e três do grupo SR.

Genes superexpressos no grupo SR

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Categoria	logFC	t	P.Value
FRS3	Fibroblast growth factor receptor substrate 3	Regulador de Autofagia	16,64127	2,657872458	0,008101898
GPSM3	G-protein signaling modulator 3	Regulador de Autofagia	14,83407	2,369234146	0,018183722
SEC24C	SEC24 homolog C, COPII coat complex component	Regulador de Autofagia	14,48627	2,313685007	0,021068142
LETM1	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1	Regulador de Autofagia	13,25687	2,117330459	0,034698704
LAMP2	Lysosomal associated membrane protein 2	Lisossomo	12,69767	2,028017409	0,04306004
ULK4	Unc-51 like kinase 4	Autofagia	12,57027	2,007669622	0,045187401
APOL1	Apolipoprotein L1	Regulador de Autofagia	12,56220	2,006381248	0,045325041
HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	Regulador de Autofagia	12,55500	2,005231295	0,045448192
EPS15L1	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like1	Regulador de Autofagia	12,07713	1,92890846	0,054277883
SEC23B	SEC23 homolog B, coat complex II component	Regulador de Autofagia	11,96180	1,910487909	0,056611786
ATF4	Activating transcription factor 4	Regulador de Autofagia	11,64947	1,860603355	0,063355908
SEC24A	SEC24 homolog A, COPII coat complex component	Regulador de Autofagia	11,12320	1,776550278	0,076217987
FKBP15	FK506 binding protein 15	Regulador de Autofagia	10,77513	1,720958548	0,085844162
BAX	BCL2-associated X protein	Regulador de Autofagia	10,62647	1,697214139	0,090245488
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1	Autofagia	10,54467	1,68414939	0,092743808
MTOR	Mechanistic target of rapamycin)	Regulador de Autofagia	10,22860	1,633668564	0,102924561
GFI1B	Growth factor independent 1B transcription repressor	Regulador de Autofagia	10,07227	1,608699668	0,108279753
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	Regulador de Autofagia	8,74540	1,396778157	0,163067093

ULK3	Unc-51 like kinase 3	Autofagia	8,57067	1,368870491	0,171621823
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	Regulador de Autofagia	8,29687	1,325140318	0,18569776
BCL2L1	BCL2 like 1 (Bcl-xL)	Regulador de Autofagia	8,27980	1,322414502	0,186602691
SEC24D	SEC24 homolog D, COPII coat complex component	Regulador de Autofagia	8,23247	1,314854623	0,189129553
ATG4A	Autophagy related 4A cysteine peptidase	Autofagia	8,19827	1,309392344	0,19097098
ATG2A	Autophagy related 2A	Autofagia	8,18787	1,3077313	0,191533562
WIP1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	Autofagia	7,99613	1,277108466	0,202125274
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	Regulador de Autofagia	7,40187	1,182194718	0,237660564
ATG16L2	Autophagy related 16 like 2	Autofagia	7,33600	1,171674773	0,241856092
ULK2	Unc-51 like autophagy activating kinase 2	Autofagia	6,47033	1,033414169	0,301883213
GNAI3	G protein subunit alpha i3	Regulador de Autofagia	6,19580	0,98956687	0,322839129
ATG7	Autophagy related 7	Autofagia	6,18633	0,988054894	0,323578323
PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	Autofagia	6,06680	0,968963538	0,333007019
ATG9A	Autophagy related 9A	Autofagia	6,03980	0,964651213	0,335161141
PPM1K	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	Autofagia	6,03580	0,96401235	0,335481034
DRAM1	DNA damage regulated autophagy modulator 1	Regulador de Autofagia	5,98693	0,956207573	0,339404969
DRAM2	DNA damage regulated autophagy modulator 1	Regulador Lisossomal	5,98693	0,956207573	0,339404969
SEC16A	SEC16 homolog A, endoplasmic reticulum export factor	Regulador de Autofagia	5,86160	0,936189865	0,349603429
ATG12	Autophagy related 12	Autofagia	5,40693	0,863572436	0,38821492
SEC23A	SEC23 homolog A, coat complex II component	Regulador de Autofagia	5,37413	0,858333759	0,391097662
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1	Lisossomo	5,36960	0,857609714	0,391497113
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	Autofagia	5,22273	0,834152794	0,40457211
ATG16L1	Autophagy related 16 like 1	Autofagia	5,19560	0,829819173	0,407016046
RASD1	Ras related dexamethasone induced 1	Regulador de Autofagia	5,18980	0,828892821	0,407539603
TP73	Tumor protein p73	Regulador de Autofagia	5,08647	0,81238886	0,416934657
ATG2B	Autophagy related 2B	Autofagia	4,69847	0,750419148	0,453336573
EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Regulador de Autofagia	4,53213	0,723853094	0,469476508
SNX30	Sorting nexin family member 30 (ATG24A)	Regulador de Autofagia	4,51920	0,721787437	0,470744689
SQSTM1	Sequestosome 1 (p62)	Regulador de Autofagia	4,49307	0,717613532	0,473312976
ATG4B	Autophagy related 4B cysteine peptidase	Autofagia	4,44867	0,710522152	0,477694111

GPSM1	G-protein signaling modulator 1	Regulador de Autofagia	4,41967	0,705890395	0,48056763
AMBRA1	Autophagy/beclin-1 regulator 1	Regulador de Autofagia	4,23853	0,676960548	0,498727458
WIPI2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	Autofagia	4,11567	0,657336806	0,511250812
RPTOR	Regulatory associated protein of MTOR complex 1 (RPTOR)	Regulador de Autofagia	3,99420	0,637936666	0,523791469
ATG10	Autophagy related 10	Autofagia	3,80107	0,60709023	0,544052003
SH3GLB1	SH3-domain GRB2 like endophilin B1	Regulador de Autofagia	3,78107	0,603895915	0,546172209
TP53	Tumor protein p53	Regulador de Autofagia	3,61000	0,576573873	0,564473063
SEC24B	SEC24 homolog B, COPII coat complex component	Regulador de Autofagia	3,57260	0,570600504	0,568513222
RB1CC1	RB1 inducible coiled-coil 1	Autofagia	3,20820	0,512400083	0,608585304
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2	Regulador de Autofagia	2,36140	0,377152782	0,706211605
UVRAG	UV radiation resistance associated gene	Regulador de Autofagia	2,24207	0,358093369	0,720416555
TPR	Translocated promoter region, nuclear basket protein	Regulador de Autofagia	2,15940	0,3448902	0,730314258
LETM2	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 2	Regulador de Autofagia	1,97233	0,315012706	0,752876459
MAP1LC3A	Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	Autofagia	1,79040	0,285955086	0,775024675
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	Regulador de Autofagia	1,54060	0,246058091	0,805732886
AKT1S1	AKT1 substrate 1 (proline rich)	Regulador de Autofagia	1,29807	0,207321697	0,835838564
GABARAPL1	GABA type A receptor associated protein like 1	Autofagia	1,18107	0,188634953	0,850451416
RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR complex 2	Regulador de Autofagia	1,12820	0,180191314	0,857071513
RGS19	Regulator of G-protein signaling 19	Regulador de Autofagia	1,06520	0,170129221	0,86497368
MCL1	Myeloid cell leukemia 1	Regulador de Autofagia	1,05740	0,168883439	0,865953003
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Regulador de Autofagia	0,75300	0,120265963	0,904318215
MAP1LC3C	Microtubule associated protein 1 light chain 3 gamma	Autofagia	0,39440	0,062991893	0,949796798
GABARAPL2	GABA type A receptor associated protein like 2	Autofagia	0,36540	0,058360137	0,953483847
BECN1	Beclin 1, autophagy-related	Autofagia	0,16353	0,02611885	0,979172411

Genes superexpressos no grupo RR

Símbolo do Gene	Nome do Gene	Categoria	logFC	t	P.Value
MLST8	MTOR associated protein, LST8 homolog	Regulador de Autofagia	12,95913	-2,06977776	0,03895891
WDR45B	WD repeat domain 45B	Autofagia	4,55113	-0,72688769	0,467616899
LAMP3	Lysosomal associated membrane protein 3	Regulador Lisossomal	4,14853	-0,66258613	0,507884772
ATG4D	ATG4 autophagy related 4 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	Autofagia	3,84887	-0,61472464	0,539001397
ATG5	Autophagy related 5	Autofagia	3,61427	-0,57725533	0,564013036
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein	Regulador Lisossomal	3,40233	-0,54340624	0,587079476
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein	Autofagia	3,40233	-0,54340624	0,587079476
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	Regulador de Autofagia	2,78153	-0,44425469	0,657040475
MAP1LC3B2	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta 2	Autofagia	2,20693	-0,35248202	0,724617452
SH3GLB2	SH3-domain GRB2-like endophilin B2	Regulador de Autofagia	1,75087	-0,27964099	0,779862466
BECN2	Beclin 2	Autofagia	1,53773	-0,24560024	0,806087139
ATG4C	Autophagy related 4C cysteine peptidase	Autofagia	1,19107	-0,19023211	0,849200364
ATG14	Autophagy related 14	Autofagia	1,09953	-0,1756128	0,860665476
MAP1LC3B	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	Autofagia	0,97387	-0,15554185	0,87645361
GPSM2	G-protein signaling modulator 2	Regulador de Autofagia	0,75073	-0,11990394	0,904604852
SEC16B	SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor	Regulador de Autofagia	0,59733	-0,09540354	0,924030498
ATG3	Autophagy related 3	Autofagia	0,21180	-0,0338278	0,973027254
EIF4EBP2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	Regulador de Autofagia	0,08940	-0,01427859	0,988613115

Os genes diferencialmente regulados nas lesões de pele dos pacientes com hanseníase MB que desenvolveram (RR) ou não RR (SR) foram submetidos às análises de interação gene a gene na base de dados STRING. As redes de interação dos genes superexpressos nas lesões de pele nos mapas de ação (Figura 34) e confiança (Figura 35) revelaram um número muito maior de interações entre genes associados à via de autofagia no grupo SR do que no grupo RR.

Os resultados descritos indicam que a resposta autofágica é diferencialmente expressa já no momento do diagnóstico da hanseníase MB, sendo maior nas lesões de pele de pacientes que não desenvolveram episódios de RR (grupo SR), quando comparados aos MBs que vieram a desenvolver esse episódio reacional futuramente (grupo RR). A lista completa de genes modulados em cada um dos grupos pode ser observada na Tabela 5.

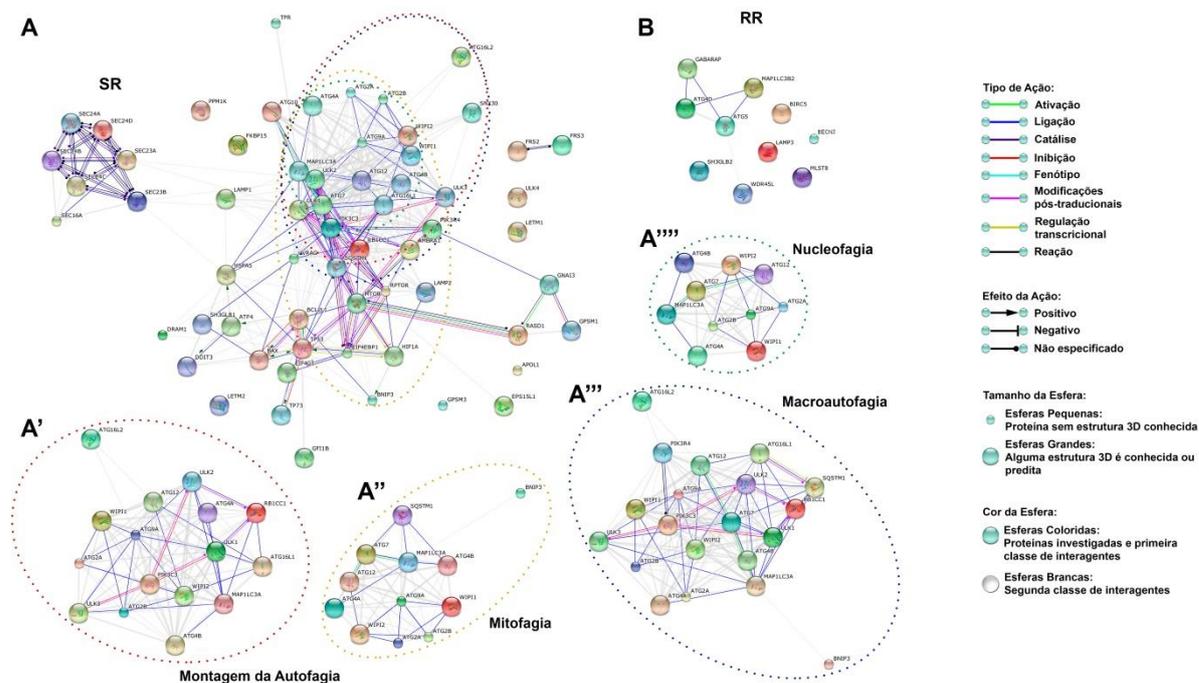


Figura 34. Rede de interação dos genes de autofagia nas lesões de pele de indivíduos multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Os genes diferencialmente regulados nas lesões de pacientes que desenvolveram (RR) ou não (SR) episódios de RR analisados pelo PCR “array” foram visualizados pelo STRING. Visualização da rede de ação. Nessa visualização as linhas coloridas e estilos de seta entre os genes indicam os vários tipos de interação. As esferas representam os genes e as linhas representam as interações gene a gene. (A) Redes de interação dos genes regulados nos pacientes do grupo SR, geral e divididas pelos processos que participam: (A') Montagem da autofagia; (A'') Mitofagia; (A''') Macroautofagia; (A''') Nucleofagia. (B) Rede de interação dos genes regulados nos pacientes do grupo RR. Os mapas de interação são representativos de cinco pacientes RR e três do grupo SR.

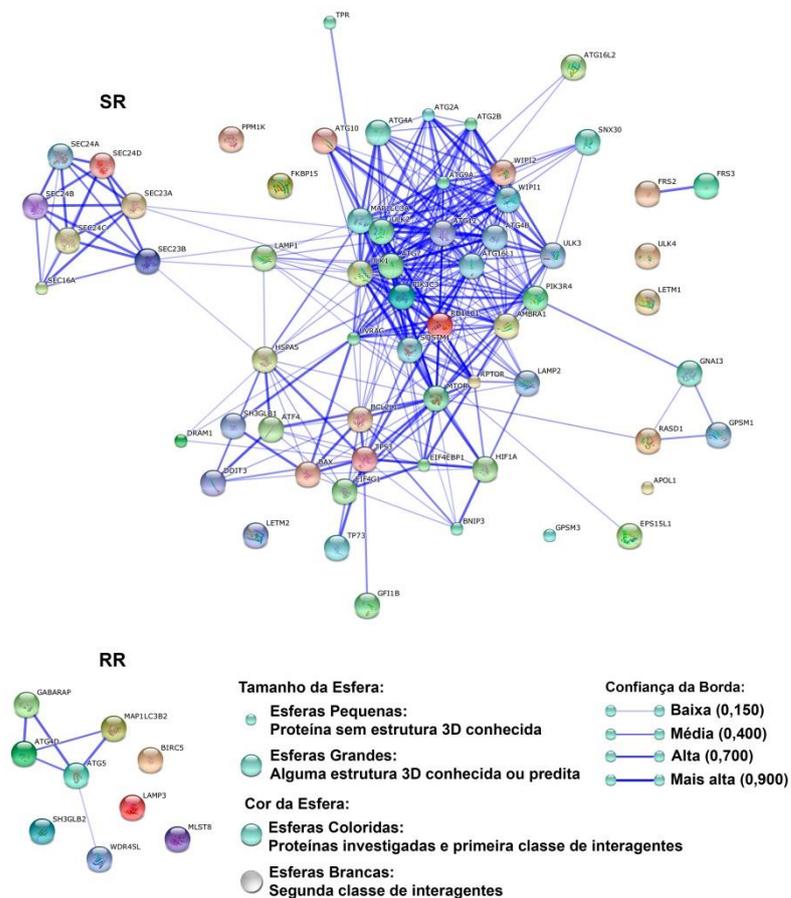


Figura 35. Rede de interação dos genes de autofagia nas lesões de pele de indivíduos multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Os genes diferencialmente regulados nas lesões de pacientes que desenvolveram (RR) ou não (SR) episódios de RR analisados pelo PCR “array” foram visualizados pelo STRING. Visualização da rede de confiança. Nessa visualização a cor e a espessura das linhas representam os “scores” de confiança das associações funcionais. As esferas representam os genes e as linhas representam associações gene a gene. Interações de genes associados à autofagia foram predominantes nos pacientes que não desenvolveram RR (SR). Os mapas de interação são representativos de cinco pacientes RR e três do grupo SR.

4.7 Genes da via de inflamassoma estão superexpressos em lesões de pele de pacientes lepromatosos que desenvolverão episódios reacionais futuramente já no momento do diagnóstico de hanseníase.

Em seguida fomos analisar os genes da via do inflamassoma NLRP3, visto que diversos trabalhos relatam que o bloqueio da autofagia pode potencializar a atividade dos inflamassomas e que observamos uma superexpressão de diversos genes relacionados à ativação de NLRP3 no PCR “array” de imunidade inata e

adaptativa. Apesar do número amostral ainda reduzido é possível observar um aumento da expressão gênica dos componentes da via do inflamassoma NLRP3 e de seus produtos nos pacientes do Grupo RR, que vieram a desenvolver episódios de RR no futuro (Figura 36), quando comparados aos pacientes do Grupo SR, indicando que esta poderia ser uma via importante na imunopatogênese da RR. Curiosamente, dentre os genes aumentados no grupo SR identificamos o gene *GPSM3*, que já foi anteriormente descrito como um inibidor do inflamassoma NLRP3 (210).

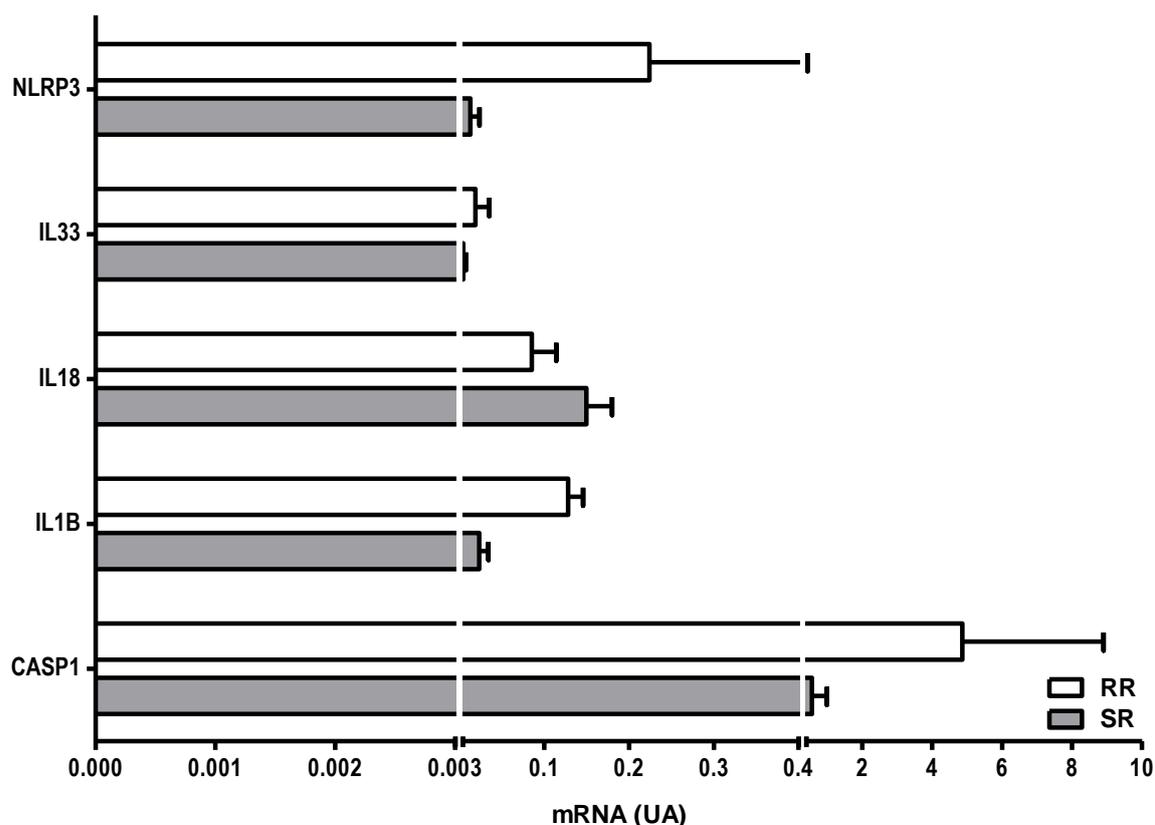


Figura 36. Genes da via de inflamassoma diferencialmente regulados em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Após um acompanhamento detalhado de ao menos um ano, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que desenvolveram RR (RR) e os que não desenvolveram (SR). Os mRNAs foram purificados das amostras de pele e o qPCR para os genes da via do inflamassoma NLRP3 foi realizado. Os dados de expressão gênica foram normalizados pela expressão de *GAPDH* e analisados pelo método do $2^{-\Delta CT}$. Os níveis de mRNA estão expressos como unidade arbitrária (UA) e as barras representam as médias \pm SEM de três amostras independentes no grupo RR e duas no grupo SR.

4.8 As subunidades de Caspase 1 estão diferencialmente reguladas em lesões de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

Para confirmar se a via dos inflamassomas está diferencialmente regulada em lesões de pele de pacientes MBs que desenvolveram (Grupo RR) ou não (Grupo SR) RR, nós marcamos as duas subunidades da Caspase-1 por “Western blotting”. Como é possível observar na Figura 37, apesar de não ter sido significativo, há um aumento da expressão da subunidade p10 da Caspase-1, a Caspase-1 ativa, e também da razão da Caspase-1 ativa (p10) por Pro-Caspase-1 (p45), indicando um aumento da ativação dessa via nos pacientes que vão desenvolver RR futuramente já no momento do diagnóstico. Além disso, é possível verificar um acúmulo de Pro-Caspase-1 (p45) nas lesões de pacientes MBs que não desenvolveram episódios de RR (Figura 37).

Juntos, esses dados indicam que está havendo uma maior ativação da autofagia nos pacientes MBs que não desenvolveram RR (Grupo SR) com consequente redução da ativação da via dos inflamassomas, visto que há um acúmulo de Pro-Caspase-1 nas lesões de pele desses pacientes. Por outro lado, nos pacientes que vieram a desenvolver episódios de RR, foi possível verificar já no momento do diagnóstico um bloqueio ativação da via da autofagia e um aumento na ativação da via dos inflamassomas.

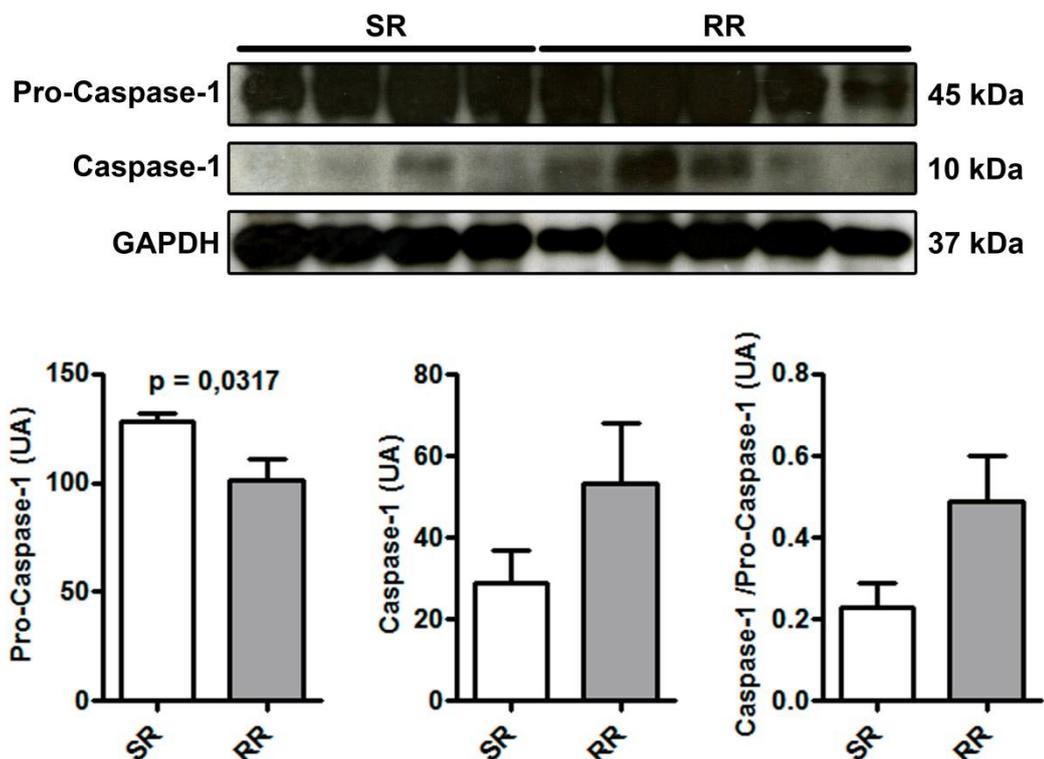


Figura 37. As subunidades da Caspase-1 estão diferencialmente reguladas em pacientes multibacilares que desenvolveram ou não episódios de RR.

As proteínas foram dialisadas a partir da fase orgânica do processamento das lesões de pele com TRizol. A expressão proteica das subunidades p10 (Caspase-1 ativa) e p45 (Pro-caspase-1) da Caspase-1 foi avaliada por "Western blotting". Imagem representativa de cinco pacientes por grupo amostral. As barras representam as médias \pm SEM de cinco amostras independentes no grupo RR e quatro no grupo SR.

5 CONCLUSÕES

Os macrófagos de lesões lepromatosas apresentam um fenótipo M2-“like”, mas mantem a capacidade de acumular ferro e exibem uma redução da expressão da Fpn-1, características clássicas de macrófagos M1.

O aumento da expressão de proteínas de aquisição, metabolismo e armazenamento de ferro, juntamente com o bloqueio da indução de autofagia, são importantes para a manutenção da carga bacilar em células de pacientes MBs.

Há uma superexpressão dos genes da via de autofagia em lesões de pele de pacientes MBs que não desenvolveram RR, enquanto os genes da via de inflamassoma e a expressão de Caspase 1 ativa estão aumentados em pacientes MBs que desenvolveram episódios de RR.

A via autofágica pode ser utilizada como alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas complementares à PQT e que possam contribuir não apenas para a redução da carga bacilar, mas também para identificação precoce e o controle do desenvolvimento de episódios de RR durante a PQT.

Há uma redução relativa de Arginase 1 nas lesões de pele de pacientes MBs no momento da alta clínica devido à redução do infiltrado inflamatório. O fenótipo dos macrófagos nas lesões de pele deve ser melhor estudado utilizando mais marcadores e categorizando os pacientes com base no índice baciloscópico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2004 Apr 10;363(9416):1209–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15081655>
2. WHO. WHO Leprosy [Internet]. 2016 [cited 2016 Dec 8]. Available from: <http://www.who.int/lep/leprosy/en/>
3. Gallo MEN, Sampaio E, Nery JA da C, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, et al. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 1st ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1383–94.
4. Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol* [Internet]. 2011 Feb;6(2):217–30. Available from: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.10.173>
5. Margoles L, Del Rio C, Franco-Paredes C. Leprosy: a modern assessment of an ancient neglected disease. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2011;68(2):110–6.
6. Goulart IMB, Araujo S, Filho AB, de Paiva PHR, Goulart LR. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2015 Oct;53(10):3345–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26202111>
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância. *Baciloscopia Hanseníase* [Internet]. 2010. 54 p. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseníase.pdf
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portal da Saúde - Hanseníase [Internet]. Ministério da Saúde. 2016 [cited 2016 Dec 10]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseníase/>
9. Opromolla DVA. *Noções de Hansenologia*. Opromolla DVA, editor. Bauru: Instituto Lauro de Souza Lima; 2000.
10. Scollard DM. Infection with *Mycobacterium lepromatosis*. *Am J Trop Med Hyg*

- [Internet]. 2016 Sep 7;95(3):500–1. Available from: <http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.16-0473>
11. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2008 Dec;130(6):856–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019760>
 12. Barbosa MG de M. O envolvimento do ferro na modulação da resposta imune em pacientes multibacilares da hanseníase. Instituto Oswaldo Cruz; 2012.
 13. Trombone APF, Pedrini SCB, Diório SM, Belone A de FF, Fachin LRV, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2014 Mar 23;(85):1–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4155980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 14. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol* [Internet]. 2001;2(8):REVIEWS1023. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532219>
 15. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* [Internet]. 2001 Feb 22;409(6823):1007–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/35059006>
 16. WHO. Global Leprosy Strategy 2016–2020: Accelerating towards a leprosy-free world - Operational Manual. New Delhi: World Health Organization; 2016.
 17. WHO. Leprosy - Forty-fourth World Health Assembly. In: Eleventh plenary meeting. World Health Organization; 1991. p. 2–5.
 18. WHO. Leprosy fact sheet (revised in February 2010). *Relev Epidemiol Hebd* [Internet]. 2010 Feb 5;85(6):46–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20151494>
 19. WHO. Global leprosy situation, 2012. *Relev Epidemiol Hebd* [Internet]. 2012 Aug 24;87(34):317–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919737>
 20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da hanseníase como problema de saúde pública. Ministério da

- Saúde; 2016. 58 p.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Guia de vigilância em saúde. Guia de vigilância em saúde. Ministério da Saúde; 2014. 1-812 p.
 22. Souza CS. HANSENÍASE: FORMAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL. Med (Ribeirao Preto Online) [Internet]. 1997 Sep 30;30(3):325. Available from: <http://revistas.usp.br/rmrp/article/view/1185>
 23. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int J Lepr Other Mycobact Dis [Internet]. 1966 Apr;34(3):255–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348338>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23765279>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X14002296>
<http://link.springer.com/10.1007/s00439-014-1502-9>
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii>
 24. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the human genome. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 2010 Dec;74(4):589–620. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21119019>
 25. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol [Internet]. 1998 Jan;31(1):69–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686181>
 26. Brasil. Ministério da Saúde. Cadernos de atenção básica - Volume 21. 2nd ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. 196 p.
 27. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Prevenção de Incapacidades. 2008. 1-141 p.
 28. Foss NT, Souza C, Goulart I, Gonçalves H, Virmond M. Projeto Diretrizes Hanseníase : Episódios Reacionais Projeto Diretrizes. Proj Diretrizes - Assoc Médica Bras e Cons Fed Med. 2003;1–19.
 29. Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MG de M, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. Expert Rev Clin Immunol [Internet]. 2015 Mar;11(3):391–407. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84923349603&partnerID=40&md5=3f41e2782af6de7d903ed6fcc9327901%5C>

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25666357>
30. Lockwood DNJ, Nicholls P, Smith WCS, Das L, Barkataki P, van Brakel W, et al. Comparing the clinical and histological diagnosis of leprosy and leprosy reactions in the infir cohort of indian patients with multibacillary leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(6).
 31. Schmitz V, Prata RB da S, Barbosa MG de M, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et al. Expression of CD64 on Circulating Neutrophils Favoring Systemic Inflammatory Status in Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2016 Aug;10(8):e0004955. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27556927>
 32. WHO. Multidrug therapy against leprosy: development and implementation over the past 25 years. Sansarricq H, editor. 2004.
 33. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull* [Internet]. 2006;77–78(1):103–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17090777>
 34. Sales AM, Sabroza PC, Nery JA da C, Dupprè NC, Sarno EN. No difference in leprosy treatment outcomes comparing 12- and 24-dose multidrug regimens: a preliminary study. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2007 Apr;23(4):815–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435879>
 35. Kyaw K, Tsoh TM, Swe SYY, Nagaoka Y, Takezaki S, Suzuki K, et al. Clinical analysis of multibacillary leprosy patients after 1-year fixed World Health Organization recommended multidrug therapy at Yangon General Hospital, Myanmar. *J Dermatol* [Internet]. 2008 May;35(5):264–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18477225>
 36. Opromolla DVA. Terapêutica da hanseníase. *Revista Med Ribeirão Preto*. 1997;30:345–50.
 37. Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. In: Alt F, editor. *Advances in immunology*. 105th ed. Academic Press; 2010. p. 1–24.
 38. Sampaio EP, MO M, Pessolani MCV, Sarno EN. Role of Th1 cytokines in host defenses against *Mycobacterium leprae*. In: Kotb M, Calandra T, editors. *Cytokines and chemokines in infectious diseases handbook* [Internet]. Press Inc.; 2003. p. 163–86. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3275715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
39. Beiguelman B. Genética e hanseníase * Genetics and leprosy. *Cien Saude Colet*. 2002;7(1):117–28.
 40. Foss NT. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA HANSENÍASE. *Med (Ribeirao Preto Online)* [Internet]. 1997 Sep 30;30(3):335. Available from: <http://revistas.usp.br/rmrp/article/view/1186>
 41. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009 Oct 22;6(4):343–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.002>
 42. Andrade PR, Jardim MR, da Silva ACC, Manhaes PS, Antunes SLG, Vital R, et al. Inflammatory Cytokines Are Involved in Focal Demyelination in Leprosy Neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2016 Mar;75(3):272–83. Available from: <http://jnen.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jnen/nlv027>
 43. Moura RS De, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2008;41 Suppl 2(Suplemento II):11–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19618069>
 44. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* [Internet]. 1991 Oct 11;254(5029):279–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681588>
 45. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1994 Jun;102(6):828–32. Available from: <http://www.nature.com/jid/journal/v102/n6/abs/5611227a.html%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006444>
 46. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* [Internet]. 1994 Oct;191(4–5):378–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7713551>
 47. Sieling PA, Modlin RL. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1994 Aug 15;730(0077–8923):42–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7915896>

48. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg-van Schip JJ, et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014 Apr;8(4):e2773. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722473>
49. de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2011 Aug;165(2):251–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592112>
50. 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.
51. de Oliveira Fulco T, Andrade PR, de Mattos Barbosa MG, Pinto TGT, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infect Immun* [Internet]. 2014 Sep;82(9):3968–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25024361>
52. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol* [Internet]. 2007 Jan 1;178(1):338–44. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.178.1.338>
53. Frehel C, Rastogi N. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect Immun* [Internet]. 1987 Dec;55(12):2916–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316028>
54. Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, et al. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem*. 2003;278(8):5513–6.
55. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* [Internet]. 1999 Jul 30;285(5428):732–6. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10426995>
56. Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2001 Aug;13(4):417–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498297>
 57. Schaible UE, Collins HL, Priem F, Kaufmann SHE. Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their increased susceptibility to tuberculosis. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Dec 2;196(11):1507–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461085>
 58. 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* [Internet]. 2005 Jun;11(6):653–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880118>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1409736&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 59. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* [Internet]. 2003 May;9(5):525–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692544>
 60. Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2009 Jun;156(3):495–501. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19438603>
 61. Schenk M, Krutzik SR, Sieling P a, Lee DJ, Teles RMB, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* [Internet]. 2012 Mar 25;18(4):555–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447076>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3348859>
 62. Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol* [Internet]. 2008 Nov 15;181(10):7115–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18981132>

63. Yuk J, Shin D, Lee H-M, Yang C, Jin HS, Kim K-K, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009 Sep 17;6(3):231–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.08.004>
64. Fabri M, Stenger S, Shin D, Yuk J, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med* [Internet]. 2011 Oct 12;3(104):104ra102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21998409>
65. Teles RMB, Kelly-Scumpia KM, Sarno EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, et al. IL-27 Suppresses Antimicrobial Activity in Human Leprosy. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2015 Oct;135(10):2410–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15418056>
66. Jung J-Y, Robinson CM. IL-12 and IL-27 regulate the phagolysosomal pathway in mycobacteria-infected human macrophages. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2014 Mar 11;12(1):16. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4007735&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
67. Teles RMB, 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* [Internet]. 2013 Mar 22;339(6126):1448–53. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1233665>
68. Bermudez LE, Covaro G, Remington J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect Immun* [Internet]. 1993 Oct;61(10):4126–30. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8406801
69. Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol* [Internet]. 1996 Mar;148(3):911–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1861719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. Petitto RB, Amadeu TP, Pascarelli BMO, Jardim MR, Vital RT, Antunes SL, et

- al. Transforming growth factor- β 1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2013 Apr;72(4):351–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23481710>
71. Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol* [Internet]. 2003 Apr;148(4):795–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752141>
 72. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* [Internet]. 1995 Dec;48(2):123–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8719110>
 73. Mehra V, Brennan PJ, Rada E, Convit J, Bloom BR. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. *Nature* [Internet]. 1984;308(5955):194–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366573>
 74. Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. *J Exp Med* [Internet]. 1987 Jan 1;165(1):239–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 75. Guenin-Macé L, Siméone R, Demangel C. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2009 Aug;56(6–7):255–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486312>
 76. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* [Internet]. 2004 Dec;25(12):677–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839>
 77. Recalcati S, Locati M, Gammella E, Invernizzi P, Cairo G. Iron levels in polarized macrophages: regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2012 Oct;11(12):883–9. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.03.003>
78. Gaetano C, Massimo L, Alberto M. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica* [Internet]. 2010 Nov;95(11):1801–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037324>
 79. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5(OCT):514. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25368618>
 80. Labonte AC, Tosello-Tramont A-C, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells* [Internet]. 2014 Apr;37(4):275–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625576> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4012075> <http://www.molcells.org/journal/view.html?doi=10.14348/molcells.2014.2374>
 81. Makino M, Maeda Y, Fukutomi Y, Mukai T. Contribution of GM-CSF on the enhancement of the T cell-stimulating activity of macrophages. *Microbes Infect* [Internet]. 2007 Jan;9(1):70–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17198761>
 82. Kibbie J, Teles RMB, Wang Z, Hong P, Montoya D, Krutzik S, et al. Jagged1 Instructs Macrophage Differentiation in Leprosy. *PLoS Pathog* [Internet]. 2016 Aug;12(8):e1005808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27532668>
 83. Rojas-Espinosa O, Jiménez-Zamudio L, Arce-Paredes P. [Sequential activation of cellular and humoral immunity in leprosy: considerations based on recent findings]. *Rev Latinoam Microbiol* [Internet]. 1994;36(3):213–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7709098>
 84. Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for *Mycobacterium leprae*-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol Lett* [Internet]. 2007 May 15;110(1):82–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17462745>
 85. Walsh DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KSA. TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2004 Jul 1;41(3):265–

9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196577>
86. Malathi M, Thappa DM. Fixed-duration therapy in leprosy: limitations and opportunities. *Indian J Dermatol* [Internet]. 2013;58(2):93–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23716796><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3657276>
87. Sierra-Filardi E, Vega MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL, Puig-Kröger A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* [Internet]. 2010 Sep;215(9–10):788–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298510000860>
88. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* [Internet]. 2001 Jan 11;409(6817):198–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11196644>
89. Fabriek BO, van Bruggen R, Deng DM, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Schornagel K, et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* [Internet]. 2009 Jan 22;113(4):887–92. Available from: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2008-07-167064>
90. Williams DL, Torrero M, Wheeler PR, Truman RW, Yoder M, Morrison N, et al. Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infection. *J Mol Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2004;8(1):58–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741741>
91. Hall RM, Wheeler PR, Ratledge C. Exochelin-mediated iron uptake into *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [Internet]. 1983 Dec;51(4):490–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6231257>
92. Hall RM, Ratledge C. Exochelin-mediated iron acquisition by the leprosy bacillus, *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol* [Internet]. 1987 Jan;133(1):193–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3309144>
93. Pessolani MC, Smith DR, Rivoire B, McCormick J, Hefta SA, Cole ST, et al. Purification, characterization, gene sequence, and significance of a

- bacterioferritin from *Mycobacterium leprae*. J Exp Med [Internet]. 1994 Jul 1;180(1):319–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006590>
94. Schaible UE, Kaufmann SHE. Iron and microbial infection. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2004 Dec;2(12):946–53. Available from: [c:%5CKarsten%5CPDFs%5CGrundlagen-PDFs%5CGrund-2004%5CSchaible - Kaufmann-Iron and microbial infection.pdf](c:%5CKarsten%5CPDFs%5CGrundlagen-PDFs%5CGrund-2004%5CSchaible-Kaufmann-Iron and microbial infection.pdf)
 95. Reeve I, Hummel D, Nelson N, Voss J, Hummell D. Overexpression, purification, and site-directed spin labeling of the Nramp metal transporter from *Mycobacterium leprae*. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2002 Jun 25;99(13):8608–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077319>
 96. Yeh K-Y, Yeh M, Mims L, Glass J. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol [Internet]. 2009;296(1):G55-65. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 97. Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. 2010;32:08–17. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000800003&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 98. Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. PLoS Pathog [Internet]. 2010 Aug 12;6(8):e1000949. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711357>
 99. Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y, Ishikawa F, Mizushima N, Iwai K. Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. Mol Cell Biol [Internet]. 2011 May;31(10):2040–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21444722%5Cnhttp://mcb.asm.org/content/31/10/2040.full.pdf>
 100. Sheftel AD, Mason AB, Ponka P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. Biochim Biophys Acta [Internet]. 2012 Mar;1820(3):161–87. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416511001851>

101. Otterbein LE, Choi a M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2000 Dec;279(6):L1029-37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076792>
102. Yamazaki H, Ohta K, Tsukiji H, Toma T, Hashida Y, Ishizaki A, et al. Corticosteroid enhances heme oxygenase-1 production by circulating monocytes by up-regulating hemoglobin scavenger receptor and amplifying the receptor-mediated uptake of hemoglobin-haptoglobin complex. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2007 Jun 29;358(2):506–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X07008856>
103. Morse D, Lin L, Choi AMK, Ryter SW. Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Jul 1;47(1):1–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089158490900207X>
104. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, et al. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*. 2008;453(7198):1127–31.
105. Nairz M, Theurl I, Swirski FK, Weiss G. “Pumping iron”-how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch* [Internet]. 2017 Apr;469(3–4):397–418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28251312>
106. Meisner SJ, Mucklow S, Warner G, Sow SO, Lienhardt C, Hill A V. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2001 Dec;65(6):733–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11791966>
107. Ferreira FR, Goulart LR, Silva HD, Goulart IMB. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMP1 promoter polymorphisms and the lepromin response. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* [Internet]. 2004 Dec;72(4):457–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755200>
108. Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* [Internet]. 2004 Apr 30;117(3):285–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109490>
109. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango:

- regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* [Internet]. 2010 Jul 9;142(1):24–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20603012>
110. Lullmann H, Mohr K, Hein L. *Farmacologia: texto e atlas*. 6th ed. Artmed; 2010.
 111. Shoden A, Gabrio BW, Finch CA. The relationship between ferritin and hemosiderin in rabbits and man. *J Biol Chem* [Internet]. 1953 Oct;204(2):823–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13117859>
 112. Drysdale JW, Ramsay WN. The Separation Of Ferritin And Haemosiderin For Studies In The Metabolism Of Iron. *Biochem J* [Internet]. 1965 Apr;95:282–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14335815>
 113. Saito H, Tomita A, Ohashi H, Maeda H, Hayashi H, Naoe T. Determination of ferritin and hemosiderin iron in patients with normal iron stores and iron overload by serum ferritin kinetics. *Nagoya J Med Sci* [Internet]. 2012 Feb;74(1–2):39–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22515110>
 114. Pan X, Tamilselvam B, Hansen EJ, Daefler S. Modulation of iron homeostasis in macrophages by bacterial intracellular pathogens. *BMC Microbiol* [Internet]. 2010 Feb 25;10(64):64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20184753>
 115. Carvalho MC De, Carlos E, Baracat E, Sgarbieri VC. Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro Iron Deficiency Anemia and Chronic Disease Anemia . *Iron Metabolic Disturbances. Segurança Aliment e Nutr Campinas*. 2006;13(2):54–63.
 116. Cançado RD, Chiattoni CS. Anemia de Doença Crônica Definição e Terminologia Patogênese. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24(2):127–36.
 117. Nairz M, Fritsche G, Crouch M-L V., Barton HC, Fang FC, Weiss G. Slc11a1 limits intracellular growth of *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* by promoting macrophage immune effector functions and impairing bacterial iron acquisition. *Cell Microbiol* [Internet]. 2009 Sep;11(9):1365–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500110>
 118. Cherayil BJ. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol Res* [Internet]. 2011 May;50(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21161695>
 119. Nakamura K, Kawakami T, Yamamoto N, Tomizawa M, Fujiwara T, Ishii T, et

- al. Activation of the NLRP3 inflammasome by cellular labile iron. *Exp Hematol* [Internet]. 2016 Feb;44(2):116–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exphem.2015.11.002>
120. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. *Immunol Rev* [Internet]. 2015 May;265(1):156–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12291>
 121. Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* [Internet]. 2016 May 5;165(4):792–800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.046>
 122. Dutra FF, Alves LS, Rodrigues D, Fernandez PL, de Oliveira RB, Golenbock DT, et al. Hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Sep 30;111(39):E4110-8. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1405023111>
 123. Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature* [Internet]. 2014 May 1;509(7498):105–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13148>
 124. Gao M, Monian P, Pan Q, Zhang W, Xiang J, Jiang X. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Res* [Internet]. 2016 Sep;26(9):1021–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2016.95>
 125. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2002 Feb;1(1):11–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12455967>
 126. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagosomes: Biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol*. 2005;17(4):415–22.
 127. Martins JD, Liberal J, Silva A, Ferreira I, Neves BM, Cruz MT. Autophagy and inflammasome interplay. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2015 Apr;34(4):274–81. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/dna.2014.2752>
 128. Wu S, Sun J. Vitamin D, vitamin D receptor, and macroautophagy in inflammation and infection. *Discov Med* [Internet]. 2011 Apr;11(59):325–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524386> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3285235>

129. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2007 Oct;9(10):1102–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb1007-1102>
130. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* [Internet]. 2008 Feb 28;451(7182):1069–75. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06639>
131. Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol* [Internet]. 2010 Feb 22;188(4):527–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20156967>
132. Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Dec 4;104(49):19500–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/104/49/19500.long>
133. Taylor MP, Burgon TB, Kirkegaard K, Jackson WT. Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J Virol* [Internet]. 2009 Jul;83(13):6599–609. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2698579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
134. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* [Internet]. 2004 Apr 12;23(16):2891–906. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15077152>
135. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008;9(12):1004–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971948>
136. McPhee CK, Logan MA, Freeman MR, Baehrecke EH. Activation of autophagy during cell death requires the engulfment receptor Draper. *Nature* [Internet]. 2010 Jun 24;465(7301):1093–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09127>
137. Silva BJDA, Barbosa MGDM, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA da C, Côte-Real S, et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog* [Internet]. 2017 Jan;13(1):e1006103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28056107>

138. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* [Internet]. 2006 Feb 10;124(3):471–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469695>
139. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval I V., et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* [Internet]. 2003 Oct;5(4):539–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14536056>
140. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signalling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2009;43(68):67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2831538/>
141. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* [Internet]. 2011 Mar;240(1):92–104. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2010.00995.x>
142. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 20;469(7330):323–35. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09782>
143. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* [Internet]. 2011 Nov 11;147(4):728–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
144. Kumar D, Rao KVS. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. *Microbes Infect* [Internet]. 2011 Feb;13(2):121–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2010.10.009>
145. Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* [Internet]. 2009 Oct 1;461(7264):654–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794493>
<http://www.nature.com/nature/journal/v461/n7264/pdf/nature08455.pdf>
146. Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, et al. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell* [Internet]. 1999 May 1;10(5):1367–79. Available from: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.10.5.1367>
147. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3,

- a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J [Internet]. 2000 Nov 1;19(21):5720–8. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdg454>
148. Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2004 Apr;2(4):301–14. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro865>
149. Legakis JE, Klionsky DJ. Introduction to Autophagy: Overview of Autophagy. In: Deretic V, editor. Autophagy in Immunity and Infection: A Novel Immune Effector. Weinheim: WILEY-VCH; 2006. p. 3–17.
150. Hussey S, Travassos LH, Jones NL. Autophagy as an emerging dimension to adaptive and innate immunity. Semin Immunol [Internet]. 2009 Aug;21(4):233–41. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532309000505>
151. Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. Science [Internet]. 2007 Mar 9;315(5817):1398–401. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1136880>
152. Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels M-J, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. J Clin Invest [Internet]. 2006 Sep 1;116(9):2366–77. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/28796>
153. Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. J Biol Chem [Internet]. 2006 Apr 21;281(16):11374–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495224>
154. Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJP, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. J Exp Med [Internet]. 2006 Sep 4;203(9):2063–71. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20061318>
155. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V.

- Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* [Internet]. 2004 Dec 17;119(6):753–66. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867404011067>
156. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Aug 17;282(33):24131–45. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M702824200>
 157. Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* [Internet]. 2009 Nov;10(11):1215–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1800>
 158. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* [Internet]. 2009 Nov 1;183(9):5909–16. Available from: <http://www.jimmunol.org.ezp-prod1.hul.harvard.edu/content/183/9/5909.full%5Cnpapers3://publication/doi/10.4049/jimmunol.0900441>
 159. Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, et al. *Shigella* phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2009 Aug 20;6(2):137–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.07.005>
 160. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2009 Oct 13;11(10):1233–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1967>
 161. Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity* [Internet]. 2010 Mar 26;32(3):329–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.02.009>

162. Kumar D, Nath L, Kamal MA, Varshney A, Jain A, Singh S, et al. Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 5;140(5):731–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.012>
163. Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin K-Q, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007 Aug 28;104(35):14050–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1955809&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
164. Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* [Internet]. 2008 Nov 13;456(7219):264–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07383>
165. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Dec 8;106(49):20842–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19926846> <http://www.pnas.org/content/106/49/20842.full.pdf>
166. Kleinnijenhuis J, Oosting M, Plantinga TS, van der Meer JWM, Joosten LAB, Crevel R V., et al. Autophagy modulates the *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine response. *Immunology* [Internet]. 2011 Nov;134(3):341–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21978003>
167. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* [Internet]. 2011 Mar;12(3):222–30. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3079381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
168. Schaefer L. Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Dec 19;289(51):35237–45.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25391648>
169. Guo H, Callaway JB, Ting JP-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med* [Internet]. 2015 Jul;21(7):677–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3893>
 170. Yuk J-M, Jo E-K. Crosstalk between autophagy and inflammasomes. *Mol Cells* [Internet]. 2013 Nov;36(5):393–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24213677>
 171. Shao B-Z, Xu Z-Q, Han B-Z, Su D-F, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol* [Internet]. 2015;6(November):262. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594174>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4633676>
 172. Sharma D, Kanneganti T-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol* [Internet]. 2016 Jun 20;213(6):617–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27325789>
 173. Harris J. Autophagy and IL-1 Family Cytokines. *Front Immunol* [Internet]. 2013;4(1):83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577011>
 174. Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O’Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Mar 18;286(11):9587–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228274>
 175. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* [Internet]. 2011 Jan 13;469(7329):221–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124315>
 176. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* [Internet]. 2012 Jan 29;13(3):255–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286270>
 177. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J* [Internet]. 2011 Nov 8;30(23):4701–11. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068051>
<http://emboj.embopress.org/content/embojnl/30/23/4701.full.pdf>
178. Jegga AG, Schneider L, Ouyang X, Zhang J. Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy* [Internet]. 2011 May;7(5):477–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21293178>
 179. Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017 Jan 4;45(D1):D362–8. Available from: <http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkw937>
 180. Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* [Internet]. 2007 Apr;42(4):467–70, 472. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17489233>
 181. 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. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Jul;47(7):2124–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439537>
 182. Silva LM, Hirai KE, de Sousa JR, de Souza J, Fuzii HT, Dias LB, et al. Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NFκB (p65), AP-1 (c-Fos and c-Jun), and JAK/STAT in leprosy. *Hum Pathol* [Internet]. 2015 May;46(5):746–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25771902>
 183. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol* [Internet]. 1990 Oct;137(4):749–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 184. Vento-Tormo R, Company C, Rodríguez-Ubreva J, de la Rica L, Urquiza JM, Javierre BM, et al. IL-4 orchestrates STAT6-mediated DNA demethylation leading to dendritic cell differentiation. *Genome Biol* [Internet]. 2016;17(1):4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4711003&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

ntrez&rendertype=abstract

185. Sieling P a, 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* [Internet]. 1999;162(3):1851–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973451>
186. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D'Avila H, Dezsö B, et al. *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin* infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol* [Internet]. 2009 Jul 15;183(2):1337–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561094>
187. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):371–84.
188. Mattos KA, Oliveira VCG, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol* [Internet]. 2014 Jun;16(6):797–815. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24552180>
189. Graversen JH, Svendsen P, Dagnæs-Hansen F, Dal J, Anton G, Etzerodt A, et al. Targeting the hemoglobin scavenger receptor CD163 in macrophages highly increases the anti-inflammatory potency of dexamethasone. *Mol Ther* [Internet]. 2012 Aug;20(8):1550–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/mt.2012.103/nature06264>
190. Ermakóva N. Studies on leprosy. II. formation, distribution and diagnostic significance of pigment. *Int J Lepr*. 1936;4(4):445–55.
191. Souza VNB de, Malaspina TS de S, Campanelli AP, Ghidella C, Ura S, Dalpino D, et al. Increased hepcidin expression in multibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 Dec;107 Suppl(SUPPL.1):183–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283470>
192. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of

- macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by hepcidin. *Blood* [Internet]. 2005 Dec 1;106(12):3979–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081696>
193. Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, et al. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood* [Internet]. 2008 Feb 15;111(4):2392–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18073346>
194. Pereira-Suárez AL, Alvarado-Navarro A, Barrietos-García JG, Estrada-Chávez C, Muñoz-Valle JF, Fafutis-Morris M. Differential expression of solute carrier family 11a member 1 and inducible nitric oxide synthase 2 in skin biopsies from leprosy patients. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* [Internet]. 2015;81(6):594–9. Available from: <http://www.ijdv.com/text.asp?2015/81/6/594/168345>
195. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol* [Internet]. 2014;5(NOV):603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505468>
196. Meneghetti F, Villa S, Gelain A, Barlocco D, Chiarelli LR, Pasca MR, et al. Iron Acquisition Pathways as Targets for Antitubercular Drugs. *Curr Med Chem* [Internet]. 2016;23(35):4009–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27281295>
197. Boradia VM, Malhotra H, Thakkar JS, Tillu VA, Vuppala B, Patil P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron by cell-surface sequestration and internalization of human holo-transferrin. *Nat Commun* [Internet]. 2014;5:4730. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25163484>
198. Olakanmi O, Schlesinger LS, Ahmed A, Britigan BE. Intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis* acquires iron from both extracellular transferrin and intracellular iron pools. Impact of interferon-gamma and hemochromatosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2002 Dec 20;277(51):49727–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399453>
199. de Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MCV, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 Dec;107 Suppl(SUPPL.1):156–66. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283467>
200. Melo RCN, Dvorak AM. Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: host defense or pathogen survival strategy? *PLoS Pathog* [Internet]. 2012;8(7):e1002729. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22792061>
 201. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2001 Sep;40(5):325–438. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470496>
 202. Luo M, Fadeev E a, Groves JT. Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2005 Aug;1(3):149–53. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nchembio717>
 203. Tullius M V, Harmston CA, Owens CP, Chim N, Morse RP, McMath LM, et al. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Mar 22;108(12):5051–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3064333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 204. Chim N, Iniguez A, Nguyen TQ, Goulding CW. Unusual diheme conformation of the heme-degrading protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* [Internet]. 2010 Jan 22;395(3):595–608. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.025>
 205. Jung ID, Lee JS, Lee C-M, Noh KT, Jeong Y-I, Park WS, et al. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase expression via heme oxygenase-1-dependant pathway during murine dendritic cell maturation. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2010 Aug 15;80(4):491–505. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430013>
 206. Krausse-Opatz B, Wittkop U, Gutzki FM, Schmidt C, Jürgens-Saathoff B, Meier S, et al. Free iron ions decrease indoleamine 2,3-dioxygenase expression and reduce IFN γ -induced inhibition of *Chlamydia trachomatis* infection. *Microb Pathog* [Internet]. 2009 Jun;46(6):289–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19306922>
 207. Bank S, Skytt Andersen P, Burisch J, Pedersen N, Roug S, Galsgaard J, et al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96,

- NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. PLoS One [Internet]. 2014;9(6):e98815. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24971461>
208. Snodgrass RG, Huang S, Choi I-W, Rutledge JC, Hwang DH. Inflammasome-mediated secretion of IL-1 β in human monocytes through TLR2 activation; modulation by dietary fatty acids. J Immunol [Internet]. 2013 Oct 15;191(8):4337–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24043885>
209. Kerur N, Hirano Y, Tarallo V, Fowler BJ, Bastos-Carvalho A, Yasuma T, et al. TLR-independent and P2X7-dependent signaling mediate Alu RNA-induced NLRP3 inflammasome activation in geographic atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci [Internet]. 2013 Nov 11;54(12):7395–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114535>
210. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. Cell Mol Immunol [Internet]. 2016 Mar;13(2):148–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549800>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4786634>

7 APÊNDICES E ANEXOS

7.1 Artigo 1: Carta de submissão

Microbes and Infection

para mim

✦

23 de nov

⋮

Dear Dr. Mayara Mattos Barbosa,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Microbes and Infection

Corresponding Author: Roberta Pinheiro

Co-Authors: Mayara G Mattos Barbosa, Master; Rhana B da Silva Prata; Priscila R Andrade, PhD; Helen Ferreira, Master; Bruno J Andrade Silva, Master; Jéssica A Paixão de Oliveira; Tayná Q Assis; Thiago G Toledo-Pinto, PhD; José Augusto C Nery, PhD; Patricia S Rosa; Verônica Schmitz; Milton O Moraes; Flávio A Lara; Euzenir N Sarno, PhD;

Title: Indoleamine 2,3-dioxygenase and Iron are required for *Mycobacterium leprae* survival

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at robertaolmo@gmail.com; roberta.olmo@pq.cnpq.br; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the

submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/micinf/l.asp?i=47846&l=ZUNK2K91>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>,

or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Microbes and Infection

7.2 Artigo 1: Indoleamine 2,3-dioxygenase and Iron are required for *Mycobacterium leprae* survival

Submetido para a Microbes and Infection em 23/11/2016

Indoleamine 2,3-dioxygenase and Iron are required for *Mycobacterium leprae* survival

Mayara Garcia de Mattos Barbosa^a, Rhana Berto da Silva Prata^{a,b}, Priscila Ribeiro Andrade^a, Helen Ferreira^a, Bruno Jorge de Andrade Silva^a, Jéssica Araújo da Paixão de Oliveira^a, Tayná Quintella Assis^a, Thiago Gomes de Toledo-Pinto^a, José Augusto da Costa Nery^a, Patricia Sammarco Rosa^c, Veronica Schmitz^a, Milton Ozório Moraes^a, Flávio Alves Lara^d, Euzenir Nunes Sarno^a & Roberta Olmo Pinheiro^{a,*}

^aLeprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bInflammation and Immunity Laboratory, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cLaboratory Animal House, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, SP, Brazil

^dCellular Microbiology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author. Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ZIP code: 21040-360

E-mail address: roberta.olmo@pq.cnpq.br (R.O. Pinheiro)

1 **Abstract**

2 Lepromatous macrophages have a regulatory M2-like phenotype that contributes to the
3 immunosuppression observed in multibacillary leprosy. Our previous study has
4 demonstrated that IL-10 may modulate both indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and
5 CD163 expression in lepromatous leprosy (LL) cells, favoring *Mycobacterium leprae*
6 persistence through induction of regulatory pathways and iron storage. Here, we
7 investigated cell phenotype related to LL pathogenesis. Increased gene expression of the
8 M2-related genes *MSRA*, *PPARG*, and *CD163* were observed in LL lesion cells,
9 accompanied by an augmented expression of hemoglobin (Hb), haptoglobin, heme
10 oxygenase 1 and transferrin receptor 1 (TfR1) when compared to tuberculoid leprosy
11 (BT) cells. We also found increased iron deposits and diminished expression of the iron
12 exporter ferroportin 1, both key characteristics of M1 macrophages. The systemic levels
13 of Hb were decreased in lepromatous sera. *M. leprae* induced an increase in TfR1 and
14 IL-10 gene expression in human monocytes. Hemin, but not FeSO₄ stimulation, was
15 able to enhance *M. leprae* viability by a mechanism that involves IDO. In summary, this
16 study demonstrates that iron may not only regulate IDO expression but its function as
17 an important element for *M. leprae* survival in host cells.

18

19 Keywords: leprosy; macrophages; iron; indoleamine 2,3-dioxygenase; *Mycobacterium*
20 *leprae*

7.3 Artigos em colaboração

1. Silva BJDA*, **Barbosa MGD***, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA da C, Côrte-Real S, et al. Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization. PLoS Pathog. 2017 Jan;13(1):e1006103.

* Contribuíram igualmente para esse trabalho.

2. Schmitz V, Prata RB da S, **Barbosa MG de M**, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et al. Expression of CD64 on circulating neutrophils favoring systemic inflammatory status in erythema nodosum leprosum. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Aug;10(8):e0004955.
3. Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, **Barbosa MG de M**, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. Expert Rev Clin Immunol. 2015 Mar;11(3):391–407.
4. de Oliveira Fulco T, Andrade PR, **de Mattos Barbosa MG**, Pinto TGT, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. Infect Immun. 2014 Sep;82(9):3968–78.

RESEARCH ARTICLE

Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization

Bruno Jorge de Andrade Silva¹ , Mayara Garcia de Mattos Barbosa¹ , Priscila Ribeiro Andrade¹, Helen Ferreira¹, José Augusto da Costa Nery¹, Suzana Côrte-Real², Gilberto Marcelo Sperandio da Silva³, Patricia Sammarco Rosa⁴, Mario Fabri^{5,6}, Euzenir Nunes Sarno¹, Roberta Olmo Pinheiro^{1*}

1 Leprosy Laboratory; Oswaldo Cruz Institute; Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil, **2** Structural Biology Laboratory; Oswaldo Cruz Institute; Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil, **3** Evandro Chagas National Institute of Infectology; FIOCRUZ; Rio de Janeiro, Brazil, **4** Laboratory Animal House; Lauro de Souza Lima Institute; São Paulo, Brazil, **5** Department of Dermatology; University of Cologne; Cologne, Germany, **6** Center for Molecular Medicine; University of Cologne; Cologne, Germany

 These authors contributed equally to this work.

* rolmo@ioc.fiocruz.br



 OPEN ACCESS

Citation: Silva BJdA, Barbosa MGdM, Andrade PR, Ferreira H, Nery JAdC, Côrte-Real S, et al. (2017) Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog* 13(1): e1006103. doi:10.1371/journal.ppat.1006103

Editor: Padmini Salgame, New Jersey Medical School, UNITED STATES

Received: August 1, 2016

Accepted: November 29, 2016

Published: January 5, 2017

Copyright: © 2017 Silva et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The study was financed by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (www.cnpq.br) 311488/2009-9 and 311489/2009-9 to ROP; and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (www.faperj.br) 203675 to ROP. ENS and ROP are research fellows of the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development – CNPq. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease that may present different clinical forms according to the immune response of the host. Levels of IFN- γ are significantly raised in paucibacillary tuberculoid (T-lep) when compared with multibacillary lepromatous (L-lep) patients. IFN- γ primes macrophages for inflammatory activation and induces the autophagy antimicrobial mechanism. The involvement of autophagy in the immune response against *Mycobacterium leprae* remains unexplored. Here, we demonstrated by different autophagic assays that LC3-positive autophagosomes were predominantly observed in T-lep when compared with L-lep lesions and skin-derived macrophages. Accumulation of the autophagic receptors SQSTM1/p62 and NBR1, expression of lysosomal antimicrobial peptides and colocalization analysis of autolysosomes revealed an impairment of the autophagic flux in L-lep cells, which was restored by IFN- γ or rapamycin treatment. Autophagy PCR array gene-expression analysis revealed a significantly upregulation of autophagy genes (*BECN1*, *GPSM3*, *ATG14*, *APOL1*, and *TPR*) in T-lep cells. Furthermore, an upregulation of autophagy genes (*TPR*, *GFI1B* and *GNAI3*) as well as LC3 levels was observed in cells of L-lep patients that developed type 1 reaction (T1R) episodes, an acute inflammatory condition associated with increased IFN- γ levels. Finally, we observed increased BCL2 expression in L-lep cells that could be responsible for the blockage of BECN1-mediated autophagy. In addition, *in vitro* studies demonstrated that dead, but not live *M. leprae* can induce autophagy in primary and lineage human monocytes, and that live mycobacteria can reduce the autophagy activation triggered by dead mycobacteria, suggesting that *M. leprae* may hamper the autophagic machinery as an immune escape mechanism. Together, these results indicate that autophagy is an important innate mechanism associated with the *M. leprae* control in skin macrophages.

RESEARCH ARTICLE

Expression of CD64 on Circulating Neutrophils Favoring Systemic Inflammatory Status in Erythema Nodosum Leprosum

Veronica Schmitz^{1*}, Rhana Berto da Silva Prata¹, Mayara Garcia de Mattos Barbosa¹, Mayara Abud Mendes¹, Sheila Santos Brandão¹, Thaís Porto Amadeu², Luciana Silva Rodrigues², Helen Ferreira¹, Fabrício da Mota Ramalho Costa¹, Jessica Brandão dos Santos¹, Fabiana dos Santos Pacheco¹, Alice de Miranda Machado¹, José Augusto da Costa Nery¹, Mariana de Andrea Hacker¹, Anna Maria Sales¹, Roberta Olmo Pinheiro¹, Euzenir Nunes Sarno¹

1 Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* veronicaschmitz@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Schmitz V, Prata RBdS, Barbosa MGdM, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et al. (2016) Expression of CD64 on Circulating Neutrophils Favoring Systemic Inflammatory Status in Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis* 10(8): e0004955. doi:10.1371/journal.pntd.0004955

Editor: Christian Johnson, Fondation Raoul Follereau, FRANCE

Received: June 23, 2016

Accepted: August 5, 2016

Published: August 24, 2016

Copyright: © 2016 Schmitz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported in part by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (URL: www.faperj.br); Grants # APQ1/E-26/111.484/2011 (ENS); APQ1/E-26/111.501/2011(VS); PDR/E-26100.113/2009 (VS). ROP is research fellow of the Faperj. ENS and ROP are research fellows of the Brazilian Research Council-CNPq (www.cnpq.br). The funders had no role in study design, data

Abstract

Erythema Nodosum Leprosum (ENL) is an immune reaction in leprosy that aggravates the patient's clinical condition. ENL presents systemic symptoms of an acute infectious syndrome with high leukocytosis and intense malaise clinically similar to sepsis. The treatment of ENL patients requires immunosuppression and thus needs to be early and efficient to prevent both disabilities and permanent nerve damage. Some patients experience multiple episodes of ENL and prolonged use of immunosuppressive drugs may lead to serious adverse effects. Thalidomide treatment is extremely effective at ameliorating ENL symptoms. Several mechanisms have been proposed to explain the efficacy of thalidomide in ENL, including the inhibition of TNF production. Given its teratogenicity, thalidomide is prohibitive for women of childbearing age. A rational search for molecular targets during ENL episodes is essential to better understand the disease mechanisms involved, which may also lead to the discovery of new drugs and diagnostic tests. Previous studies have demonstrated that IFN- γ and GM-CSF, involved in the induction of CD64 expression, increase during ENL. The aim of the present study was to investigate CD64 expression during ENL and whether thalidomide treatment modulated its expression. Leprosy patients were allocated to one of five groups: (1) Lepromatous leprosy, (2) Borderline leprosy, (3) Reversal reaction, (4) ENL, and (5) ENL 7 days after thalidomide treatment. The present study demonstrated that CD64 mRNA and protein were expressed in ENL lesions and that thalidomide treatment reduced CD64 expression and neutrophil infiltrates—a hallmark of ENL. We also showed that ENL blood neutrophils exclusively expressed CD64 on the cell surface and that thalidomide diminished overall expression. Patient classification based on clinical symptoms found that severe ENL presented high levels of neutrophil CD64. Collectively, these data revealed that ENL neutrophils express CD64, presumably contributing to the immunopathogenesis of the disease.

Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition

Expert Rev. Clin. Immunol. 11(3), 391–407 (2015)

Priscila Ribeiro
Andrade,
Roberta Olmo
Pinheiro*,
Anna Maria Sales,
Ximena Illarramendi,
Mayara Garcia
de Mattos Barbosa,
Milton Ozório Moraes,
Marcia Rodrigues
Jardim,
Jose Augusto
da Costa Nery,
Elizabeth Pereira
Sampaio and
Euzenir Nunes Sarno

Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz
Institute, Oswaldo Cruz Foundation,
Av. Brasil 4365, Manguinhos,
Rio de Janeiro, RJ, 21040-360, Brazil
*Author for correspondence:
Tel.: +55 212 562 1541
robertaolmo@gmail.com

Type 1 reaction (T1R) or reversal reaction is the leading cause of physical disabilities and deformities in leprosy. Leprosy patients, even after being considered cured and released from treatment, may suffer from reactional episodes for long periods of time. Early diagnosis is a great challenge for effectively treating and managing T1R. There is an urgent need to identify the most significant biomarkers to prevent recurrent T1R and to differentiate late T1R from relapse. T1R continues to be treated with corticosteroids and complications due to iatrogenic treatment remain frequent. This review aims to provide a framework from which to approach the great challenges that still persist in T1R management and debate key issues in order to reduce the distance between basic research and the clinic.

KEYWORDS: dendritic cells • IFN- γ • leprosy • *Mycobacterium leprae* • reversal reaction • TNF- α • type 1 reaction

Leprosy, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, is characterized by a spectrum of clinical forms (borderline tuberculoid leprosy [BT], borderline leprosy [BB], borderline lepromatous leprosy [BL] and lepromatous leprosy [LL]) that correlate with the host immune response against the mycobacteria and is inversely related to the bacillary load. Leprosy reactions are well-known complications of the disease which are associated with changes in the patient's immune response that occur either before, during or after treatment (multidrug therapy [MDT]), associated or not with the development of peripheral neuropathy [1–3].

Reactions are classified as type 1 (T1R) or reversal reaction, type 2 reaction (T2R) represented mainly as erythema nodosum leprosum (ENL) and neuritis, which may occur isolated or in the context of T1R or T2R. Leprosy reaction classified as Lucio's phenomenon has also been described and commonly identified among the Mexican population [4,5].

T1R is the leading cause of disabilities and deformities in leprosy [6,7]. Clinically, T1R is perceived as an inflammatory exacerbation of skin lesions with either the appearance of new lesions and/or the reactivation of old ones, associated or not with impairment of peripheral nerve function. The most frequent sensory neurological symptoms range from diffuse cutaneous hyperesthesia, paresthesia and allodynia, to motor nerve impairment associated or not with neural tenderness and enlargement, which are the classical clinical features of neuritis in leprosy. Moreover, damage-associated nerve trunks together with acute motor impairment result in fallen hand and foot drop.

T1R is known to occur across the leprosy clinical spectrum in the unstable borderline (BT, BB and BL) and the subpolar LL forms. It commonly occurs after the onset of MDT, but can be the first manifestation of the disease or appear long after MDT release [1,3,8].

Effect of Apoptotic Cell Recognition on Macrophage Polarization and Mycobacterial Persistence

Tatiana de Oliveira Fulco,^a Priscila Ribeiro Andrade,^a Mayara Garcia de Mattos Barbosa,^a Thiago Gomes Toledo Pinto,^a Paula Fernandez Ferreira,^a Helen Ferreira,^a José Augusto da Costa Nery,^a Suzana Côrte Real,^b Valéria Matos Borges,^c Milton Ozório Moraes,^a Euzenir Nunes Sarno,^a Elizabeth Pereira Sampaio,^a Roberta Olmo Pinheiro^a

Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^a; Structural Biology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil^b; Research Center of Gonçalves Moniz, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, BA, Brazil^c

Intracellular *Mycobacterium leprae* infection modifies host macrophage programming, creating a protective niche for bacterial survival. The milieu regulating cellular apoptosis in the tissue plays an important role in defining susceptible and/or resistant phenotypes. A higher density of apoptotic cells has been demonstrated in paucibacillary leprosy lesions than in multibacillary ones. However, the effect of apoptotic cell removal on *M. leprae*-stimulated cells has yet to be fully elucidated. In this study, we investigated whether apoptotic cell removal (efferocytosis) induces different phenotypes in proinflammatory (M ϕ 1) and anti-inflammatory (M ϕ 2) macrophages in the presence of *M. leprae*. We stimulated M ϕ 1 and M ϕ 2 cells with *M. leprae* in the presence or absence of apoptotic cells and subsequently evaluated the *M. leprae* uptake, cell phenotype, and cytokine pattern in the supernatants. In the presence of *M. leprae* and apoptotic cells, M ϕ 1 macrophages changed their phenotype to resemble the M ϕ 2 phenotype, displaying increased CD163 and SRA-I expression as well as higher phagocytic capacity. Efferocytosis increased *M. leprae* survival in M ϕ 1 cells, accompanied by reduced interleukin-15 (IL-15) and IL-6 levels and increased transforming growth factor beta (TGF- β) and IL-10 secretion. M ϕ 1 cells primed with *M. leprae* in the presence of apoptotic cells induced the secretion of Th2 cytokines IL-4 and IL-13 in autologous T cells compared with cultures stimulated with *M. leprae* or apoptotic cells alone. Efferocytosis did not alter the M ϕ 2 cell phenotype or cytokine secretion profile, except for TGF- β . Based on these data, we suggest that, in paucibacillary leprosy patients, efferocytosis contributes to mycobacterial persistence by increasing the M ϕ 2 population and sustaining the infection.

Macrophages have remarkable plasticity, allowing them to efficiently respond to environmental signals and change their phenotype. Their physiology can be markedly altered by both innate and adaptive immune responses (1–8). Proinflammatory (M ϕ 1) and anti-inflammatory (M ϕ 2) macrophage polarization contributes to the resolution of inflammatory processes. The presence of the M ϕ 2 macrophage population is important for maintaining a basal anti-inflammatory environment in tissues continuously exposed to exogenous agents such as skin. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) contribute to macrophage and dendritic cell development (9–12) but influence the macrophage polarization state in opposite manners. Whereas M ϕ 1 polarized in the presence of GM-CSF promotes type 1 immunity, M ϕ 2 polarized with M-CSF subverts type 1 immunity and thus may promote immune escape and chronic infection (13).

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular pathogen. The disease is characterized by a spectrum with two polar clinical forms. Tuberculoid or paucibacillary leprosy is characterized by a robust Th1 immune response, strong cellular immunity, low bacillary counts, and low lesion numbers. On the other hand, lepromatous or multibacillary leprosy features high levels of Th2-type cytokines, a high bacillary load, and many skin lesions (14–17).

Previous studies by our group demonstrated that *M. leprae* can lead to macrophage apoptosis through a mechanism involving the expression of tumor necrosis factor (TNF) and the proteasome function (18–20). In addition, in comparing lesions from multi- and paucibacillary patients, Walsh and colleagues reported that apoptosis was more frequent in paucibacillary lesions, suggesting

that the activation of apoptosis could act as a containment mechanism for the multiplication and spread of bacilli (21).

Macrophages undergo dramatic molecular and functional changes upon encounter with, interaction with, and uptake of apoptotic cells during inflammation resolution. We demonstrated here that, in the presence of *M. leprae*, the clearance of apoptotic cells (efferocytosis) induces proinflammatory macrophage deviation toward an anti-inflammatory phenotype. Although efferocytosis has been described as an antimicrobial effector mechanism that operates during *M. tuberculosis* infection (22, 23), our findings suggest that, in leprosy, efferocytosis may explain the persistence of mycobacterial disease in paucibacillary patients regardless of the capacity of these patients to mount a cellular immune response by modulating the macrophage phenotype and function in cell lesions.

Received 10 June 2014 Returned for modification 30 June 2014

Accepted 5 July 2014

Published ahead of print 14 July 2014

Editor: J. L. Flynn

Address correspondence to Roberta Olmo Pinheiro, robertaolmo@gmail.com.

T.D.O.F. and P.R.A. contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02194-14>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.02194-14