

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Importância da enzima 3 β -Hidroxiesterol desidrogenase (3 β - HSD) na sobrevivência intracelular do *Mycobacterium leprae*

Thabatta Leal Silveira Andrezo Rosa

RIO DE JANEIRO

Agosto/2017

Rosa, Thabatta Leal Silveira Andrezo .

Importância da enzima 3 β -Hidroxiesterol desidrogenase (3 β - HSD) na sobrevivência intracelular do *Mycobacterium leprae* / Thabatta Leal Silveira Andrezo Rosa. - Rio de janeiro, 2017.

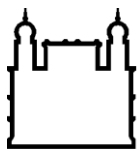
119 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientadora: Maria Cristina Vidal Pessolani.

Bibliografia: f. 85-102

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Colesterol. 3. Colestenona. 4. Célula de Schwann. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Thabatta Leal Silveira Andrezo Rosa

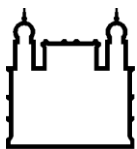
Importância da enzima 3 β -Hidroxiesterol desidrogenase (3 β - HSD) na sobrevivência intracelular do *Mycobacterium leprae*

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

Orientadora: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO

Agosto/2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Thabatta Leal Silveira Andrezo Rosa

Importância da enzima 3 β -Hidroxiesterol desidrogenase (3 β - HSD) na sobrevivência intracelular do *Mycobacterium leprae*

ORIENTADORA: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Leila de Mendonça Lima (IOC-Fiocruz) - **Presidente**

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC-Fiocruz)

Prof. Dra. Wanda Maria Almeida von Kruger (IBCCF- UFRJ)

Prof. Dr. Julio Jablonski Amaral (Inmetro)

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes (IOC-Fiocruz)

Rio de Janeiro, 23 de Agosto de 2017

*Dedico a dissertação à minha
mãe e meu pai, que sempre
me apoiaram, e a toda minha
família.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha mãe e meu pai, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim e que iriam até o fim do mundo para me ver feliz. Agradeço por sempre estarem ao meu lado e por toda dedicação e amor. Amo muito vocês, eu não poderia ter pedido por pais mais maravilhoso, essa conquista é tanto de vocês quanto minha, por todos os sacrifícios que vocês fizeram para me ajudar chegar até aqui.

A minha avó Leia, que dedicou 25 anos de sua vida inteiramente para cuidar de mim, que me deu todo o carinho, amor e paciência. Você sempre foi um exemplo de superação para mim.

Ao meu avô Cidney, que faleceu durante meu mestrado, mas que eu guardo tantas memórias boas de uma infância feliz. Uma das pessoas mais inteligentes que eu conheci e que se dedicava a fazer os outros rir, não importasse o problema que ele mesmo estivesse passando. Você costumava dizer que eu era seu orgulho, e em todas as vezes que eu não acreditei em mim e que eu pensei em desistir, mesmo você não estando aqui, eu me lembrava que para você eu sempre ia ser seu orgulho, não importasse o que acontecesse, e daí eu tirei forças todas as vezes para continuar, mesmo nos momentos mais difíceis. E como 2016 foi difícil! mas eu continuei e estou aqui, e agradeço, pois eu sei que onde quer que o senhor esteja você pode me ver e compartilhar essa conquista comigo.

Ao meus avós, em memória, também já falecidos, Lourdes e Norival, que também sempre me apoiaram, que sinto muita falta e eu gostaria que vocês pudessem estar aqui nesse momento, mas sei que vocês estão cuidando de mim.

À minha prima Anne, que é a irmã que eu nunca tive, que foi tantas vezes minha psicóloga quando precisei, que sempre me faz rir e que não importa o que aconteça está sempre lá por mim. Fico feliz que estamos crescendo juntas, passando pelas fases da vida juntas e espero que sempre estejamos lá, uma para a outra.

À toda minha família: tias e tios, primas e primos, são tantos que não consigo nomear todos, mas todos foram igualmente importantes para a construção de quem eu sou e foram importantes para essa conquista.

À minha orientadora, Dra. Maria Crisitina Vidal Pessolani que me acompanha desde o início da minha jornada no mundo científico e acadêmico, que me inspira todos os dias.

À minha coorientadora Dra. Marcia de Berredo Pinho Moreira, que tem toda paciência com minhas crises de ansiedade, e que está sempre ao meu lado, sempre preocupada comigo, que só acrescenta com suas ideias e sugestões para o projeto e que topou embarcar nessa jornada junto comigo, apesar de todas as dificuldades.

À Dra. Angela Marques que dividiu comigo os desafios desse projeto e que me ajudou muito com sua vasta experiência ao longo dos experimentos e com materiais e reagentes.

Agradeço ao meu grande amigo Fabrício. Entramos quase ao mesmo tempo no laboratório e passamos por muito juntos. Obrigada pela sua ajuda, tanto na parte acadêmica, como por todo apoio. Mas de tudo, sou muita grata pela sua amizade.

À minha amiga Chyntia, que me ajudou imensamente em muitas experimentos e com ideias para outros. Espero um dia ser um pouco como você, a pessoa mais corajosa, dedicada e inteligente que já conheci e de ter a sua calma diante de toda a inconstância e imprevistos da vida científica. Eu te admiro por tudo.

À família LAMICEL, todos, sem exceção, aos que são lamichel, aos que já foram e aos que são lamichel de coração, agregados, mas acolhidos. Todos são muito importantes para mim e me ajudaram na construção dessa dissertação, com todas as discussões, ideias, ajuda, clubes, mas acima de tudo, obrigado por tornar o nosso ambiente de trabalho tão leve e divertido, por serem todos tão companheiros, por estarem todos tão solícitos a ajudar uns aos outros, por me fazerem sentir tão em casa, tão acolhida e motivada, cada um de vocês me inspira.

À Dra. Georgia Atella e Mileane Busch, que me auxiliaram com toda a parte de análise de lipídios e foram fundamentais para a dissertação.

Às minhas grandes amigas Jessica Stztajn e Mariana Nascimento. Amizades que eu sempre carrego e que sempre me acompanham em todas as conquistas.

“A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.”

Neil deGrasse Tyson

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	xi
Índice de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – A hanseníase	1
1.1.1 – Aspectos gerais, história e epidemiologia.....	1
1.1.2 – Formas clínicas e reações	3
1.1.3 – A lesão neural na hanseníase	6
1.1.4 – Diagnóstico e tratamento	6
1.2 – O <i>Mycobacterium leprae</i>	8
1.2.1 – Características gerais e parede celular	8
1.2.2 – Modelos experimentais	10
1.2.3 – Genoma e evolução	13
1.3 – A interação do <i>M. leprae</i> com a célula de Schwann	15
1.4 – Metabolismo lipídico na hanseníase	19
1.4.1 – O metabolismo lipídico das células hospedeiras durante a infecção	19
1.4.2 – A síntese de lipídios da parede do <i>M. leprae</i>	20
1.5 – O colesterol, seu metabolismo e as micobactérias	22
1.5.1 – A importância biológica do colesterol e seus derivados: Aspectos gerais	22
1.5.2 – Importância do colesterol e seus derivados para as micobactérias	25
1.5.3 – Catabolismo de colesterol nas micobactérias	26
1.5.4 – A importância biológica da colestenoína	31
1.6 – Justificativa	31

2. OBJETIVOS	33
2.1 – Objetivo geral	33
2.2 – Objetivos específicos	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 – Cultivo celular das linhagens e obtenção do <i>M. leprae</i>	34
3.1.1 – Cultivo celular de células de Schwann humanas da linhagem ST88-14.	34
3.1.2 – Cultivo celular de monócitos humanos da linhagem THP-1 e diferenciação em macrófagos	34
3.1.3 – <i>M. leprae</i> e amostras clínicas de biópsias de pele de pacientes LL	35
3.2 – Avaliação da toxicidade da colestenoína e atorvastatina sobre células de Schwann humanas da linhagem ST88-14	35
3.3 – Avaliação do efeito da atorvastatina sobre viabilidade intracelular do <i>M.</i> <i>leprae</i> em células de Schwann da linhagem ST88-14	36
3.4 – Técnicas moleculares	36
3.4.1 – Extração de RNA e de DNA	36
3.4.2 – Dosagem de ácidos nucleicos, tratamento com DNase e avaliação da integridade do RNA	37
3.4.3 – Transcrição Reversa	38
3.4.4 – Determinação molecular da viabilidade do <i>M. leprae</i> analisando o RNA 16S por qPCR.....	38
3.5 – Detecção da expressão da enzima 3 β -HSD em biópsias de pacientes	39
3.6 – Ensaio de inibição da enzima 3 β -HSD com o composto SB100	41
3.6.1 – Determinação da viabilidade do <i>M. leprae</i> por radiorrespirometria	41
3.6.2 – Quantificação da produção de colestenoína por <i>M. leprae</i> vivo	42
3.6.3 – Determinação do efeito do SB100 sobre a produção de NADH e de citocromo C reduzido	42
3.7 – Determinação do efeito de SB100 sobre a síntese de PGL-I e PDIMs do <i>M.</i> <i>leprae</i>	43

3.8 – Estudo da importância da enzima 3 β -HSD para a infecção do <i>M. leprae</i> em células de Schwann	43
3.9 – Determinação do efeito da colestenoína no grau de associação de partículas e micobactérias	44
3.10 – Análise do perfil de esteróis na célula hospedeira	46
3.10.1 – Obtenção de colestenoína radioativa	46
3.10.2 – Análise da capacidade da célula hospedeira em converter a [³ H] colestenoína em outros metabólitos	47
3.11 – Análise da produção de colestenoína em células de Schwann infectadas ..	48
4. RESULTADOS	49
4.1 – Efeito da atorvastatina na viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i>	49
4.2 – Detecção da enzima 3 β -HSD de <i>M. leprae</i> em biópsias de pacientes por <i>western blotting</i>	51
4.3 – Determinação do efeito do composto SB100 sobre a produção de colestenoína e NADH pelo <i>M. leprae</i>	52
4.4 – Efeito da inibição da enzima 3 β -HSD sobre a biossíntese de lipídios micobacterianos	56
4.5 – Análise do efeito da inibição da enzima 3 β -HSD sobre a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> em células de Schwann	59
4.6 – Análise do efeito da adição exógena de colestenoína sobre a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> em células de Schwann	62
4.7 – Análise do perfil de esteróis derivados da colestenoína na célula hospedeira estimulada com <i>M. leprae</i>	68
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

Lista de Abreviaturas

ABCA-1	Cassete transportador ligante de ATP subfamília A1 (<i>ATP-binding cassette transporter subfamily A</i>)
ABCG-1	Cassete transportador ligante de ATP subfamília G-1 (<i>ATP-binding cassette transporter subfamily G</i>)
ACAT	Acil-CoA colesterol aciltransferase
ADRP	Proteína relacionada à diferenciação adiposa (<i>Adipose differentiation-related protein</i>)
ATP	Adenosina trifosfato (<i>Adenosine triphosphate</i>)
B.A.A.R	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Borderline -Borderline</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumine</i>)
BL	<i>Borderline</i> Lepromatoso
BT	<i>Borderline</i> Tuberculóide
ChoD	Colesterol oxidase (<i>Cholesterol oxidase</i>)
CPM	Contagens por minuto
CT	<i>Cycle threshold</i>
CYP	Citocromo P450
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Pirocarbonato de dietila
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
DPM	Desintegrações por minuto
EchA	Enoil CoA Hidratase A
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
ENH	Eritema nodoso hansênico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular (<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>)
FAM	6- Carboxifluoresceína
FPP	Farnesil pirofosfato
GGPP	Geranil geranil pirofosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>High density lipoprotein</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
Hlp	Proteína semelhante à histona (<i>Histone-like protein</i>)
HMG-CoA	Hidróxi metil-glutaril-Coenzima A
HMGCR	Hidróxi metil-glutaril-Coenzima A Redutase
HRP	Peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
3 β -HSD	3 beta hidroxiesterol desidrogenase
IB	Índice baciloscópio
IBL	Índice baciloscópio de lesão
IFN	Interferon
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (<i>Insuline-like growth factor- 1</i>)
IL-	Interleucina (<i>Interleukine</i>)
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Ksh	3-cetoesteróide 9 alfa-hidroxilase
KstD	3-cetoesteróide-delta-1-desydrogenase

LAM	Lipoarabinomanana
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Receptor de LDL
LL	Lepromatoso polar
LM	Lipomanana
LXR	Receptor X de fígado (<i>liver X receptor</i>)
Mce4	Operon de entrada em célula de mamífero (<i>mammalian cell entry</i>)
MGB	Ligante de sulco menor (<i>Minor groove binding</i>)
ML-LBP21	Proteína ligante de laminina 21 de <i>M. leprae</i>
ML	<i>M. leprae</i>
MLM	<i>M. leprae</i> morto
MOI	Multiplicidade de infecção (<i>Multiplicity of infection</i>)
MOPS	Ácido 3- (N-morfolino) propano sulfônico
mTOR	Alvo mecanístico de rapamicina (<i>Mechanistic target of rapamycin</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotideo oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotideo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NE	Não estimulado
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NFQ	Quencher não fluorescente
NI	Não Infectado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato – salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDIM	Fticerol dimicocerosato
PGE ₂	Prostaglandina E 2
PGL-I	Glicolipídio fenólico -1
PI	Iodeto de propídio
PIM	Fosfatidilinositol manosídeos
PMA	Phorbol-12-Miristato-13-Acetato
PMN	Polimorfonuclear
PQT	Poliquimioterapia
qPCR	PCR quantitativo
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RR	Reação Reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo simples (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SREBP-2	Proteína ligante de elemento regulatório de esterol(<i>Sterol regulatory element-binding proteins-2</i>)
START	Transportador de lipídios relacionado a StAR (<i>StAR-related lipid-transfer</i>)
TACO	Proteína de revestimento contendo triptofano e aspartato (<i>Tryptophan-aspartate containing coat protein</i>)
TBS-T	Tampão tris-salina-tween 20

TE	Tampão Tris-EDTA
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th-	<i>T helper</i>
TLR-	Receptor do tipo Toll (<i>Toll like receptor</i>)
TMM	Monomicolato de trealose
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TT	Tuberculóide polar
U	Unidades

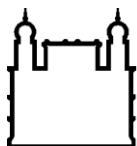
Índice de Figuras

Figura 1 – Mapa do total de novos casos de hanseníase no ano de 2015 (WHO, 2016a).....	2
Figura 2 – Classificação da hanseníase e seus respectivos perfis de respostas imunológicas (Misch et al., 2010).....	4
Figura 3 – Esquema simplificado da parede celular de micobactérias (Brown et al., 2015).....	9
Figura 4 – Modelos animais de infecção com o <i>M. leprae</i> (Scollard et al., 2006).....	12
Figura 5 – Distribuição filogeográfica do <i>M. leprae</i> (Monot et al., 2009).....	15
Figura 6 – Esquema da interação do <i>M. leprae</i> com a unidade axônio-célula de Schwann (Ng et al., 2000).....	16
Figura 7 – Esquema da síntese de ácidos micólicos em <i>M. tuberculosis</i> (Jankute et al., 2015).....	21
Figura 8 – Esquema de síntese de PDIMs e PGLs (Yu et al., 2012).....	22
Figura 9 – Via catabólica do colesterol em <i>M. tuberculosis</i> (Wipperman et al., 2013).....	28
Figura 10 – Os azasteróides são potentes inibidores da 3 β -HSD de <i>M. tuberculosis</i> (Thomas et al., 2011a).....	30
Figura 11 – A atorvastatina não é citotóxica para células de Schwann.....	50
Figura 12 – Atorvastatina diminui a viabilidade do <i>M. leprae</i> em células de Schwann humanas.....	51
Figura 13 – A enzima 3 β -HSD de <i>M. leprae</i> é expressa em biópsias de pele de pacientes LL.....	52
Figura 14 – Efeito do composto SB100 sobre a produção de colestenoína pelo <i>M. leprae</i>	53
Figura 15 – O tratamento com o composto SB100 em concentrações acima de 100 μ M reduz a produção de colestenoína pelo <i>M. leprae</i>	54
Figura 16 – O tratamento com SB100 afeta a redução de NAD a NADH pelo <i>M. leprae</i>	55

Figura 17 – A atividade da 3 β -HSD promove um aumento nos níveis de citocromo C reduzido.....	56
Figura 18 – SB100 inibe a biossíntese de PGL-I pelo <i>M. leprae</i>	57
Figura 19 – A inibição da enzima 3 β -HSD de <i>M. leprae</i> diminui a síntese de PDIM.....	58
Figura 20 – SB100 apresenta um efeito de inibição prolongada sobre a 3 β -HSD do <i>M. leprae</i>	61
Figura 21 – A inibição da enzima 3 β -HSD diminui a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> em células de Schwann infectadas.....	62
Figura 22 – Análise da citotoxicidade da colestenoína em células de Schwann.....	63
Figura 23 – Colestenona parece favorecer a sobrevivência intracelular do <i>M. leprae</i> na célula de Schwann.....	64
Figura 24 – A colestenoína parece não afetar a associação de partículas e micobactérias às células de Schwann.....	65
Figura 25 – Colestenona não afeta a internalização de micobactérias e partículas em macrófagos THP-1.....	67
Figura 26 – Colestenona é convertida em outros lipídios pela célula hospedeira.....	69
Figura 27 – [³ H]Colesterol é convertido em colestenoína em células de Schwann infectadas com <i>M. leprae</i>	71
Figura 28 – Modelo esquemático representando a atuação da enzima 3 β -HSD durante a infecção de células de Schwann pelo <i>M. leprae</i> no nervo periférico.....	83

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados nas reações de PCR.....	39
---	----



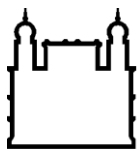
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (ML), um bacilo intracelular obrigatório que infecta preferencialmente células de Schwann dos nervos periféricos e macrófagos da pele. A lesão neural é o sintoma mais grave da doença e, dessa forma, compreender as bases moleculares da interação ML- célula de Schwann constitui um tópico de grande relevância na patogênese da hanseníase. Estudos apontam que o ML modula o metabolismo lipídico da célula hospedeira, levando ao acúmulo de corpúsculos lipídicos. Dentre os lipídios acumulados, o colesterol é um dos mais abundantes e parece ser importante para a sobrevivência do ML. O colesterol também possui relevância em outras micobacterioses, como na tuberculose, sendo uma importante fonte de carbono para o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), quando submetido à estarvação nutricional no hospedeiro. Durante o processo evolutivo, o ML sofreu uma redução drástica no número de genes funcionais quando comparado ao Mtb. Dentre os genes perdidos pelo ML estão os envolvidos no catabolismo de colesterol, tendo como exceção da enzima 3 β -Hidroxiesterol desidrogenase (3 β -HSD), que catalisa a oxidação do colesterol à colestenoa. Considerando a ideia de que o ML preservou apenas genes essenciais para sua sobrevivência no seu nicho intracelular, este estudo tem como objetivo compreender o papel da 3 β -HSD na patogênese do ML. Inicialmente verificamos que o tratamento da célula de Schwann com atorvastatina, inibidor da biossíntese de colesterol, diminui a viabilidade intracelular do ML, sugerindo que o colesterol é importante para sua sobrevivência neste tipo celular. Em seguida comprovamos a expressão da enzima 3 β -HSD *in vivo* através da sua detecção com anticorpo específico em biópsias de pele de pacientes lepromatosos. Numa etapa seguinte mostramos a capacidade do composto SB100, inibidor previamente desenvolvido para a enzima homóloga de Mtb, de inibir a enzima de ML de duas formas: a) incubando ML vivo isolado de camundongos *nude* com [¹⁴C]colesterol e [¹⁴C]palmitato e monitorando a sua conversão a colestenoa por cromatografia em camada fina (TLC); e b) quantificando a redução de NAD a NADH após incubação de lisado da bactéria com colesterol. De forma inesperada, o bloqueio da 3 β -HSD também inibiu a produção de lipídios micobacterianos como o PGL-I e PDIM, observado através da incubação de ML vivo com [¹⁴C]palmitato, seguida de análise por TLC. De forma importante, pré-tratamento de ML com SB100 diminuiu a viabilidade intracelular do ML em células de Schwann infectadas, monitorado por qPCR. Também verificamos que a adição exógena de colestenoa a células de Schwann parece favorecer a sobrevivência intracelular do ML e que a colestenoa pode ser convertida em outros esteróis pela célula hospedeira. Nossos resultados sugerem que a enzima 3 β -HSD pode ter papel importante tanto na geração de poder redutor, essencial em vias anabólicas da bactéria, assim como de um perfil alterado de oxiesteróis que poderiam alterar funções na célula hospedeira relevantes durante a infecção. Concluindo, nosso estudo ampliou os conhecimentos acerca da importância do metabolismo de colesterol e do papel da 3 β -HSD na interação ML-célula de Schwann, revelando um alvo terapêutico potencial para novas intervenções visando o controle da neuropatia hanseniana.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae* (ML), which infects preferentially Schwann cells from peripheral nerves and skin macrophages. Neural lesions are the most severe symptom of this disease; therefore, understanding the molecular bases of ML-Schwann cells interaction is a relevant topic in leprosy pathogenesis. Studies demonstrate that ML modulates host cell metabolism leading to lipid droplet accumulation. Among the lipids that are accumulated, cholesterol is one of the most abundant and it is important for bacilli intracellular survival. Cholesterol is also relevant for other mycobacteriosis, such as in Tuberculosis, being an important carbon source for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) when it is under nutritional starvation on the host. During the evolutionary process, ML has suffered a drastic reduction of the number of functional genes when compared to Mtb. Among the genes lost by ML are the ones involved in cholesterol catabolism, with exception of the enzyme 3 β -Hydroxysterol dehydrogenase (3 β -HSD) that promotes cholesterol oxidation into cholestenone. Considering the idea that ML has only preserved genes essential to its survival inside the intracellular niche, this study has the goal to understand 3 β -HSD role in ML pathogenesis. First, we verified that Schwann cell treatment with atorvastatin, a cholesterol biosynthesis inhibitor, decreased ML intracellular viability, suggesting that cholesterol is important for its survival in this cell type. Then, we demonstrated the expression of 3 β -HSD enzyme *in vivo* through its detection with specific antibody in lepromatous patients' skin biopsies. In a next step, we demonstrated the ability of SB100 compound, a inhibitor developed for the Mtb homologous enzyme, to inhibit the ML enzyme in two ways: a) incubating live ML isolated from *nude* mice with [¹⁴C]cholesterol and [¹⁴C]palmitic acid and monitoring its conversion to cholestenone by thin layer chromatography (TLC) and b) quantifying NAD reduction to NADH after incubating ML lysates with cholesterol. Unexpectedly, blocking 3 β -HSD also inhibited the production of other mycobacterium lipids, such as PGL-I and PDIM, observed through incubation of live ML with [¹⁴C]palmitate, followed by TLC analysis. Importantly, pre-treatment of ML with SB100 decreased ML intracellular viability in infected Schwann cells. Moreover, we also verified that exogenous addition of cholestenone in Schwann cells cultures seemed to favor ML intracellular survival and that cholestenone may be converted into other sterols by the host cell. Our results suggest that the 3 β -HSD enzyme might have an important role both in generating reductive power, essential to bacteria anabolic pathways, as well as in an altered oxysterols profile, that might be relevant during the infection. Thus, the study expanded the knowledge about the importance of cholesterol metabolism and 3 β -HSD role in ML-Schwann cell interaction, revealing a potential therapeutic target for new interventions aiming at the control of leprosy neuropathies.

1. Introdução

1.1 – A hanseníase

1.1.1- Aspectos gerais, história e epidemiologia

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. A doença tem um período assintomático em que o patógeno fica incubado por cerca de 5 anos até o aparecimento dos primeiros sintomas, podendo se estender a até 20 anos de incubação (WHO, 2016b). Os principais sintomas incluem lesões cutâneas hipopigmentadas ou eritematosas com perda de sensibilidade, devido ao comprometido dos nervos periféricos, podendo também surgir nódulos (WHO, 2016b). A transmissão do bacilo ocorre principalmente através de aerossóis expelidos pelo nariz e boca dos indivíduos não tratados para contatos próximos e frequentes (Davey & Rees, 1974).

A hanseníase, também conhecida previamente como lepra, é uma doença ancestral. Alguns registros em antigos papiros egípcios de 1500 A.C (Ebbell & Banov Jr, 1937), assim como no velho e novo testamentos Bíblicos sugerem a ocorrência da hanseníase nesses períodos, embora ainda seja discutido se tais relatos estariam relacionados com outras enfermidades (Hulse, 1972). Acredita-se que a doença foi introduzida na região do mediterrâneo pelas tropas de Alexandre, o Grande, quando retornavam da campanha na Índia no terceiro século A.C. (Andersen, 1969; Mark, 2002).

Diversos registros arqueológicos confirmam evidências da hanseníase na antiguidade, sendo o registro mais antigo datado de 2000 anos A.C. encontrado na Índia, em que reporta alterações ósseas na região naso-maxilar, ossos dos braços, pernas, mãos e pés, características da forma lepromatosa da doença (Robbins et al., 2009). Houve ainda registros de achados arqueológicos em múmias egípcias do segundo século A.C (Dzierzykay-Rogalski, 1980). Outros estudos identificaram DNA de *M. leprae* extraído de ossos como, por exemplo, nos achados de uma tumba em Jerusalém, datada do primeiro século D.C. (Matheson et al., 2009); e em corpos medievais na Europa (Schuenemann et al., 2013).

No ano de 1873, o fisiologista G. H. A. Hansen isolou e identificou o agente etiológico da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*, o primeiro patógeno humano identificado (Hansen, 1874). Ao longo dos anos, muitos avanços na área da saúde tornaram possível o tratamento da hanseníase, como o surgimento dos antibióticos que permitiram o estabelecimento da poliquimioterapia (PQT), viabilizando seu

tratamento e cura. Contudo os danos e lesões neurais causados ao longo da infecção podem ser irreversíveis se a doença é diagnosticada tardiamente.

Embora a hanseníase possa ser tratada atualmente, muitos desafios ainda existem até sua total erradicação. A organização mundial de saúde (OMS) recentemente reforçou o comprometimento com a eliminação da doença, que apesar da redução marcante no número de casos mundiais, ainda apresentou uma prevalência de cerca de 200 mil casos até o início de 2016 e é endêmica em alguns países como Índia e Brasil (WHO, 2016a).

O Brasil é o segundo país com o maior número de novos casos no mundo, ficando atrás apenas da Índia (Figura 1), que apresentou cerca de 127 mil novos casos reportados em 2015, enquanto no Brasil, foram reportados cerca de 26 mil novos casos. As maiores taxas de prevalência e incidência da hanseníase são encontradas nos estados do Mato Grosso do Sul, Maranhão e Tocantins (Ministério da Saúde, 2016). Pode-se notar uma tendência à queda na incidência de novos casos de hanseníase ao longo dos anos no país, já que em 2005 foram reportados por volta de 40 mil novos casos (WHO, 2016a). Entretanto, as taxas de prevalência da hanseníase no Brasil ainda são consideradas altas, persistindo como um problema de saúde pública ainda nos dias atuais.

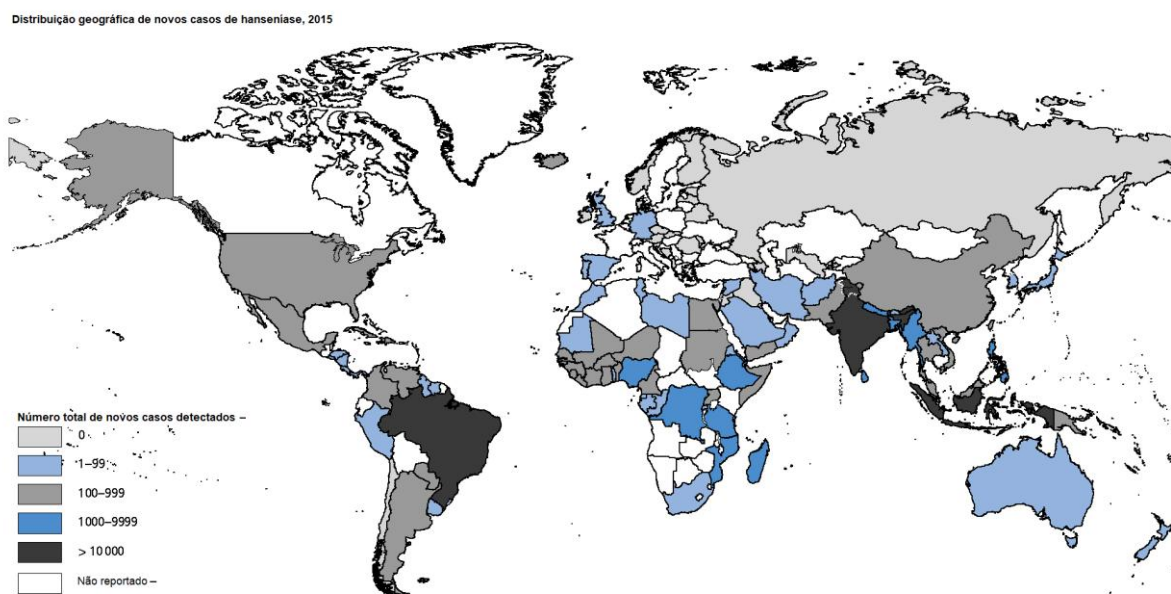


Figura 1 – Mapa do total de novos casos de hanseníase no ano de 2015. (Modificado de WHO, 2016a).

1.1.2 – Formas clínicas e reações

A hanseníase apresenta um espectro de manifestações clínicas e histopatológicas que permitem que seja classificada em duas formas polares e formas intermediárias graduais entre os polos segundo a classificação de Ridley e Jopling (1966) (Figura 2). Uma das formas clínicas polares é a Tuberculóide (TT), em que a doença se apresenta na sua forma mais branda, com poucos bacilos e lesões granulomatosas em menor número, com frequentemente apenas uma lesão. No outro extremo do espectro se encontram indivíduos com a forma polar Lepromatosa (LL), onde a doença apresenta as manifestações clínicas mais severas, com muitas lesões, macrófagos espumosos, e elevado número de bacilos. Entre os polos existe uma gradação das manifestações clínicas que podem ser enquadradas como *Borderline-Tuberculóide* (BT), *Borderline-Borderline* (BB) ou *Borderline-Lepromatosa* (BL). As formas clínicas TT e BT são consideradas paucibacilares (PB), devido à baixa quantificação de bacilos nas lesões, enquanto as formas BB, BL e LL são considerados multibacilares (MB), devido ao elevado número de bacilos (revisto em Misch et al., 2010).

O polo Tuberculóide da doença está comumente relacionado a uma resposta imunológica com um perfil Th1 (*T helper 1*), com elevada imunidade celular e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF (fator de necrose tumoral), IFN- γ (interferon gama), IL-12 (Interleucina-12), entre outras (Figura 2). Esse perfil de resposta imunológica observado no polo tuberculóide pode ser fundamental para o combate ao patógeno, limitando a disseminação da micobactéria e resultando em poucas lesões e poucos bacilos (revisto em Scollard et al., 2006). Em contrapartida, o polo lepromatoso está associado a uma baixa resposta imune com um perfil Th1, e, portanto, com baixa imunidade celular, associado à elevada produção de citocinas com funções predominantemente anti-inflamatórias, como IL-10 (interleucina 10) (Figura 2), o que contribui para o estabelecimento da infecção, uma vez que é uma resposta pouco eficiente para combate da micobactéria (revisto em Misch et al., 2010).

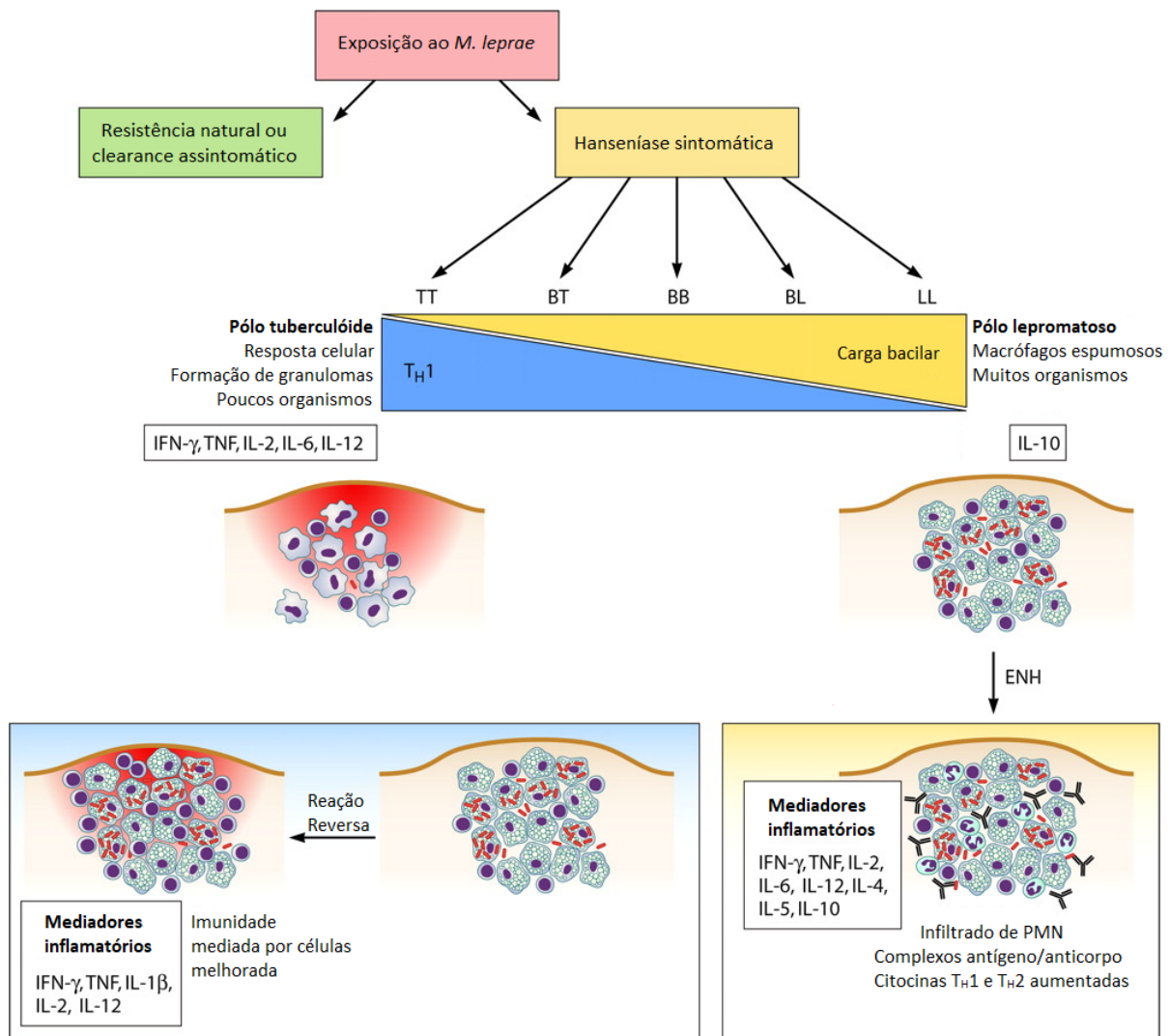


Figura 2 – Classificação da hanseníase e seus respectivos perfis de respostas imunológicas.

Uma parcela pequena dos indivíduos que são expostos ao *M. leprae* evolui para um quadro de infecção com sintomatologia clínica, enquanto grande parte é resistente à infecção e não desenvolve a doença. Entre os indivíduos que apresentam a doença, segundo a classificação de Ridley e Jopling (Ridley & Jopling, 1966), a hanseníase é classificada em dois polos extremos tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL), com formas intermediárias *Borderline* (BT; BB e BL). Nos polo TT, a resposta imunológica do hospedeiro apresenta um perfil celular e altamente pró-inflamatório, enquanto no polo LL, a resposta imune apresenta um perfil humoral e alta carga bacilar. Existem duas possíveis reações durante ou após o tratamento, conhecidas como reação reversa, em que ocorre um aumento da imunidade celular e de produção de citocinas pró-inflamatória e o outro tipo de reação, conhecida como eritema nodoso hansênico (ENH), caracterizado pelo infiltrado neutrofílico e deposição de imunocomplexos (Modificado de Misch et al., 2010).

Algumas evidências sugerem que o perfil genético do hospedeiro é determinante para a resposta ao bacilo. Cerca de 95% da população é naturalmente resistente à infecção pelo *M. leprae* (Lázaro et al., 2010) e alguns polimorfismos gênicos podem estar diretamente associados à susceptibilidade à hanseníase. Já foi

relatado, por exemplo, que polimorfismos no gene *park2* (Mira et al., 2004), que codifica a parkina, uma E3-ubiquitina ligase, estão relacionados com a susceptibilidade à doença. Também já foi reportado que o polimorfismo rs574318, que resulta em uma alteração de uma isoleucina por uma serina na posição 602 da sequência de aminoácidos do receptor do tipo toll 1 (TLR1), está associado a um comprometimento da via de sinalização de TLR1 e confere maior proteção contra a doença (Johnson et al., 2007). O perfil genético também pode determinar a forma clínica da doença. Dados da literatura, por exemplo, reportam que alguns haplótipos do gene da citocina anti-inflamatória IL-10 estão mais relacionados com um perfil multibacilar (Moraes et al., 2004). Existem ainda estudos que sugerem uma correlação entre o gene *tnf* e a polarização da doença (Mira et al., 2003). Um estudo genômico em larga escala utilizando amostras brasileiras reportou uma série de ligações, como a relação da região 6p21.32 do gene codificante para HLA (antígeno leucocitário humano) com a susceptibilidade à hanseníase em si, mas também reportou a relação de outras regiões com a polarização da doença (Miller et al., 2004).

Em alguns casos, a hanseníase pode apresentar reações inflamatórias exacerbadas durante o tratamento, que são altamente debilitantes e comprometem a continuidade da PQT, exigindo o uso de medicamentos adicionais para o combate às reações como os corticoides. Existem dois principais tipos de reações, uma é conhecida como reação do tipo I, também denominada de reação reversa (RR), que ocorre primariamente em pacientes *Borderline* (BT; BB e BL), em que se observa o aumento da resposta imune celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 2), podendo durar por diversas semanas ou meses. Os sintomas da reação reversa podem aparecer de forma gradual, em que se observa o aumento do número de eritemas normalmente associado às lesões e a reação frequentemente está associada a uma neurite progressiva, podendo evoluir para neuropatias sensoriais e motoras (revisto em Scollard et al., 2006). Já a reação do tipo II, conhecida como Eritema nodoso hansênico (ENH), acomete pacientes BL e LL, e está associada ao aparecimento de nódulos eritematosos espalhados usualmente na cabeça, troncos e extremidades podendo apresentar também quadros de febre e neurite. Nas lesões de ENH é observada a infiltração de neutrófilos (revisto em Scollard et al., 2006) e alguns indícios reportam a deposição de imunocomplexos (Wemambu & Turk, 1969) (Figura 2).

1.1.3 – A lesão neural na hanseníase

A infecção de nervos periféricos é um marco na hanseníase, em que o comprometimento dos mesmos pode ser irreversível, mesmo após a cura da doença. Inclusive, existem casos em que a hanseníase acomete apenas os nervos periféricos, levando a perda de sua função e redução de sensibilidade, sem a ocorrência de lesões cutâneas (Pannikar et al., 1983), compreendendo a forma neural pura da hanseníase.

A forma neural pura é mais rara, ocorre em 4-8% dos casos (Wilder-smith, 2002), e o maior desafio é o diagnóstico. O diagnóstico exige a identificação de *M. leprae* em biópsias de nervos afetados, seja por detecção do bacilo álcool-ácido resistente (B.A.A.R.) na biópsia ou por detecção de DNA de *M. leprae* por PCR (reação em cadeia da polimerase) (Da Cunha et al., 2006) e observação das características histológicas da biópsia (Antunes et al., 2012), mas eventualmente necessita de metodologias adicionais para confirmar o diagnóstico, como sorologia anti-PGL-I (glicolípido fenólico) (Jardim et al., 2005) ou imunohistoquímica (Medeiros et al., 2014). De modo geral, não há alterações cutâneas aparentes, mas em alguns casos os tecidos cutâneos adjacentes já apresentam alterações histológicas características da hanseníase, ou mesmo alterações cutâneas podem se desenvolver posteriormente, necessitando então de um acompanhamento do paciente (Kumar, 2016).

A inflamação do tecido perineural, que envolve os feixes de fibras nervosas, se encontra presente na maioria dos casos de dano neural na hanseníase (revisto em Scollard et al., 2015) e já foi relatada a atrofia do nervo durante a hanseníase, demonstrando a redução do calibre das fibras (Shetty et al., 1988) e inflamações adjacentes aos pontos infectados, causando principalmente edema (revisto em Scollard, 2008). Embora os mecanismos de lesão neural ainda não estejam completamente elucidados, além da inflamação crônica presente no tecido (revisto em Scollard et al., 2015), um dos principais fatores para o desenvolvimento do dano neural seria a infecção das células de Schwann nos nervos periféricos pelo *M. leprae*.

1.1.4 – Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico usual da hanseníase é feito primariamente a partir da observação dos sinais clínicos e sintomas, aliado à verificação dos aspectos

histológicos da lesão e detecção dos bacilos em lâminas derivadas de esfregaços cutâneos e/ou biópsias retiradas das lesões, usualmente da pele (Scollard et al., 2006). Para observação ao microscópio, as lâminas são coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen e os bacilos são contados por campo para obtenção do índice baciloscópico (IB) (Reibel et al., 2015), que é correlacionado em uma escala logarítmica (Ridley & Hilson, 1967).

A OMS propõe uma forma mais simplificada de classificação das formas da doença para diagnóstico, dividindo em dois grupos, um grupo caracterizado como multibacilar e outro paucibacilar. Em 1998, a OMS alterou os parâmetros de classificação, baseando-se na avaliação do número de lesões, em que indivíduos com menos de 5 lesões são classificados como paucibacilares, e indivíduos com seis lesões ou mais são considerados multibacilares (WHO, 1998).

Em casos de hanseníase paucibacilar com poucas lesões ou somente uma única lesão e poucos bacilos, a busca por bacilos na microscopia pode se tornar um desafio para o diagnóstico. Sendo assim, cada vez mais, novos esforços com o intuito de auxiliar o diagnóstico estão sendo feitos, principalmente utilizando ferramentas de biologia molecular, como a PCR, que são mais sensíveis. Dessa forma, estudos recentes foram capazes de detectar a presença de genes específicos de *M. leprae* em biópsias de pacientes utilizando PCR, incluindo pacientes do polo tuberculóide, mostrando que essa técnica pode ser uma ferramenta para contribuir no diagnóstico de casos atípicos (Barbieri et al., 2014). O uso de PCR como ferramenta de diagnóstico já foi avaliado para diversos alvos como o gene *fbpB*, que codifica a proteína Ag85B (Martinez et al., 2006) e a região repetitiva RLEP (Truman et al., 2008). O uso da ferramenta de PCR também está sendo empregado para acompanhar o tratamento da doença. Alguns estudos relacionam a viabilidade do *M. leprae* após o tratamento avaliando a expressão de RNA (Kurabachew et al., 1998). Martinez e colaboradores (Martinez et al., 2009) avaliaram a eficiência do tratamento com rifampicina *in vitro* sobre a viabilidade do *M. leprae* fazendo uma relação entre RNA e DNA da micobactéria, utilizando o RNA ribossomal (rRNA) 16S, o gene *sodA* e a região repetitiva RLEP.

Existem ainda testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-PGL-I, um componente exclusivo da parede celular do *M. leprae*, que são usualmente utilizados em estudos de epidemiologia, mas pouco utilizados na clínica devido à baixa sensibilidade do método (revisado em Scollard et al., 2006).

No teste cutâneo da lepromina, o antígeno do *M. leprae* é injetado e avalia-se a resposta imunológica e formação do edema após 4 semanas. Contudo, o teste da lepromina não se enquadra num teste de diagnóstico ou de exposição ao bacilo, atuando mais como um avaliador da capacidade de resposta granulomatosa do indivíduo, e apesar de não ser uma resposta específica ao *M. leprae*, a ausência de resposta indicaria uma possibilidade de desenvolver uma forma lepromatosa (revisto em Scollard et al., 2006)

A hanseníase possui tratamento estabelecido, um regime combinado dos antibióticos rifampicina e dapsona por 6 meses para os pacientes paucibacilares e rifampicina, dapsona e clofazimina para os pacientes multibacilares durante um período de 12 meses (WHO, 2016a), pacientes com forma indeterminada por dificuldade de diagnóstico são tratados segundo o regime administrado para pacientes multibacilares. A PQT foi introduzida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1982 (WHO, 2016a), após a evidência de resistência ao tratamento unicamente com Dapsona (Pettit & Rees, 1964), que revelou a necessidade de padronização do tratamento em combinação com outras drogas, surgindo então a poliquimioterapia (PQT).

Ainda não existem vacinas preventivas específicas para o *M. leprae*, mas estudos apontam que a vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) confere proteção ao *M. leprae*. Estudos no Brasil mostram que o uso da BCG pode ser bastante relevante para proteção dos casos de contatos próximos de pacientes hanseníacos (Düppre et al., 2008) e ainda que as duas medidas adotadas pelo ministério da saúde para controle da infecção: tratamento de pacientes e vacinação dos contatos com BCG são eficientes para proteção à doença e favorecem o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e específica para antígenos micobacterianos (de Carvalho et al., 2017).

1.2 – O *Mycobacterium leprae*

1.2.1– Características gerais e parede celular

O agente etiológico da hanseníase, *M. leprae*, é um patógeno intracelular obrigatório que infecta preferencialmente células de Schwann do sistema nervoso periférico e macrófagos da pele (revisto em Scollard et al., 2006). O *M. leprae* tem metabolismo respiratório microaerófilo, apresenta forma bacilar e é considerado um

bacilo álcool-ácido resistente, devido à composição altamente lipídica de sua parede celular.

A parede celular das micobactérias de modo geral apresenta um *core* que é formado pelo peptidoglicano, composto por cadeias alternadas de N-acetilglicosamina e N-glicolilmuramato, ligado a uma camada de arabinogalactana. Os ácidos micólicos estão associados aos resíduos terminais de arabinose da arabinogalactana, formando uma região conhecida como folheto interno da pseudo bicamada. Existem ainda outros lipoglicanos que estão ancorados na membrana plasmática como os fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), lipomananas (LM) e lipoarabinomananas (LAM). A parede celular do *M. leprae* ainda apresenta um folheto externo da pseudo bicamada que é composto por outros lipídios e carboidratos que ficam ancorados aos ácidos micólicos, como o ftiocerol dimicocerosato (PDIM), monomicolato de trealose (TMM), os PIMs e o glicolípido fenólico I (PGL-I), que por sua vez é um componente específico do *M. leprae*. (Figura 3) (revisto em Scollard et al., 2006).

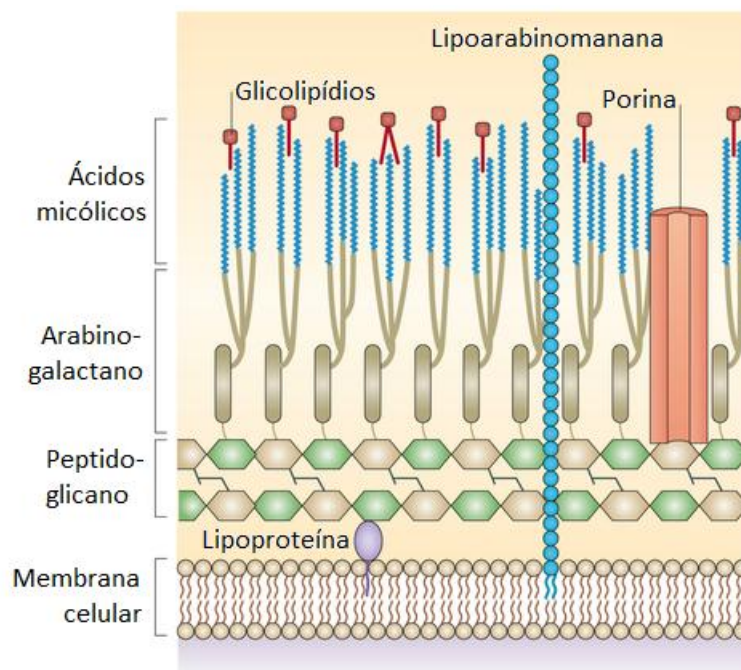


Figura 3 – Esquema simplificado da parede celular de micobactérias. Acima da membrana plasmática está posicionada a camada de peptidoglicano que está ligado à camada de arabinogalactana, que por sua vez está associada aos ácidos micólicos, formando o *core* da parede celular da micobactéria. Associado aos ácidos micólicos, formando o folheto externo da pseudo bicamada, estão outros componentes e lipídios não covalentemente ligados como PDIM e glicolípídios, mas que a composição varia de acordo com a espécie. No caso do *M. leprae*, o glicolípido fenólico I (PGL-I) é um dos principais componentes da camada mais externa da parede celular. Ainda associado à membrana plasmática, encontra-se a lipoarabinomanana (LAM). (Modificado de Brown et al., 2015)

1.2.2 – Modelos experimentais

O *M. leprae* apresenta crescimento lento, levando cerca de 14 dias para se duplicar (Shepard, 1985), com temperatura de crescimento de 30-33°C (Truman & Krahenbuhl, 2001) e até o momento não é possível cultivá-lo *in vitro*. Desde seu isolamento e descoberta, Hansen realizou várias tentativas de estabelecer infecções em coelhos, e ao longo dos anos diversos outros modelos animais foram testados, como ratos, porcos, primatas não humanos, entre outros, todos sem sucesso (Johnstone, 1987).

Contudo, em 1960, Shepard demonstrou ser possível estabelecer a infecção inoculando *M. leprae* no coxim plantar das patas de camundongos CFW, tendo sido observadas lesões granulomatosas proporcionais ao número de bacilos inoculados, mas que não disseminam. Além disso, também foi observada uma multiplicação modesta do bacilo (Shepard, 1960). O estabelecimento do modelo de Shepard foi fundamental para os avanços dos estudos *in vivo* e *in vitro* da hanseníase. Shepard, inclusive, em 1962, aproveitou seu modelo para determinar o impacto de certas drogas na viabilidade do *M. leprae* (Shepard & Chang, 1962). Apesar de ter sido fundamental, o modelo de Shepard é muito limitado para obtenção de grandes quantidades de bacilo para estudos *in vitro*, necessitando modelos adicionais.

Ao longo dos anos, um novo modelo animal foi proposto utilizando o tatu de nove bandas (*Dasyurus novemcinctus*) ao observar que o tatu é susceptível à doença (Kirchheimer & Storrs, 1971; Kirchheimer et al., 1972) e sua temperatura corporal mais fria entre 33-35°C (Storrs, 1971) favorece o crescimento do *M. leprae*. O tatu pode ser usado como um bom modelo animal para estudos *in vivo*, pois manifesta a doença sistemicamente, sendo encontrados tatus naturalmente infectados (Binford et al., 1977) (Figura 4A).

O tatu de nove bandas é considerado um reservatório natural, tendo sido encontrado em muitos casos nos Estados Unidos, tatus selvagens infectados (Truman, 2005). Inclusive os tatus são os maiores suspeitos de estarem envolvidos nos casos autóctones de hanseníase, uma vez que foi reportada que na maioria dos casos o *M. leprae* encontrado nos pacientes apresentava o mesmo genótipo que as micobactérias detectadas nos tatus selvagens nos estados do sul dos Estados Unidos (Truman et al., 2011). Um estudo no Brasil apontou uma relação entre a exposição e contato com tatus e o desenvolvimento de hanseníase, sugerindo que há maior risco de contrair a doença quando há contato com o animal (Deps et al., 2008). Mais recentemente, um estudo também reportou a ocorrência de esquilos

vermelhos na Inglaterra, naturalmente infectados por uma cepa ancestral de *M. leprae* e com algumas lesões características de hanseníase (Avanzi et al., 2016), sugerindo que também possam ser reservatórios naturais e que ainda muitos estudos devem ser feitos para elucidar a possibilidade de existência de outros reservatórios.

A infecção de órgãos do tatu com *M. leprae* permite a obtenção de grandes quantidades do bacilo para estudos *in vitro*, sendo uma vantagem em relação ao modelo de Shepard. Entretanto, apesar de todos esses fatores, por ser um animal atípico como modelo de infecção e ser mais complexo manter colônias e obter reagentes laboratoriais específicos para tatus, seu uso como modelo animal ainda é muito limitado.

Como no modelo de Shepard a infecção é autolimitante e gera poucos bacilos, proporcionando um número máximo em torno de 10^6 , mesmo quando o inóculo inicial parte de 10^6 ou mais (Shepard, 1960), começou-se a relacionar a limitação do crescimento bacilar com a eficiência da resposta imunológica em conter a infecção. Estudos subsequentes utilizando camundongos timentomizados e irradiados mostraram que a infecção das patas com *M. leprae* levou ao crescimento da bactéria em bons números e que o inóculo, mesmo pela via intravenosa, que é pouco usual, resultou em uma infecção disseminada, encontrando depois bacilos nas patas e orelhas dos camundongos, sugerindo assim que as células T têm papel fundamental no controle da hanseníase no camundongo e que camundongos imunocomprometidos sejam modelos de infecção mais eficientes (Rees et al., 1967). Outro estudo infectando as patas de camundongos *nude* congenitamente atímicos mostrou um crescimento bacteriano bem significativo, sugerindo ser um modelo experimental melhor para obtenção de bactéria que modelos que usam camundongos imunocompetentes (Colston & Hilson, 1976). De fato Lancaster e colaboradores demonstraram que a infecção do camundongo atímico *nude* pelo *M. leprae* dissemina e alcança proporções sistêmicas, além de reportar que o crescimento bacteriano é exponencial e em escala comparável ao obtido em tatu (Lancaster et al., 1983). Com isso, atualmente o modelo de infecção em patas de camundongos atímicos *nude* é amplamente utilizado como meio de obtenção de bactérias viáveis para estudos *in vitro* (Figura 4B) (Truman & Krahenbuhl, 2001).

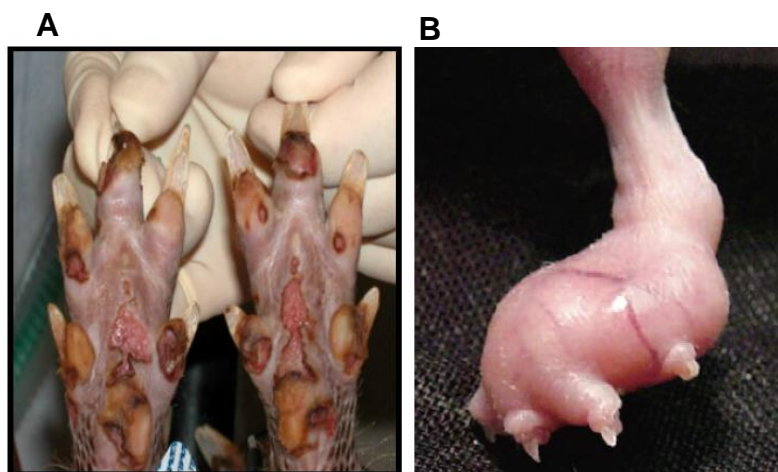


Figura 4 – Modelos animais de infecção com o *M. leprae*. (A) Lesão avançada na pata do tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*). (Sharma et al., 2013) (B) Lesão no coxim plantar na pata de camundongo congenitamente atímico *nude* com 6 meses de infecção. (Modificado de Scollard et al., 2006).

A determinação da viabilidade do bacilo também é crucial para a eficiência dos experimentos *in vitro*. Ao longo dos anos diferentes técnicas foram desenvolvidas para compensar a ausência de crescimento bacteriano em meio axênico. A técnica padrão ouro atualmente para determinação da viabilidade do *M. leprae* é a radorrespirometria, que mede a produção de $^{14}\text{CO}_2$ gerado a partir de ^{14}C -palmitato dado à micobactéria, em um processo dependente de atividade metabólica do bacilo (Franzblau, 1988; Truman & Krahenbuhl, 2001). Outros métodos, como a coloração com corantes vitais também são amplamente utilizados e tem eficiência comparável à técnica de radorrespirometria (Lahiri et al., 2005). Existem, por exemplo, kits comerciais que utilizam dois corantes, como o iodeto de propídio (PI) e Syto9. Ambos corantes tem afinidade para ácidos nucleicos, porém o Syto9 é capaz de penetrar em membranas intactas, enquanto o PI apenas penetra em células mortas, com a membrana pouco integra. Dessa forma, células viáveis apenas serão coradas com Syto9, enquanto células mortas serão coradas com ambos os corantes.

Recentemente, o uso de técnicas moleculares para determinação da viabilidade das micobactérias tem ganhado espaço, principalmente pela sensibilidade dos métodos. Em sua maioria os métodos se baseiam na detecção de RNA da micobactéria por qRT-PCR (Hirawati et al., 2006; Kurabachew et al., 1998; Martinez et al., 2009; Patel et al., 1993; Save et al., 2016), uma vez que o RNA é uma molécula com baixa estabilidade, quando comparado, por exemplo, com o

DNA, e, portanto, a presença de RNA micobacteriano indica que o mesmo foi recentemente produzido por micobactérias viáveis (Patel et al., 1993). Martinez e colaboradores (2009) demonstraram a eficiência de determinar a viabilidade a partir do RNA de determinados alvos do *M. leprae* por qPCR, mostrando que tem eficiência comparável aos métodos citados acima e foi eficaz em determinar a viabilidade *in vitro*. Esse estudo propõe não só a detecção de RNA do *M. leprae*, mas também a normalização pelo conteúdo de DNA da micobactéria, que é utilizado como medida indireta da quantidade de bacilos (Martinez et al., 2009) e assim como outros autores (Hirawati et al., 2006; Kurabachew et al., 1998; Save et al., 2016), também utilizam o gene do RNA ribossomal 16S como alvo nos ensaios de viabilidade por conta de sua abundância e facilidade de detecção (Martinez et al., 2009). Outros estudos também demonstraram a aplicabilidade dos métodos moleculares para determinar a viabilidade do *M. leprae* em biópsias de pacientes (Davis et al., 2013).

1.2.3 – Genoma e evolução

Em 2001, Cole e colaboradores contribuíram fortemente com os avanços no estudo da hanseníase ao sequenciar e anotar o genoma de *M. leprae* de um isolado indiano mantido em tatu, e conhecido como cepa Tamil Nadu (TN). O *M. leprae* apresenta um genoma com cerca de 3,3 Mb, em que apenas metade do seu genoma é composto por regiões codificantes, enquanto cerca de 27% representa pseudogenes (Cole et al., 2001). Seu genoma é bem reduzido quando comparado ao genoma do *M. tuberculosis*, que possui cerca de 4,4 Mb (Cole et al., 1998).

Acredita-se que seu genoma é resultante de uma evolução reducional, em que, devido à sua característica como patógeno intracelular obrigatório, muitos genes foram perdidos ao longo da evolução ou estão atualmente na forma de pseudogenes. Com isso, o bacilo manteve apenas os genes essenciais, enquanto parte de suas necessidades são atendidas pelo metabolismo da célula hospedeira (Sakharkar et al., 2004). Dessa forma, observa-se pouca redundância no genoma do *M. leprae*, como é visto em *M. tuberculosis* e muitas vias, principalmente vias catabólicas estão truncadas ou extremamente simplificadas. A via glicolítica foi mantida intacta e o ciclo de Krebs apresenta algumas variações, mas ainda assim funcional. Contudo, a cadeia de transporte de elétrons da fosforilação oxidativa está truncada. O *M. leprae*, por exemplo, não conservou todas as subunidades do complexo I, a NADH desidrogenase, o que afeta diretamente a síntese de ATP

(adenosina trifosfato), e também a regeneração de NAD oxidado (NAD⁺). Entretanto, as vias anabólicas permaneceram em sua maioria sem grandes alterações (Cole et al., 2001).

Um estudo comparativo com 7 cepas de diferentes locais demonstrou que as diferenças entre genomas são mínimas, com uma taxa menor de SNPs (polimorfismos de base única) ao longo do genoma do que outros patógenos como *M. tuberculosis*, apresentando um genoma extremamente conservado (Monot et al., 2005). O sequenciamento de outra cepa de *M. leprae* isolada do Brasil, a cepa BR4923 reforçou as observações feitas após o sequenciamento da cepa TN. Foi visto que a cepa BR4923 apresenta 141 pb a menos que a cepa TN, mas ainda assim é altamente clonal (Monot et al., 2009). O estudo ainda comparou a cepa TN, BR4923 e mais duas outras cepas e constatou que a semelhança entre elas é de 99,995%, o que facilita a busca por novos alvos terapêuticos. Por exemplo, dentro de cerca das 1600 proteínas totais estimadas codificadas pelo *M. leprae*, apenas 49 apresentariam alguma diferença na sequência de aminoácidos (Monot et al., 2009), reforçando a sugestão do genoma altamente conservado do *M. leprae*.

Dados da literatura apontam que existem 4 SNPs informativos chamados de SNP 1 a 4 que estão diretamente associados com a localidade de onde a cepa foi isolada e podem ser usados para inferir a distribuição das cepas no mundo (Monot et al., 2005). Um estudo mais recente do mesmo grupo, utilizando mais isolados e ampliando os locais de origem dos mesmos, desdobrou os 4 SNPs originais em subtipos, gerando 16 SNPs no total e assim contribuindo ainda mais para determinação da distribuição filogeográfica das cepas (Monot et al., 2009). O grupo observou que a filogeografia das cepas segue o padrão de migrações da humanidade ao longo da história (Figura 5). Assim, o SNP do tipo 2 seria o ancestral precursor das cepas atuais de *M. leprae*, surgindo no Leste da África. Acompanhando as migrações humanas, esta cepa teria sido introduzida no sul da Ásia dando origem ao SNP 1 e seus subtipos, que então teriam dado origem ao SNP 3 e seus subtipos na Europa e Oriente Médio. Estes últimos teriam sido carregados até as Américas, onde teriam dado origem ao SNP 4 e seus subtipos que também teriam sido carregados para o oeste da África (Monot et al., 2009). Pode-se observar também a ocorrência de cepas em locais diferentes de seus locais de origem por conta dos processos de migração e viagens ao longo dos anos, como por exemplo, se observam genótipos do SNP tipo 2 nas Américas que foram trazidos com o comércio de escravos vindo da África (Monot et al., 2009).

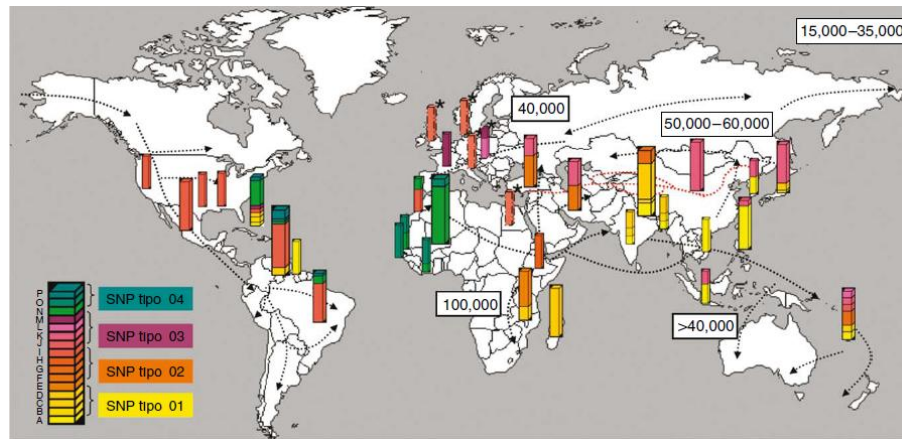


Figura 5 – Distribuição filogeográfica do *M. leprae*. A micobactéria pode ser genotipada e dividida em quatro grande classes de SNPs, cada uma com suas divisões e a distribuição das cepas segue o padrão de migrações humanas, com isso pode-se associar um determinado SNP à uma região geográfica. O SNP do tipo 2 seria o ancestral, presente no Leste da África e deu origem então ao SNP do tipo 1, mais prevalente na região da Ásia. O SNP do tipo 3, mais prevalente no Oriente Médio e Europa, por sua vez surgiu a partir da cepa contendo o SNP do tipo 2 e então as migrações até as Américas introduziram o *M. leprae* no continente e então culminando no surgimento do SNP do tipo 4. (Modificado de Monot et al., 2009).

1.3 – A interação do *M. leprae* com a célula de Schwann

As células de Schwann são as principais células gliais no sistema nervoso periférico, uma vez que todos os axônios nos nervos periféricos apresentam alguma interação com as células de Schwann. Elas podem ser divididas em diferentes tipos, em que os dois tipos mais estudados e caracterizados são as células de Schwann mielínicas, capazes de produzir a bainha de mielina e as células de Schwann amielínicas, que não produzem mielina (revisto em Corfas et al., 2004). Ambos os tipos são derivados de um mesmo precursor celular, mas quando inteiramente diferenciadas, apresentam funções e composições bioquímicas bem distintas e ambas são relevantes durante a hanseníase. As células de Schwann mielínicas são capazes de produzir a bainha de mielina, que consiste em um enrolamento em espiral da membrana plasmática sobre si mesma, gerando uma estrutura modificada e especializada, crucial para o envolvimento e isolamento de axônios de largo calibre, permitindo assim impulsos nervosos rápidos e saltatórios (revisto em Corfas et al., 2004). Já as células de Schwann amielínicas formam envoltórios simples ao redor de axônios de pouco diâmetro e, diferentemente das mielínicas que normalmente envolvem um único axônio, frequentemente envolvem múltiplos axônios (revisto em Corfas et al., 2004).

Todas as células de Schwann estão envoltas por uma lâmina basal, uma estrutura organizada em associação direta com a membrana celular e constituída por diferentes componentes da matriz extracelular. Já foi demonstrado que a laminina é um importante componente da lâmina basal de células de Schwann, que é produzida quando há o contato com axônios (Cornbrooks et al., 1983). Ainda foi relatado que, juntamente com a sinalização promovida pela interação com o axônio, a sinalização proveniente da lâmina basal é um importante fator para direcionar o processo de diferenciação da célula de Schwann em uma célula mielinizante ou não mielinizante (revisto em Court et al., 2006).

A interação do *M. leprae* com a lâmina basal de células de Schwann já foi amplamente descrita, em que dados da literatura apontam que a micobactéria interage especificamente com os domínios G da cadeia alfa 2 da laminina-2, que é encontrada primariamente na lâmina basal de células de Schwann, e assim explicaria o tropismo por nervos periféricos (Rambukkana et al., 1997). A laminina-2 é reconhecida pelo receptor α -Distroglicana na célula de Schwann que está ancorado ao citoesqueleto, dessa forma sendo um dos fatores responsáveis pelo ancoramento da célula à sua lâmina basal (Ervasti & Campbell, 1993). Rambukkana e colaboradores demonstraram que o *M. leprae* também interage com o receptor α -Distroglicana através do domínio G da laminina-2, (Rambukkana et al., 1998), mostrando que a micobactéria potencialmente se utiliza da interação com a laminina-2 e o complexo distroglicano para invadir a célula de Schwann (Figura 6). Já para outras células hospedeiras, como macrófagos, foi proposta a interação com outros receptores de superfície, como o receptor de manose (Astarie-Dequeker et al., 1999; Prigozy et al., 1997) e o receptor de complemento C3 (Schlesinger & Horwitz, 1991).

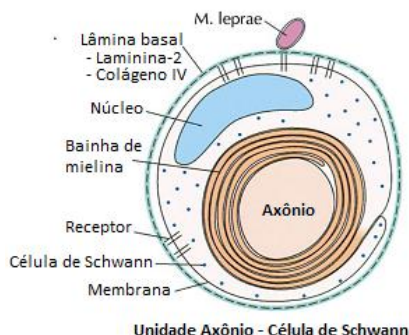


Figura 6 – Esquema da interação do *M. leprae* com a unidade axônio-célula de Schwann. O esquema demonstra a interação do *M. leprae* com a laminina-2 na lâmina basal da célula de Schwann mielinizante que envolve o corpo axonal, necessária para a invasão da célula de Schwann (Modificado de Ng et al., 2000).

Posteriormente, diversos estudos buscaram caracterizar adesinas na superfície do *M. leprae* que estariam envolvidas na interação com a laminina-2. Inicialmente foi descrita a interação de uma proteína de 21 kDa, a proteína ML-LBP21, também chamada Hlp, com a laminina-2 (Marques et al., 2000; Shimoji et al., 1999). Num estudo posterior, Ng e colaboradores (2000) demonstraram que o lipídio PGL-I, específico do *M. leprae*, interage com a laminina-2 e é capaz de mediar a interação do *M. leprae* com a célula de Schwann, permitindo então que a micobactéria atravesse a lâmina basal e invada a célula de Schwann. Os autores ainda demonstraram que a interação com a laminina-2 é mediada pela porção sacarídica terminal do PGL-I, que é a porção específica e diferente dos outros glicolipídios fenólicos de outras micobactérias (Ng et al., 2000). Recentemente, dados do nosso grupo reforçaram as observações que o PGL-I é importante para interação com a célula de Schwann, ao observar que a micobactéria *M. bovis* BCG recombinante expressando o PGL-I é capaz de aderir e ser internalizada pela célula de Schwann, enquanto o mesmo não é observado para o *M. bovis* BCG selvagem (Acosta, 2016).

A linhagem celular humana de schwannoma ST88-14 tem sido amplamente utilizada como modelo para estudos de interação patógeno-célula hospedeira *in vitro* e se assemelha às células de Schwann amielínicas (da Silva et al., 2008). Estudos com a linhagem ST88-14 demonstraram que a mesma é capaz de fagocitar o *M. leprae*, e após 4 horas de infecção, já são observadas bactérias internalizadas. Uma vez tendo invadido a célula, a micobactéria interfere no processo de maturação e acidificação endossomal, visto que pouca co-localização é vista entre micobactérias viáveis e vesículas ácidas (Alves et al., 2004), contribuindo assim para a sobrevivência do bacilo dentro da célula hospedeira. Um outro estudo demonstrou que a infecção de células de Schwann pelo *M. leprae* promove a sobrevivência da célula *in vitro* através da indução da produção do fator de crescimento semelhante à insulina, IGF-1, que tem atividade reconhecidamente anti-apoptótica (Rodrigues et al., 2010).

Em contrapartida, um outro trabalho mostrou que o estímulo ao receptor do tipo toll 2 (TLR2) em células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 com uma lipoproteína de *M. leprae* levou a um número elevado de células apoptóticas, sugerindo que possa contribuir para os mecanismos de lesão neural (Oliveira et al., 2003). Adicionalmente, dados da literatura apontam que a infecção de células de

Schwann pelo *M. leprae* estimula a produção de TNF e TGF- β (Fator de crescimento tumoral beta), podendo assim contribuir com o processo inflamatório no nervo periférico e, assim, ser mais um fator decisivo para o desenvolvimento da lesão neural (Oliveira et al., 2005).

Rambukkana e colaboradores (2002) demonstraram que a micobactéria é capaz de se associar tanto às células de Schwann mielínicas e amielínicas, contudo as células de Schwann mielínicas são mais resistentes à invasão, enquanto células amielínicas são prontamente invadidas pelo *M. leprae* (Rambukkana et al., 2002). O estudo ainda demonstrou que a adesão do *M. leprae* às células de Schwann mielínicas induz a desmielinização das mesmas, e que o PGL-I é essencial para o processo (Rambukkana et al., 2002), sugerindo que a desmielinização das células de Schwann seja um fator crucial para a ocorrência da lesão neural observada durante a hanseníase. Dados posteriores da literatura demonstraram que a infecção de células de Schwann pelo *M. leprae* leva a uma reprogramação do perfil de expressão gênica celular, culminando na desdiferenciação da célula e apresentação de um perfil semelhante à célula tronco (Masaki et al., 2013a). O mesmo grupo já havia demonstrado anteriormente que a infecção pela micobactéria ativa a via de ERK1/2 e leva a um aumento na proliferação das células de Schwann, já sugerindo a indução de um processo de desdiferenciação celular (Tapinos & Rambukkana, 2005). A célula de Schwann desdiferenciada induzida pelo *M. leprae* secreta uma série de citocinas e quimiocinas que contribuem para o recrutamento de macrófagos (Masaki et al., 2013a, 2014), e que podem ser cruciais para a dispersão e disseminação do *M. leprae*. Adicionalmente, foi demonstrado que a célula de Schwann reprogramada libera *M. leprae*, podendo também contribuir para a disseminação do bacilo (Masaki et al., 2013b).

A interação entre o *M. leprae* e a célula de Schwann ainda deve ser melhor estudada a fim de caracterizar todas as vias e processos celulares que são modulados para favorecer a infecção e manutenção do *M. leprae* no ambiente intracelular e promover sua sobrevivência.

1.4 – Metabolismo lipídico na hanseníase

1.4.1 – O metabolismo lipídico das células hospedeiras durante a infecção

O metabolismo lipídico da célula hospedeira é extremamente importante para a hanseníase, assim como para outras micobacterioses em geral. A relevância do metabolismo lipídico tem sido observada desde o início da caracterização da doença, já que um aspecto marcante das lesões de pacientes lepromatosos é a ocorrência de macrófagos espumosos, ricos em corpúsculos lipídicos, descrito inicialmente por Virchow em 1863 e posteriormente confirmado por Mattos e colaboradores (2010). O acúmulo de corpúsculos lipídicos também foi demonstrado em células infectadas pelo *M. tuberculosis* e em granulomas (Kim et al., 2010), reforçando a importância do metabolismo lipídico para a patogênese dessas micobactérias.

Dados da literatura apontam que existe uma preferência pelas micobactérias em metabolizar e utilizar substratos lipídicos ao invés de carboidratos como fonte de energia (Segal & Bloch, 1956). Já foi demonstrado que o *M. leprae* modula o metabolismo lipídico do hospedeiro, em que foi observado que lesões de pacientes lepromatosos exibem um aumento na expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipoproteínas e ácidos graxos (Cruz et al., 2008). A importância do metabolismo lipídico também se amplia para seu uso como fonte de carbono, pois os lipídios também são direcionados para a síntese de lipídios da parede celular da micobactéria, como por exemplo, o PDIM (Jain et al., 2007) que são importantes fatores de virulência e podem apresentar características imunomodulatórias (Ehrt & Schnappinger, 2007). O ensaio de respirometria mencionado anteriormente para avaliar a viabilidade do *M. leprae* também se baseia na propriedade do bacilo de prontamente degradar ácidos graxos via β -oxidação a CO_2 e água (Franzblau, 1988; Wheeler et al., 1991). Por outro lado, a incubação do *M. leprae* com ácido graxo marcado radioativamente resulta na incorporação do mesmo no PGL-I (Franzblau et al., 1987), mostrando a capacidade do bacilo de utilizá-los como fonte de carbono para síntese de lipídios micobacterianos.

O aspecto espumoso dos macrófagos em biópsias de pacientes lepromatosos está correlacionado com o acúmulo de corpúsculos lipídicos nessas células (Mattos et al., 2010; Tanigawa et al., 2008). A infecção pelo *M. leprae* em macrófagos humanos da linhagem THP-1 induz o aumento da expressão de ADRP e perilipina,

duas proteínas responsáveis na estruturação dos corpúsculos lipídicos (Tanigawa et al., 2008). Trabalhos do nosso grupo reforçaram estas observações, mostrando que o *M. leprae* induz o acúmulo de corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos primários infectados, através de um processo independente da viabilidade do bacilo, uma vez que tanto *M. leprae* vivo e morto induziram o acúmulo de corpúsculo na célula hospedeira (Mattos et al., 2010). O mecanismo de indução de corpúsculos em macrófagos é dependente de TLR2 e TLR6 e envolve uma sinalização parácrina, visto que corpúsculos são vistos também em células não infectadas, mas próximas às células infectadas (Mattos et al., 2010). O estudo ainda demonstrou que os corpúsculos lipídicos apresentam uma composição rica em colesterol e colesterol éster e são sítios de produção de prostaglandina E2 (PGE₂), um importante modulador da imunidade que regula negativamente a resposta Th1 (Betz & Fox, 1991), produzido em nível aumentado nas células infectadas (Mattos et al., 2010).

O acúmulo de corpúsculos lipídicos também foi observado em células de Schwann infectadas com *M. leprae*. Nestas células foi detectado o recrutamento dos corpúsculos para as vesículas contendo o bacilo, e que este recrutamento é importante para a sobrevivência intracelular da micobactéria (Mattos et al., 2011a). Nas células de Schwann, diferentemente do observado em macrófagos, a formação dos corpúsculos induzida por *M. leprae* apenas ocorre com a bactéria viável e é somente dependente de TLR6, e não TLR2 (Mattos et al., 2011b). Os corpúsculos lipídicos, além de serem importantes reservas lipídicas para fontes de carbono, também apresentam efeitos imunomodulatórios, estando relacionados com a produção de PGE₂ nas células de Schwann infectadas (Mattos et al., 2011b). O papel imunomodulatório de fosfolipídios oxidados, encontrados em abundância em lesões lepromatosas também foi reportado, correlacionando o mesmo com o aumento de produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e redução da secreção da citocina pró-inflamatória IL-12, contribuindo assim para a modulação da imunidade e com isso com a patogênese da hanseníase (Cruz et al., 2008).

1.4.2 – A síntese de lipídios da parede do *M. leprae*

A parede das micobactérias apresenta diversos componentes lipídicos que são cruciais para a virulência da micobactéria e assim reforçam a importância dos lipídios. O principal componente lipídico da parede celular das micobactérias são os ácidos micólicos, que são ácidos graxos alfa-acil beta hidroxil, compostos de duas cadeias de ácidos graxos, uma mais curta, de cerca de 26 carbonos e outra mais

longa, com até 56 carbonos e podem ser classificados em três categorias: alfa, metoxi e ceto (revisto em Minnikin et al., 2002), em que o principal tipo presente no *M. leprae* são os ácidos micólicos alfa (Kusaka et al., 1981). Os ácidos micólicos são sintetizados a partir das enzimas ácido graxo sintase I (FAS I) e ácido graxo sintase II (FAS II) (revisto em Abrahams & Besra, 2016). Enquanto a FAS I é responsável pela síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia de 16 a 26 carbonos, a FAS II é a principal responsável em alongar as cadeias gerando ácidos graxos mais longos, em um processo dependente tanto de NADPH quanto NADH e essas cadeias podem ser posteriormente modificadas adicionando grupos metoxi ou cetona (revisto em Abrahams & Besra, 2016) (Figura 7). A síntese dos ácidos micólicos acontece no citosol e embora ainda não esteja completamente elucidada sua transferência para a parede celular da micobactéria, acredita-se que esse processo ocorra através da formação de TMMs (Takayama et al., 2005) e a transferência ocorra com auxílio do transportador MmpL juntamente com a ação do antígeno 85, complexo de enzimas com atividade de micolil transferase responsável por ancorar o ácido micólico à porção de arabinogalactano na parede celular (Jackson et al., 1999).

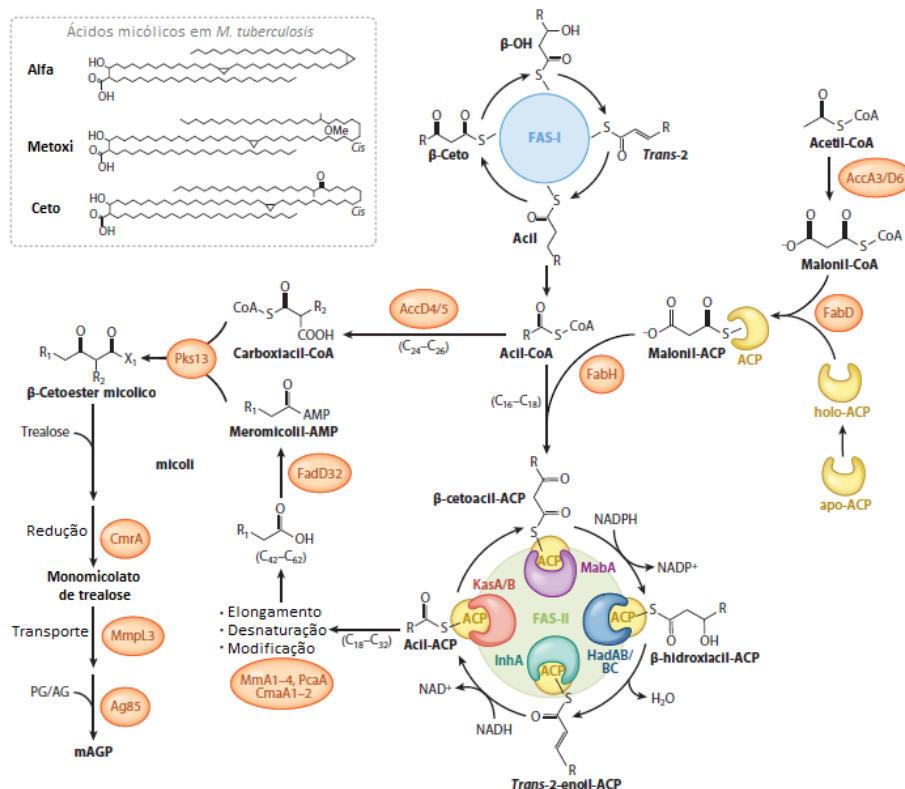


Figura 7 – Esquema da síntese de ácidos micólicos em *M. tuberculosis*. A síntese em *M. leprae* ocorre de forma similar em que a ácido graxo sintase I (FAS I) sintetiza ácidos graxos *de novo* com até 26 carbonos e a ácido graxo sintase II (FAS II) alonga os ácidos graxos formando moléculas de cadeias mais longas. (Modificado de Jankute et al., 2015)

Os demais lipídios da parede celular como PDIMs e PGLs são sintetizados por enzimas poliketídeo sintases. Já foi descrito que o cluster de genes ppsA-E é um dos principais responsáveis pela síntese das unidades de fenolftiocerol, no caso do PGL-I, e de ftiocerol, para o PDIM (Azad et al., 1997). Em ambos os lipídios são adicionados os ácidos micocerósicos, que por sua vez são sintetizados pela enzima MAS (ácido micocerósico sintase) (Trivedi et al., 2005) e então transferidos e covalentemente ligados à unidade de ftiocerol ou fenolftiocerol por ação da enzima PapA5 (Chavadi et al., 2012; Onwueme et al., 2004) (Figura 8). Assim como os ácidos micólicos, a síntese de PDIMs e PGL-I também ocorre no citosol e requer a translocação desses lipídios para a parede da micobactéria.

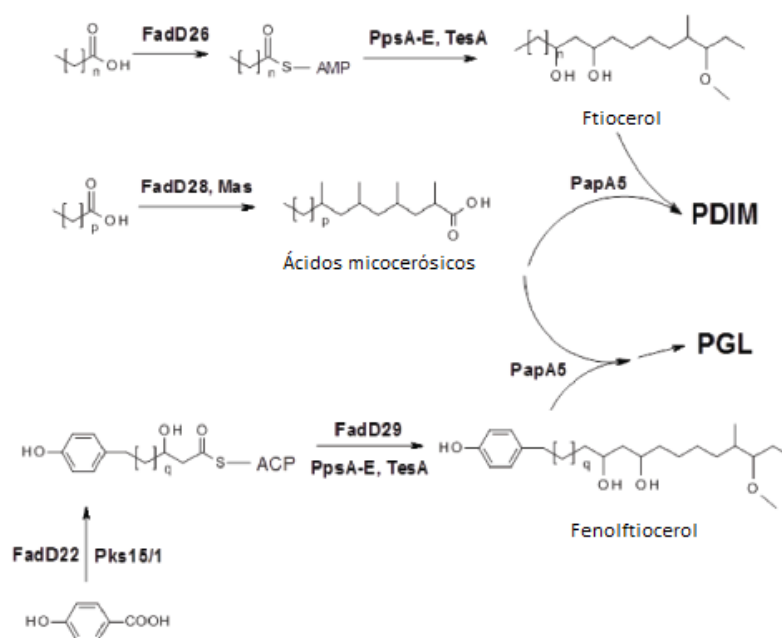


Figura 8 – Esquema de síntese de PDIMs e PGLs. (Modificado de Yu et al., 2012)

1.5 – O colesterol, seu metabolismo e as micobactérias

1.5.1 – A importância biológica do colesterol e seus derivados: Aspectos gerais

O colesterol é um lipídio de extrema relevância para a manutenção da homeostase celular, sendo um importante componente da membrana plasmática das células de mamíferos onde representa cerca de 20 a 25 % dos lipídios presentes (revisto em Ikonen, 2008). A estrutura do colesterol é crucial para a organização e compactação da membrana lipídica, diminuindo a sua fluidez, assim como a sua permeabilidade a compostos polares (revisto em Ikonen, 2008). O

colesterol é um lipídio neutro e apresenta um núcleo esteroide com quatro anéis, denominados de A, B, C e D e uma cadeia alifática, partindo do anel D e uma hidroxila no carbono 3 do anel A.

As principais fontes de colesterol para a célula são provenientes da dieta e da biossíntese *de novo*. A via do mevalonato é a principal via responsável pela biossíntese de colesterol a partir do acetil-coA e a transformação de HMG-CoA (hidroxi metil-glutaril-Coenzima A) em mevalonato por ação da enzima HMG-CoA redutase (HMGCR) é uma etapa limitante e com isso é um alvo potencial de regulação dessa via (Goldstein & Brown, 1990).

O fornecimento de colesterol pela dieta implica na distribuição do mesmo e de outros lipídios em lipoproteínas. O colesterol normalmente é fornecido para os tecidos através do LDL (lipoproteína de baixa densidade). O LDL circulante pode ser captado por células nos tecidos a partir de receptores de LDL (LDLR) na membrana, assim como outros receptores que reconhecem LDL modificado, como, por exemplo, receptores *scavengers* (Rhaids & Brissette, 1999). Quando há um acúmulo de colesterol nas células dos tecidos, elas podem ativar o transporte reverso de colesterol que envia o mesmo para o fígado via HDL (lipoproteína de alta densidade) (Kennedy et al., 2005).

No interior da célula, o colesterol captado a partir da endocitose do LDL pode apresentar dois mecanismos principais de tráfego intracelular, um transporte vesicular e um transporte não vesicular. O colesterol livre após hidrólise da lipoproteína no endossoma tardio ou lisossomo interage com as proteínas *Niemann Pick disease, type C1 e 2* (NPC-1 e NPC-2) e então é transferido para a membrana ou para fora do endossoma tardio, por um processo com mecanismo ainda desconhecido (Maxfield et al., 2016). Recentemente, foi atribuído ao colesterol livre presente no lisossomo a função de regulador da ativação da via de mTOR (Castellano et al., 2017), que está envolvido em vias de sobrevivência celular, regulação de metabolismo lipídico, autofagia, dentre outras (Laplante & Sabatini, 2009), assim ampliando o espectro de funções biológicas do colesterol na célula. No transporte não vesicular, as proteínas intracelulares da família START (*StAR-related lipid transfer*) são importantes carreadoras e facilitam o tráfego intracitoplasmático do colesterol (Tsuji-shita & Hurley, 2000). O colesterol também pode ser esterificado por ação da enzima Acil-CoA colesterol aciltransferase (ACAT) e então o colesterol éster formado é estocado na forma de corpúsculos lipídicos (revisto em Ikonen, 2008).

A homeostase de colesterol na célula é mediada pelos fatores de transcrição SREBP-2 (*Sterol regulatory binding protein 2*) e LXR (*Liver X receptor*) que atuam como sensores de colesterol. O SREBP-2, localizado no retículo endoplasmático, é ativado em situações de baixa concentração de colesterol celular, sendo responsável pela modulação positiva de proteínas responsáveis pela biossíntese, como a HMGCR, e pela captação de colesterol exógeno, como o receptor de LDL (Horton et al., 2002), resultando no acúmulo de colesterol. Já o LXR, que tem como ligantes clássicos, oxisteróis como o 24S-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 27-hidroxicolesterol e o precursor do colesterol, desmosterol (Yang et al., 2006), atua em situações de excesso de colesterol na célula. Estes ligantes ativam este fator de transcrição, aumentando a expressão de genes relacionados ao transporte reverso de colesterol, como os transportadores ABCA1 e ABCG1 (*ATP-binding cassette transporter*), aumentando o efluxo de colesterol (Spann & Glass, 2013), sendo um mecanismo que a célula apresenta capaz de regular os níveis intracelulares de colesterol.

Outra função importante do colesterol é a sua participação na formação de domínios na bicamada lipídica com baixa fluidez e conhecidos como *lipid rafts*, responsáveis pela organização de componentes de importantes cascatas de sinalização (Pike, 2003). No entanto, estudos recentes tem demonstrado uma participação mais direta do colesterol na regulação da atividade de proteínas, como em um estudo que demonstrou que o colesterol pode atuar como modulador alostérico de uma proteína translocadora mitocondrial (Jaipuria et al., 2017). Ainda, outras evidencias apontam que o colesterol pode ser importante para estabilizar diretamente a estrutura de uma série de proteínas membranares (Yang et al., 2016).

O colesterol ainda é utilizado como precursor para a formação de ácidos biliares e hormônios esteroides, além de poder sofrer modificações para a formação de oxisteróis, que apresentam funções biológicas importantes (Spann & Glass, 2013). A formação dos oxisteróis a partir do colesterol pode ser feita de forma enzimática, por enzimas pertencentes à família das citocromo P450, ou de forma não enzimática, através da oxidação mediada por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Spann & Glass, 2013). Os oxisteróis podem apresentar papel imunomodulatório, como já foi relatado, por exemplo, para o 25-hidroxicolesterol que inibe a ativação do inflamassoma e produção de IL-1 β (Reboldi et al., 2014). A ativação do LXR mediada pelos oxisteróis também apresenta papel anti-inflamatório em macrófagos, inibindo a síntese da enzima óxido nítrico sintase

(iNOS), de IL-6 e modulando negativamente a via de NF- κ B (Fator nuclear Kappa B) (Joseph et al., 2003). Já, o 27-hidroxicolesterol, um dos oxisteróis mais abundantes na placa aterosclerótica, apresenta papel pró-inflamatório, por exemplo, aumentando a síntese de TNF em macrófagos (Kim et al., 2013). Contudo, a ativação do LXR, pelo intermediário da via de síntese de colesterol, desmosterol, foi associada a um perfil anti-inflamatório em células espumosas, ricas em corpúsculos, no modelo de aterosclerose (Spann et al., 2012). Já foi reportado que camundongos *knock out* para os genes do LXR α e β são mais susceptíveis à infecção pelo *M. tuberculosis*, apresentando maior carga bacilar e um maior número de lesões granulomatosas (Korf et al., 2009). Portanto, os oxisteróis, por intermédio da ativação do fator de transcrição LXR, podem ter importância no estabelecimento de quadros infecciosos como no caso da hanseníase.

1.5.2 – Importância do colesterol na interação de micobactérias com o hospedeiro

O colesterol pode ser extremamente importante para determinados patógenos. Dados da literatura demonstram que uma série de patógenos intracelulares modulam o metabolismo de colesterol para favorecer a infecção, como em infecções de *Trypanosoma cruzi*, em que foi detectado o acúmulo de colesterol nos tecidos (Johndrow et al., 2013) e na toxoplasmose, em que foi observado que o *Toxoplasma gondii* modula o metabolismo de colesterol levando a um aumento da captação de LDL, que então favorece o acúmulo de colesterol na célula hospedeira (Coppens et al., 2000).

O colesterol também tem papel importante na interação das micobactérias com a célula hospedeira. Já foi descrito sua importância para a entrada das micobactérias na célula hospedeira, onde a depleção de colesterol das membranas diminui a fagocitose de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* por macrófagos (Gatfield & Pieters, 2000). O *M. tuberculosis* é capaz de induzir o acúmulo de colesterol nas regiões próximas ao bacilo, levando a formação de domínios na membrana ricos em colesterol, os *lipids rafts*, que são importantes para a entrada do bacilo em mastócitos (Muñoz et al., 2009)

A depleção do colesterol, além de afetar a internalização das micobactérias, também favorece a maturação do fagossoma e fusão com o lisossomo em macrófagos infectados com *M. avium* (de Chastellier & Thilo, 2006). O colesterol ainda é crucial para o recrutamento da proteína TACO para o fagossoma contendo a

bactéria (Gatfield & Pieters, 2000), processo que é importante para impedir a fusão do fagossoma com o lisossomo (Ferrari et al., 1999), contribuindo para o estabelecimento da infecção e sobrevivência intracelular das micobactérias.

O metabolismo de colesterol celular também é crucial para a manutenção da infecção. O acúmulo de colesterol éster em macrófagos infectados pelo *M. leprae* já havia sido reportado (Kurup & Mahadevan, 1982). Mais recentemente, nosso grupo demonstrou o acúmulo de colesterol em biópsias de pacientes LL e ainda demonstrou que a infecção pelo *M. leprae* modula o metabolismo de colesterol em monócitos primários humanos, direcionando a célula para o acúmulo do mesmo no fagossoma contendo o bacilo (Mattos et al., 2014). A via de biossíntese de colesterol é modulada positivamente na hanseníase lepromatosa, uma vez que foi reportado o aumento da expressão de enzimas importantes dessa via, como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR) em biópsias de pacientes LL (Mattos et al., 2014). Além disso, o bacilo ainda aumenta a captação de colesterol exógeno, aumentando a expressão do receptor de LDL, principal responsável pela captação de LDL na sua forma nativa, assim como de receptores *scavengers*, responsáveis pela captação de LDL modificado, contribuindo ainda mais com o acúmulo do mesmo na célula infectada (Mattos et al., 2014). Os estudos ainda apontam que o acúmulo de colesterol observado na célula infectada é crucial para a sobrevivência do *M. leprae*, uma vez que o tratamento da célula com estatinas, que são drogas classicamente descritas como inibidores da biossíntese de colesterol, reduz a viabilidade do *M. leprae* em monócitos infectados *in vitro* (Mattos et al., 2014) e em camundongos BALB/c infectados segundo o modelo de Shepard (Lobato et al., 2014).

1.5.3 – Catabolismo de colesterol nas micobactérias

O colesterol pode ser degradado por diferentes espécies de microorganismos e aproveitado como fonte de carbono ou energia. Av-gay e Sobouti (2000) forneceram os primeiros relatos de degradação do colesterol por micobactérias, entretanto, a observação do fenômeno foi limitada apenas às micobactérias não patogênicas, como o *Mycobacterium smegmatis*. Mas no mesmo estudo observou-se que o *M. tuberculosis* era capaz de acumular colesterol quando cultivado em meio mínimo suplementado com colesterol (Av-Gay & Sobouti, 2000). Posteriormente, análises de bioinformática demonstraram que o *M. tuberculosis* apresenta em seu genoma todo o aparato enzimático necessário para o catabolismo

do colesterol (van der Geize et al., 2007). De fato, com o avanço das técnicas analíticas foi verificado que além de acumular colesterol, o *M. tuberculosis* é também capaz de catabolizá-lo (Brzostek et al., 2009)

A utilização de uma fonte alternativa de carbono representa uma possibilidade de burlar os mecanismos de defesa do hospedeiro, que usualmente restringe as fontes energéticas para o patógeno. Nesse contexto, foi demonstrado que o uso do colesterol como fonte de carbono é essencial para a persistência do *M. tuberculosis* nas infecções pulmonares e em macrófagos ativados (Pandey & Sasseti, 2008). A captação do colesterol pelo *M. tuberculosis* envolve o sistema de transporte traduzido pelo operon *mce4* (Pandey & Sasseti, 2008; Rathor et al., 2013), que é crucial para a sobrevivência do *M. tuberculosis* no período mais tardio da infecção (Sasseti & Rubin, 2003). O envolvimento do operon *mce* com a utilização do colesterol também foi descrito em outras micobactérias, como para o *M. smegmatis*, que apresenta os genes do operon *mce* regulados positivamente quando crescido em meio com colesterol (Li et al., 2016)

A via de degradação do colesterol pelo *M. tuberculosis* pode ser dividida em duas etapas, a degradação da cadeia lateral e a quebra dos anéis esteroides. Antes da clivagem da cadeia lateral, ocorre uma reação de oxidação e isomerização do anel esteroide. Esta reação pode ser catalisada pela enzima 3-beta-hidroxiesterol-desidrogenase (3β -HSD) (Figura 9) em que o colesterol é oxidado a colest-4-en-3-ona, também conhecida como colestenoa (Yang et al., 2007). A degradação da cadeia lateral consiste essencialmente em um processo de beta oxidação que culmina na produção de propionil CoA e androstenediona (Figura 9). O operon *igr* é crucial para a utilização do colesterol, uma vez que o mutante Δ *igr* é incapaz de crescer em meio com o lipídio (Chang et al., 2009; Miner et al., 2009), e seus genes codificam enzimas que estão envolvidas nas etapas finais de degradação da cadeia lateral do colesterol (Thomas et al., 2011b).

A degradação dos anéis A e B começa com a ação da enzima KstD após a conversão do colesterol em colestenoa. A deleção deste gene leva ao acúmulo de androstenediona e ao crescimento atenuado da bactéria em meio 7H9 com colesterol como única fonte de carbono (Brzostek et al., 2009). A próxima reação envolve a hidroxilação do cetoesteroide catalisada por uma 3-cetoesteroide-9-alfa-hidroxilase (KshA e KshB). Em sequência as monoxigenases do *cluster* HsaA-HsaD começam a atuar levando à abertura do anel A e por fim, os anéis A e B são

degradados por ação das enzimas HsaD e HsaFGH (Figura 9) (revisto em Wipperman et al., 2014).

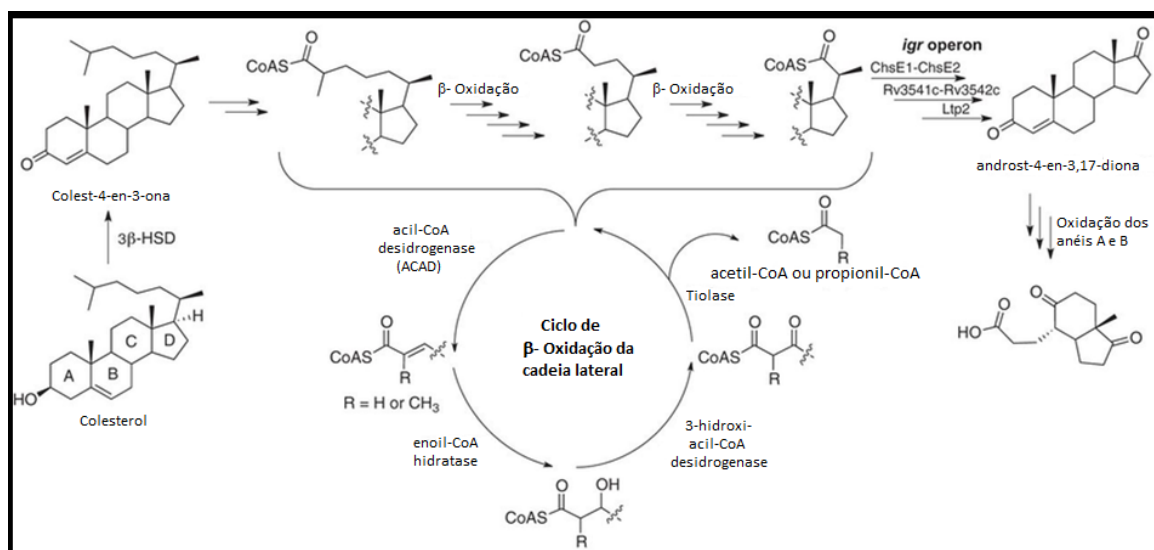


Figura 9 - Via catabólica do colesterol em *M. tuberculosis*. Modificado de (Wipperman et al., 2013).

A degradação dos anéis C e D do colesterol pelas micobactérias ainda não está completamente elucidada. Contudo, evidências apontam que ela ocorre, uma vez que o *M. tuberculosis* é capaz de sobreviver em um meio suplementado somente com um derivado dos anéis C e D e sugere que envolve a participação dos genes que são regulados pelo regulador transcricional KstR2 (Casabon et al., 2013a). Outros estudos ainda apontam que a enzima FadD3 seria a responsável por dar prosseguimento à degradação do produto resultante do catabolismo dos anéis A e B (Casabon et al., 2013b) e mais recentemente, o mesmo grupo propôs a participação das enzimas EchA20 e IpdAB na degradação dos anéis C e D. (Crowe et al., 2017).

De modo geral, a degradação do colesterol requer um grupo de genes que estão localizados no genoma do *M. tuberculosis* em uma região denominada de *Cho-Island* (ilha de colesterol) (Nesbitt et al., 2010), regulados em sua maioria pelos reguladores transcricionais KstR e KstR2 (Kendall et al., 2010). O *M. leprae* não possui grande parte dos genes descritos para o catabolismo de colesterol em *M. tuberculosis*, estando ausente em seu genoma, inclusive os reguladores transcricionais KstR e KstR2, além do transportador de colesterol Mce4. De fato, o *M. leprae* é incapaz de degradar o colesterol e utilizá-lo como fonte de carbono como outras micobactérias, visto que a incubação do bacilo tanto com [4- C^{14}]Colesterol, marcado no núcleo de anéis esteroides, quando com [26-

C¹⁴]Colesterol, marcado na cadeia lateral, foi incapaz de levar à produção de ¹⁴CO₂, conforme visto para *M. tuberculosis* (Marques et al., 2015).

Contudo, apesar da evolução reducional do genoma do *M. leprae* não ter conservado a maioria dos genes envolvidos com o catabolismo do colesterol, o bacilo conservou o gene referente à enzima responsável pela primeira etapa da via de degradação da cadeia lateral, a 3-beta-hidroxiesterol desidrogenase (3 β -HSD – ML1942), responsável pela oxidação e isomerização do colesterol em colesteno. A expressão deste gene foi confirmada através da identificação desta enzima por análise proteômica em frações da parede celular do *M. leprae* (Marques et al., 2008).

Embora nessa etapa também seja atribuída a participação da enzima colesterol oxidase (ChoD), gene também conservado no genoma do bacilo, estudos mais recentes sugerem que ela não seja a principal enzima atuante, reservando esse papel para a 3 β -HSD. Esta conclusão foi derivada da observação de que o *M. tuberculosis* mutante $\Delta choD$ ainda é capaz de crescer no meio com colesterol (Yang et al., 2011), enquanto o mutante $\Delta 3\beta\text{-hsd}$ é incapaz de realizar a oxidação do colesterol à colesteno e de crescer no meio com colesterol (Yang et al., 2007, 2011). As análises de alinhamento de sequências das respectivas enzimas do *M. leprae* reforçam a sugestão da 3 β -HSD como única enzima capaz de realizar a oxidação do colesterol, uma vez que esta possui 75% de identidade com a 3 β -HSD de *M. tuberculosis* (Marques et al., 2015), que foi descrita ser capaz de oxidar o colesterol à colesteno (Yang et al., 2007). A enzima do *M. leprae* conserva todos os domínios importantes, como os sítios de interação com cofator e sítio ativo (Marques et al., 2015). Já a ChoD de *M. tuberculosis*, assim como de *M. leprae*, tem pouca semelhança com a enzima colesterol oxidase de outros organismos com capacidade já descrita de produzir colesteno (Marques et al., 2015).

A 3 β -HSD descrita em *M. tuberculosis* catalisa a oxidação do colesterol à colesteno em duas etapas, inicialmente oxidando o colesterol a colest-5-en-3-ona e posteriormente isomerizando até colest-4-en-3-ona (ou colesteno), utilizando NAD⁺ como cofator e reduzindo a NADH (Yang et al., 2007). O grupo de enzimas colesterol desidrogenases pode utilizar tanto NAD⁺, como NADP⁺ como cofator, contudo dados da literatura apontam que apenas na presença de NAD⁺, a enzima 3 β -HSD foi capaz de oxidar os substratos. O estudo ainda apontou que além do colesterol, a enzima também foi capaz de oxidar a pregnenolona e a dihidroepiandrosterona (Yang et al., 2007), mas que o colesterol seria o substrato

preferencial da enzima (Thomas et al., 2011a). Como a identidade entre as enzimas de *M. tuberculosis* e *M. leprae* é significativa, possivelmente a 3 β -HSD apresenta as mesmas propriedades bioquímicas. A funcionalidade 3 β -HSD de *M. leprae* foi atestada pela observação da produção de colestenoa *in vitro*, bem como a colestenoa foi detectada em extratos lipídicos provenientes do *M. leprae* purificado da pata de camundongos *nude* infectados (Marques et al., 2015).

Recentemente, o metabolismo de colesterol de *M. tuberculosis* tem sido alvo de estudos para o desenvolvimento de drogas, visto que são vias importantes para a micobactéria e a 3 β -HSD tem sido utilizada como alvo de inibidores. Os azasteróides são grupos de moléculas classicamente descritas como inibidoras de enzimas que modificam o colesterol (Frye et al., 1993). Eles apresentam de modo geral uma estrutura similar aos derivados de colesterol, contendo um grupamento amida na estrutura do anel esterol. Alguns inibidores, como finasterida e dutasterida, inibem enzimas da família 5-alfa redutase, bloqueando então a conversão do colesterol à dihidrotestosterona (Frye et al., 1993), embora alguns estudos apontem que também apresentem efeitos inibitórios sobre a enzima 3 β -HSD humana (Frye et al., 1994). Recentemente, tem-se estudado o uso de variantes de duas classes principais de azasteroides: os 4-azasteróides e os 6-azasteróides (Figura 10A) e foi visto que os 6-azasteróides são mais eficientes em inibir a 3 β -HSD de *M. tuberculosis* (Thomas et al., 2011a). Dentre os 6-azasteróides estudados nesse trabalho, alguns se mostraram extremamente eficientes, como o composto 7, que conserva grande parte da estrutura original de 27 carbonos do colesterol, mas também outros compostos foram eficientes em inibir a atividade da 3 β -HSD de *M. tuberculosis*, como o composto 5, também conhecido como SB100 (Figura 10B) (Thomas et al., 2011a). Portanto, os azasteróides podem ser importantes ferramentas para estudar o papel da 3 β -HSD para as micobactérias durante a infecção.

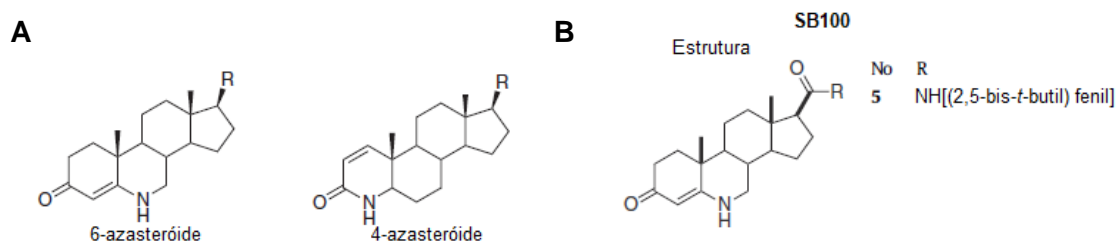


Figura 10 – Os azasteróides são potentes inibidores da 3 β -HSD de *M. tuberculosis*. (A) Estrutura das duas principais classes de azasteróides, 6 e 4- azasteróides. (B) Estrutura do composto SB100 (composto número 5). R representa o radical da estrutura. (Modificado de Thomas et al., 2011b)

1.5.4 – A importância biológica da colestenona

A colestenona pode ser tóxica e inibir o crescimento do *M. tuberculosis in vitro*, conforme já relatado (Frank et al., 2016; Ouellet et al., 2010). Entretanto, no contexto da hanseníase a colestenona pode assumir um papel único na patogênese do *M. leprae*, visto que, diferentemente do *M. tuberculosis*, que é capaz de prosseguir com a degradação da colestenona, o *M. leprae* incapacitado de continuar, fatalmente levará a um acúmulo deste metabólito.

A colestenona pode interferir em aspectos importantes na célula hospedeira, e apesar de ser pouco estudada, já foi descrito, que devido à troca do grupamento hidroxila por um grupamento cetona em sua estrutura, a colestenona promove um aumento da desorganização da bicamada lipídica, inibindo a migração celular (Neuvonen et al., 2014), conferindo propriedades diferentes às bicamadas lipídicas que o colesterol. Dessa forma, a presença de colestenona pode impactar processos celulares que dependam das propriedades das membranas, como em um estudo recente que reportou que a colestenona inibe a sinalização de TGF- β e um dos fatores que contribuem para essa inibição é a indução da formação de *lipid rafts* em regiões adjacentes aos receptores de TGF- β , com isso interrompendo a sinalização da via (Chen et al., 2016).

A colestenona ainda pode ser convertida em outros metabólitos como colestanol, por exemplo (Harold et al., 1956). Mais ainda, a colestenona pode ser convertida em oxisteróis, onde já foi relatado que a enzima CYP27A1, uma citocromo P450 responsável pela síntese de 27-hidroxicolesterol, possui maior afinidade com a colestenona como substrato que com colesterol (Norlin et al., 2003). Dessa forma, as possíveis modificações da colestenona pelo hospedeiro podem ter alguma atuação no processo de estabelecimento da infecção.

1.6 – Justificativa

A hanseníase ainda é um grave problema de saúde pública no Brasil, país endêmico para a doença. As lesões neurais, que muitas vezes perduram mesmo após a cura e são ainda mais agravadas durante os quadros reacionais, são um marco da doença, devido ao tropismo do *M. leprae* por células de Schwann no sistema nervoso periférico. Os mecanismos que resultam na lesão neural observada durante a hanseníase não estão completamente elucidados e, portanto, estudos voltados para a compreensão da interação patógeno-hospedeiro, mais

especificamente do *M. leprae* com a célula de Schwann, são necessários para melhor compreensão dos eventos críticos que promovem a infecção.

Ao longo dos anos, muitos estudos apontaram a importância do metabolismo lipídico e especificamente do colesterol para a patogênese do *M. leprae*, contudo os mecanismos pelos quais o colesterol atua favorecendo a infecção ainda são pouco compreendidos. Diferentemente de outras micobactérias, o *M. leprae* não é capaz de degradar o colesterol, mas ainda assim modula o metabolismo da célula hospedeira para induzir seu acúmulo, conservando também a enzima responsável pela oxidação do colesterol à colestenoína, que seria a primeira reação da via de degradação do colesterol.

Considerando que o *M. leprae* apresenta um genoma reduzido, mantendo possivelmente só os genes essenciais para sua sobrevivência intracelular, a conservação do gene *ml1942*, que codifica a 3 β -HSD, em seu genoma sugere que o mesmo seja importante para o bacilo. Dessa forma, o estudo busca compreender a relevância da 3 β -HSD na patogênese do *M. leprae* no nervo periférico, estudando sua contribuição para sobrevivência intracelular do bacilo.

A fim de destrinchar os mecanismos pelos quais a enzima poderia ser importante para a infecção, buscou-se investigar se a inibição da enzima afeta a síntese de outros lipídios, bem como se a colestenoína, produto da enzima, pode ser convertida em outros metabólitos, que podem influenciar na patogênese do *M. leprae*.

Dessa forma, o trabalho buscou um melhor entendimento da manutenção da 3 β -HSD pelo *M. leprae* e suas implicações na interação do *M. leprae* com a célula de Schwann, para elucidar a importância do metabolismo de colesterol para o bacilo durante a infecção no nervo periférico, e assim possivelmente ampliar os conhecimentos acerca dos processos que resultam na lesão neural e possivelmente contribuir para o tratamento desses eventos.

2. Objetivos

2.1 – Objetivo geral

O estudo teve como objetivo geral compreender a importância do colesterol e da enzima 3 β -HSD para a sobrevivência do *M. leprae* no nervo periférico.

2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a importância do metabolismo de colesterol na célula de Schwann estudando o efeito da atorvastatina na viabilidade do *M. leprae*;
- Detecção da expressão da enzima 3 β -HSD de *M. leprae* em biópsias de pacientes por *Western Blotting*;
- Investigar o efeito do composto SB100 na inibição da atividade da enzima e quais seus efeitos para o *M. leprae*;
- Investigar o impacto da inibição da enzima 3 β -HSD na viabilidade intracelular do *M. leprae*;
- Avaliar o efeito da adição exógena de colesteno sobre a viabilidade do *M. leprae* em células infectadas;
- Investigar o efeito da adição exógena de colesteno na fagocitose da micobactéria e partículas pela célula de Schwann;
- Estudar o perfil de esteróis derivados da colesteno na célula hospedeira estimulada com *M. leprae*.

3. Materiais e Métodos

3.1 – Cultivo celular das linhagens e obtenção do *M. leprae*

3.1.1 – Cultivo celular de células de Schwann humanas da linhagem ST88-14: Células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 isoladas de um paciente com neurofibromatose de tipo 1 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jonathan A. Fletcher (Departamento de Patologia do Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA). As células foram criopreservadas em nitrogênio líquido em meio contendo 90% de soro fetal bovino (SFB – Cripion Biotecnologia LTDA) e 10% de DMSO (Dimetil Sulfóxido – Sigma Aldrich) que age como crioprotetor. O descongelamento foi feito em banho maria a 37°C e, em seguida, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL contendo 9 mL de meio RPMI 1640 (LGC biotecnologia LTDA) suplementado com SFB. Após centrifugação a 513,6 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1mL de meio, 10 µL foram retirados e diluídos 1:1 em azul de tripan (Sigma-Aldrich) e feita a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer. Foram transferidos 10⁶ células para uma garrafa de cultura de 25 cm² (Corning) com 4 mL de meio RPMI suplementado com 10% SFB. As culturas foram então mantidas em estufas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até a utilização nos experimentos ou atingirem cerca de 80% de confluência para realização do protocolo de tripsinização para expansão da cultura. Por serem células aderentes, foi adicionado às culturas 0,05% de tripsina (LGC) pelo tempo de 2 minutos para desprendimento das mesmas; após a centrifugação e lavagem com PBS (Tampão fosfato salino) as células foram contadas e foram plaqueadas em placas de cultura (Kasvi) conforme as necessidades do experimento.

3.1.2 – Cultivo celular de monócitos humanos da linhagem THP-1 e diferenciação em macrófagos: A linhagem de monócitos THP-1 (ATCC[®] TIB-202[™]) adquirida do banco de células da ATCC foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB e mantidas em estufa a 37 °C com 5% CO₂. Os estoques celulares foram criopreservados e descongelados conforme descrito acima. Após a contagem celular, 4 x10⁵ células/mL foram transferidas para uma garrafa de cultura de 25 cm² (Corning) com 4 mL de meio RPMI suplementado com 10% SFB. A cultura foi expandida até a obtenção de células suficientes para

realização dos ensaios. As células foram centrifugadas conforme descrito anteriormente, contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em quantidades e recipientes adequados ao experimento. O cultivo foi feito em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB juntamente com 80nM de PMA (Forbol-12-Miristato-13-Acetato – Sigma Aldrich) por 24 horas a 37 °C / 5% CO₂ para diferenciação em macrófagos. Após este tempo o meio foi substituído por um novo meio RPMI 1640 com 10% de SFB livre de PMA e as células permaneceram por mais 24 horas a 37 °C / 5% CO₂ para depois dar prosseguimento aos experimentos .

3.1.3 – *M. leprae* e amostras clínicas de biópsias de pele de pacientes

LL: Amostras de *M. leprae* Thai-53 viáveis foram isoladas de coxim plantar de camundongos atímicos BALB/c (*Nu/Nu*) doados pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil. A purificação do *M. leprae* foi realizada pelo tecnologista do laboratório segundo o protocolo descrito por Trombone e colaboradores (2014). Após a purificação, as micobactérias foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (Neelsen, 1883; Ziehl, 1883) e contadas por microscopia; em paralelo foi feita a aferição da viabilidade através do kit Live/Dead[®] (Thermo Fisher Scientific) segundo informações do fabricante.

Foram incluídas neste estudo extrato de proteínas de duas biosias de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa classificada de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966). O estudo tem aprovação do comitê de ética da Fiocruz com o parecer com numeração 504/09 e este material foi gentilmente cedido pela Dra. Euzenir Sarno e Dra. Roberta Olmo do Laboratório de Hanseníase da Fundação Oswaldo Cruz

3.2 – Avaliação da toxicidade da colestenona e atorvastatina sobre células de Schwann humanas da linhagem ST88-14: 8,0 x 10³ células de Schwann da linhagem ST8814 foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB e foram estimuladas com 1µM atorvastatina (Sigma-Aldrich) ou colestenona nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 ou 10 µM (Sigma-Aldrich) ou com 1%, 0,1% ou 0,05% etanol (Merck), veículo utilizado para diluir os compostos. Após 48 e 72 horas de incubação em estufa de CO₂ a 37°C , adicionou-se MTT (3-(4,5- Dimetiliazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio Brometo) (5 mg/mL) (Sigma-Aldrich) e as células foram mantidas por 4 horas na estufa a 37 °C, aonde o MTT é reduzido em cristais de formazan roxos por atividade enzimática preservada apenas em células viáveis. Após este

período os cristais foram dissolvidos utilizando SDS 10% e a leitura foi feita a 590 nm utilizando o leitor de ELISA modelo EON (BioTek Instruments, Inc.).

3.3 – Avaliação do efeito da atorvastatina sobre a viabilidade intracelular do *M. leprae* em células de Schwann da linhagem ST88-14: 5×10^4 células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 foram plaqueadas em placas de 24 poços (Kasvi) e incubadas por 16 horas em meio RPMI com 10% de SFB. Após este tempo, o meio foi descartado e novo meio RPMI suplementado com 2 % de soro foi adicionado e as células foram incubadas por mais 24 horas, para diminuição dos níveis basais de corpúsculos lipídicos. Posteriormente foi adicionado 1 μ M de atorvastatina, inibidor da biossíntese de colesterol, ou o veículo, etanol 1%, e em seguida as células foram infectadas com *M. leprae* em uma de MOI 5:1 (multiplicidade de infecção) e mantidas a 33° C por 24 h em estufa com 5% de CO₂. Passado o tempo de incubação as células foram lisadas com Trizol®(Invitrogen), para preservação e extração do RNA e então prosseguiu com a análise da viabilidade do *M. leprae* por qPCR.

3.4 – Técnicas Moleculares:

3.4.1 – Extração de RNA e de DNA

Extração de RNA: As extrações de ácidos nucleicos foram realizadas pelo método de fenol-clorofórmio, com o auxílio do reagente Trizol®. Para isso, foram adicionados 500 μ L de Trizol® nos poços, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo de cada poço foi recuperado e transferido para um tubo de 1,5mL livre de RNAses (Eppendorf). O RNA foi extraído com 100 μ L de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) após agitação vigorosa até adquirirem um aspecto leitoso e as amostras ficaram em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C, a fase aquosa contendo o RNA foi recolhida e a fase orgânica estocada para posterior extração de DNA. À fase aquosa foram adicionados 250 μ L de álcool isopropílico, homogeneizado por inversão suave 1-2 vezes e as amostras foram incubadas por 16 horas a -70 °C para precipitação do RNA. Após a precipitação do RNA, foi adicionado 1 μ L de GlycoBlue (Ambion), para marcação do sedimento e as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 14.000 x g por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 250 μ L de etanol 70% (preparado em água livre de RNase tratada com dietilpirocarbonato - DEPC). Após

homogenização por inversão, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, por 10 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e após total evaporação do etanol, o sedimento foi ressuspensão em 20 µL água livre de *RNAse*, tratada com DEPC. As amostras de RNA foram estocadas -70 °C até o uso.

Extração de DNA: A extração de DNA foi feita adicionando 100 µL de TE modificado (200mM de Tris-HCl pH 8.0, 5mM de EDTA) e 150 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) a fase de fenol-clorofórmio resultante após a extração e isolamento do RNA e após agitação vigorosa as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 13.800 x g por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, a fase aquosa foi recolhida e foi transferida para um novo tubo livre de RNAses, aonde foram adicionados 300µL de isopropanol e então as amostras foram incubadas à -20°C por 16 horas para precipitação do ácido nucleico. Passada a incubação, foram adicionados 1 µL de GlycoBlue (Ambion), as amostras foram homogeneizadas por inversão e então centrifugadas a 13.800 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados, o sedimento lavado com 250 µL de etanol 70% e as amostras homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 13.800 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras ficaram em repouso por cerca de 5 minutos até total evaporação do solvente, em seguida foi adicionado 20 µL de água livre de *RNAse* para ressuspensão das mesmas que foram estocadas a -20°C para análises posteriores.

3.4.2 – Dosagem de ácidos nucleicos, tratamento com DNase e avaliação da integridade do RNA: As amostras de RNA extraídas foram integralmente submetidas a um tratamento para a remoção de eventuais contaminantes de DNA utilizando a enzima DNase do kit TURBO DNA-free (Ambion). Foram adicionados a cada amostra 3 µL de tampão 10x contido no kit, 1 µL de enzima DNase TURBO e adicionou-se 6 µL de água livre de *RNAse* para avolumar até o volume final de reação de 30 µL. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos a 37 °C e então inativadas com 3 µL de reagente de inativação. Após incubação a temperatura ambiente por 5 minutos sob constante agitação, os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 1 minuto e o sobrenadante coletado, transferido para um novo tubo de 1,5 mL livre de *RNAse*, e o RNA foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop (ND-100, Thermo Fisher Scientific). As

amostras que tiveram ambas as razões $R_{260/280}$ e $R_{260/230}$ entre 1,8 e 2 foram consideradas de boa qualidade e seguiram para análise. Em seguida, foi feito um gel de agarose 1,2% para determinação da integridade do RNA. O gel 1,2% de agarose foi preparado com agarose ultra pura (Invitrogen) dissolvida em MOPs (ácido 3- (N-morfolino) propano sulfônico) 1x em água livre de *RNAse* tratada com DEPC com auxílio de aquecimento ao microondas. Foram utilizados 400ng de RNA, a estes foram acrescentados 7 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol e xileno cianol 0,3%, formamida 70% e MOPS 2x); 1 μ L de SYBR e água livre de *RNAse* *qsp* 15 μ L. As amostras foram aquecidas a 65 °C no banho seco por 15 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada no gel imerso no tampão MOPS 1x, a 120 V por 1 hora e o gel foi visualizado com a iluminação ultravioleta (U.V.), no transiluminador (MiniBis pro – DNR BioImaging System); foram consideradas integras as amostras com 2 bandas referentes aos rRNAs 28S e 18S e sem rastros.

3.4.3 – Transcrição Reversa: Para síntese do DNA complementar (cDNA), as amostras de RNA foram submetidas à reação de transcrição reversa utilizando o kit GoScript (Promega). Foram utilizados 500 ng de amostra para os experimentos com 10^5 e $6,0 \times 10^4$ células e 250 ng de amostra para os experimentos com $5,0 \times 10^4$ células e foi adicionada água, quando necessário, de modo a avolumar todos a 4 μ L, sendo em seguida adicionado 1 μ L de *Random Primer*. As amostras foram centrifugadas para abaixar todo o conteúdo e aquecidas a 70°C durante 5 minutos com o auxílio de um banho seco. Em seguida, as amostras ficaram incubando no gelo por 1 minuto e a elas foram adicionados 15 μ L do mix [2 μ L de tampão GoScript 5x + 1,5 μ L de $MgCl_2$ + 0,5 μ L de PCR Nucleotide Mix (dNTP) + 0,25 μ L do inibidor de *RNAse* RNAsin + 0,5 μ L da transcriptase reversa GoScript + 10,25 μ L de água livre de *RNAse*]. Controles negativos foram usados nos quais a transcriptase reversa não foi adicionada. As amostras então foram incubadas a 25°C por 5 minutos, aquecidas por 1 h a 42 °C (para a reação de transcrição reversa) utilizando o termociclador, e em seguida incubadas a 70 °C por 15 minutos para inativação da enzima. Em seguida as amostras foram diluídas até a concentração de 5 μ g/mL para posterior utilização na reação de PCR e armazenadas a -20 °C.

3.4.4 – Determinação molecular da viabilidade do *M. leprae* analisando o RNA 16S por qPCR: A análise de viabilidade pelo método molecular foi descrita por

Martinez e colaboradores (2009). As reações foram feitas utilizando sondas de hidrólise (Taqman) para o gene de rRNA de *M. leprae* 16S, as sequências de ambos os oligonucleotídeos iniciadores e sonda encontram-se descritas na tabela 1. A reação de PCR foi realizada em 10 µL de reação, utilizando Taqman Universal Master Mix 5x (Thermo-Fisher Scientific), 200nM de oligonucleotídeos iniciadores para o gene de rRNA 16S (senso e anti-senso – Eurofins Scientific), 200nM de sonda para o gene de rRNA 16S (FAM/MGB-NFQ- Life Technologies), 10 ng de cDNA ou 20 ng de DNA e água livre de RNase para completar o volume. As placas foram submetidas a uma rápida centrifugação e dispostas na máquina StepOnePlus® (Applied Biosystems). As reações foram ajustadas para o método comparativo por $\Delta\Delta CT$, com o sistema de detecção para taqman, e com duração de cerca de 1 hora e 15 minutos, com uma etapa de iniciação da reação a 50 °C por 2 minutos, seguido de um aquecimento a 95 °C por 10 minutos e então prosseguindo para 40 ciclos de amplificação de 95°C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados nas reações de PCR.

Gene/Sonda	Sequências
ML 16S - Oligonucleotídeo Senso	5'- GCATGTCTTGTGGTGGAAAGC -3'
ML 16S – Oligonucleotídeo Anti-senso	5'- CACCCACCAACAAGCTGAT -3'
ML 16S – Sonda	5' FAM – CATCCTGCACCGCA- MGBNFQ 3'

A eficiência da PCR foi determinada para cada reação com o auxílio do software LinRegPCR (Ramakers et al., 2003) e análise de CT comparativo foi realizada considerando as correções de eficiência segundo descrito (Pfaffl, 2001). Para o cálculo de viabilidade, normalizou-se as amostras de cDNA pelas amostras de DNA correspondentes de cada condição e a viabilidade foi determinada em percentual, considerando as amostras não tratadas como 100% e comparando a viabilidade das amostras tratadas em relação ao controle não tratado. As análises estatísticas dos dados foram feitas pelo teste não paramétrico, não pareado Mann Whitney U com auxílio do Software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, inc.).

3.5 – Detecção da expressão da enzima 3β-HSD em biópsias de pacientes: Para detecção da expressão da enzima 3β-HSD de *M. leprae*, foi utilizado anticorpo anti 3β-HSD (Lampire Biological Laboratories) gentilmente cedido pela Dra. Angela Marques (Colorado State University, CO, USA), produzido em coelho, imunizando o

mesmo com a proteína recombinante 3 β -HSD de *M. leprae* e com adjuvante incompleto de Freund.

Foram utilizadas amostras de proteínas obtidas a partir de biópsias de pele (6 mm) de pacientes LL com alto índice baciloscópico na lesão (IBL > 4,8) e cedidas já na forma de extratos proteicos, em que a extração de proteínas foi feita segundo descrito por Hummon e colaboradores (2007), onde foi adicionado o reagente Trizol às biópsias e a fase de fenol-etanol resultante após a extração de RNA e DNA foi submetida a diálise com 0,1% de SDS (Dodecil sulfato de sódio) a 4°C por 24 horas, com três trocas de solução, uma a 16 horas, a segunda a 20 horas e a última a 22 horas (Hummon et al., 2007) e as amostras foram então centrifugadas a 6.000 x g por 20 minutos a temperatura ambiente e o sedimento foi ressuspenso em tampão de lise RIPA (50nM de Tris-HCl pH 7,5; 1% de Nonidet p40; 0,25% de Deoxicolato de sódio e 0,1% de SDS) com um comprimido do inibidor de protease cOmplete (Roche) a cada 10 mL de tampão. Em seguida, a quantidade de proteína nas amostras foi dosada pelo método de Bradford, utilizando o reagente Pierce Comassie (Thermo Fisher Scientific), segundo instruções do fabricante.

O volume equivalente a 30 μ g de proteína de cada amostra foi reservado em um novo tubo e a ele foi adicionado tampão de amostra 4x (Tris-HCl pH 6,8 240 mM, glicerol 40%, β - mercaptoetanol 5%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,08%) em volume suficiente para ficar com a concentração final de 1x. As amostras foram então fervidas por 5 minutos e então foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12%. Aplicou-se também o padrão de peso molecular pré corado PageRuler (Thermo Fisher Scientific) para então realização do SDS-PAGE. A corrida foi realizada em equipamento MiniProtean (BIO-RAD) utilizando o tampão de corrida composto por Tris-base 25mM, glicina 192 mM e 0,1% de SDS e a voltagem foi fixada em 100 V. Ao término da corrida, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (G.E. Healthcare LifeSciences) em tampão composto por Tris-base 25mM, glicina 192 mM e 20% de etanol a 100 V por 1 hora. Ao final da transferência, a membrana foi corada com Amido Black, para visualização das proteínas e eficiência da transferência, para dar então prosseguimento ao *western blotting*.

Durante o *western blotting*, a membrana foi bloqueada por 16 horas com solução de 5% albumina sérica bovina (BSA - preparada em TBS-T composto por Tris-HCl 20mM pH 8,0 ; NaCl 150 μ M e 0,1 % Tween 20). Em seguida a membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-3 β HSD

1:60.000 (Preparado em 1% de BSA em TBS-T) em agitação leve. Passada a incubação, a membrana foi lavada com TBS-T durante 10 minutos em agitação moderada, repetindo o processo mais 2 vezes, trocando a solução. Posteriormente, incubou-se a membrana com anticorpo secundário anti IgG (Imunoglobulina G) de coelho conjugado à enzima peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:5.000 durante uma hora, sob agitação leve. Ao término da incubação, foram realizadas mais 3 lavagens, conforme já descrito e então a membrana foi posicionada no cassete de revelação para dar prosseguimento ao procedimento de revelação por quimioluminescência, utilizando o Kit Amersham ECL Western Blotting (G.E. Healthcare LifeSciences), que contém o substrato, aplicado diretamente sobre a membrana. A revelação foi realizada na câmara escura, através da exposição do filme radiográfico Amersham Hyperfilm ECL (G.E. Healthcare LifeSciences) à membrana e então revelação do filme utilizando as soluções reveladora (Kodak) e fixadora (Kodak).

3.6 – Ensaio de inibição da enzima 3 β -HSD com o composto SB100.

3.6.1 – Determinação da viabilidade do *M. leprae* por radiorrespirometria:

O composto SB100 foi desenvolvido e sintetizado como inibidor da enzima 3 β -HSD de *M. tuberculosis* e foi gentilmente doado pela Dra. Nicole S. Sampson (Stony Brooke University, NY.). Para avaliar se o composto apresenta também capacidade de inibir a enzima 3 β -HSD de *M. leprae*, foi realizada uma curva dose com concentrações crescentes do composto. Foram utilizados $1,6 \times 10^8$ bacilos viáveis, mantidos em meio axênico (Meio Middlebrook 7H9 suplementado com 0,5% de BSA, 0,05% de tyloxapol, 0,1% de hidrolisado de caseína, 50 μ g/ml de ampicilina e 48 U/mL de catalase) com adição do inibidor SB100 (diluído em 2% DMSO) nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100, 200, 400 e 600 μ M, por 1 hora a 30°C sob agitação. Passada a pré-incubação, foram adicionados 1 μ Ci de [26- 14 C] colesterol (Quotient Bioresearch Ltd.) e 1 μ Ci [14 C] ácido palmítico (American Radiolabeled Chemicals, Inc.) e o bacilo foi incubado por 48 horas a 33°C em tubo de cintilação contendo o papel de filtro impregnado com 2N NaOH. Posteriormente, o papel de filtro contendo o CO₂ capturado foi transferido para um novo tubo de cintilação para a determinação da viabilidade do bacilo pelo ensaio de radiorrespirometria, conforme descrito (Buddemeyer, 1974), com as modificações já propostas (Marques et al., 2015).

3.6.2 – Quantificação da produção de colestenoa por *M. leprae* vivo: A partir do experimento anterior, em que o bacilo também foi incubado com [26-¹⁴C] colesterol, a suspensão bacilar foi transferida do tubo de 1,5 mL para um tubo de vidro onde foi realizada a extração total de lipídios. Os lipídios foram extraídos com clorofórmio: metanol (2:1), seguido de duas lavagens com adição de água, conforme descrito (Folch et al., 1957) e posteriormente foram secos em atmosfera de N₂. Em seguida, os lipídios foram dissolvidos no mesmo solvente e resolvidos pelo método de cromatografia de camada fina (*Thin layer chromatography* – TLC), utilizando uma placa de gel de sílica G60 (Millipore), em que foram aplicados o equivalente a 10⁴ DPM de cada amostra e utilizou-se clorofórmio:metanol (95:5) como fase móvel e padrões de colesterol, colestenoa, PGL-I e ácido palmítico. A TLC foi submetida à coloração com iodo, para visualização e demarcação dos padrões e a visualização foi feita com o auxílio do imageador Typhoon 9400 scanner (G.E. Healthcare LifeScience). Posteriormente, as análises de densitometria foram realizadas com o auxílio do software ImageJ (NIH), utilizando o colesterol como referência.

Para determinar se o efeito do inibidor persiste mesmo após a remoção do mesmo, foi utilizada uma suspensão com 1,6 x 10⁸ bacilos mantidos em meio axênico, conforme descrito, com adição de 100 µM de SB100. A suspensão foi incubada por 6 horas a 30°C sob agitação e posteriormente as bactérias foram centrifugadas a 12.000 x g por 8 minutos e o meio foi descartado. Em seguida, novo meio foi adicionado com reposição ou não de mais SB100 a 100 µM. Foram também adicionados 1µCi de [26-¹⁴C] Colesterol (Quotient Bioresearch Ltd.) e 1µCi [¹⁴C] ácido palmítico (American Radiolabeled Chemicals, Inc.) e em sequência o *M. leprae* foi incubado por 24 ou 48 horas a 33°C em tubos de cintilação como descrito anteriormente, seguido de respirometria e análise lipídica.

3.6.3 – Determinação do efeito do SB100 sobre a produção de NADH e citocromo C reduzido: A fim de melhor caracterizar o efeito do inibidor sobre a enzima 3β-HSD de *M. leprae*, avaliou-se o efeito do inibidor na produção do outro produto da reação, o NADH. Com isso, foram utilizados sonificados totais de *M. leprae* reconstituídos em PBS. A quantidade de proteínas totais foi avaliada pelo método de Bradford e foram então utilizados o equivalente a 50 µg de proteína por reação. A reação foi realizada em meio HBSS (Gibco) adicionando 200 µM de NAD⁺ (Sigma-Aldrich) em todas as condições e em uma condição ainda adicionou-se 200 µM de colesterol (Sigma-Aldrich) com ou sem 100 µM do inibidor SB100. Foram

medidas as absorvâncias a 340 nm, para determinação de NADH e a 550 nm, para determinação de citocromo c reduzido, em uma cinética de 30 em 30 segundos por 20 minutos com o auxílio do leitor de Elisa.

3.7 – Determinação do efeito de SB100 sobre a síntese de PGL-I e PDIMs do *M. leprae*:

***leprae*:** Partindo dos extratos de lipídios gerados conforme mencionado no item 3.6.1, em que a micobactéria também foi incubada com [¹⁴C] ácido palmítico e tratada com concentrações crescentes de 5, 10, 20, 40 e 80 µM de SB100, assim como com concentrações maiores de 50, 100, 200, 400 e 600 µM de SB100, a síntese de PGL-I foi avaliada por TLC em sílica com fase móvel de clorofórmio: metanol (95:5) e a visualização foi feita com o imageador Typhoon 9400 scanner. Para avaliar se o tratamento com SB100 afeta a síntese de PDIMs, outra classe de lipídios do *M. leprae* importantes para sua virulência, foram utilizados cerca de 10⁴ DPM (desintegrações por minuto) dos extratos lipídicos provenientes de *M. leprae* não tratado e tratado com 80 µM de SB100, conforme já descrito, para realizar uma TLC bidimensional segundo já descrito (Marques et al., 1998). Cada amostra foi aplicada em uma placa de TLC e o primeiro sentido da corrida foi realizado com a fase móvel de éter de petróleo: acetato de etila (98:2) por 3 vezes para então realizar a corrida no novo sentido, girando a placa 90°, com a fase móvel constituída de éter de petróleo: acetona (98:2) por uma vez e a corrida foi visualizada no imageador. Foram utilizados padrões de PDIMs de *M. tuberculosis* em uma outra placa, visualizados com coloração com anisaldeído.

3.8 – Estudo da importância da enzima 3β-HSD para a infecção do *M. leprae* em células de Schwann:

Para avaliar a contribuição da enzima para a infecção, o *M. leprae* foi pré-incubado sob agitação por 6 horas a 30 °C na estufa com 100µM de SB100, inibidor da enzima 3β-HSD, em tubo de 1,5 mL estéril com 500µL de meio RPMI 1640 com 0,5% BSA (Sigma-Aldrich) e 2 % DMSO ou só no meio com 0,5% BSA e com o veículo (2% de DMSO), sem a droga. Passado o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados a 16.000 x g por 15 minutos para sedimentação das bactérias. Células de Schwann ST88-14 foram semeadas em placas de 12 poços (Kasvi) com 10⁵ células viáveis por poço em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. No dia seguinte, o meio das células foi substituído por um novo meio RPMI, agora suplementado com 2% de SFB. As células foram, então, infectadas com o *M.*

leprae pré-tratado com SB100 ou só com o veículo na MOI de 5:1 e a cultura foi mantida em estufa de CO₂ a 33 °C por 24 horas para avaliação da viabilidade conforme descrito anteriormente no tópico 3.4.

Ainda, para investigar a contribuição da colestenona para a infecção, células de Schwann da linhagem ST88-14 foram utilizadas para semear 6,0 x 10⁴ células por poço em placa de 12 poços (Kasvi) e foram mantidas em meio RPMI com 2% SFB, em 2 mL de meio por poço. As células foram pré-estimuladas com 5µM de colestenona ou veículo (etanol 0,01%, dissolvido em RPMI e filtrado com o auxílio de filtro de seringa de 0,22 µm) e foram mantidas por 24 horas a 37 °C. Após o pré-tratamento, as células foram infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1), incubadas a 33 °C e adicionou-se rifampicina 10µM como controle de morte em alguns poços. Passadas mais 24 horas após a infecção, o meio foi descartado, para remoção das bactérias não internalizadas e um novo meio foi adicionado, juntamente com os estímulos (colestenona, veículo e rifampicina). Após 96 horas de infecção, as células foram lisadas com Trizol e avaliou-se a viabilidade do *M. leprae* por qPCR conforme descrito no tópico 3.4.

3.9 – Determinação do efeito da colestenona no grau de associação de partículas e micobactérias: Células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 foram semeadas em placas de 24 poços (5,0 x 10⁴ células por poço) e mantidas em meio RPMI suplementado com 2 % de SFB. Posteriormente as células foram pré-tratadas com 5 µM de colestenona ou veículo (etanol) e incubadas por 24 horas a 37 °C. Em seguida, foram adicionadas *beads* verde-fluorescentes de 1 µm (Thermo Fisher Scientific) em uma MOI de 10:1 e as células foram incubadas por mais 24 horas. Passado o tempo de incubação, realizou-se o protocolo de tripsinização para soltar as células da placa e o conteúdo de cada poço foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Após a inativação da tripsina com meio com soro, as células foram centrifugadas em torno de 184 x g a temperatura ambiente, por 10 minutos, e então o sobrenadante foi descartado e adicionou-se paraformaldeído 4% para fixação das células, durante 20 minutos a 4 °C. Após a fixação, as células foram centrifugadas e então o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em PBS. As células foram centrifugadas mais uma vez e então ressuspensas em PBS para leitura no citometro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). As análises foram feitas utilizando o software FlowJo (FlowJo, LCC).

O mesmo experimento também foi realizado com monócitos humanos da linhagem THP-1 diferenciados com 80 nM de PMA plaqueados em $2,0 \times 10^5$ células por poço. Os monócitos foram similarmente pré-tratados com colesteno 5 μ M ou veículo e após 24 horas foram estimulados com *beads* verde fluorescentes de 1 μ m (MOI 10:1), sendo posteriormente incubados por mais 24 horas. Passado o período de incubação, as células foram soltas da placa por remoção mecânica, com o auxílio de um *cell scraper* e então as células foram mantidas em gelo para a análise subsequente no citometro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), conforme citado anteriormente.

O grau de associação de micobactérias às células hospedeiras também foi avaliado por microscopia de fluorescência, onde foram plaqueadas $3,0 \times 10^4$ células de Schwann da linhagem ST88-14 por poço em uma placa de 24 poços sobre lamínulas estéreis ou $2,0 \times 10^5$ células por poço de monócitos humanos da linha THP-1 que foram diferenciados com 80 nM de PMA e foram mantidas em meio RPMI com 2% de SFB. As células foram estimuladas com colesteno 5 μ M, 10 μ M ou veículo (etanol 0,01%) e foram mantidas por 24 horas a 37 °C.

M. leprae foi submetido ao protocolo de marcação com o kit PKH26 Red Fluorescent cell linker (Sigma-Aldrich), que marca membranas, em que o PKH26 foi diluído em diluente C (1:250) e utilizado para ressuspender a bactéria já sedimentada (antes tendo sido centrifugada a 16.000 x g por 15 minutos). Então a micobactéria foi incubada por 2 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz. Posteriormente o corante foi inativado com adição de SFB, incubando por mais 1 minuto a temperatura ambiente e então a micobactéria foi centrifugada com descrito anteriormente. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e a micobactéria foi ressuspensa em PBS e mais uma vez foi centrifugada, até a ressuspensão final em meio RPMI puro.

Após a pré-incubação com colesteno ou veículo, as culturas de células de Schwann foram estimuladas com *M. leprae* viável (MOI 5:1) marcado com PKH26 por 96 horas a 37 °C e as culturas de monócitos foram igualmente estimuladas com *M. leprae* morto na MOI de 5:1, mas por 24 horas a 37 °C. Passado o tempo de incubação de cada cultura, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos a 4°C. As células foram lavadas com PBS e deu-se prosseguimento ao protocolo de marcação do núcleo com o corante DAPI 1x (4',6-diamidino-2-fenilindol – Molecular Probes, Life Technologies), em que as lamínulas foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz e em seguida as lamínulas

foram lavadas 3 vezes com PBS por 1 minuto e então foram cuidadosamente dispostas em uma lâmina sobre uma gota de anti-fade Prolong Gold (Thermo Fisher Scientific) e seladas com EVRmount (EasyPath) para visualização ao microscópio de fluorescência Zeiss observer acoplado ao sistema colibri (Carl Zeiss) e à câmera coolSnap pro CI e as imagens foram analisadas com o software Zeiss AxionVision (Carl Zeiss).

3.10 – Análise do perfil de esteróis na célula hospedeira

3.10.1 – Obtenção de colestenoa radioativa: Para síntese de colestenoa radioativa, foi realizada uma reação de oxidação do colesterol com auxílio da enzima colesterol oxidase, baseado em um protocolo já descrito (Smith & Brooks, 1977). A reação foi realizada com 50 μCi de [1,2 - ^3H (N)] Colesterol (PerkinElmer) e 0,5 U da enzima colesterol oxidase de *Nocardia erythropolis* (Sigma-Aldrich) por 3 horas a temperatura ambiente em 3 mL e tampão fosfato 50mM pH 7,0 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) e 50 μL de isopropanol, em tubos cônicos de vidro para extração lipídica. Ao fim da reação, os lipídios foram extraídos em clorofórmio: metanol: água (1:2:0,8) por 16 horas (Bligh & Dyer, 1959) e, após a extração, os tubos foram centrifugados a 1940 x g por 20 minutos a 4°C e então o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Posteriormente, realizou-se uma nova extração, mantendo as mesmas proporções dos solventes e vortexando de 5 em 5 minutos por 1 hora. A amostra foi, então, mais uma vez centrifugada e o sobrenadante foi recolhido e transferido para tubo contendo o sobrenadante já coletado da primeira etapa. Em seguida, realizou-se uma lavagem com clorofórmio e água (1:1) (Folch et al., 1957), observando a formação de duas fases. A amostra foi mais uma vez centrifugada conforme descrito e então ao final da centrifugação, a fase orgânica inferior foi recolhida para um novo tubo com o auxílio de uma seringa de vidro. Os lipídios foram secos em N_2 e então ressuspensos em clorofórmio, para então cerca de 10% do volume ser transferido para vials (PerkinElmer) contendo 2 mL de líquido de cintilação Optiphase Hisafe 3 (PerkinElmer) para leitura no Cintilador (TRI Carb 2810 tr – PerkinElmer).

Para purificação da colestenoa e separação do colesterol não oxidado residual, foi realizada a técnica de TLC em placas com gel de sílica G60 (Millipore), utilizando fase móvel composta por clorofórmio: metanol: ácido acético (95:4:1). Além da utilização dos padrões de colestenoa (Sigma-Aldrich), colesterol (Sigma-

Aldrich) e colesterol ester (Sigma-Aldrich) como referências da corrida, também foram adicionados 50 µg de padrões de colesterol e colesteno misturadas à amostra. Ao término da corrida, a placa foi revelada com iodo e a banda contendo a colesteno foi demarcada. Após total sublimação do iodo, raspou-se a sílica correspondente à banda da colesteno, e a mesma foi reextraída da sílica utilizando clorofórmio: metanol (2:1) seguida de centrifugação 1940 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, então, transferido para um novo tubo e o processo foi repetido mais duas vezes, ao final juntando todos os sobrenadantes. O sobrenadante foi seco em N₂, ressuspensão em etanol e 10% do volume foram reservados para contagem da radiação, conforme já descrito, e a colesteno radioativa foi armazenada a -20°C até posterior uso.

3.10.2– Análise da capacidade da célula hospedeira em converter a [³H] colesteno em outros metabólitos: Foram plaqueadas 10⁶ células de Schwann da linhagem ST8814 em garrafas de cultura de 25 cm² e foram mantidas em meio RPMI 2% de SFB durante o experimento. As células foram infectadas ou não com *M. leprae* viável na MOI de 5:1 e após 12 horas de infecção, o meio foi descartado e substituído por 3 mL de meio RPMI com 2% SFB contendo cerca de 2,5 x 10⁶ CPM (contagens por minuto) de [³H] colesteno e 25 µg de colesteno fria. As células foram mantidas a 33°C por 48 horas, com a adição de mais 2 mL de meio RPMI com 2% SFB, 6 horas após a adição de [³H] colesteno. Após o término da incubação, os sobrenadantes foram recolhidos em tubos cônicos de vidro para extração lipídica e as células foram desprendidas da garrafa por tripsinização. Após centrifugação das células para remoção da tripsina, o sedimento de células foi ressuspensão em água. As amostras foram sonicadas em 2 ciclos de 5 minutos utilizando um sonificador de banho. Prosseguiu-se então com a dosagem de proteínas nas amostras provenientes das células pelo método de Lowry e então os lipídios foram extraídos conforme já apontado anteriormente, em clorofórmio: metanol: água (1:2:0,8) (Bligh & Dyer, 1959) e com lavagens com clorofórmio e água (1:1) (Folch et al., 1957). Ao final da extração, as amostras foram secas em N₂ e ressuspensas em clorofórmio: metanol (1:1) e 10% do volume foi reservado para contagem da radiação no cintilador. O equivalente a 600 µg de proteína de cada amostra foi aplicado na placa de sílica, e a TLC foi resolvida com uma fase móvel composta por hexano: éter dietílico: metanol: ácido acético (50:50:5:1). Após o término da corrida e secagem da placa, a TLC foi exposta por cerca de uma semana, para posterior visualização da

radioatividade com o aparelho Cyclone Plus Storage Phosphor System (PerkinElmer) e então os padrões foram revelados com marcação com iodo.

Outro experimento com condições semelhantes foi realizado utilizando monócitos humanos da linhagem THP-1. Foram plaqueadas $3,0 \times 10^6$ de células em garrafas de 25 cm^2 e diferenciados com 80 nM de PMA. As células foram estimuladas ou não com *M. leprae* morto (MOI 5:1) e após 12 horas de estímulo foram adicionados cerca de $4,0 \times 10^5$ CPM de [^3H] Colestenona e 25 μg de colestenoa fria e as células foram incubadas a 37°C por 48 horas. Ao término da incubação os sobrenadantes foram recolhidos, adicionou-se PBS e as células foram desprendidas por remoção mecânica e então foi realizada a extração de lipídios, conforme já descrito e os lipídios foram analisados por TLC conforme descrito para células de Schwann.

3.11 – Análise da produção de colestenoa em células de Schwann infectadas:

O [^3H] colesterol utilizado no experimento foi inicialmente processado para remoção de qualquer possível contaminante, partindo-se de 50 μCi de [^3H] colesterol que foi aplicado em placa de sílica G60, utilizando-se clorofórmio: metanol: ácido acético (95: 4:1) como fase móvel. Ao final da corrida, a TLC foi marcada com iodo, as bandas foram identificadas e o colesterol foi re-extraído da sílica com clorofórmio: metanol (2:1) por 3 vezes. O lipídio final após esse processo foi aplicado em uma nova TLC, utilizando a fase móvel composta por clorofórmio: éter dietílico: metanol: ácido acético (50:50:5:1), segundo descrito (Chen et al., 2015). Ao final da corrida, a TLC foi marcada com iodo e banda referente ao colesterol foi demarcada e re-extraída conforme descrito com clorofórmio: metanol (2:1). Por fim, os lipídios foram secos em atmosfera de N_2 , ressuspensos em etanol e armazenados a -20°C até sua utilização.

Para avaliar a produção de colestenoa *in vitro* a partir do colesterol, células de Schwann da linhagem ST88-14 foram semeadas em garrafas de 25 cm^2 (10^6 células por garrafa), mantendo em meio RPMI suplementado com 2% de SFB. As células foram infectadas ou não com *M. leprae* viável (MOI 5 :1) e após 12 horas foi adicionado cerca de $5,0 \times 10^6$ CPM de estímulo de [^3H]colesterol a cada garrafa. As células foram incubadas a 33°C por 48 horas. Terminada a incubação, os sobrenadantes foram recolhidos e as células foram soltas da garrafa por tripsinização. Conforme já descrito em maiores detalhes no tópico 3.12.2, os lipídios foram extraídos e então analisados.

4. Resultados

4.1 – Efeito da atorvastatina na viabilidade intracelular do *M. leprae*: A relevância do metabolismo de colesterol para a infecção do *M. leprae* em monócitos humanos já havia sido descrita pelo nosso grupo (Mattos et al., 2014), que também demonstrou que a infecção pelo *M. leprae* leva ao acúmulo de corpúsculos lipídicos em células de Schwann, outro tipo celular preferencialmente infectado pelo *M. leprae* no ser humano (Mattos et al., 2011b). Contudo, a importância do colesterol para o *M. leprae* durante a infecção em células de Schwann, ainda não havia sido investigada. Desta maneira, buscou-se avaliar se a inibição da biossíntese do colesterol através do tratamento com atorvastatina também apresentaria algum efeito sobre a viabilidade intracelular do *M. leprae* em células de Schwann, conforme observado em monócitos (Mattos et al., 2010). Para isso, o primeiro passo foi analisar se o tratamento com atorvastatina apresentaria algum efeito citotóxico para célula de Schwann. Portanto, células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 foram tratadas com 1µM de atorvastatina, inibidor da biossíntese de colesterol, assim como com o veículo utilizado para diluição do composto (1% de etanol) e a viabilidade celular foi aferida pela redução do MTT a formazan. A decisão pela atorvastatina se baseou no fato desta ser a classe de estatina mais utilizada e de fácil obtenção, além disso, dados do nosso grupo mostraram que esta droga tem um efeito de sinérgico quando utilizada em conjunto à rifampicina, reduzindo potencialmente mais a viabilidade do *M. leprae* quando comparado ao tratamento com os compostos individualmente (Lobato et al., 2014). Assim, foi utilizada a atorvastatina na mesma concentração do estudo em que tais resultados foram vistos. Os resultados obtidos mostram que após 48 horas de tratamento, tanto a atorvastatina, como seu veículo, não apresentaram efeitos citotóxicos para a célula de Schwann, uma vez que as células apresentaram níveis similares de redução de MTT ao observado na condição controle (Figura 11).

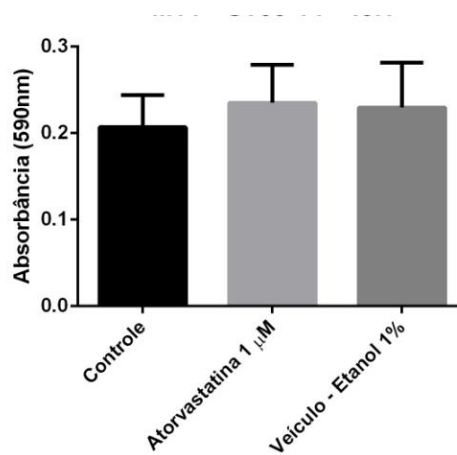


Figura 11 – A atorvastatina não é citotóxica para células de Schwann. Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram tratadas com 1 µM de atorvastatina ou veículo etanol 1% por 48 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. A análise estatística foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com correção de Dunn, $p > 0,05$ ($n=3$).

A partir destas observações prosseguiu-se com as análises do efeito da inibição da síntese do colesterol no modelo de infecção em célula de Schwann. Assim, as células foram simultaneamente tratadas com 1 µM de atorvastatina ou veículo (etanol 1%) e infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1) por 24 horas a 33 °C e a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi determinada por qPCR. Foi observado que o tratamento com atorvastatina diminui a viabilidade intracelular do *M. leprae* em cerca de 30%, enquanto o tratamento com o veículo etanol não afetou a viabilidade do bacilo (Figura 12). Entretanto, é importante ressaltar que as análises estatísticas, comparando as condições infectadas não tratada e tratada com atorvastatina, foram feitas utilizando o teste não paramétrico e não pareado de Kruskal-Wallis com correção de Dunn, e apresentaram um valor de $p=0,0571$. Entretanto, os pressupostos deste teste estatístico utilizado exigem um maior número de replicatas experimentais ($N > 4$) para um resultado estatisticamente significativo. Logo, apesar do *p-value* não ter dado um valor significativo, os dados apontam uma grande tendência de diminuição da viabilidade do bacilo e sugerem que o metabolismo de colesterol também é crucial para o *M. leprae* no modelo de infecção de célula de Schwann.

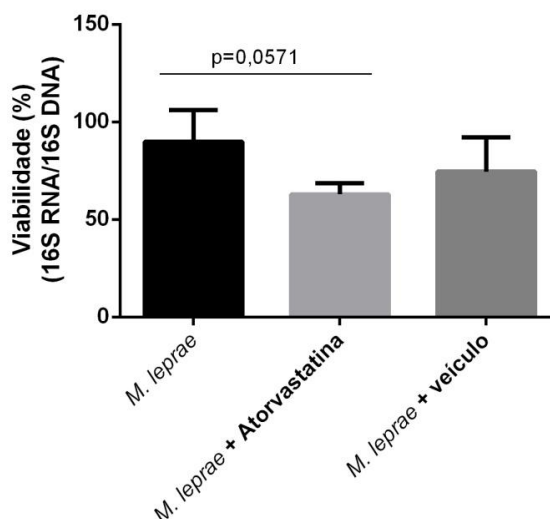


Figura 12 – Atorvastatina diminui a viabilidade do *M. leprae* em células de Schwann humanas.

Células de Schwann da linhagem ST8814 foram infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1) e tratadas com atorvastatina 1 μ M ou veículo (etanol 1%) e foram mantidas a 33°C por 24 horas. Análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com correção de Dunn, *M. leprae* versus *M. leprae* + atorvastatina $p=0,0571$; *M. leprae* + atorvastatina versus *M. leprae* + veículo $p=0,8$ e *M. leprae* versus *M. leprae* + veículo $p=0,8$ ($n=4$).

4.2 – Detecção da enzima 3 β -HSD de *M. leprae* em biópsias de pacientes por *western blotting*:

Conforme já relatado, o *M. leprae* não é capaz de degradar o colesterol, no entanto, ele realiza a primeira reação da via de degradação deste esteroide, a oxidação de colesterol em colestenona (Marques et al., 2015). Este estudo ainda sugeriu que a principal enzima responsável por essa conversão seria a 3 β -HSD, previamente detectada na parede celular do *M. leprae* (Marques et al., 2008). O primeiro passo foi então detectar a presença da enzima em biópsias de pele de pacientes lepromatosos por *western blotting*. Para isso, foi utilizado um anticorpo policlonal, anti-3 β -HSD, produzido em coelho, (colaboração com a Dra. Angela Marques-Colorado State University, CO, EUA). Testes prévios demonstraram a eficiência do anticorpo em reconhecer a proteína recombinante (dados não mostrados). Neste sentido, extratos proteicos proveniente de biópsias de pele de dois pacientes lepromatosos, LL1 e LL2, foram utilizados. A figura 13A mostra o perfil das amostras proteicas após fracionamento por SDS-PAGE. Após eletrotransferência para membrana de nitrocelulose e realização do *western blotting*, pode-se observar a presença de uma forte banda entre 40 e 55 kDa (Figura 13) detectada com o anticorpo anti-3 β -HSD em ambas as amostras, indicando que o

bacilo expressa a enzima durante a infecção humana e que a mesma pode vir a desempenhar funções importantes durante a patogênese do *M. leprae*.

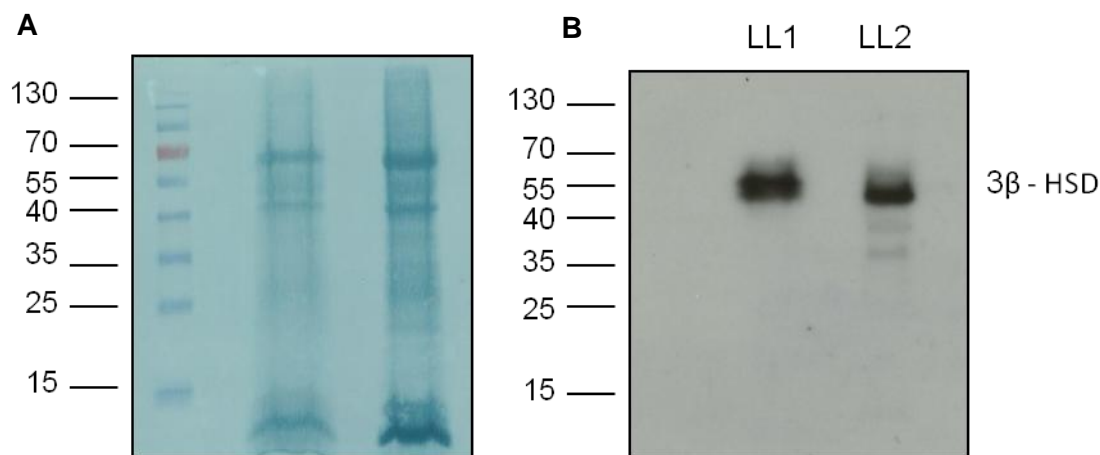


Figura 13 - A enzima 3β-HSD de *M. leprae* é expressa em biópsias de pele de pacientes LL. Biópsias de lesões de pele de pacientes LL foram tratadas com Trizol e as proteínas foram recuperadas através de diálise em 0,1% de SDS. (A) 30 µg de proteínas totais fracionadas por SDS-PAGE, transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com Amido Black. (B) *Western blotting* revelado com anticorpo anti-3β-HSD (1:60.000) e substrato quimioluminescente (n=2). Marcador de peso molecular indicado à esquerda em kDa.

4.3 – Determinação do efeito do composto SB100 sobre a produção de colestenona e NADH pelo *M. leprae*: Para compreender o papel da enzima 3β-HSD na infecção pelo *M. leprae*, foi utilizado o composto SB100, um inibidor da 3β-HSD de *M. tuberculosis*, gentilmente cedido pela Dra. Nicole S. Sampson (Stone Brooke University, NY, EUA). A utilização deste composto foi possível, considerando a elevada identidade entre a 3β-HSD de *M. tuberculosis* e *M. leprae*. O composto SB100 foi então testado quanto a capacidade de inibir a geração de colestenona pelo *M. leprae* vivo. Para tal, as bactérias foram incubadas em concentrações crescentes de SB100 na presença de [26-¹⁴C]-colesterol e de [¹⁴C]-palmitato, este último para determinação da viabilidade do bacilo por respirometria. A geração de colestenona foi avaliada através de TLC, seguida de quantificação através da densitometria das autorradiografias. Primeiramente testaram-se concentrações na faixa de 5 a 80 µM, onde se pode observar uma leve inibição da síntese de colestenona, de cerca de 20% na maior concentração de 80 µM (Figura 14A e B), sem afetar a viabilidade do *M. leprae* (Figura 14C).

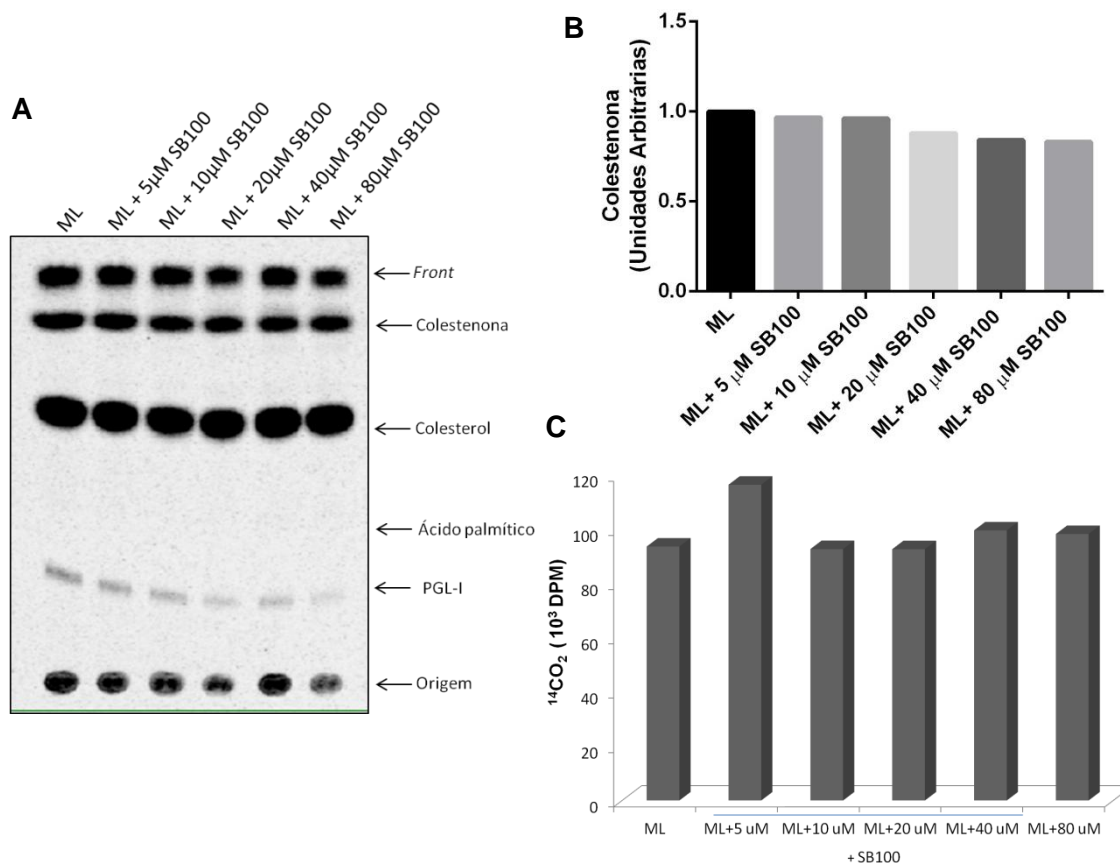


Figura 14 – Efeito do composto SB100 sobre a produção de colestenoa pelo *M. leprae*. 1,8 x10⁸ *M. leprae* (ML) foram tratado ou não com concentrações de 5, 10, 20, 40 ou 80 µM do inibidor SB100 por 1 hora a 30°C e incubados com [¹⁴C] ácido palmítico e [26-¹⁴C] colesterol por 48 horas a 30°C. (A) Autorradiografia da TLC em sílica com fase móvel de clorofórmio:metanol (95:5) (B) Densitometria correspondente à TLC. (C) Radiorrespirometria para medição da viabilidade do *M. leprae* (n=1).

Dessa forma, para avaliar se doses maiores do inibidor resultariam num efeito mais pronunciado sobre a inibição da síntese de colestenoa, foram utilizadas concentrações na faixa de 50 a 600 µM do composto SB100. Pode-se observar que a partir da concentração de 100 µM a inibição da produção de colestenoa foi mais evidente atingindo cerca de 50% (Figura 15). Este efeito inibitório permaneceu estável nas concentrações superiores até 600 µM (Figura 15). O efeito da SB100 sobre a viabilidade da bactéria foi também avaliado. O resultado mostra uma variabilidade entre as replicatas experimentais 1 e 2, principalmente nas doses de 400 e 600 µM. Contudo, nas doses até 200 µM, o efeito foi discreto e consistente (Figura 15C). Com base nestes dados, definimos a concentração de 100 µM, que corresponde à concentração mínima necessária para gerar a inibição máxima observada, sem afetar significativamente a viabilidade bacteriana, como a dose ótima para ser utilizada nos ensaios subsequentes. Além disto, pode-se dizer que a

inibição da geração de colestenona após o tratamento com SB100 sugere que a 3 β -HSD apresente um papel importante na produção da colestenona pelo *M. leprae*.

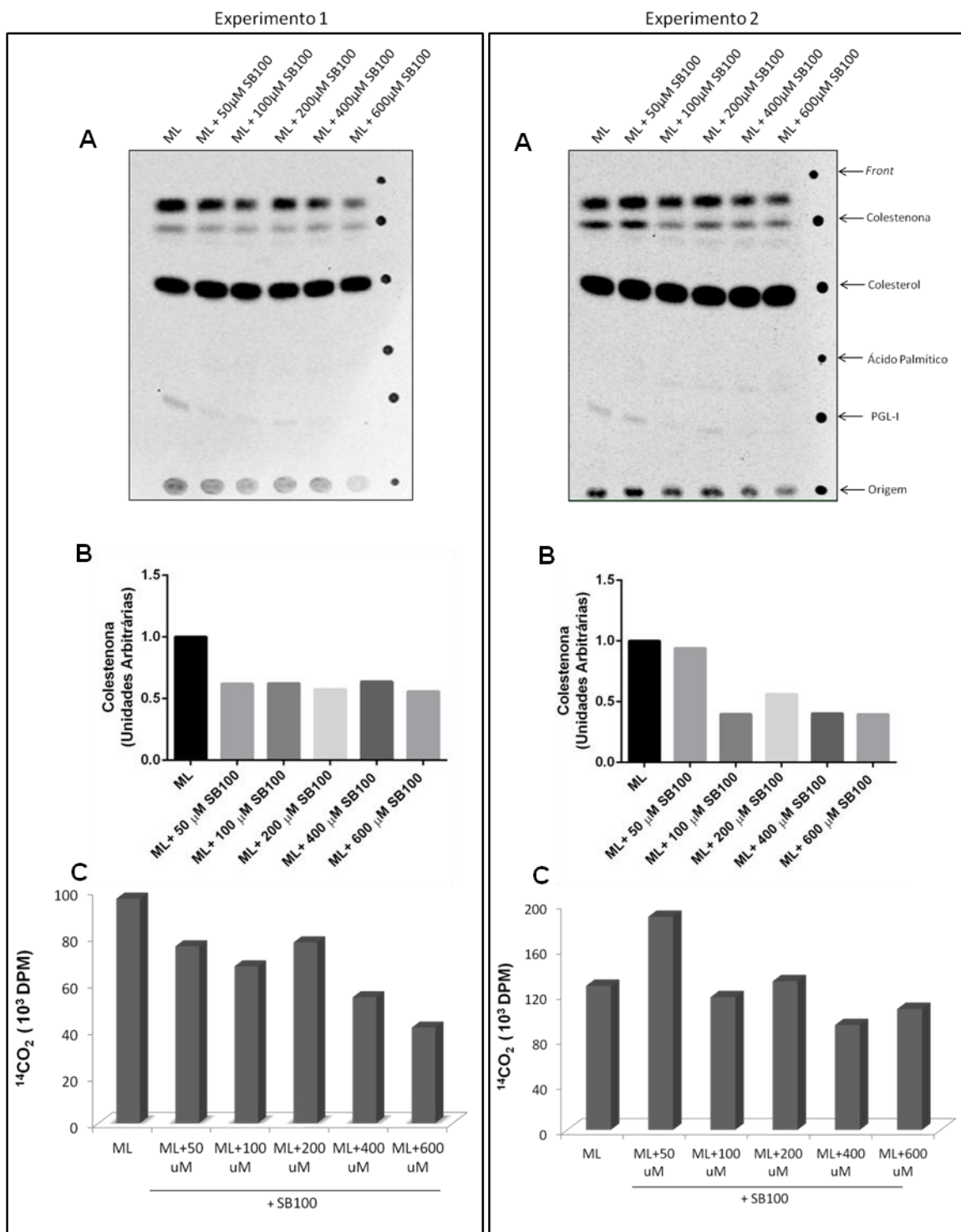


Figura 15 – O tratamento com o composto SB100 em concentrações acima de 100 μ M reduz a produção de colestenona pelo *M. leprae*. $1,8 \times 10^8$ *M. leprae* (ML) foi tratado ou não com concentrações de 50, 100, 200, 400 ou 600 μ M do inibidor SB100 por 1 hora e incubado com [26- ^{14}C] colesterol (A e B) e [^{14}C] ácido palmítico (C). (A) Autorradiografia da TLC em sílica com fase móvel de clorofórmio:metanol (95:5) (B) Densitometria correspondente à TLC. (C) Radiorrespirometria para medição da viabilidade do *M. leprae*. (n=2).

Como mencionado anteriormente, a inibição da enzima 3 β -HSD reduz não só a produção de colestenoa mas também de outro produto da reação, o NADH. Para avaliarmos se o tratamento com SB100 afetaria a geração de NADH foi feita uma curva temporal do efeito do composto SB100 sobre a redução de NAD a NADH e analisado por densitometria óptica a 340 nm. Para isto, adicionou-se ou não colesterol ao sonicado de *M. leprae*. Os resultados mostram em duas replicatas biológicas, 1 e 2, que a adição de colesterol e NAD aumentou os níveis de NADH quando comparado a situação basal (ausente de colesterol) (Figura 16). Entretanto, a adição de 100 μ M do inibidor SB100 reduziu a produção de NADH a níveis abaixo do basal em todas as replicatas biológicas analisadas (Figura 16). Dessa forma, os resultados apontam mais uma vez que o inibidor SB100 é eficiente em inibir a atividade da 3 β -HSD de *M. leprae* e que parte do NADH gerado pela bactéria pode resultar da oxidação do colesterol a colestenoa por ação da 3 β -HSD.

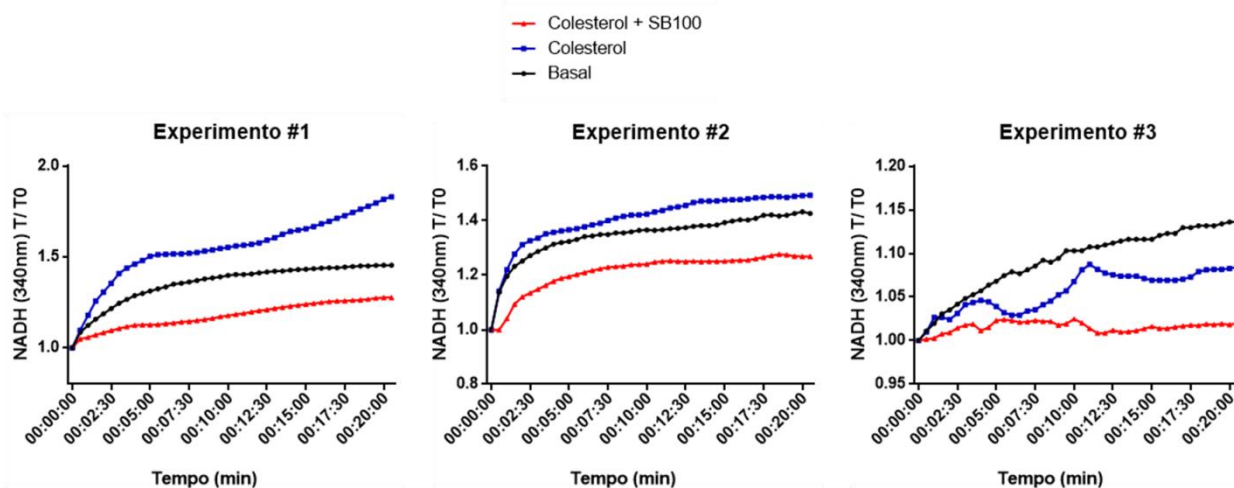


Figura 16 – O tratamento com SB100 afeta a redução de NAD a NADH pelo *M. leprae*. Representação da razão entre a densidade óptica (D.O.) a 340 nm no tempo de leitura / D.O. no tempo zero ao longo da cinética realizada a cada 30 segundos por 20 minutos de sonicados de *M. leprae* incubados com colesterol e tratados ou não com 100 μ M do inibidor SB100 para medir a redução do NAD⁺ a NADH (n=3).

Um dos importantes papéis do NADH resultante da oxidação do colesterol pode ser o de agir como poder redutor, doando elétrons para a cadeia respiratória. Dessa forma, numa etapa seguinte foi avaliado o efeito da inibição da 3 β -HSD sobre a redução de citocromo C, um importante componente da cadeia transportadora de elétrons. Para isto, utilizou-se extrato total da bactéria e os níveis de citocromo C reduzido foram medidos por densitometria na D.O.= 550 nm. Foi observado que a oxidação do colesterol aumenta os níveis de citocromo C reduzido. Este padrão se

repetiu nos três experimentos realizados (Figura 17). Além disso, foi observado que a adição de SB100 diminui os níveis de citocromo C reduzido, indicando que a atividade da enzima 3 β -HSD estaria relacionada com a redução de citocromo C observada (Figura 17).

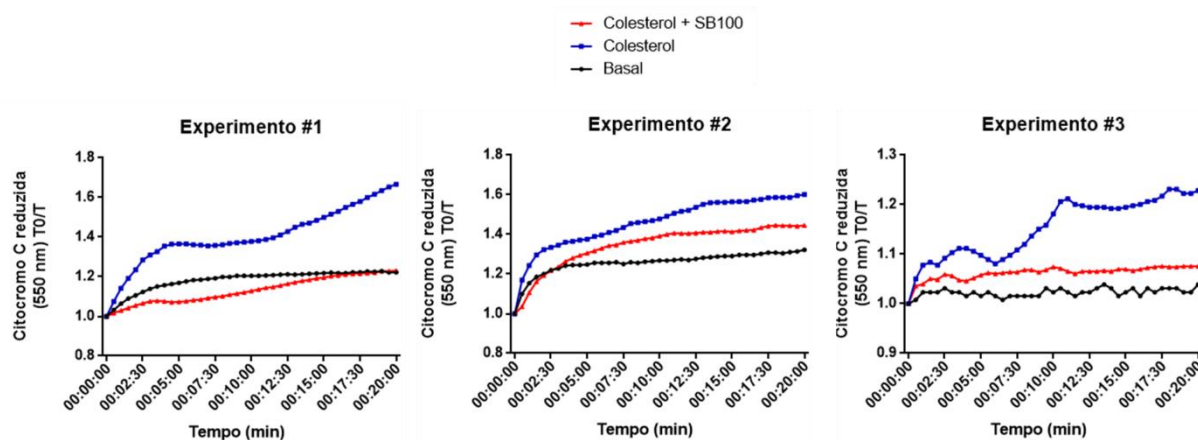


Figura 17 – A atividade da 3 β -HSD promove um aumento nos níveis de citocromo C reduzido. Representação da razão entre a densidade ótica (D.O.) a 550 nm no tempo de leitura / D.O. no tempo zero ao longo da cinética de 30 em 30 segundos por 20 minutos em sonificados de *M. leprae* incubados com colesterol e tratados ou não com 100 μ M do inibidor SB100 para medir a redução do citocromo C (n=3).

4.4 – Efeito da inibição da enzima 3 β -HSD sobre a biossíntese de lipídios micobacterianos: Como observado a inibição da enzima 3 β -HSD de *M. leprae* não afeta somente a produção de colesteno, também inibe a geração de NADH. Sabe-se que a síntese de alguns lipídios das micobactérias exige poder redutor, como por exemplo, a enzima ácido graxo sintase de *M. tuberculosis*, envolvida na síntese e alongamento de ácidos graxos, que utiliza NADH como cofator (Minnikin et al., 2002). Com isso, buscou-se avaliar se a inibição da enzima também poderia afetar a biossíntese de lipídios do *M. leprae*. Dessa forma, o *M. leprae* foi incubado com ¹⁴C-palmitato na presença ou não de concentrações crescentes de SB100 e o perfil lipídico foi avaliado por TLC. Na Figura 18A pode-se observar que a inibição da enzima levou a uma diminuição acentuada da síntese de PGL-I já na dose mínima utilizada de 50 μ M de SB100. Num terceiro experimento trabalhamos, então, com uma faixa de concentração menor do inibidor, onde pudemos observar de forma mais clara um efeito dose-dependente, com o aumento da concentração do SB100 resultando em uma inibição mais acentuada (Figura 18B). Com isso, observa-se que a inibição da enzima 3 β -HSD também afeta a produção de lipídios micobacterianos, como o PGL-I, que é crucial para o *M. leprae*, e esse fenômeno potencialmente está

relacionado com a inibição da produção de poder redutor, contudo essa relação ainda deve ser melhor estudada, assim como a síntese de outros lipídios, como ácidos micólicos também deve ser avaliada.

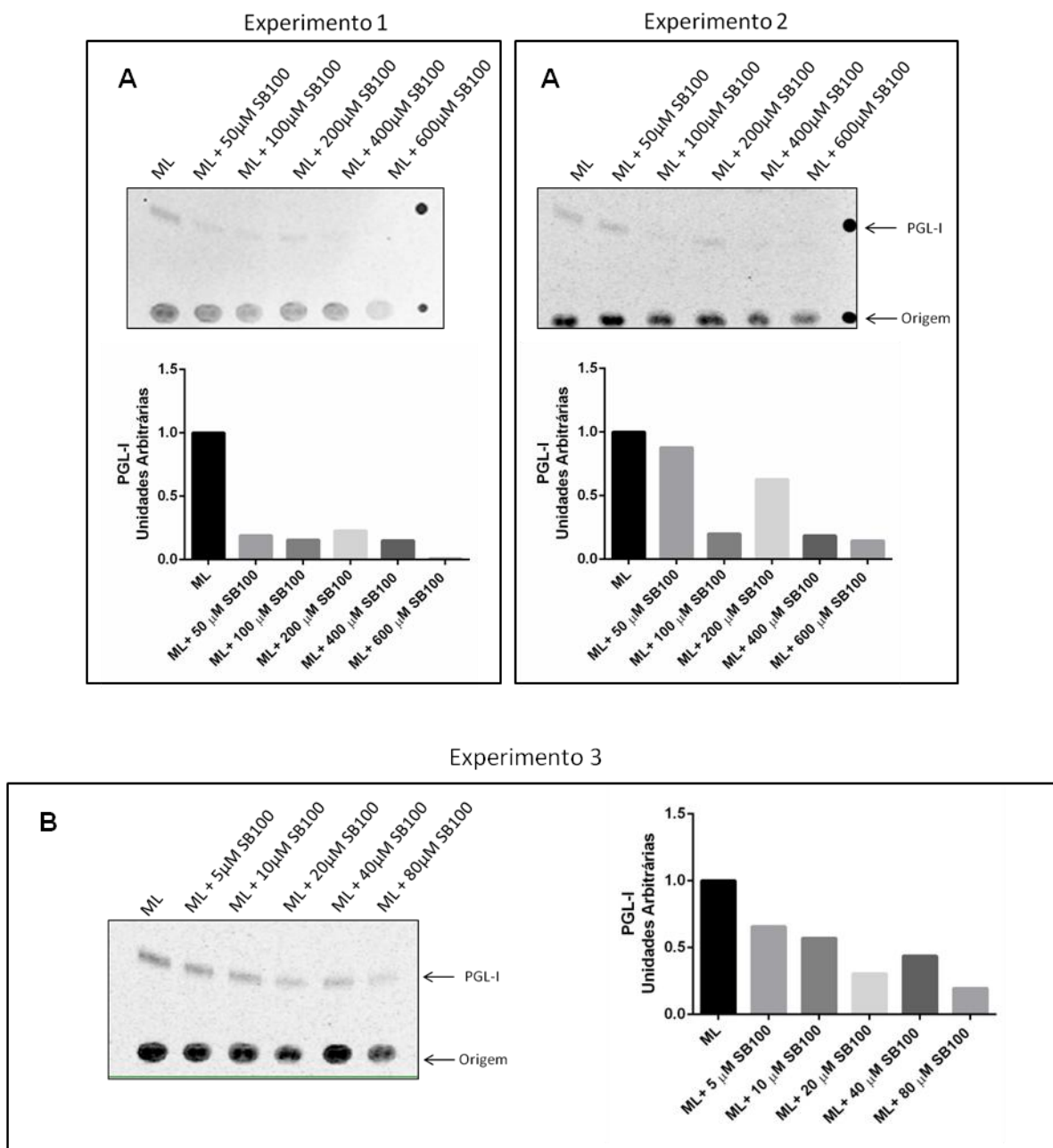


Figura 18 – SB100 inibe a biossíntese de PGL-I pelo *M. leprae*. (A) O *M. leprae* foi tratado com concentrações crescentes de SB100 (50; 100; 200; 400 ou 600 µM) por 1 hora e incubado por 48 horas a 33°C e a produção de PGL-I foi determinada por TLC, representada pela autorradiografia da TLC à esquerda, utilizando fase móvel de clorofórmio: metanol (95:5) de cada experimento e gráficos abaixo representam a densitometria da TLC respectiva de cada experimento (n=2). (B) A micobactéria foi tratada com concentrações menores de SB100 (5; 10; 20; 40 ou 80 µM) e a produção de PGL-I foi avaliada por TLC, à esquerda representado a autorradiografia e à direita a densitometria correspondente (n=1).

Outra classe de lipídios da parede celular que também é essencial para a virulência do *M. leprae* são os PDIMs. Para analisar o efeito do composto SB100 na produção deste lipídio, foi feita uma TLC bidimensional conforme descrito (Marques et al., 1998). Para isto, foram utilizados dois extratos lipídicos, obtidos de bactérias, não tratadas e tratadas com 80µM de SB100. O resultado revelou que o tratamento com o inibidor da 3β-HSD também leva a uma redução da síntese de PDIM (Figura 19B). Ao avaliar diferentes concentrações de SB100 e seus efeitos na síntese de PDIMs por TLCs unidimensionais foi confirmada a observação que a inibição da enzima afeta a síntese de PDIM, aparentando ter o efeito intensificado à medida que se aumenta a concentração do inibidor (Figura 19C).

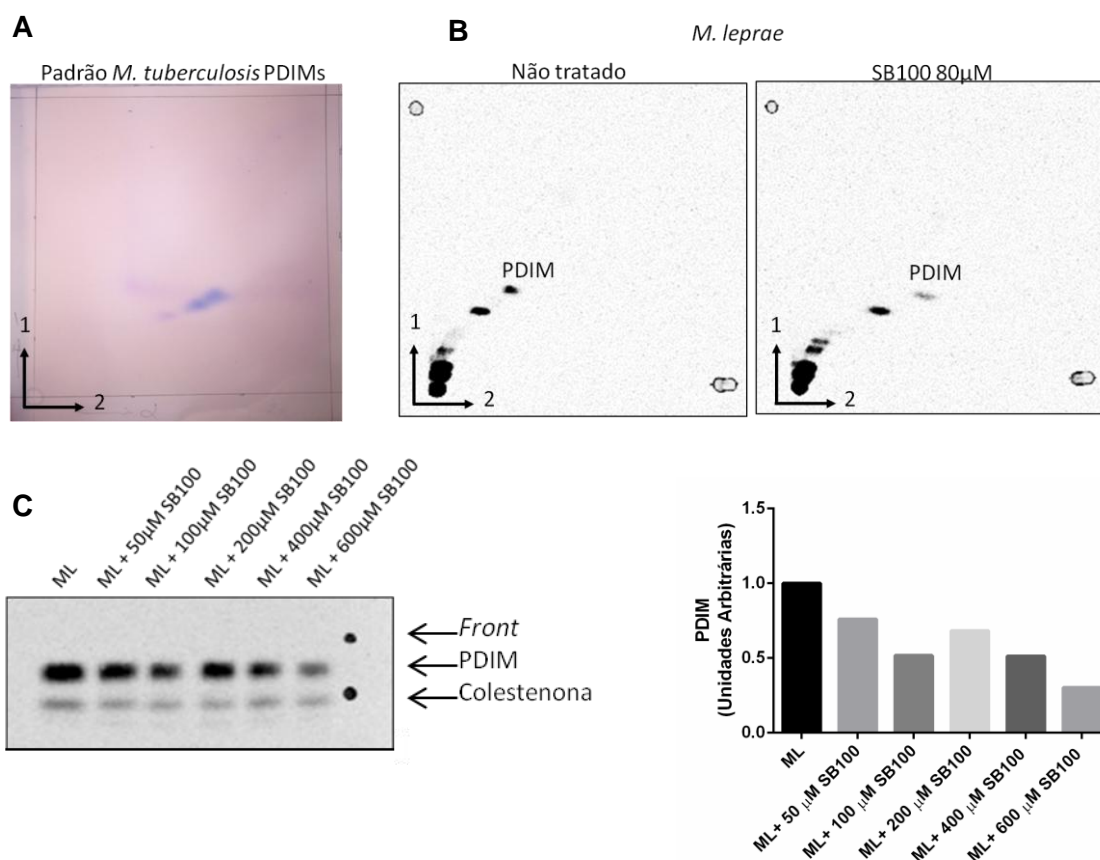


Figura 19 – A inibição da enzima 3β-HSD de *M. leprae* diminui a síntese de PDIM. Extratos lipídicos de *M. leprae* incubado com [¹⁴C] ácido palmítico e tratado com 80µM SB100 em TLC bidimensional com fase móvel de éter de petróleo: acetato de etila (98:2) corrida por 3 vezes na direção 1, e fase móvel de éter de petróleo: acetona (98:2) corrida uma vez na direção 2 (A) Padrão de PDIMs de *M. tuberculosis* corados com anisaldeído. (B) Autorradiografias das corridas de TLC, à esquerda representando a corrida do extrato lipídico de *M. leprae* não tratado, enquanto à direita representa a amostra de *M. leprae* tratado com 80µM de SB100 (n=1) (C) Autorradiografia representativa de 2 experimentos à esquerda de extratos lipídico de *M. leprae* tratado com diferentes concentrações de SB100 (50, 100, 200, 400 e 600 µM) por 1 hora e com incubação com [¹⁴C] ácido palmítico por mais 48 horas analisados em corrida de TLC com fase móvel de clorofórmio:metanol (95:5); à direita, a densitometria correspondente à corrida (n=2).

4.5 – Análise do efeito da inibição da enzima 3 β -HSD sobre a viabilidade intracelular do *M. leprae* em células de Schwann: A fim de aprofundar o estudo do papel da enzima 3 β -HSD na patogênese do *M. leprae*, buscou-se avaliar o impacto da inibição de sua atividade enzimática na viabilidade intracelular do bacilo em células de Schwann.

Apesar da isoforma de 3 β -HSD do *M. leprae* não ser expressa em células eucarióticas, estas possuem algumas isoformas dessas enzimas desta mesma família. Portanto, a fim de evitar um possível efeito cruzado do inibidor SB100 nas hidroxisterol desidrogenases da célula hospedeira, padronizamos um protocolo no qual a bactéria foi pré-tratada com SB100, removendo o inibidor antes da infecção das células. Testes em meio axênico foram realizados a fim de determinar o tempo de pré-tratamento mais adequado da bactéria com a droga. Também buscou-se avaliar o efeito do inibidor na viabilidade do bacilo, assim como se, mesmo após a retirada de SB100, a inibição da enzima e consequente geração de colesteno se matinha.

Sendo assim, a micobactéria foi pré-tratada ou não com 100 μ M de SB100 em dois esquemas temporais, um de 6 horas e outro de 24 horas de tratamento. Após o pré-tratamento a micobactéria foi centrifugada e então ressuspensa em novo meio com reposição ou não do inibidor, esta última representada como (-). O *M. leprae* foi então incubado por mais 24 ou 48 horas. Inicialmente avaliou-se o impacto dos esquemas temporais de tratamento sobre a viabilidade do bacilo medida por radiorrespirometria. Os resultados mostram que a incubação por 24 horas pós tratamento apresentou um menor impacto na viabilidade do *M. leprae* (Figura 20A) quando comparado a incubação por 48 horas após o pré-tratamento com o inibidor (Figura 20B). Nesta condição foi observado que independente do tempo utilizado de pré-tratamento, a viabilidade do *M. leprae* foi significativamente afetada quando comparado ao *M. leprae* não tratado (Figura 20B). Contudo, a figura 20A mostra também que o efeito sobre a viabilidade do bacilo variou de acordo com o pré-tratamento e com a presença ou não do inibidor. Em linhas gerais, foi observado que a remoção do inibidor após o pré-tratamento afetou menos a viabilidade do *M. leprae* do que as condições em que o inibidor foi mantido durante toda a incubação (Figura 20A). Logo, pode-se concluir que o composto em si após certo tempo de tratamento já é tóxico ao bacilo. Adicionalmente observamos que o pré-tratamento por 24 horas com o inibidor resultou em uma queda na viabilidade do *M. leprae* tanto na condição

(24/24) quanto (24/24 (-)), tendo a primeira um efeito mais drástico. No entanto, o pré-tratamento por 6 horas (6/24 (-)), com posterior remoção do inibidor não afetou a viabilidade do *M. leprae*, quando comparado ao *M. leprae* não tratado (Figura 20A). Com relação a atividade inibitória do SB100 observamos que este aparenta apresentar um efeito inibitório de longo prazo, pois todos os esquemas temporais de tratamento, com ou sem reposição do inibidor foram eficientes em reduzir a produção de colesteno em até 48 horas após o tratamento (Figura 20C), embora naqueles em que o inibidor não foi repostado (condições (-)), a produção da colesteno apresente um leve aumento (Figura 20C). Dessa forma, foi escolhido o esquema temporal de pré-tratamento com o SB100 por 6 h/24h(-) para os ensaios de infecção da célula de Schwann, pois nesse esquema temporal a eficiência da inibição é mantida e não são observados maiores comprometimentos à viabilidade do *M. leprae*.

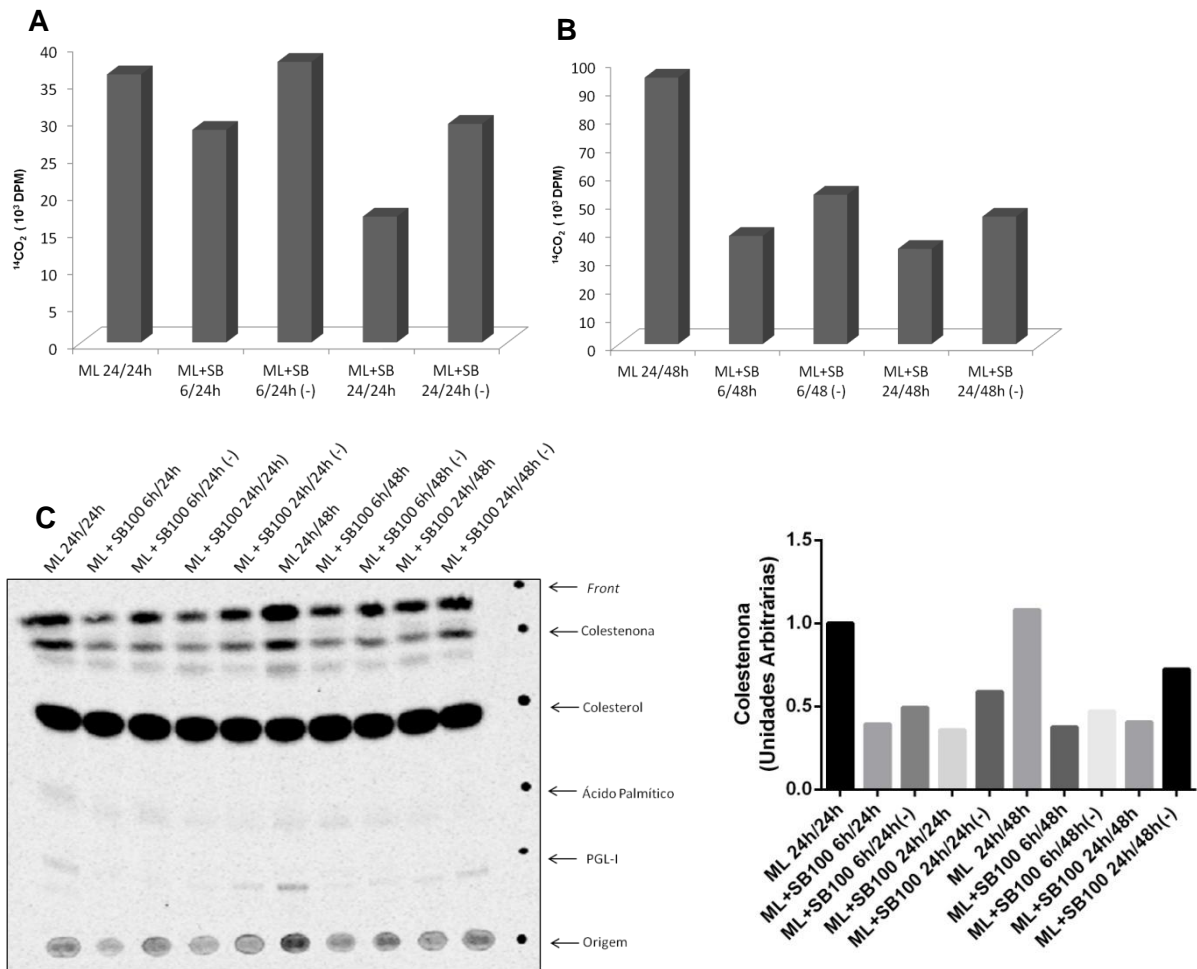


Figura 20 – SB100 apresenta um efeito de inibição prolongada sobre a 3 β -HSD do *M. leprae*. Efeito do tratamento com 100 μ M de inibidor SB100 sobre a viabilidade do *M. leprae* (ML) em meio axênico aferida por radiorrespirometria após 24 horas (A) ou 48 horas (B) com ou sem manutenção do inibidor (a condição sem o inibidor está representada como (-)) após a pré-incubação em tempos de 6 horas ou 24 horas, (n=1). (C) Inibição da produção de colestenona após o tratamento com 100 μ M SB100 e em diferentes esquemas temporais de tratamento: pré-tratamento com o inibidor por 6 horas e posterior incubação por 24 horas (6h/24h); pré-tratamento por 24 horas e incubação por 24 horas (24h/24h), pré-tratamento por 6 horas e incubação por 48 horas (6h/48h) e pré-tratamento por 24 horas e incubação por 48 horas (24h/48h). À esquerda encontra-se a autorradiografia da TLC em sílica com fase móvel de clorofórmio:metanol (95:5) e à direita encontra-se a densitometria referente a TLC.

Dessa forma, o *M. leprae* foi pré-incubado por 6 horas com o inibidor SB100 na concentração de 100 μ M. Após o tratamento, as bactérias foram recuperadas por centrifugação o inibidor removido e as células de Schwann foram, então, infectadas por 24 horas e a viabilidade do *M. leprae* monitorada por qPCR. Os dados mostrados na figura 21 apontam para uma queda na viabilidade do *M. leprae* tratado com o inibidor SB100, quando comparado ao *M. leprae* tratado apenas com o veículo DMSO (Figura 21), sugerindo assim a importância da enzima 3 β -HSD para o estabelecimento da infecção em células de Schwann.

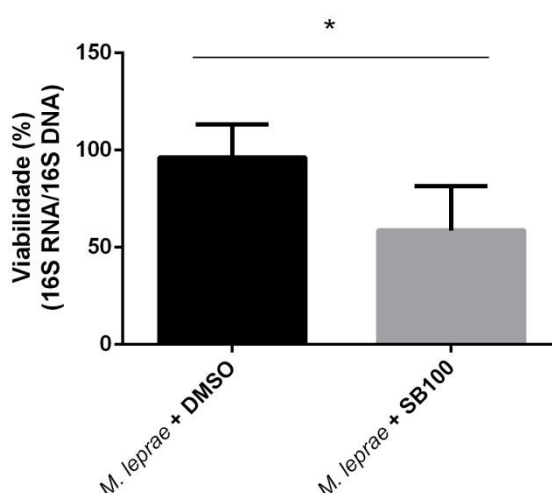


Figura 21 – A inibição da enzima 3 β -HSD diminui a viabilidade intracelular do *M. leprae* em células de Schwann infectadas. *M. leprae* foi pré-tratado com o inibidor SB100 (100 μ M) ou somente com o veículo (DMSO 2%) por 6h. Em seguida, as bactérias foram recuperadas por centrifugação, o inibidor foi removido e então o *M. leprae* tratado ou não foi utilizado na infecção de células de Schwann da linhagem ST8814 (MOI 5:1) por 24 horas. A viabilidade do *M. leprae* foi determinada por qPCR. Análise estatística foi realizada utilizando o teste Mann Whitney U two-tailed, * $p < 0,05$ (n=5).

4.6 – Análise do efeito da adição exógena de colestenona sobre a viabilidade intracelular do *M. leprae* em células de Schwann: O dado anterior sugere que a enzima 3 β -HSD seja importante para a viabilidade intracelular do *M. leprae* em infecções em células de Schwann da linhagem ST88-14. Dessa forma, posteriormente buscou-se compreender se a contribuição da enzima para a viabilidade intracelular do *M. leprae* estaria também relacionada à produção de colestenona em si, isto é, se a colestenona *per se* apresentaria algum efeito biológico que poderia favorecer a sobrevivência intracelular do bacilo nas células de Schwann. Para isso, primeiramente, células de Schwann da linhagem ST88-14 foram tratadas com colestenona nas concentrações de 0,1; 0,5; 1, 2,5; 5 e 10 μ M para avaliar o possível efeito citotóxico nas células e determinar a melhor

concentração de uso, que não apresentasse efeitos danosos à célula. Os dados mostram que a colestenona não comprometeu a viabilidade celular em nenhuma das concentrações utilizadas, tanto no tempo de 48 horas (Figura 22A), como após 72 horas de incubação (Figura 22B). O veículo utilizado para a solubilização da droga, o etanol, também foi avaliado em duas concentrações de 0,1% e 0,05% e também não apresentou efeito citotóxico nas células no tempo de 48 horas (Figura 22A).

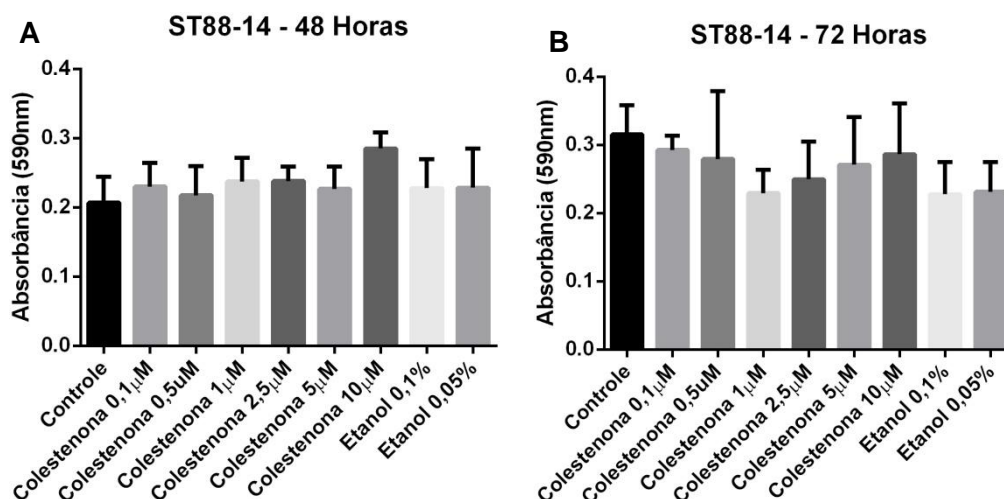


Figura 22 - Análise da citotoxicidade da colestenona em células de Schwann. Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram tratadas com 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 e 10 µM de colestenona ou com o veículo etanol nas concentrações de 0,1% e 0,05% e a viabilidade celular foi medida pelo método do MTT, através da leitura da absorbância a 590 nm após 48 horas de incubação com colestenona (n=3) (A) ou após 72 horas (n=1) (B). Análise estatística em (A) foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com correção de Dunn, p>0,05.

A partir destes achados, foi escolhida a concentração intermediária de 5 µM para os ensaios subsequentes. As células de Schwann foram pré-tratadas com colestenona na concentração de 5 µM ou com o veículo etanol por 24 horas e então infectadas com o *M. leprae* por mais 96 horas, quando a viabilidade da micobactéria foi determinada por qPCR. O percentual de viabilidade do *M. leprae* após o tratamento com colestenona foi, então, avaliado em comparação à célula tratada com o veículo na concentração de 0,01% (Figura 23). Os resultados apontam uma tendência à colestenona em favorecer a sobrevivência intracelular do *M. leprae* na célula de Schwann (Figura 23). Entretanto, conforme já comentado anteriormente, o teste estatístico utilizado exige como pressupostos um n amostral maior para determinar um dado com diferença estatística.

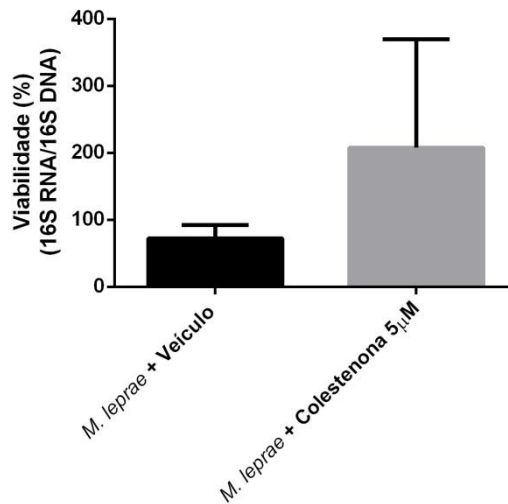


Figura 23 - Colestenona parece favorecer a sobrevivência intracelular do *M. leprae* na célula de Schwann. Células de Schwann da linhagem ST8814 foram pré-tratadas ou não por 24 horas com colestenoa 5μM ou veículo, 0,01% etanol, e foram infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1) por 96 horas para determinação da viabilidade do *M. leprae* por qPCR. Análises estatísticas realizadas pelo teste de Mann Whitney U, $p=0,11$. (n=4).

Já foi descrito na literatura que devido à diferença estrutural da colestenoa em relação ao colesterol, a mesma altera algumas das propriedades membranares, podendo impactar em processos como migração celular (Neuvonen et al., 2014). Dessa forma, um controle importante seria verificar se a colestenoa poderia impactar na entrada de bacilos na célula hospedeira, o que alteraria as condições de infecção. Para isso, em um primeiro momento foi avaliado se o tratamento com colestenoa afetaria a associação de micropartículas (*beads*) fluorescentes às células de Schwann através de citometria de fluxo. Foi observado que nem colestenoa ou o veículo etanol afetaram a associação de *beads* às células de Schwann (Figura 24A). Além disso, o efeito da colestenoa sobre a internalização do *M. leprae* pela célula de Schwann também foi avaliado por microscopia de fluorescência. Corroborando com os dados de citometria, não foi observada diferença de internalização entre as células infectadas e as infectadas e tratadas seja com veículo ou com a colestenoa (Figura 24B).

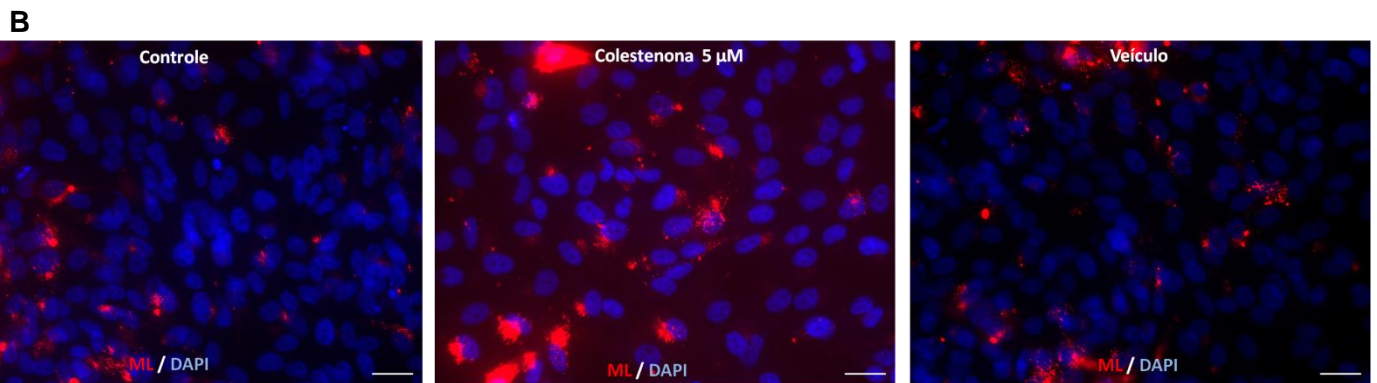
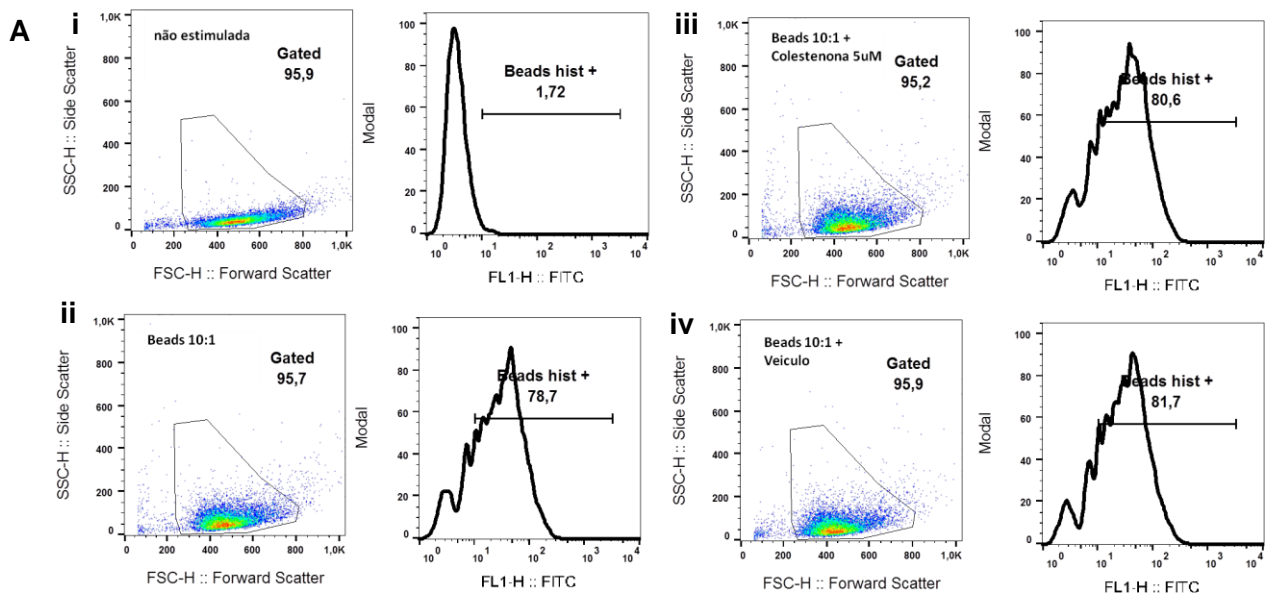


Figura 24 – A colesthenona parece não afetar a associação de partículas e micobactérias às células de Schwann. (A) Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram pré-estimuladas com colesthenona na concentração de 5µM ou veículo por 24 horas, seguido da adição de *beads* verde-fluorescentes numa relação 10:1 partículas:célula. Após incubação por mais 24 horas, a intensidade de fluorescência foi medida por citometria de fluxo. i: condição controle sem estímulo; ii: Condição somente com adição de *beads* (MOI 10:1); iii: Condição com o pré-tratamento com colesthenona 5µM e iv: pré-tratamento com o veículo etanol. Para cada condição, o painel mais à esquerda representa os eventos e a população de estudo demarcada. O gráfico mais à direita representa o histograma do canal FL-1 (FITC). Resultado representativo de 2 experimentos (n=2). (B) Células de Schwann foram pré-tratadas ou não com colesthenona 5µM ou veículo por 24 horas. Em sequência as células foram infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1) marcado com PKH26 e foram mantidas por mais 96 horas. *M. leprae* (ML – vermelho); núcleo (DAPI, azul). Barra de escala representa 20 µm (n=1).

Para confirmar que a colestenoína não compromete a membrana plasmática a ponto de interferir com a internalização de partículas e micobactérias também foram realizados testes em outra célula hospedeira da micobactéria, os macrófagos. Para isso utilizaram-se macrófagos humanos da linhagem THP-1 diferenciados com PMA que foram pré-tratados por 24 horas com colestenoína nas concentrações de 5 ou 10 μM ou com o veículo etanol, em sequência foram estimulados com *M. leprae* morto (MOI 5:1) marcado com PKH26 (vermelho) por mais 24 horas, avaliando-se o percentual de células com bacilos fagocitados por microscopia de fluorescência. O potencial efeito da colestenoína sobre a fagocitose também foi observado por citometria de fluxo, utilizando *beads* verde-fluorescentes, conforme realizado com células de Schwann.

Pode-se observar através das imagens que não há uma diferença visual no percentual de células com micobactéria internalizada (Figura 25A), o que foi confirmado após quantificação, (Figura 25B). Também não foi observada diferença na associação de *beads* aos macrófagos entre as condições não tratada ou tratada com colestenoína por citometria de fluxo (Figura 25C). Em conjunto, todos estes resultados mostram que a colestenoína não afeta a infecção e internalização do bacilo.

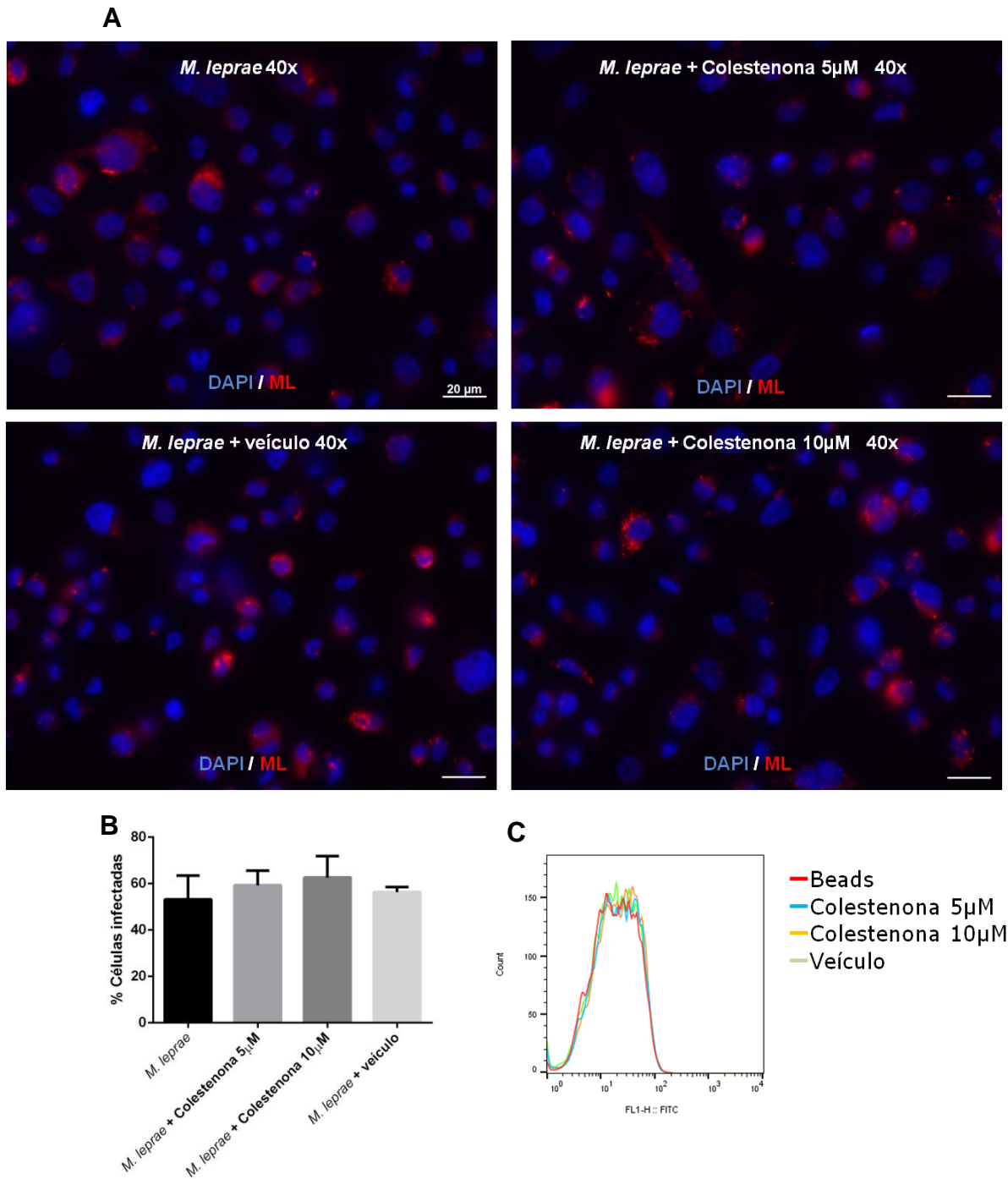


Figura 25 - Colestenona não afeta a internalização de micobactérias e partículas em macrófagos THP-1. (A) Macrófagos humanos da linhagem THP-1 diferenciados com 80nM de PMA foram pré-tratados com colestenona 5, 10 μ M ou veículo (etanol) por 24 horas e estimulados com *M. leprae* morto (MOI 5:1) por mais 24 horas. Fotos representativas do experimento tiradas com aumento de 40x. Núcleos marcados em azul com DAPI e *M. leprae* marcado em vermelho com PKH26. Barra de escala representa 20 μ m (n=1) (B) Contagem do percentual de células infectadas referentes ao experimento de microscopia. (n=1). (C) Histograma do canal FL-1 (FITC) do experimento com macrófagos. As células foram pré-tratados com colestenona 5 μ M (azul), 10 μ M (amarelo) ou veículo (etanol) (verde) por 24 horas e estimulados com *beads* (relação 10:1) por 24 horas. Condição só com as *beads* (vermelho) (n=1).

4.7 – Análise do perfil de esteróis derivados da colesteno na célula hospedeira estimulada com *M. leprae*: Diversos estudos apontam que algumas enzimas citocromo P450 (CYPs) possuem afinidade com a colesteno e a utilizam como substrato para a conversão em oxisteróis, como a CYP27A1, que é responsável em produzir 27-hidroxicolesterol ou 27-hidroxicolestenona (Norlin et al., 2003). Dessa forma, buscou-se investigar se a colesteno poderia ser convertida pela célula hospedeira em outros lipídios, que então poderiam contribuir de alguma forma para o estabelecimento da infecção. Para tal, foi produzida uma colesteno marcada radioativamente com trítio ($[^3\text{H}]$ colesteno) e a mesma foi adicionada nas células de Schwann previamente infectadas ou não com *M. leprae* (MOI 5:1). Foi observado que a célula de Schwann é capaz de converter a colesteno em outros esteróis, sendo detectadas duas bandas mais abundantes no extrato lipídico das células infectadas, que co-migraram com os padrões de colesterol e desmosterol (Figura 26A), embora a real natureza destes lipídios ainda precise ser confirmada. Estes dados sugerem que a colesteno é convertida em outros metabólitos pela célula de Schwann. Também foram analisados os lipídios extraídos dos sobrenadantes das células. Pode-se observar que uma parte dos lipídios derivados da colesteno, modificados pela célula hospedeira é liberada no sobrenadante, (Figura 26A).

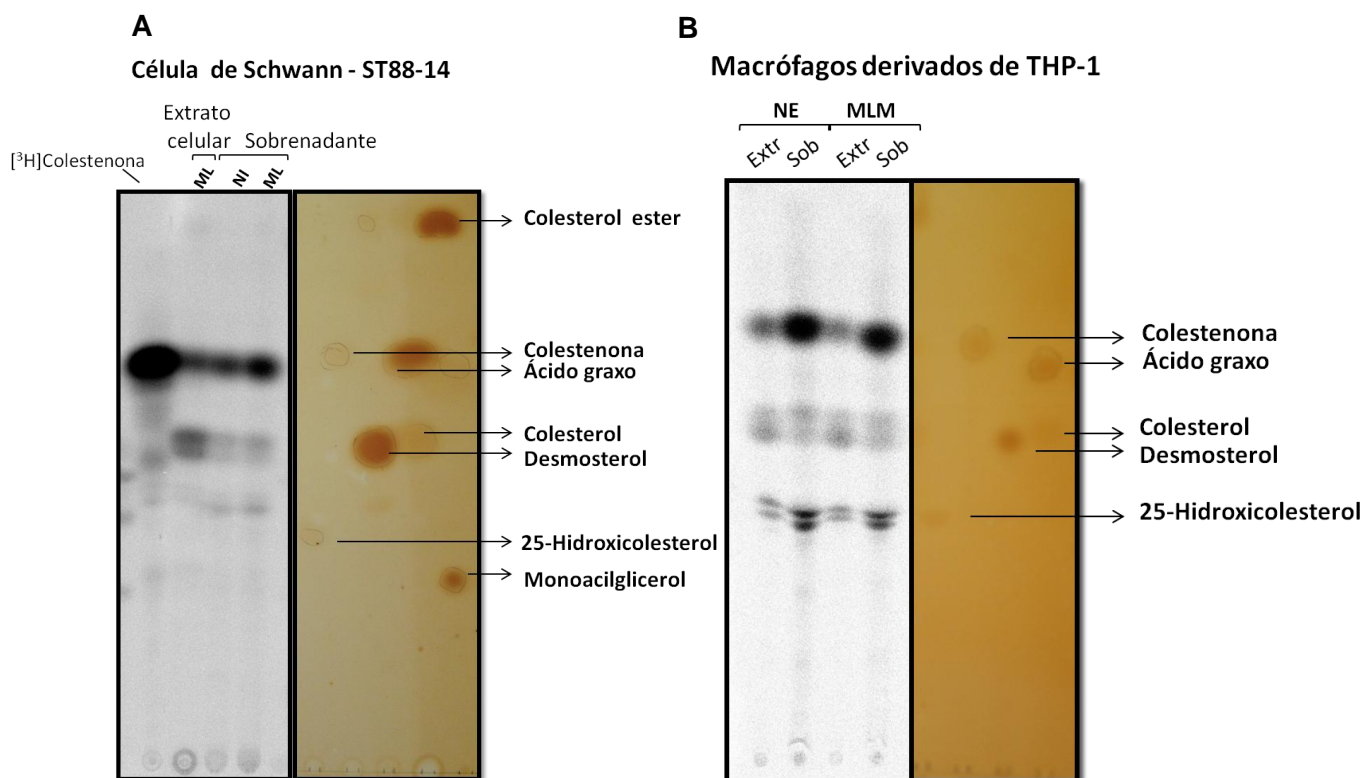


Figura 26 – Colestenona é convertida em outros lipídios pela célula hospedeira. (A) Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram infectadas com *M. leprae* (ML) (MOI 5:1) ou não por 12 horas e então pulsadas com [³H]colestenona. As células foram incubadas por mais 48 horas até extração de lipídios das células e do sobrenadante e análise por TLC em sílica com fase móvel de hexano: éter dietílico: metanol: ácido acético (50:50:5:1). A [³H]colestenona utilizada no experimento também foi aplicada na TLC. ML – *M. leprae*; NI – Não infectado (n=1). À direita encontram-se os padrões corados em iodo (B) Macrófagos derivados de monócitos diferenciados com 80nM PMA foram estimulados com *M. leprae* morto (MLM) (MOI 5:1) por 12 horas e passado o tempo, foram pulsados com [³H]colestenona. As células foram incubadas por mais 48 horas para prosseguir com a extração de lipídios das células e do sobrenadante e análise por TLC como já descrito. MLM – *M. leprae* morto; NE – Não estimulado, Extr – extrato celular, sob - sobrenadante (n=1) padrões à direita corados com iodo.

A mesma análise também foi realizada em macrófagos derivados de monócitos da linhagem THP-1 estimulados com *M. leprae* morto (MOI 5:1). Estas células também foram capazes de converter a colestenona em outros metabólitos (Figura 26B). Entretanto, além das duas bandas que co-migram com os padrões de colesterol e desmosterol, foram observadas duas bandas adicionais bem demarcadas na altura do padrão de 25-hidroxicolesterol, não observadas nas células de Schwann (Figura 26B). De modo geral não houve diferença entre as células não estimuladas ou estimuladas com o *M. leprae* e os lipídios derivados da colestenona foram também detectados no sobrenadante (Figura 26B). Estes resultados sugerem

que a colestenona produzida pelo *M. leprae* possa ser convertida em outros lipídios nas duas células hospedeiras. Estes lipídios podem apresentar papéis importantes durante a infecção e, portanto, devem ser identificados e mais estudados.

A fim de confirmar que a célula hospedeira realmente já teria a capacidade inerente de converter a colestenona em outros produtos, incubamos a célula de Schwann não infectada com [³H]colestenona. Para isso, a [³H]colestenona foi submetida previamente a uma TLC com os solventes hexano:éter dietílico: metanol: ácido acético (50:50:5:1). Após a corrida a [³H]colestenona foi extraída da placa para remoção de qualquer impureza que pudesse interferir na interpretação dos resultados. Conforme pode-se observar, a colestenona utilizada não apresentou nenhuma impureza (Figura 27). Observamos também que a célula de Schwann não infectada é capaz de converter a colestenona nos mesmos metabólitos identificados na figura 26: duas bandas que co-migram com os padrões de desmosterol e colesterol e uma banda na altura do padrão do oxiesterol 27-hidroxicolesterol. Como observado anteriormente, grande parte da colestenona não foi incorporada e se manteve no sobrenadante, mas ainda assim, alguns dos lipídios derivados da colestenona também foram encontrados no sobrenadante da cultura, ainda que em menor quantidade que aqueles observados no interior da célula. Curiosamente, uma banda acima da colestenona foi detectada apenas no extrato de lipídios das células não infectadas, que apresenta um padrão de migração diferente dos padrões utilizados, e, portanto, com identidade desconhecida, mas que merece destaque para estudos futuros.

Para se aproximar um pouco mais do modelo de infecção, onde o substrato disponível para o bacilo é o colesterol, as células de Schwann foram infectadas ou não com *M. leprae* e incubadas com [³H]colesterol e o perfil lipídico foi avaliado. O resultado mostra que o colesterol radioativo utilizado no experimento apresentou uma banda única, portanto, livre de contaminantes visíveis no sistema de solventes utilizado (Figura 27). No extrato lipídico proveniente das células, tanto infectada quanto não infectada, se observa uma incorporação do colesterol aparentemente equivalente entre as duas condições e diferentemente do observado com a colestenona, não observamos a formação de muitos produtos, exceto uma banda superior à migração da colestenona, sinalizada com a seta branca, que também aparece na incubação com o colesterol radioativo, e que está claramente mais abundante na célula não infectada quando comparado a condição infectada (Figura 27). Como possivelmente apenas uma pequena parte do colesterol é modificado na

célula infectada, é provável que não sejam observadas mais bandas pela falta de sensibilidade do método. Já nos lipídios extraídos do sobrenadante das culturas, pode-se observar bandas bem suaves, nas duas condições, na altura do padrão de 27-hidroxicolesterol, demarcado com o retângulo branco com linhas cheias e outra banda bem suave na altura da colestenona, demarcado com o quadrado branco com linhas pontilhadas, apenas observada na condição da célula infectada com o *M. leprae* (Figura 27).

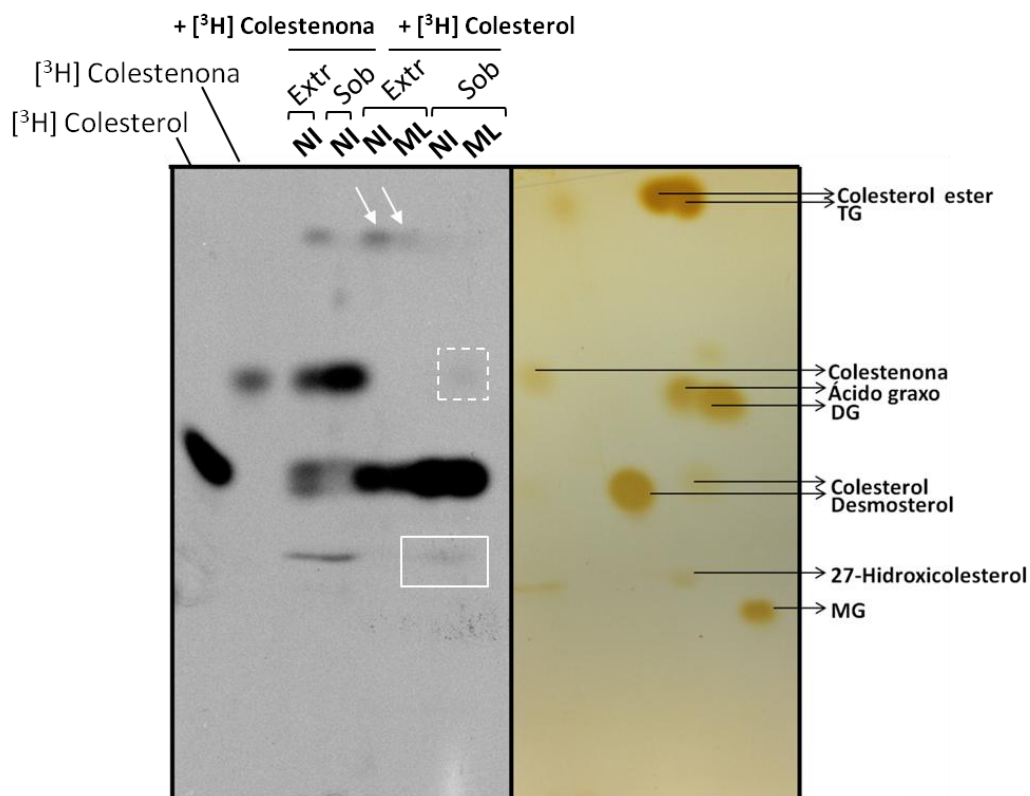


Figura 27 – $[^3\text{H}]$ Colesterol é convertido em colesthenona em células de Schwann infectadas com *M. leprae*. Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram infectadas com *M. leprae* (MOI 5:1) ou não por 12 horas e adicionou-se cerca de $4,0 \times 10^5$ CPM de $[^3\text{H}]$ colesthenona ou $5,0 \times 10^6$ CPM de $[^3\text{H}]$ colesterol, mantidos por 48 horas até extração de lipídios das células e do sobrenadante. Os lipídios foram analisados por TLC em sílica com fase móvel de hexano: éter dietílico: metanol: ácido acético (50:50:5:1). Alíquotas de $[^3\text{H}]$ colestenona e $[^3\text{H}]$ colesterol utilizadas no experimento também foram aplicados na TLC. ML – *M. leprae*; NI – Não infectado; Extr – Extrato celular; Sob – Sobrenadante. Padrões corados com iodo, MG- monoacilglicerol, DG- diacilglicerol, TG- triacilglicerol (n=1).

5. Discussão

A hanseníase ainda é causadora de grandes agravos e incapacidades, onde uma das principais consequências da doença são as lesões neurais, devido à infecção dos nervos periféricos pelo *M. leprae* e que podem ser irreversíveis, mesmo após o tratamento. Estas lesões são mais acentuadas nos quadros reacionais da hanseníase, onde podem ocasionar neurites que comumente ocorrem durante o tratamento. Portanto, a infecção das células de Schwann desempenha um papel determinante na patogênese desta micobactéria.

Os mecanismos de interação do *M. leprae* com a célula de Schwann e como essa interação culmina na lesão neural ainda não estão totalmente elucidados. Dessa forma, a compreensão das vias e processos celulares que são importantes para o estabelecimento da infecção nesta célula hospedeira torna-se essencial para o entendimento da patogênese da micobactéria, e pode contribuir para o desenvolvimento de possíveis estratégias de prevenção do estabelecimento da infecção, ocorrência da doença, bem como para a prevenção do desenvolvimento das lesões neurais e incapacidades.

Dentre os processos das células hospedeiras importantes para o *M. leprae*, o metabolismo lipídico ocupa uma posição de destaque. A infecção pela micobactéria induz o acúmulo de corpúsculos lipídicos, ricos em colesterol, em monócitos (Mattos et al., 2010) e células de Schwann (Mattos et al., 2011a). O metabolismo de colesterol em si possui elevada importância para o *M. leprae*. Mattos e colaboradores demonstraram que o *M. leprae* induz a expressão de genes da via de biossíntese de colesterol e leva a um aumento da captação de colesterol exógeno, modulando esses processos celulares para induzir o acúmulo do mesmo em monócitos (Mattos et al., 2014). Adicionalmente, o trabalho demonstrou que o tratamento *in vitro* de macrófagos primários com lovastatina, inibidor da biossíntese de colesterol, reduz a viabilidade do *M. leprae*, o que foi posteriormente fortalecido com dados em monócitos da linhagem THP-1 e camundongos Balb/c infectados com *M. leprae*, usando o modelo de Sheppard, neste caso, utilizando outras classes de estatinas como a atorvastatina e a sinvastatina. (Lobato et al., 2014). Contudo, a relevância do metabolismo de colesterol no modelo de célula de Schwann ainda não havia sido avaliada.

Dessa forma, foi estudado o efeito do tratamento com atorvastatina sobre a viabilidade do *M. leprae* em células de Schwann. Foi observado que o tratamento

destas células com atorvastatina leva a uma redução da viabilidade do *M. leprae* já em 24 horas de infecção, enquanto o veículo da droga não afetou a viabilidade. Os resultados são referentes a um tratamento com estatina concomitante à infecção. Contudo, seria também interessante, para fins terapêuticos, avaliar futuramente se o efeito da atorvastatina sobre a viabilidade do *M. leprae* seria observado quando o tratamento for aplicado após a infecção, além disto, o uso de outras classes de estatinas também seria importante nesta análise. Possivelmente, o efeito das estatinas sobre a viabilidade do *M. leprae* pode se tornar mais acentuado com tempos maiores de tratamento, considerando que o rRNA 16S tem uma estabilidade relativamente maior que outros RNAs, como mRNAs, e assim, no tempo observado, é possível que parte do rRNA do *M. leprae* ainda não tenha sido degradada, mesmo após a morte do bacilo, portanto, tempos maiores de tratamento também devem ser avaliados.

Os dados da literatura reforçam a ideia de que o metabolismo de colesterol também é importante durante a infecção de células de Schwann pelo *M. leprae*, semelhante ao relatado para macrófagos infectados (Mattos et al., 2014). Resultados do nosso grupo demonstraram que células de Schwann infectadas com *M. leprae* apresentam maior captação exógena de LDL-colesterol (Amaral, 2012) reforçando o dado anterior, de que células infectadas acumulam colesterol na forma de corpúsculos lipídicos (Mattos et al., 2011a). Contudo, ainda não foi verificado se a biossíntese de colesterol também está modulada na célula de Schwann infectada. Entretanto, os resultados observados após o tratamento com atorvastatina sugerem que no modelo de células de Schwann, a modulação da via de biossíntese de colesterol também esteja ocorrendo.

As estatinas são fármacos classicamente utilizados nos quadros de hipercolesterolemia e aterosclerose e inibem a via do mevalonato, inibindo a HMG-CoA redutase, responsável por converter HMG-CoA em mevalonato (Goldstein & Brown, 1990), ao se ligar no sítio de interação com o substrato (Istvan, 2002). Além de gerar o colesterol em si, a via também resulta na síntese de outros isoprenóides, como geranyl geranyl pirofosfato (GGPP), farnesil pirofosfato (FPP), além da produção de ubiquinona e dolicol. Dessa forma, considerando que as estatinas atuam no início da via, antes das ramificações que vão gerar diferentes produtos, deve-se considerar que os efeitos das estatinas não são restritos à inibição da síntese do colesterol em si. De fato, um amplo espectro de efeitos pleiotrópicos são

descritos na literatura para as estatinas. Hoje em dia, acredita-se que estes efeitos não estão atrelados à inibição da produção de colesterol em si, mas sim, dos outros produtos da via do mevalonato, principalmente os isoprenóides GGPP e FPP (revisto em Greenwood et al., 2006). Um dos efeitos *off target* das estatinas, é sua ação imunomodulatória. As estatinas são classicamente descritas como anti-inflamatórias, tendo sido descritas como inibidoras da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e MCP-1 assim como do recrutamento de leucócitos (Diomedea et al., 2001), além de inibirem a ativação de células T (Kwak et al., 2000). Em contrapartida, alguns estudos apontam que as estatinas promovem a ativação da plataforma molecular do inflamassoma, levando a ativação de caspase 1 e liberação da citocina pró-inflamatória IL-1 β em monócitos da linhagem THP-1 estimulados com LPS. Neste caso foi mostrada a associação direta dos isoprenóides, GGPP e FPP (Kuijk et al., 2008). O envolvimento destas moléculas como ativadores do inflamassoma também foi observado em monócitos derivados de PBMC infectados com *M. tuberculosis* (Montero et al., 2000). Já um outro estudo aponta que o tratamento com estatinas aumenta a ativação das vias de TLR e a produção de citocinas pró-inflamatórias na microglia (Van Der Putten et al., 2012). Logo, a ativação deste mecanismo pelas estatinas poderia ser a responsável pela morte do bacilo. Apesar dos relatos serem contrários, deve-se considerar que o resultado final da resposta imunológica é um balanço de diversas vias e, além disso, alguns estudos apontam que as diferentes classes de estatinas apresentam efeitos distintos, que estão intimamente associados com suas características lipofílicas ou hidrofílicas (Ikeda et al., 2001; Kiener et al., 2001).

As estatinas também foram descritas com um elevado potencial microbicida, tendo efeito em patógenos desde vírus, como influenza (Mehrbood et al., 2014), protozoários, como *T. gondii* (Sanfelice et al., 2017) e bactérias, como *Listeria monocytogenes* (Parihar et al., 2013), *Staphylococcus aureus* (Graziano et al., 2015) inclusive *M. tuberculosis* (Parihar et al., 2014). Contudo, diversos efeitos foram relacionados com a morte de diferentes bactérias, no caso de *S. aureus*, as estatinas interferem com a produção de biofilme (Graziano et al., 2015), agindo diretamente sobre a bactéria, enquanto no caso de *L. monocytogenes*, foi demonstrado que as estatinas inibem o escape da bactéria do fagossoma para o citoplasma (Parihar et al., 2013) e no caso do *M. tuberculosis*, as estatinas parecem

influenciar na maturação do fagolisossoma promovendo o aumento da autofagia na célula hospedeira, culminando na morte das bactérias (Parihar et al., 2014).

Dessa forma, são diversos os mecanismos de ação das estatinas que culminam na morte dos patógenos, desta maneira, os exatos efeitos gerados pelas estatinas que afetam a viabilidade do *M. leprae* ainda devem ser mais estudados, pois podem não estar somente relacionados com a inibição da síntese do colesterol *per se*. Entretanto, a utilização das estatinas como potencial tratamento já tem demonstrado benefícios em infecções com o *M. tuberculosis*, onde o tratamento com sinvastatina parece potencializar o efeito microbicida da isoniazida (Skerry et al., 2014) e mais recentemente, um estudo demonstrou que a sinvastatina também potencializa a ação microbicida da rifampicina, diminuindo o tempo de tratamento para total eliminação da infecção em camundongos (Dutta et al., 2016). Assim, a possibilidade de unir o efeito bactericida da estatina com seus potenciais efeitos anti-inflamatórios seria útil no tratamento da hanseníase, principalmente para possivelmente reduzir a ocorrência dos episódios reacionais.

A importância do colesterol tem sido mostrada para diferentes micobactérias, por exemplo: *M. tuberculosis* é capaz de acumular colesterol, incorporando-o em sua parede celular (Brzostek et al., 2009) e então o utiliza como fonte de carbono. Foi mostrado que tais processos são importantes para a persistência da infecção (Pandey & Sasseti, 2008). Contudo, o *M. leprae*, que apresenta o genoma muito reduzido quando comparado ao genoma do *M. tuberculosis* (Cole et al., 2001), não possui uma série de genes relacionados à via de degradação do colesterol e é incapaz de metabolizar o mesmo (Marques et al., 2015).

Antes da degradação do colesterol em si, é necessário que ocorra o transporte do esteroide através da parede celular da micobactéria, que devido a sua estrutura altamente complexa impossibilita a difusão do colesterol. O *M. tuberculosis* (Joshi et al., 2006) e outras micobactérias, como *M. smegmatis* e *M. bovis* (Casali & Riley, 2007), apresentam 4 operons, *mce1* a *mce4*, que apresentam de modo geral a mesma estrutura, codificando as proteínas MceA-F e 2 proteínas YrbEA e YrbEB, que são permeases transmembranares, formando transportadores do tipo ABC (Cole et al., 1998). Os dados da literatura sugerem que o transportador codificado pelo operon *mce4* é o responsável pelo transporte do colesterol (Pandey & Sasseti, 2008). Já o operon *mce1* seria responsável pelo transporte de ácidos micólicos (Forrellad et al., 2014), e mais recentemente foi demonstrado que este operon

participa também do transporte de ácidos graxos (Nazarova et al., 2017). Ainda foi demonstrado que o transporte mediado pelos transportadores codificados pelos operons *mce1* e *mce4* necessitam do suporte de uma proteína codificada pelo gene *lucA*, que se localiza externamente ao operon (Nazarova et al., 2017). O *M. leprae* perdeu os operons *mce2-4*, apenas conservando o operon *mce1*. Sendo assim, devido à ausência do operon *mce4* responsável pelo transporte de colesterol, qualquer processo de degradação do colesterol estaria prejudicado no *M. leprae*, considerando que grande parte das enzimas responsáveis pelo catabolismo do colesterol se encontra internamente à bactéria. O *M. leprae* também conservou o homólogo do gene *lucA* (ML2337), indicando que o transporte de lipídios via *mce1* pode ser funcional na micobactéria, embora o papel do *mce1* para o *M. leprae* ainda deva ser confirmado.

Além de não possuir o transportador de esteróis, o *M. leprae* não apresenta nenhum dos genes envolvidos com a degradação dos anéis esteróis e não apresenta a maioria dos genes chaves necessários para a degradação da cadeia lateral do colesterol, impossibilitando assim a degradação do colesterol. Contudo, curiosamente o *M. leprae* conservou a enzima 3 β -HSD responsável pela oxidação do colesterol a colestenoa. Essa etapa constitui a primeira reação da via de degradação do colesterol, onde o colesterol é inicialmente convertido em colestenoa, para então prosseguir para a degradação do núcleo de anéis esteroides ou da cadeia lateral. Considerando a redução no conteúdo gênico do *M. leprae*, a conservação desta enzima sugere que ela seja importante para a micobactéria.

A expressão da enzima 3 β -HSD, codificada pelo gene *ml1942*, já havia sido descrita por Marques e colaboradores (Marques et al., 2008), tendo sido observada sua expressão na fração de parede celular do *M. leprae* purificado de tatus infectados. A fim de complementar este dado, buscou-se detectar a expressão dessa enzima nas biópsias de pele de pacientes lepromatosos, para confirmar sua expressão durante o curso da infecção no ser humano. Foi observada que a enzima 3 β -HSD está presente nas biópsias dos pacientes lepromatosos, sugerindo que a mesma seja importante durante o contexto da infecção.

Marques e colaboradores demonstraram que a colestenoa produzida pelo *M. leprae* em meio axênico é acumulada no meio de cultivo com o decorrer do tempo, no entanto, uma grande parte permanece associada à bactéria (Marques et al.,

2015). Devido à ausência de um transportador de esteróis na micobactéria e juntamente com a localização prevista da enzima na parede celular, possivelmente a reação ocorre no envelope do *M. leprae*, com conseqüente liberação da colestenoína para o microambiente fagossomal.

A oxidação do colesterol à colestenoína é classicamente realizada por uma enzima colesterol oxidase (ChoD) em muitos modelos bacterianos. Mais recentemente, a enzima 3 β -HSD tem sido implicada também como responsável pela função. Tanto *M. leprae* como *M. tuberculosis* apresentam as duas enzimas em seu genoma e em muitos casos tem sido considerado que ambas estariam envolvidas no processo de oxidação do colesterol à colestenoína. Embora para o *M. tuberculosis* tal observação seria possível, no caso do *M. leprae*, que passou pela evolução reducional, perdendo uma série de genes e apresentando poucas redundâncias no genoma, a manutenção de duas enzimas com funções intercambiáveis seria pouco provável. Por isso, pode-se supor que cada uma tenha uma função distinta para a micobactéria. De fato, alguns autores já indicam que a 3 β -HSD seja a enzima responsável pela produção de colestenoína (Marques et al., 2015; Yang et al., 2011), enquanto algumas evidências apontam que o gene anotado como *choD* nos genomas de *M. tuberculosis* e *M. leprae* tenha um papel imunomodulador e esteja envolvido na acetilação de glicolipídios (Gao & Sampson, 2014).

Dessa forma, a fim de comprovar experimentalmente o envolvimento da enzima 3 β -HSD na produção de colestenoína, o *M. leprae* foi tratado em meio axênico com o azasteróide SB100, inibidor da enzima 3 β -HSD de *M. tuberculosis*. Os dados mostraram que o SB100 reduz modestamente a produção de colestenoína em concentrações mais baixas, entre 5 e 80 μ M, mas apresentando efeitos mais significativos e evidentes a partir da concentração de 100 μ M, onde observou-se um efeito prolongado, por até 48 horas mesmo após a retirada do inibidor.

Yang e colaboradores, ao caracterizarem a enzima de *M. tuberculosis*, sugeriram o NAD⁺ como cofator da enzima (Yang et al., 2007). Sendo assim, a fim de ratificar a atuação do inibidor sobre a enzima, também foi avaliado seu efeito sobre a redução do NAD⁺ a NADH confirmando o bloqueio da produção de NADH após o tratamento com SB100. As evidências de que a enzima 3 β -HSD do *M. leprae* se encontra ativa, oxidando colesterol a colestenoína com a conseqüente redução de NAD a NADH, levantou a possibilidade da reação catalisada pela 3 β -HSD ser uma importante fonte de poder redutor para o bacilo.

Esta hipótese foi reforçada quando observamos que o tratamento do *M. leprae* com o inibidor SB100 diminui a síntese de PGL-I e de PDIM, dois lipídios majoritários do envelope micobacteriano. As micobactérias apresentam duas ácido graxo sintases (FAS). Enquanto a FAS I está envolvida com a síntese *de novo* de ácidos graxos, a FAS II participa mais do alongamento das cadeias de carbono, partindo de ácidos graxos de 16 carbonos, como o palmitato, gerando ácidos graxos de cadeias longas (Marrakchi et al., 2000). A FAS I utiliza tanto NADH quanto NADPH durante a síntese lipídica (Kikuchi et al., 1992). Já a FAS II é uma enzima multimérica cuja subunidade InhA utiliza NADH como cofator (Marrakchi et al., 2000). Ambas as enzimas foram relacionadas com a produção de precursores para a síntese de ácidos micólicos (Marrakchi et al., 2000). Recentemente foi descrito uma interação entre a FAS II e as policetídeo sintases, responsáveis pela síntese de ftiocerol dos PDIMs, sugerindo que exista uma interação entre as vias (Kruh et al., 2008). Além disso, durante a síntese de PDIMs são incorporados os micocerosatos, produzidos pela enzima ácido micocerosico sintase (MAS), que utilizam NADPH como cofator (Trivedi et al., 2005). Os PGLs também são sintetizados por policetídeo sintases e tem micocerosatos incorporados em sua estrutura. Com isso, o balanço redox da micobactéria também é relevante para a síntese lipídica (Vergnolle et al., 2015). Dessa forma, a síntese desses lipídios do *M. leprae* envolveria a utilização de poder redutor de NADH e NADPH, e assim, a redução dos níveis de NADH por conta da inibição da enzima 3 β -HSD pode ser um fator responsável pelo impacto na síntese do PGL-I e PDIM. Embora o NADPH seja o cofator mais utilizado em reações anabólicas, principalmente de síntese lipídica, as enzimas da classe hidroxisterol desidrogenase podem utilizar NAD⁺ e NADP⁺ como cofatores. Embora tenha sido descrito para a 3 β -HSD de *M. tuberculosis* que NAD⁺ é o único cofator, não pode ser descartado que o NADP⁺ possa atuar como cofator da 3 β -HSD de *M. leprae*, pois as enzimas de *M. leprae* e *M. tuberculosis* apresentam elevado grau de identidade, mas ainda assim apresentam diferenças em sua estrutura primária que poderiam justificar esta diferença funcional. Além disso, as micobactérias possuem formas de manter o balanço de poder redutor. Já foi descrita a funcionalidade da enzima NAD quinase, codificada pelo gene *ppnK*, que catalisa a fosforilação do NAD a NADP em *M. tuberculosis* (Kawai et al., 2000) e este gene encontra-se preservado no genoma do *M. leprae*. Também existem as transhidrogenases que promovem a transferência de elétrons entre NAD⁺ e NADPH e vice e versa (Spaans et al., 2015). São encontrados três genes correspondentes a transhidrogenases no genoma do *M.*

leprae, sugerindo que o balanço de poder redutor é mantido, e o NADH gerado possa ser convertido para NADPH, sendo aproveitado nas reações de síntese lipídica. Até o presente momento, a observação foi feita apenas para PGL-I e PDIM, contudo o impacto da inibição da 3 β -HSD na síntese de outros lipídios, principalmente ácidos micólicos, que necessitam de poder redutor para sua síntese, também deve ser avaliada.

O balanço redox da micobactéria é crucial também para a síntese de ATP. Os dados observados apontam que a oxidação do colesterol à colestenoína por ação da 3 β -HSD culmina em um aumento da redução de citocromo C, sugerindo que a cadeia transportadora de elétrons está funcional e possivelmente é alimentada pelo NADH gerado na reação. Inicialmente acreditava-se que a cadeia transportadora de elétrons do *M. leprae* não apresentava funcionalidade, devido à ausência de muitos genes que codificam o complexo I (NADH desidrogenase do tipo I), responsável por receber elétrons do NADH (Cole et al., 2001). Contudo, o *M. leprae* apresenta o gene *ndh*, que codifica uma NADH desidrogenase do tipo II e recentemente foi observado que em *M. tuberculosis*, esse seria o principal gene envolvido na síntese de ATP, enquanto o complexo I seria dispensável (revisto em Black et al., 2014). Em condições aeróbicas, os elétrons provenientes do NADH e de outras fontes de poder redutor são transferidos para a metaquinona que então transfere os elétrons para o destino final, a citocromo c oxidase (revisto em Black et al., 2014). Dessa forma, a observação da redução do citocromo c quando há adição de colesterol ao extrato bacteriano, sugere que respiração oxidativa está ocorrendo levando à síntese de ATP pelo *M. leprae* a partir do poder redutor gerado pela 3 β -HSD. Isto também poderia explicar a redução da viabilidade da micobactéria observada após tratamento com o inibidor, visto que a geração de ATP é crucial para a sobrevivência da micobactéria. Assim, assumindo que a hipótese da 3 β -HSD como fornecedora de poder redutor esteja correta, e considerando a ausência de transportadores de esteróis na superfície da bactéria, pode-se supor que a micobactéria apresente meios de transferir o poder redutor gerado no envelope celular para a face citosólica da membrana para ser utilizado na síntese lipídica e fosforilação oxidativa.

Tanto PGL-I como PDIM são lipídios que desempenham papéis importantes na interação com a célula hospedeira. PGL-I está envolvido nos processos de interação e infecção da célula hospedeira, principalmente em células de Schwann (Ng et al., 2000) e recentemente foi descrito que o PDIM seria importante para

mediar o evento de escape do *M. tuberculosis* do fagossoma (Quigley et al., 2017). Assim, o comprometimento da síntese desses lipídios possivelmente impactaria na viabilidade intracelular do *M. leprae*.

Contudo, é possível que a colestenoína *per se* também possa modular funções celulares importantes uma vez que parece acumular-se no tecido infectado (Marques et al., 2015). A colestenoína não é um metabólito usualmente encontrado nos tecidos, apesar de já terem sido detectados traços da mesma em alguns casos devido à ação de alguns microorganismos da microbiota gastrointestinal (Rosenfeld et al., 1967). De fato, foi detectada uma produção modesta de colestenoína apenas no sobrenadante de célula de Schwann infectada pelo *M. leprae*. Para testar esta hipótese, inicialmente investigamos se a colestenoína *per se* teria algum efeito sobre a sobrevivência intracelular do *M. leprae*. Para isso foi adotada a estratégia de adicionar a colestenoína de forma exógena nas culturas de células de Schwann, estabelecendo um tratamento previamente à infecção com o *M. leprae*. Embora os dados ainda necessitem de maiores comprovações, as observações até o momento sugerem que a colestenoína favorece a sobrevivência do *M. leprae*, apresentando uma tendência a proteger o bacilo, levando a uma menor morte de bacilos quando comparada às células apenas tratadas com o veículo. É importante ressaltar que o efeito observado não pode ser atribuído a uma multiplicação do *M. leprae*, que possui um tempo de geração entre 12 a 14 dias.

Os mecanismos pelos quais a colestenoína estaria protegendo o *M. leprae* da morte ainda devem ser investigados. Recentemente, um estudo demonstrou que o tratamento de células de epitélio alveolar com concentrações baixas de colestenoína, por volta de 10 μ M, inibe a fosforilação de Akt e NF κ B, levando a uma inativação de importantes vias pró-inflamatórias (Ma et al., 2016). Portanto, a modulação da resposta imune inata da célula hospedeira pode ser um mecanismo importante para favorecer a sobrevivência intracelular do bacilo e a manutenção da infecção. Além disso, estudos com a oxima de colestenoína, um derivado desse metabólito, tem demonstrado seu elevado potencial neuroprotetor, promovendo a sobrevivência celular e estimulando processos de regeneração neural (Bordet et al., 2007). Dessa forma, é possível que a colestenoína produzida pelo *M. leprae* favoreça a sobrevivência da célula hospedeira, auxiliando assim na manutenção do seu nicho de infecção. Também poderíamos pensar que, como a hanseníase é uma doença de progressão lenta e lesões neurais são observadas no curso de anos de infecção, a

colestonona pode estar apresentando esse efeito neuroprotetor, permitindo assim a manutenção da infecção por períodos prolongados e retardando o processo de desenvolvimento de lesão neural.

Como havia sido descrito previamente que a colestonona afeta as propriedades de bicamadas lipídicas (Neuvonen et al., 2014) pensou-se na possibilidade da colestonona influenciar o processo de fagocitose da micobactéria. Contudo, os resultados observados sugerem que a colestonona não influencia na internalização do *M. leprae*, tanto em células de Schwann como em macrófagos, uma vez que todas as condições apresentaram um percentual similar de células infectadas ou com partículas associadas.

A colestonona apresenta propriedades químicas diferentes do colesterol devido à substituição da hidroxila pelo grupamento cetona do carbono 3. Essas modificações estruturais são suficientes para alterar as propriedades físicas das membranas em que estão inseridas, aumentando a fluidez das mesmas (Neuvonen et al., 2014). Assim, mesmo não impactando diretamente na fagocitose da micobactéria, a colestonona pode afetar as propriedades de outras bicamadas lipídicas, como a membrana do fagossoma, uma vez que a mesma seria produzida nesse microambiente, e assim, pode interferir em processos como a fusão fagolisossomal. Também poderia interferir em eventos de sinalização celular. Já foi visto que a colestonona inibe a formação de microdomínios na membrana (Xu & London, 2000), e interfere na sinalização de alguns receptores, como o CXCR4 e CCR5 (Nguyen & Taub, 2003), sendo então estes outros possíveis mecanismos de modulação celular promovidos pela colestonona.

Embora o *M. leprae* não metabolize a colestonona, as células hospedeiras apresentam enzimas da classe das citocromos P450 (CYPs) que são capazes de metabolizar a colestonona e gerar outros compostos, como por exemplo, oxisteróis; com isso, é possível que parte dos efeitos fisiológicos observados na célula sejam provenientes de derivados da colestonona. Os resultados obtidos permitiram observar que as células de Schwann são capazes de converter a colestonona em outros esteróis, embora ainda precisem ser melhor caracterizados. Os macrófagos também são capazes de converter a colestonona em outros lipídios. Nos dois modelos celulares, o pré-estímulo com *M. leprae* não resultou em nenhuma modulação funcional diferenciada quando comparado à célula não estimulada e em ambas as condições foram capazes de modificar a colestonona.

Os principais lipídios derivados da colestenona apresentaram um padrão de migração semelhante ao colesterol e desmosterol. Contudo, seria pouco provável que a colestenona esteja sendo reconvertida em colesterol ou mesmo em seu intermediário, desmosterol, já que a célula hospedeira não apresenta enzimas que realizem tais reações. Por outro lado, um metabólito usual derivado da colestenona é o colestanol, que apresenta estrutura muito similar ao colesterol e ao desmosterol, pois também apresenta o grupamento hidroxila (Rosenfeld et al., 1967), portanto, é possível que a banda observada na TLC represente este metabólito.

Ainda foram observadas bandas com padrão de migração próximo ao padrão de 25-hidroxicolesterol ou 27-hidroxicolesterol, sugerindo que a colestenona seja convertida nesses metabólitos, embora ainda não tenha sido possível identificar qual especificamente. Os oxisteróis estão envolvidos na modulação do metabolismo lipídico celular e resposta imune (revisado em Spann & Glass, 2013), e com isso podem ser importantes durante a infecção. Dados da literatura demonstram que o 25-hidroxicolesterol favorece a sobrevivência intracelular de *L. monocytogenes* em macrófagos (Zou et al., 2011). Posteriormente, foi demonstrado que o 25-hidroxicolesterol inibe a ativação do inflamassoma e produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Reboldi et al., 2014). Com isso, os oxisteróis derivados tanto da colestenona, quanto do colesterol acumulado durante a infecção, podem contribuir para a sobrevivência intracelular do bacilo.

Também não se deve descartar a importância do colesterol *per se* durante a infecção, uma vez que o mesmo também é encontrado em acúmulo em células infectadas. O colesterol pode apresentar efeitos diretos que podem ser benéficos para a micobactéria, como, por exemplo, já foi observada sua participação na inibição da maturação fagolisossomal (Gatfield & Pieters, 2000). Mais recentemente, um estudo demonstrou que o colesterol presente nos lisossomos proveniente da lipólise das lipoproteínas, e não a colestenona ou outros oxisteróis e derivados, está envolvido na ativação da via de mTOR (Castellano et al., 2017), que regula uma série de processos celulares, incluindo autofagia, metabolismo lipídico e sobrevivência celular. Assim o colesterol também pode modular processos celulares e favorecer a infecção.

O modelo representado na figura 28 propõe que a enzima 3 β -HSD do *M. leprae* seja crucial para sua virulência, justificando a permanência do gene *ml1942*, que codifica a enzima, no genoma da micobactéria. Durante a infecção da célula de

Schwann, a mesma tem seu metabolismo lipídico modulado para induzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos ricos em colesterol, que são recrutados para o fagossoma contendo a micobactéria (Mattos et al., 2011a). Neste contexto temos a enzima 3 β -HSD sendo expressa em um ambiente com colesterol em abundância, que é então oxidado a colestenoa na superfície da micobactéria, uma vez que a enzima se localiza na parede celular do bacilo e não existem transportadores de esteróis no *M. leprae*, limitando a ocorrência da reação à face exterior da parede celular. A oxidação do colesterol favoreceria a infecção em dois aspectos. Primeiramente favoreceria diretamente a micobactéria, atuando como fornecedora de poder redutor, que então pode ser aproveitado na fosforilação oxidativa e na síntese de lipídios como o PGL-I e PDIM, que por sua vez são importantes fatores de virulência e podem modular a resposta imune inata da célula hospedeira, favorecendo a sobrevivência intracelular do *M. leprae*. O segundo aspecto seria que a colestenoa gerada pela reação seria convertida em outros esteróis como os oxiesteróis, que então podem modular a fisiologia celular, principalmente a resposta bactericida inata da célula promovendo a sobrevivência da micobactéria. A colestenoa *per se* produzida no ambiente do fagossoma poderia também modular vias importantes e favorecer a infecção. Possivelmente a enzima 3 β -HSD seria crucial para patogênese do *M. leprae* durante a infecção de macrófagos, a outra célula hospedeira de *M. leprae*, o que será investigado em experimentos futuros.

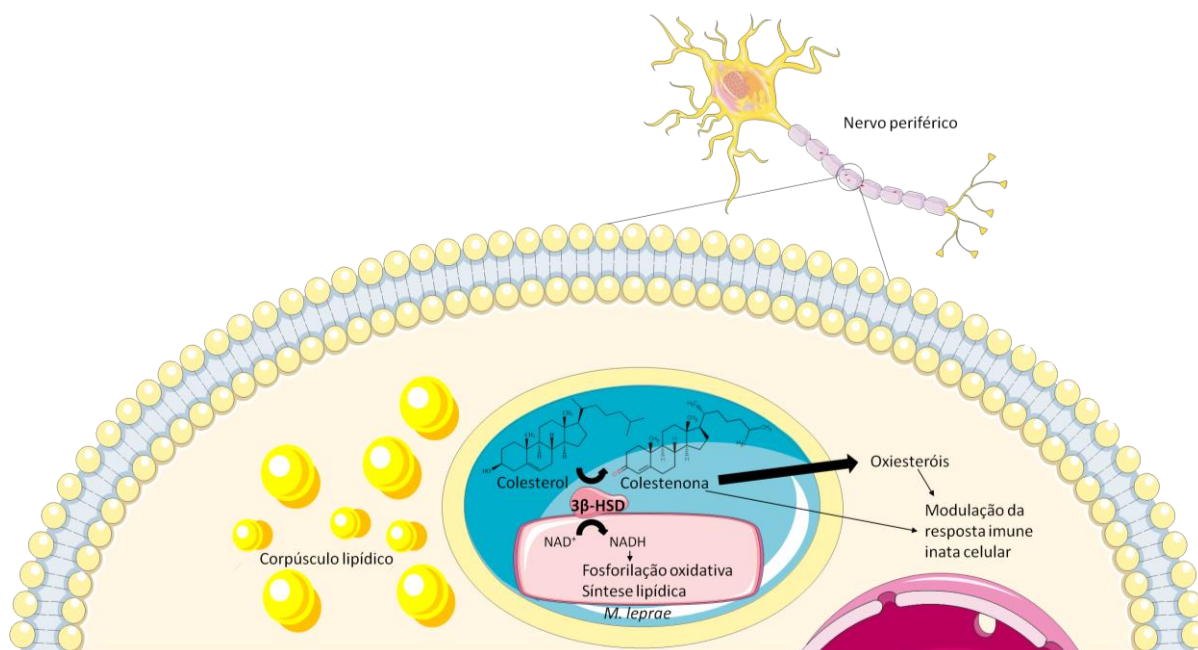


Figura 28 – Modelo esquemático representando a atuação da enzima 3 β -HSD durante a infecção de células de Schwann pelo *M. leprae* no nervo periférico.

6. Conclusões

Os dados obtidos permitem concluir que o metabolismo de colesterol é também importante para a micobactéria no modelo de infecção em células de Schwann. O gene codificante para a enzima 3 β -HSD foi preservado em seu genoma, sendo esta expressa *in vivo* e responsável pela oxidação de colesterol a colestenoa. A inibição de sua atividade prejudica a sobrevivência intracelular do *M. leprae* e inibe a síntese de lipídios micobacterianos. Nossa hipótese é que esta enzima seria uma importante fonte de poder redutor para a micobactéria, que seria utilizado tanto em eventos de fosforilação oxidativa para geração de ATP, como para alimentar vias biossintéticas da bactéria, como a síntese de lipídios da parede celular, que são importantes fatores de virulência da micobactéria, como o PDIM e PGL-I. Adicionalmente, a colestenoa gerada a partir do colesterol parece favorecer a sobrevivência intracelular do bacilo, podendo ser ainda convertida em outros esteróis pela célula hospedeira, que podem participar durante a infecção. No entanto, as funções celulares moduladas pela colestenoa e pelo colesterol durante a infecção ainda precisam ser mais investigadas.

7. Referências Bibliográficas

Abrahams, K.A., & Besra, G.S. (2016). Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology* 1–18.

Acosta, C.C.D. (2016). Papel do glicolípido PGLI na interação do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann: participação na e de receptores endocíticos e no metabolismo lipídico. 254f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ.

Alves, L., Lima, L. de M., Maeda, E. da S., Carvalho, L., Holy, J., Sarno, E.N., Pessolani, M.C.V., & Barker, L.P. (2004). *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 429–437.

Amaral, J.J. (2012). Estudo de alterações no metabolismo lipídico induzidas pela infecção por *Mycobacterium leprae*: contribuições no entendimento da imunopatogenia da hanseníase através de uma abordagem metabolômica. 134f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ.

Andersen, J.G. (1969). Studies in the mediaeval diagnosis of leprosy in Denmark: an osteoarchaeological, historical and clinical study. *Dan. Med. Bull.* 16, 10–45.

Antunes, S.L.G., Chimelli, L., Jardim, M.R., Vital, R.T., Nery, J.A. da C., Corte-Real, S., Hacker, M.A.V.B., & Sarno, E.N. (2012). Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 246–253.

Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E.-N., Le Cabec, V., Rittig, M.G., Prandi, J., & Maridonneau-Parini, I. (1999). The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. *Infect. Immun.* 67, 469–477.

Avanzi, C., Del-Pozo, J., Benjak, A., Stevenson, K., Simpson, V.R., Busso, P., McLuckie, J., Loiseau, C., Lawton, C., Schoening, J., et al. (2016). Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science* 354, 744–747.

Av-Gay, Y., & Sobouti, R. (2000). Cholesterol is accumulated by mycobacteria but its degradation is limited to non-pathogenic fast-growing mycobacteria. *Can. J. Microbiol.* 46, 826–831.

Azad, A.K., Sirakova, T.D., Norvin, D., & Kolattukudy, P.E. (1997). Gene Knockout Reveals a Novel Gene Cluster for the Synthesis of a Class of Cell Wall Lipids Unique to Pathogenic Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 272, 16741–16745.

Barbieri, R.R., Sales, A.M., Illarramendi, X., Moraes, M.O., Nery, J.A.D.C., Moreira, S.J.M., Sarno, E.N., Machado, A.D.M., & Bozza, F.A. (2014). Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109, 944–947.

- Betz, M., & Fox, B.S. (1991). Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* *146*, 108–113.
- Binford, C.H., Meyers, W.M., Walsh, G.P., Storrs, E.E., & Brown, H.L. (1977). Naturally acquired leprosy like disease in the nine-banded armadillo *D. novemcinctus*, histopathologic and microbiologic studies of tissues. *J. Reticuloendothel Soc.* *33*, 377–388.
- Black, P.A., Warren, R.M., Louw, G.E., Van Helden, P.D., Victor, T.C., & Kana, B.D. (2014). Energy metabolism and drug efflux in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 2491–2503.
- Bligh, E.G., & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* *37*, 911–917.
- Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galéa, P., Delaage, P., Akentieva, N.P., Evers, A.S., Covey, D.F., Ostuni, M.A., et al. (2007). Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *322*, 709–720.
- Brown, L., Wolf, J.M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* *13*, 620–630.
- Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., & Dziadek, J. (2009). Mycobacterium tuberculosis is able to accumulate and utilize cholesterol. *J. Bacteriol.* *191*, 6584–6591.
- Buddemeyer, E.U. (1974). Liquid scintillation vial for cumulative and continuous radiometric measurement of in vitro metabolism. *Appl. Microbiol.* *28*, 177–180.
- De Carvalho, F.M., Rodrigues, L.S., Duppre, N.C., Alvim, I.M.P., Ribeiro-Alves, M., Pinheiro, R.O., Sarno, E.N., Pessolani, M.C.V., & Pereira, G.M.B. (2017). Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to Mycobacterium leprae specific antigens. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *11*, e0005560.
- Casabon, I., Zhu, S.H., Otani, H., Liu, J., Mohn, W.W., & Eltis, L.D. (2013a). Regulation of the KstR2 regulon of Mycobacterium tuberculosis by a cholesterol catabolite. *Mol. Microbiol.* *89*, 1201–1212.
- Casabon, I., Crowe, A.M., Liu, J., & Eltis, L.D. (2013b). FadD3 is an acyl-CoA synthetase that initiates catabolism of cholesterol rings C and D in actinobacteria. *Mol. Microbiol.* *87*, 269–283.
- Casali, N., & Riley, L.W. (2007). A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. *BMC Genomics* *8*.
- Castellano, B.M., Thelen, A.M., Moldavski, O., Feltes, M., van der Welle, R.E.N., Mydock-McGrane, L., Jiang, X., van Eijkeren, R.J., Davis, O.B., Louie, S.M., et al. (2017). Lysosomal cholesterol activates mTORC1 via an SLC38A9–Niemann-Pick C1 signaling complex. *Science* *355*, 1306–1311.

- Chang, J.C., Miner, M.D., Pandey, A.K., Gill, W.P., Harik, N.S., Sasseti, C.M., & Sherman, D.R. (2009). *igr* genes and Mycobacterium tuberculosis cholesterol metabolism. *J. Bacteriol.* 191, 5232–5239.
- De Chastellier, C., & Thilo, L. (2006). Cholesterol depletion in Mycobacterium avium-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cell. Microbiol.* 8, 242–256.
- Chavadi, S.S., Onwueme, K.C., Edupuganti, U.R., Jerome, J., Chatterjee, D., Soll, C.E., & Quadri, L.E.N. (2012). The mycobacterial acyltransferase PapA5 is required for biosynthesis of cell wall-associated phenolic glycolipids. *Microbiology* 158, 1379–1387.
- Chen, C.-L., Wu, D.-C., Liu, M.-Y., Lin, M.-W., Huang, H.-T., Huang, Y.-B., Chen, L.-C., Chen, Y.-Y., Chen, J.-J., Yang, P.-H., et al. (2016). Cholest-4-en-3-one attenuates TGF- β responsiveness by inducing TGF- β receptors degradation in Mv1Lu cells and colorectal adenocarcinoma cells. *J. Recept. Signal Transduct.* 37, 1–11.
- Chen, Y., Arnal-levron, M., Lagarde, M., Moulin, P., Luquain-Costaz, C., & Delton, I. (2015). THP1 macrophages oxidized cholesterol, generating 7-derivative oxysterols specifically released by HDL. *Steroids* 1–7.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V, Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., et al. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., et al. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007–1011.
- Colston, M.J., & Hilson, G.R.F. (1976). Growth of Mycobacterium leprae and M. marinum in congenitally athymic (nude) mice. *Nature* 262, 399–401.
- Coppens, I., Sinai, A., & Joiner, K. (2000). Toxoplasma gondii exploits host low-density lipoprotein receptor-mediated endocytosis for cholesterol acquisition. *J Cell Biol* 149:167–180. *J Cell Biol* 149, 167–180.
- Corfas, G., Velardez, M.O., Ko, C.-P., Ratner, N., & Peles, E. (2004). Mechanisms and Roles of Axon–Schwann Cell Interactions. *J. Neurosci.* 24, 9250–9260.
- Cornbrooks, C.J., Carey, D.J., McDonald, J. a, Timpl, R., & Bunge, R.P. (1983). In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3850–3854.
- Court, F.A., Wrabetz, L., & Feltri, M.L. (2006). Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 501–507.

- Crowe, A.M., Casabon, I., Brown, K.L., Liu, J., Lian, J., Rogalski, J.C., Hurst, T.E., Snieckus, V., Foster, L.J., & Eltis, L.D. (2017). Catabolism of the Last Two Steroid Rings in *Mycobacterium tuberculosis* and Other Bacteria. *MBio* 8, e00321–17.
- Cruz, D., Watson, A.D., Miller, C.S., Montoya, D., Ochoa, M.T., Sieling, P.A., Gutierrez, M.A., Navab, M., Reddy, S.T., Witztum, J.L., et al. (2008). Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest.* 118, 2917–2928.
- Da Cunha, F.M.B., Werneck, M.C.M., Scola, R.H., & Werneck, L.C. (2006). Pure neural leprosy: Diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle and Nerve* 33, 409–414.
- Davey, T., & Rees, R. (1974). The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr. Rev.* 45, 121–134.
- Davis, G.L., Ray, N.A., Lahiri, R., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Williams, D.L., & Adams, L.B. (2013). Molecular Assays for Determining *Mycobacterium leprae* Viability in Tissues of Experimentally Infected Mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2404.
- Deps, P.D., Alves, B.L., Gripp, C.G., Aragao, R.L., Guedes, B.V.S., Filho, J.B., Andreatta, M.K., Marcari, R.S., Prates, I.C.A., & Rodrigues, L.C. (2008). Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: A case control study. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 74, 338–342.
- Diomedede, L., Albani, D., Sottocorno, M., Donati, M.B., Bianchi, M., Fruscella, P., & Salmona, M. (2001). In vivo anti-inflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1327–1332.
- Düppre, N.C., Camacho, L.A.B., da Cunha, S.S., Struchiner, C.J., Sales, A.M., Nery, J.A.C., & Sarno, E.N. (2008). Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 631–638.
- Dutta, N.K., Bruiners, N., Pinn, M.L., Zimmerman, M.D., Prideaux, B., Dartois, V., Gennaro, M.L., & Karakousis, P.C. (2016). Statin adjunctive therapy shortens the duration of TB treatment in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* dkw014.
- Dzierzykraj-Rogalski, T. (1980). Paleopathology of the Ptolemaic Inhabitants of the Dakhleh Oasis (Egypt). *J. Hum. Evol.* 9, 71–74.
- Ebbell, B., & Banov Jr, L. (1937). *The Papyrus Ebers : the greatest Egyptian medical document* (Copenhagen : Levin & Munksgaard, 1937).
- Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* virulence: lipids inside and out. *Nat. Med.* 13, 284–285.
- Ervasti, J.M., & Campbell, K.P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122, 809–823.
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., & Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* 97, 435–447.

- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Forrellad, M.A., McNeil, M., Santangelo, M.D.L.P., Blanco, F.C., García, E., Klepp, L.I., Huff, J., Niederweis, M., Jackson, M., & Bigi, F. (2014). Role of the Mce1 transporter in the lipid homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 94, 170–177.
- Frank, D.J., Zhao, Y., Wong, S.H., Basudhar, D., De Voss, J.J., & De Montellano, P.R.O. (2016). Cholesterol analogs with degradation-resistant alkyl side chains are effective *Mycobacterium tuberculosis* growth inhibitors. *J. Biol. Chem.* 291, 7325–7333.
- Franzblau, S.G. (1988). Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. *J. Clin. Microbiol.* 26, 18–21.
- Franzblau, S.G., Service, U.S.P.H., & Hansen, W.L. (1987). Axenic incorporation of [U -14 C] palmitic acid into the phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 48, 407–411.
- Frye, S., Haffner, C., Maloney, P., Mook, R. jr, Dorsey, G.J., Hiner, R., Cribbs, C., Wheeler, T., Ray, J., & Andrews, R. (1994). Azasteroids: structure-activity relationships for inhibition of type 1 and 2 human 5 alpha-reductase and human adrenal 3 beta-hydroxy-delta 5-steroid dehydrogenase/3-keto-delta 5-steroid isomerase. *J Med Chem.* 37, 2352–2360.
- Frye, S. V, Haffner, C.D., Maloney, P.R., Mook, R.A., Dorsey, G.F., Hiner, R.N., Batchelor, K.W., Bramsonj, H.N., Stuart, J.D., Schweikerj, S.L., et al. (1993). 6-Azasteroids: Potent dual inhibitor of human type 1 and 2 steroid-5 α -reductase. *J Med Chem* 36, 4313–4315.
- Gao, J., & Sampson, N.S. (2014). A GMC oxidoreductase homologue is required for acetylation of glycopeptidolipid in *mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* 53, 611–613.
- Gatfield, J., & Pieters, J. (2000). Essential Role for Cholesterol in Entry of *Mycobacteria* into Macrophages. *Science* 288, 1647–1651.
- Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M.H., Hara, H., Anderton, M.C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J.E., Mohn, W.W., et al. (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1947–1952.
- Goldstein, J.L., & Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.
- Graziano, T.S., Cuzzullin, M.C., Franco, G.C., Schwartz-Filho, H.O., de Andrade, E.D., Groppo, F.C., & Cogo-Müller, K. (2015). Statins and Antimicrobial Effects: Simvastatin as a Potential Drug against *Staphylococcus aureus* Biofilm. *PLoS One* 10, e0128098.

- Greenwood, J., Steinman, L., & Zamvil, S.S. (2006). Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 358–370.
- Hansen, G.H.A. (1874). Undersogelser angaaende spedalskhedens aasager. *Nor. Mag. Laegervidenskaben* 4, 1–88.
- Harold, F.M., Abraham, S., & Chaikoff, I.L. (1956). Metabolism of Δ^4 -cholestenone-4-C14 in the rat. *J. Biol. Chem.* 221, 435–448.
- Hirawati, Katoch, K., Chauhan, D.S., Singh, H.B., Sharma, V.D., Singh, M., Kashyap, M., & Katoch, V.M. (2006). Detection of *M. leprae* by reverse transcription-PCR in biopsy specimens from leprosy cases: a preliminary study. *J. Commun. Dis.* 38, 280–287.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., & Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.
- Hulse, E. V. (1972). Leprosy and Ancient Egypt. *Lancet* 300, 659.
- Hummon, A.B., Lim, S.R., Difilippantonio, M.J., & Ried, T. (2007). Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques* 42, 467–472.
- Ikeda, U., Shimpo, M., Ikeda, M., Minota, S., & Shimada, K. (2001). Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38, 69–77.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 125–138.
- Istvan, E.S. (2002). Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am. Heart J.* 144, S27–S32.
- Jackson, M., Raynaud, C., Lan elle, M.A., Guilhot, C., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B., & Daff e, M. (1999). Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol. Microbiol.* 31, 1573–1587.
- Jain, M., Petzold, C.J., Schelle, M.W., Leavell, M.D., Mougous, J.D., Bertozzi, C.R., Leary, J.A., & Cox, J.S. (2007). Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 5133–5138.
- Jaipuria, G., Leonov, A., Giller, K., Vasa, S.K., Jaremko, Ł., Jaremko, M., Linser, R., Becker, S., & Zweckstetter, M. (2017). Cholesterol-mediated allosteric regulation of the mitochondrial translocator protein structure. *Nat. Commun.* 8, 14893.
- Jankute, M., Cox, J.A.G., Harrison, J., & Besra, G.S. (2015). Assembly of the *Mycobacterial Cell Wall*. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 405–423.

- Jardim, M.R., Antunes, S.L.G., Simons, B., Wildenbeest, J.G., Nery, J.A.C., Illarramendi, X., Moraes, M.O., Martinez, A.N., Oskam, L., Faber, W.R., et al. (2005). Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr. Rev.* 76, 232–240.
- Johndrow, C., Nelson, R., Tanowitz, H., Weiss, L., & Nagajyothi, F. (2013). *Trypanosoma cruzi* infection results in an increase in intracellular cholesterol. *18*, 1199–1216.
- Johnson, C.M., Lyle, E.A., Omuetti, K.O., Stepensky, V.A., Yegin, O., Alpsoy, E., Hamann, L., Schumann, R.R., & Tapping, R.I. (2007). Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J. Immunol.* 178, 7520–7524.
- Johnstone, P.A. (1987). The Search For Animal Models For Leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 55, 535–547.
- Joseph, S.B., Castrillo, A., Laffitte, B.A., Mangelsdorf, D.J., & Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat. Med.* 9, 213–219.
- Joshi, S.M., Pandey, A.K., Capite, N., Fortune, S.M., Rubin, E.J., & Sasseti, C.M. (2006). Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11760–11765.
- Kawai, S., Mori, S., Mukai, T., Suzuki, S., Yamada, T., Hashimoto, W., & Murata, K. (2000). Inorganic Polyphosphate/ATP-NAD kinase of *Micrococcus flavus* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 57–63.
- Kendall, S.L., Burgess, P., Balhana, R., Withers, M., Ten Bokum, A., Lott, J.S., Gao, C., Uhia-Castro, I., & Stoker, N.G. (2010). Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR2*. *Microbiology* 156, 1362–1371.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, Á., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., & Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1, 121–131.
- Kiener, P.A., Davis, P.M., Murray, J.L., Youssef, S., Rankin, B.M., & Kowala, M. (2001). Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int. Immunopharmacol.* 1, 105–118.
- Kikuchi, S., Rainwater, D., & Kolattukudy, P. (1992). Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Arch Biochem Biophys* 295, 318–326.
- Kim, M.J., Wainwright, H.C., Locketz, M., Bekker, L.G., Walther, G.B., Dittrich, C., Visser, A., Wang, W., Hsu, F.F., Wiehart, U., et al. (2010). Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol. Med.* 2, 258–274.

- Kim, S.M., Jang, H., Son, Y., Lee, S.A., Bae, S.S., Park, Y.C., Eo, S.K., & Kim, K. (2013). 27-Hydroxycholesterol induces production of tumor necrosis factor- α from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *430*, 454–459.
- Kirchheimer, W.F., & Storrs, E.E. (1971). Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* *39*, 693–702.
- Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E., & Binford, C.H. (1972). Attempts to establish the Armadillo (*Dasypus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the Armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* *40*, 229–242.
- Korf, H., Vander Beken, S., Romano, M., Steffensen, K.R., Stijlemans, B., Gustafsson, J.-Å., Grooten, J., & Huygen, K. (2009). Liver X receptors contribute to the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 1626.
- Kruh, N.A., Borgaro, J.G., Ruzsicska, B.P., Xu, H., & Tonge, P.J. (2008). A novel interaction linking the FAS-II and phthiocerol dimycocerosate (PDIM) biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* *283*, 31719–31725.
- Kuijk, L.M., Mandey, S.H., Schellens, I., Waterham, H.R., Rijkers, G.T., Coffey, P.J., & Frenkel, J. (2008). Statin synergizes with LPS to induce IL1- β release by THP-1 cells through activation of caspase-1. *Mol. Immunol.* *45*, 2158–2165.
- Kumar, B. (2016). Pure or Primary neuritic Leprosy (PNL). *Lepr Rev* *87*, 450–455.
- Kurabachew, M., Wondimu, A., & Ryon, J.J. (1998). Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* *36*, 1352–1356.
- Kurup, I.G., & Mahadevan, P.R. (1982). Cholesterol metabolism of macrophages in relation to the presence of *Mycobacterium leprae*. *J. Biosci.* *4*, 307–316.
- Kusaka, T., Kohsaka, K., Fukunishi, Y., & Akimori, H. (1981). Isolation and identification of mycolic acids in *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* *49*, 406–416.
- Kwak, B., Mulhaupt, F., Myit, S., & Mach, F. (2000). Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat. Med.* *6*, 1399–1402.
- Lahiri, R., Randhawa, B., & Krahenbuhl, J. (2005). Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J. Med. Microbiol.* *54*, 235–242.
- Lancaster, R.D., Hilson, G.R.F., McDougall, A.C., & Colston, M.J. (1983). *Mycobacterium leprae* infection in nude mice: Bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. *Infect. Immun.* *39*, 865–872.

- Laplante, M., & Sabatini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122, 3589–3594.
- Lázaro, F.P., Werneck, R.I., Mackert, C.C.O., Cobat, A., Prevedello, F.C., Pimentel, R.P., Macedo, G.M.M., Eleutério, M.A.M., Vilar, G., Abel, L., et al. (2010). A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *J. Infect. Dis.* 201, 1598–1605.
- Li, Q., Ge, F., Tan, Y., Zhang, G., & Li, W. (2016). Genome-Wide Transcriptome Profiling of *Mycobacterium smegmatis* MC² 155 Cultivated in Minimal Media Supplemented with Cholesterol, Androstenedione or Glycerol. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 689.
- Lobato, L.S., Rosa, P.S., Ferreira, J.D.S., Neumann, A.D.S., Silva, M.G. Da, Nascimento, D.C. Do, Soares, C.T., Pedrini, S.C.B., Oliveira, D.S.L. De, Monteiro, C.P., et al. (2014). Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5766–5774.
- Ma, J., Fu, G., Wu, J., Han, S., Zhang, L., Yang, M., Yu, Y., Zhang, M., Lin, Y., & Wang, Y. (2016). 4-cholesten-3-one suppresses lung adenocarcinoma metastasis by regulating translocation of HMGB1, HIF1 α and Caveolin-1. *Cell Death Dis.* 7, e2372.
- Mark, S. (2002). Alexander the Great, Seafaring, and the Spread of Leprosy. *J. Hist. Med. Allied Sci.* 57, 285–311.
- Marques, M.A. de M., Mahapatra, S., Nandan, D., Dick, T., Nunes, E.S., Brennan, P.J., & Pessolani, M.C.V. (2000). Bacterial and host-derived cationic proteins bind α 2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes Infect.* 2, 1407–1417.
- Marques, M.A.M., Chitale, S., Brennan, P.J., & Pessolani, M.C. V (1998). Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 66, 2625–2631.
- Marques, M.A.M., Neves-Ferreira, A.G.C., Xavier Da Silveira, E.K., Valente, R.H., Chapeaurouge, A., Perales, J., Bernardes, R.D.S., Dobos, K.M., Spencer, J.S., Brennan, P.J., et al. (2008). Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics* 8, 2477–2491.
- Marques, M.A.M., Berrêdo-pinho, M., Rosa, T.L.S.A., Pujari, V., Lemes, R.M.R., Crick, D.C., Belisle, J.T., & Pessolani, M.C.V. (2015). The Essential Role of Cholesterol Metabolism in the Intracellular Survival of *Mycobacterium leprae* Is Not Coupled to Central Carbon Metabolism and Energy Production. *J. Bacteriol.* 197, 3698–3707.
- Marrakchi, H., Lanéelle, G., & Quémard, A. (2000). *InhA*, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* 146, 289–296.

Martinez, A.N., Britto, C.F.P.C., Nery, J.A.C., Sampaio, E.P., Jardim, M.R., Sarno, E.N., & Moraes, M.O. (2006). Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 3154–3159.

Martinez, A.N., Lahiri, R., Pittman, T.L., Scollard, D., Truman, R., Moraes, M.O., & Williams, D.L. (2009). Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 2124–2130.

Masaki, T., Qu, J., Cholewa-waclaw, J., Burr, K., & Raam, R. (2013a). Reprogramming Adult Schwann Cells to Stem Cell-like Cells by Leprosy Bacilli Promotes Dissemination of Infection. *Cell* *152*, 51–67.

Masaki, T., McGlinchey, A., Tomlinson, S.R., Qu, J., & Rambukkana, A. (2013b). Reprogramming diminishes retention of *Mycobacterium leprae* in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. *F1000Research* *2*, 1–15.

Masaki, T., McGlinchey, A., Cholewa-Waclaw, J., Qu, J., Tomlinson, S.R., & Rambukkana, A. (2014). Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cell. Reprogram.* *16*, 9–17.

Matheson, C.D., Vernon, K.K., Lahti, A., Fratpietro, R., Spigelman, M., Gibson, S., Greenblatt, C.L., & Donoghue, H.D. (2009). Molecular exploration of the first-century tomb of the shroud in Akeldama, Jerusalem. *PLoS One* *4*.

Mattos, K. a, D'Avila, H., Rodrigues, L.S., Oliveira, V.G.C., Sarno, E.N., Atella, G.C., Pereira, G.M., Bozza, P.T., & Pessolani, M.C. V (2010). Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* *87*, 371–384.

Mattos, K.A., Lara, F.A., Oliveira, V.G.C., Rodrigues, L.S., D'Avila, H., Melo, R.C.N., Manso, P.P.A., Sarno, E.N., Bozza, P.T., & Pessolani, M.C. V. (2011a). Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell. Microbiol.* *13*, 259–273.

Mattos, K.A., Oliveira, V.G.C., D'Avila, H., Rodrigues, L.S., Pinheiro, R.O., Sarno, E.N., Pessolani, M.C. V, & Bozza, P.T. (2011b). TLR6-Driven Lipid Droplets in *Mycobacterium leprae*-Infected Schwann Cells: Immunoinflammatory Platforms Associated with Bacterial Persistence. *J. Immunol.* *187*, 2548–2558.

Mattos, K.A., Oliveira, V.C.G., Berrêdo-Pinho, M., Amaral, J.J., Antunes, L.C.M., Melo, R.C.N., Acosta, C.C.D., Moura, D.F., Olmo, R., Han, J., et al. (2014). *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell. Microbiol.* *16*, 797–815.

Maxfield, F.R., Iaea, D.B., & Pipalia, N.H. (2016). Role of StarD4 and NPC1 in intracellular sterol transport. *Biochem. Cell Biology* *94*, 499–506.

- Medeiros, M.F., Jardim, R., Vital, R.T., Augusto, J., Sales, A.M., Moraes, M.O. De, Chimelli, L.M., Cristina, M., Pessolani, V., Ferreira, H., et al. (2014). An attempt to improve pure neural leprosy diagnosis using immunohistochemistry tests in peripheral nerve biopsy specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22, 222–230.
- Mehrbod, P., Hair-Bejo, M., Ibrahim, T.A.T., Omar, A.R., El Zowalaty, M., Ajdari, Z., & Ideris, A. (2014). Simvastatin modulates cellular components in influenza A virus-infected cells. *Int. J. Mol. Med.* 34, 61–73.
- Miller, E.N., Jamieson, S.E., Joberty, C., Fakiola, M., Hudson, D., Peacock, C.S., Cordell, H.J., Shaw, M., Lins-Lainson, Z., Shaw, J.J., et al. (2004). Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes Immun.* 5, 63–67.
- Miner, M.D., Chang, J.C., Pandey, A.K., Sasseti, C.M., & Sherman, D.R. (2009). Role of cholesterol in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Indian J. Exp. Biol.* 47, 407–411.
- Ministério da Saúde (2016). Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase, estados, Brasil, 2015.
- Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G., & Besra, G.S. (2002). The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 9, 545–553.
- Mira, M.T., Alcais, A., di Pietrantonio, T., Thuc, N. V., Phuong, M.C., Abel, L., & Schurr, E. (2003). Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun.* 4, 67–73.
- Mira, M.T., Alcais, A., Nguyen, V.T., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Vu, H.T., Mai, C.P., Nguyen, T.H., Nguyen, N.B., Pham, X.K., et al. (2004). Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 427, 636–640.
- Misch, E.A., Berrington, W.R., Vary Jr., J.C., & Hawn, T.R. (2010). Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 589–620.
- Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J.-Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., et al. (2005). On the origin of leprosy. *Science* 308, 1040–1042.
- Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., Matsuoka, M., Taylor, G.M., Donoghue, H.D., Bouwman, A., et al. (2009). Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.* 41, 1282–U39.
- Montero, M.T., Hernández, O., Suárez, Y., Matilla, J., Ferruelo, A.J., Martínez-Botas, J., Gómez-Coronado, D., & Lasunción, M.A. (2000). Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition stimulates caspase-1 activity and Th1-cytokine release in peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis* 153, 303–313.

- Moraes, M.O., Pacheco, A.G., Schonkeren, J.J.M., Vanderborght, P.R., Nery, J.A.C., Santos, A.R., Moraes, M.E., Moraes, J.R., Ottenhoff, T.H.M., Sampaio, E.P., et al. (2004). Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 5, 592–595.
- Muñoz, S., Rivas-Santiago, B., & Enciso, J.A. (2009). Mycobacterium tuberculosis entry into mast cells through cholesterol-rich membrane microdomains. *Scand. J. Immunol.* 70, 256–263.
- Nazarova, E. V, Montague, C.R., La, T., Wilburn, K.M., Sukumar, N., Lee, W., Caldwell, S., Russell, D.G., & Vanderven, B.C. (2017). Rv3723 / LucA coordinates fatty acid and cholesterol uptake in Mycobacterium tuberculosis. *Elife* 6, e26969.
- Neelsen, F. (1883). Ein Casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. *Cent. Für Die Medizinischen Wissenschaften* 28, 497–501.
- Nesbitt, N.M., Yang, X., Fontán, P., Kolesnikova, I., Smith, I., Sampson, N.S., & Dubnau, E. (2010). A thiolase of Mycobacterium tuberculosis is required for virulence and production of androstenedione and androstadienedione from cholesterol. *Infect. Immun.* 78, 275–282.
- Neuvonen, M., Manna, M., Morkkila, S., Javanainen, M., Rog, T., Liu, Z., Bittman, R., Vattulainen, I., & Ikonen, E. (2014). Enzymatic Oxidation of Cholesterol: Properties and Functional Effects of Cholestenone in Cell Membranes. *PLoS One* 9, e103743.
- Ng, V., Zanazzi, G., Timpl, R., Talts, J.F., Salzer, J.L., Brennan, P.J., & Rambukkana, A. (2000). Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. *Cell* 103, 511–524.
- Nguyen, D.H., & Taub, D.D. (2003). Inhibition of chemokine receptor function by membrane cholesterol oxidation. *Exp. Cell Res.* 291, 36–45.
- Norlin, M., von Bahr, S., Björkhem, I., Wikvall, K., Bjorkhem, I., & Wikvall, K. (2003). On the substrate specificity of human CYP27A1: implications for bile acid and cholestanol formation. *J. Lipid Res.* 44, 1515–1522.
- Oliveira, R., Ochoa, M., & Sieling, P. (2003). Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect. Immun.* 71, 1427–1433.
- Oliveira, R., Sampaio, E., Aarestrup, F., & Teles, R. (2005). Cytokines and Mycobacterium leprae Induce Apoptosis in Human Schwann Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 882–890.
- Onwueme, K.C., Ferreras, J.A., Buglino, J., Lima, C.D., & Quadri, L.E.N. (2004). Mycobacterial polyketide-associated proteins are acyltransferases: proof of principle with Mycobacterium tuberculosis PapA5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4608–4613.

- Ouellet, H., Guan, S., Johnston, J.B., Chow, E.D., Kells, P.M., Burlingame, A.L., Cox, J.S., Podust, L.M., & De Montellano, P.R.O. (2010). Mycobacterium tuberculosis CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Mol. Microbiol.* 77, 730–742.
- Pandey, A.K., & Sasseti, C.M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4376–4380.
- Pannikar, V.K., Arunthathi, S., Chacko, C.J., & Fritschi, E.P. (1983). A clinico-pathological study of primary neuritic leprosy. *Lepr. India* 55, 212–221.
- Parihar, S.P., Guler, R., Lang, D.M., Suzuki, H., Marais, A.D., & Brombacher, F. (2013). Simvastatin Enhances Protection against *Listeria monocytogenes* Infection in Mice by Counteracting *Listeria*-Induced Phagosomal Escape. *PLoS One* 8, 1–11.
- Parihar, S.P., Guler, R., Khutlang, R., Lang, D.M., Hurdoyal, R., Mhlanga, M.M., Suzuki, H., Marais, A.D., & Brombacher, F. (2014). Statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J. Infect. Dis.* 209, 754–763.
- Patel, B., Banerjee, D., & Butcher, P. (1993). Determination of *Mycobacterium leprae* viability by polymerase chain reaction amplification of 71 KDa Heat-Shock Protein mRNA. *J. Infect. Dis.* 168, 799–800.
- Pettit, J.H., & Rees, R.J. (1964). Sulphone Resistance in Leprosy. an Experimental and Clinical Study. *Lancet (London, England)* 2, 673–674.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 2002–2007.
- Pike, L.J. (2003). Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 44, 655–667.
- Prigozy, T.I., Sieling, P.A., Clemens, D., Stewart, P.L., Behar, S.M., Porcelli, S.A., Brenner, M.B., Modlin, R.L., & Kronenberg, M. (1997). The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity* 6, 187–197.
- Van Der Putten, C., Kuipers, H.F., Zuiderwijk-Sick, E.A., Van Straalen, L., Kondova, I., Van Den Elsen, P.J., & Bajramovic, J.J. (2012). Statins amplify TLR-induced responses in microglia via inhibition of cholesterol biosynthesis. *Glia* 60, 43–52.
- Quigley, J., Hughitt, V.K., Velikovskiy, C.A., Mariuzza, R.A., El-Sayed, N.M., & Briken, V. (2017). The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio* 8, e00148–17.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne Deprez, R.H., & Moorman, A.F.M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* 339, 62–66.
- Rambukkana, A., Salzer, J.L., Yurchenco, P.D., & Tuomanen, E.I. (1997). Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. *Cell* 88, 811–821.

- Rambukkana, A., Yamada, H., Zanani, G., Mathus, T., Yurchenco, P.D., Campbell, K.P., & Fischetti, V.A. (1998). Role of alpha-Dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282, 11–14.
- Rambukkana, A., Zanazzi, G., Tapinos, N., & Salzer, J.L. (2002). Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. *Science* 296, 927–931.
- Rathor, N., Chandolia, A., Saini, N.K., Sinha, R., Pathak, R., Garima, K., Singh, S., Varma-Basil, M., & Bose, M. (2013). An insight into the regulation of mce4 operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 93, 389–397.
- Reboldi, A., Dang, E. V., McDonald, J.G., Liang, G., Russell, D.W., & Cyster, J.G. (2014). 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1 driven inflammation downstream of type 1 interferon. *Science* 345, 679–684.
- Rees, R.J., Waters, M.F., Weddell, A.G., & Palmer, E. (1967). Experimental lepromatous leprosy. *Nature* 215, 599–602.
- Reibel, F., Cambau, E., & Aubry, A. (2015). Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med. Mal. Infect.* 45, 383–393.
- Rhains, D., & Brissette, L. (1999). Low density lipoprotein uptake: Holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 915–931.
- Ridley, D.S., & Hilson, G.R.F. (1967). A Logarithmic Index of Bacilli. 1. Method. *Int. J. Lepr.* 35, 184–186.
- Ridley, D.S., & Jopling, W.H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34, 255–273.
- Robbins, G., Mushrif Tripathy, V., Misra, V.N., Mohanty, R.K., Shinde, V.S., Gray, K.M., & Schug, M.D. (2009). Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). *PLoS One* 4, 1–8.
- Rodrigues, L.S., Maeda, S., Elisabete, M., Moreira, C., Tempone, A.J., Lobato, L.S., Ribeiro-resende, V.T., Alves, L., Rossle, S., Lopes, U.G., et al. (2010). *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon. *Cell. Microbiol.* 12, 42–54.
- Rosenfeld, R.S., Zumoff, B., & Hellman, L. (1967). Conversion of cholesterol injected into man to cholestanol via a 3-ketonic intermediate. *J. Lipid Res.* 8, 16–23.
- Sakharkar, K.R., Kumar Dhar, P., & Chow, V.V.T.K. (2004). Genome reduction in prokaryotic obligatory intracellular parasites of humans: A comparative analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1937–1941.
- Sanfelice, R.A., da Silva, S.S., Bosqui, L.R., Miranda-Sapla, M.M., Barbosa, B.F., Silva, R.J., Ferro, E.A.V., Panagio, L.A., Navarro, I.T., Bordignon, J., et al. (2017). Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion, replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Acta Trop.* 167, 208–215.

- Sasseti, C.M., & Rubin, E.J. (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 12989–12994.
- Save, M.P., Dighe, A.R., Natrajan, M., & Shetty, V.P. (2016). Association of viable *Mycobacterium leprae* with type 1 reaction in leprosy. *Lepr. Rev.* 87, 78–92.
- Schlesinger, L.S., & Horwitz, M.A. (1991). Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J. Exp. Med.* 174, 1031–1038.
- Schuenemann, V.J., Singh, P., Mendum, T.A., Krause-Kyora, B., Jager, G., Bos, K.I., Herbig, A., Economu, C., Benjak, A., Busso, P., et al. (2013). Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern *Mycobacterium leprae*. *Science* 341, 179–184.
- Scollard, D.M. (2008). The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr. Rev.* 79, 242–253.
- Scollard, D.M., Adams, L.B., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Truman, R.W., & Williams, D.L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 338–381.
- Scollard, D.M., Truman, R.W., & Ebenezer, G.J. (2015). Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin. Dermatol.* 33, 46–54.
- Segal, W., & Bloch, H. (1956). Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *J. Bacteriol.* 72, 132–141.
- Sharma, R., Lahiri, R., Scollard, D.M., Pena, M., Williams, D.L., Adams, L.B., Figarola, J., & Truman, R.W. (2013). The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 6, 19–24.
- Shepard, C.C. (1960). The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli Into Foot-Pads of Mice. *J. Exp. Med.* 112, 445–454.
- Shepard, C.C. (1985). *Leprosy* (Edinburgh: Churchill Livingstone).
- Shepard, C.C., & Chang, Y.T. (1962). Effect of Several Anti-Leprosy Drugs on Multiplication of Human Leprosy Bacilli in Foot-Pads of Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 109, 636–638.
- Shetty, V.P., Antia, N.H., & Jacobs, J.M. (1988). The pathology of early leprosy neuropathy. *J. Neurol. Sci.* 88, 115–131.
- Shimoji, Y., Ng, V., Matsumura, K., Fischetti, V.A., & Rambukkana, A. (1999). A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 9857–9862.
- Da Silva, T.P., da Silva, A.C.C., Baruque, M. da G.A., Oliveira, R.B. de, Machado, M.P., & Sarno, E.N. (2008). Morphological and functional characterizations of Schwann cells stimulated with *Mycobacterium leprae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 363–369.

Skerry, C., Pinn, M.L., Bruiners, N., Pine, R., Gennaro, M.L., & Karakousis, P.C. (2014). Simvastatin increases the in vivo activity of the first-line tuberculosis regimen. *J. Antimicrob. Chemother.* *69*, 2453–2457.

Smith, A.G., & Brooks, C.J.W. (1977). The substrate specificity and stereochemistry, reversibility and inhibition of the 3-oxo steroid delta 4-delta 5-isomerase component of cholesterol oxidase. *Biochem. J.* *167*, 121–129.

Spaans, S.K., Weusthuis, R.A., van der Oost, J., & Kengen, S.W.M. (2015). NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Front. Microbiol.* *6*, 1–27.

Spann, N.J., & Glass, C.K. (2013). Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat. Immunol.* *14*, 893–900.

Spann, N.J., Garmire, L.X., McDonald, J.G., Myers, D.S., Milne, S.B., Shibata, N., Reichart, D., Fox, J.N., Shaked, I., Heudobler, D., et al. (2012). Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* *151*, 138–152.

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

Takayama, K., Wang, C., & Besra, G.S. (2005). Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* *18*, 81–101.

Tanigawa, K., Suzuki, K., Nakamura, K., Akama, T., Kawashima, A., Wu, H., Hayashi, M., Takahashi, S.I., Ikuyama, S., Ito, T., et al. (2008). Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lett.* *289*, 72–79.

Tapinos, N., & Rambukkana, A. (2005). Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *102*, 9188–9193.

Thomas, S.T., Yang, X., & Sampson, N.S. (2011a). Inhibition of the *M. tuberculosis* 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase by azasteroids. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* *21*, 2216–2219.

Thomas, S.T., VanderVen, B.C., Sherman, D.R., Russell, D.G., & Sampson, N.S. (2011b). Pathway profiling in *Mycobacterium tuberculosis*: Elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism. *J. Biol. Chem.* *286*, 43668–43678.

Trivedi, O. A., Arora, P., Vats, A., Ansari, M.Z., Tickoo, R., Sridharan, V., Mohanty, D., & Gokhale, R.S. (2005). Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Mol. Cell* *17*, 631–643.

Trombone, A.P.F., Pedrini, S.C.B., Diório, S.M., Belone, A. de F.F., Fachin, L.R.V., do Nascimento, D.C., & Rosa, P.S. (2014). Optimized Protocols for *Mycobacterium leprae* Strain Management: Frozen Stock Preservation and Maintenance in Athymic Nude Mice. *J. Vis. Exp.* *85*, 1–7.

- Truman, R. (2005). Leprosy in Wild Armadillos. *Lepr. Rev.* 76, 198–208.
- Truman, R.W., & Krahenbuhl, J.L. (2001). Viable *M. leprae* as a Research Reagent. *Int. J. Lepr.* 69, 1–12.
- Truman, R.W., Andrews, P.K., Robbins, N.Y., Adams, L.B., Krahenbuhl, J.L., & Gillis, T.P. (2008). Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e328.
- Truman, R.W., Singh, P., Sharma, R., Busso, P., Rougemont, J., Paniz-Mondolfi, A., Kapopoulou, A., Brisse, S., Scollard, D.M., Gillis, T.P., et al. (2011). Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *N. Engl. J. Med.* 364, 1626–1633.
- Tsujishita, Y., & Hurley, J.H. (2000). Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat. Struct. Biol.* 7, 408–414.
- Vergnolle, O., Chavadi, S.S., Edupuganti, U.R., Mohandas, P., Chan, C., Zeng, J., Kopylov, M., Angelo, N.G., Warren, J.D., Soll, C.E., et al. (2015). Biosynthesis of cell envelope-associated phenolic glycolipids in *Mycobacterium marinum*. *J. Bacteriol.* 197, 1040–1050.
- Virchow, R. (1863). *Die krankhaften Geschwülste* (Berlin: August Hirschwald).
- Wemambu, S.N.C., & Turk, J.L. (1969). Erythema Nodosum Leprosum: a Clinical Manifestation of the Arthus Phenomenon. *Lancet* 294, 933–935.
- Wheeler, P.R., Bulmer, K., & Ratledge, C. (1991). Fatty acid oxidation and the β -oxidation complex in *Mycobacterium leprae* and two axenically cultivable mycobacteria that are pathogens. *J. Gen. Microbiol.* 137, 885–893.
- WHO (1998). Expert Committee on Leprosy. Seventh Report (Geneva).
- WHO (2016a). Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 35, 405–420.
- WHO (2016b). Leprosy.
- Wilder-smith, E. (2002). Diagnosis of pure neuritic leprosy. *Neurol J Southeast Asia* 7, 61–63.
- Wipperman, M.F., Yang, M., Thomas, S.T., & Sampson, N.S. (2013). Shrinking the *fadE* proteome of mycobacterium tuberculosis: Insights into cholesterol metabolism through identification of an $\alpha_2\beta_2$ heterotetrameric acyl coenzyme a dehydrogenase family. *J. Bacteriol.* 195, 4331–4341.
- Wipperman, M.F., Sampson, N.S., & Thomas, S.T. (2014). Pathogen roid rage: Cholesterol utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 269–293.
- Xu, X., & London, E. (2000). The effects of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry* 39, 843–849.

- Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C., et al. (2006). Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J. Biol. Chem.* *281*, 27816–27826.
- Yang, S.-T., Kreuzberger, A.J.B., Lee, J., Kiessling, V., & Tamm, L.K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids* *199*, 136–143.
- Yang, X., Dubnau, E., Smith, I., & Sampson, N.S. (2007). Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* is a 3 B-Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Biochemistry* *46*, 9058–9067.
- Yang, X., Gao, J., Smith, I., Dubnau, E., & Sampson, N.S. (2011). Cholesterol is not an essential source of nutrition for *Mycobacterium tuberculosis* during infection. *J. Bacteriol.* *193*, 1473–1476.
- Yu, J., Tran, V., Li, M., Huang, X., Niu, C., Wang, D., Zhu, J., Wang, J., Gao, Q., & Liu, J. (2012). Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*.
- Ziehl, F. (1883). Ueber die Färbung des Tuberclebacillus. *Dtsch. Med Wochenschr.* *9*, 247–249.
- Zou, T., Garifulin, O., Berland, R., & Boyartchuk, V.L. (2011). *Listeria monocytogenes* infection induces prosurvival metabolic signaling in macrophages. *Infect. Immun.* *79*, 1526–1535.