

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

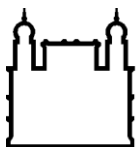
Rychelle Clayde Affonso Medeiros

**Modulação metabólica induzida pelo
Mycobacterium leprae e implicações
para a suscetibilidade à hanseníase**

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

Abril/ 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

**Modulação metabólica induzida pelo
Mycobacterium leprae e implicações
para a suscetibilidade à hanseníase**

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

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

Abril/ 2019

Medeiros, Rychelle Clayde Affonso.

Modulação metabólica induzida pelo *Mycobacterium leprae* e implicações para a susceptibilidade à hanseníase / Rychelle Clayde Affonso Medeiros. - Rio de Janeiro, 2019.

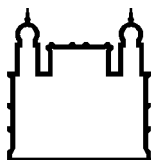
182 f.; il.

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

Orientador: Milton Ozório Moraes.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Mycobacterium leprae* . 2. glicose. 3. metabolismo. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

Modulação metabólica induzida pelo *Mycobacterium leprae* e implicações para a suscetibilidade à hanseníase

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Aprovada em: 12/04/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Claudio Akio Masuda / Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ

Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani / Instituto Oswaldo Cruz - RJ

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira / Pontifícia Universidade Católica-PUC-PR

SUPLENTES:

Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira / Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Prof. Dra. Cristiana Santos de Macedo / Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS)

REVISOR: Marcus Fernandes de Oliveira / Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Rio de Janeiro, 12 de abril de 2019

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

Benjamin Disraeli

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

Agradecimentos

Aos meus pais, Evaldo e Mary, pelo grande amor, carinho e dedicação. Meus grandes incentivadores. Fonte de toda a minha inspiração. Agradecer por aguantar as minhas ausências diante da finalização deste trabalho. Obrigada!

Aos meus irmãos, Evaldo e Rycharda por todo amor, força e inspiração.

Aos meus sobrinhos, Marjorie e Bernardo, fontes de amor, luz e felicidade na nossa família

Ao meu marido e amor, Marcio Vinicius, por todo carinho, apoio incondicional perante grande parte da minha vida. Agradeço o seu intenso companheirismo na elaboração desta tese. Sua ajuda foi fundamental em todos os aspectos! Amo você!

Ao meu orientador e mestre, Dr. Milton Ozório Moraes por destinar a mim tamanha responsabilidade: desenvolver este projeto científico. Agradeço também por ter me recebido tão bem no seu laboratório e por ajudar na minha formação como profissional. Além disso, sua paciência diante as minhas angústias, foi de fato, sensacional! (rs) Muito obrigada!

Ao meu orientador do mestrado, e para mim eterno orientador Dr. Flávio Alves Lara. Obrigada por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto. Tamanha foi a sua importância no desenvolvimento deste trabalho e na minha formação. Muito obrigada!

À minha aluna, que se tornou amiga, irmã e que agora é minha mãe (rs), Karina Girardi. Minha parceira de experimentos, discussões, análises, loucuras. Muito obrigada por desenvolver este trabalho comigo e por toda ajuda.

Ao meu amigo, orientador, psicólogo e guru Dr. Leonardo Ribeiro! Obrigada por me ajudar em tudo e atender o telefone à noite para debater o direcionamento do trabalho(rs). Sem a sua participação não chegaria até aqui. Obrigada!

À minha amiga Ohanna pela grande ajuda nos resultados e análises genéticas, companheirismo no decorrer do trabalho e boas conversas no corredor do pavilhão hanseníase.

Ao Dr. Mauro Sola-penna por me ajudar nos ensaios de atividade enzimática, discutir resultados e contribuir bastante para a formação deste trabalho.

Ao Dr. Marcus Fernandes de Oliveira e sua aluna Ana Paula, por toda ajuda nos ensaios relacionados ao metabolismo, disponibilizando seu tempo para inúmeras discussões sobre os nossos resultados. Além disso, Marcus, obrigada por ter aceitado revisar esta tese. Suas contribuições são sempre muito importantes.

À Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani pela grande ajuda intelectual no desenvolvimento deste projeto e na minha formação como pesquisadora.

Aos meus grandes amigos e confidentes do eterno laboratório de Microbiologia celular: Fabrício Motta, Jessica Ferreira, André, Roberta, Débora, Fernanda, Chyntia, Camila, João e Thabatta pela intensa ajuda na elaboração deste trabalho. Além disso, foram primordiais para tornar os momentos “estressantes”

de trabalho, em agradáveis e felizes. Vocês são essenciais na minha vida. Para vocês, meu eterno carinho e amizade! Um agradecimento especial para a Dr. Robertha Lemes que atuou diretamente, junto comigo, nos ensaios de IGF e que se tornou uma grande parceira na vida científica e pessoal. Obrigada!

Aos meus amigos do Lahan que sempre me apoiaram, ajudaram e também tornaram os meus dias mais engraçados e felizes: Fernanda Manta, Ferdi, Suellen, PT, Mayara, Lucia e Isabella. Vocês são demais! Obrigada por todo apoio e carinho! Em especial para meu amigo Thyago Leal que participou ativamente da produção deste trabalho e que se tornou um grande amigo! Obrigada!

Ao meu eterno, pleno amigo e agora Doutor, Thiago Pinto. O que sempre me ajuda, seja no desenvolvimento deste trabalho ou em alguma questão pessoal. Que sempre puxa algo engraçado mesmo diante de qualquer situação de drama. Você é sensacional! Torna meus dias mais alegres e felizes! Meu eterno carinho e amizade! Obrigada!

À minhas eternas amigas da UFRJ: Vanessa, Larissa e Rosane. Nossa amizade e companheirismo se mantem cada vez mais forte e o apoio delas para finalização deste trabalho foi essencial!

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

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xi
Lista de figuras.....	xv
Lista de tabelas	xvi
Resumo	xvii
Abstract.....	xviii
CAPÍTULO I – Introdução, Justificativa e Objetivos.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 - Hanseníase.....	2
1.1.1 – Breve histórico e epidemiologia	2
1.1.2 – Classificação das formas clínicas e episódios reacionais.....	4
1.1.3 – Lesão neural na hanseníase.....	7
1.1.4 – Transmissão	9
1.1.5 – Diagnóstico, tratamento e profilaxia.....	10
1.1.6 – O <i>Mycobacterium leprae</i>	12
1.1.7 – As células de Schwann e interações entre o <i>M. leprae</i> e suas células hospedeiras	16
1.1.8 – O <i>M. leprae</i> é capaz de induzir a formação de agregados lipídicos na célula hospedeira.....	22
1.2 Metabolismo de glicose	25
1.2.1 – Entrada passiva de glicose na célula.....	25
1.2.2 – Uma visão geral do metabolismo de glicose.....	27
1.2.3 – A via das pentose-fosfato	32
1.2.4- O gene G6PD e sua deficiência.....	37
1.2.5- Interação metabólica entre patógenos e hospedeiro.....	39
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 – Objetivo geral	49
3.2 – Objetivos específicos	49
CAPÍTULO II – Subversão do metabolismo de glicose da célula de Schwann realizada pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	50

2.1 Metodologia dos resultados complementares do capítulo II.....	65
2.2 Resultados complementares do capítulo II.....	68
CAPÍTULO III – Caracterização de variantes genéticas de G6PD que ocasionam deficiência da enzima na hanseníase e os impactos funcionais dessas variações na infecção causada pelo <i>M. leprae</i>.....	70
CAPÍTULO IV – Discussão e Conclusões	103
1. DISCUSSÃO	104
2. CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
3. CONCLUSÕES	118
4. ARTIGO DE REVISÃO	119
5. PUBLICAÇÃO EM EDIÇÃO ESPECIAL DA <i>JBC</i>	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
ANEXOS	161
1.Resultados complementares.....	162
2. Metodologia dos resultados complementares.....	164

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	Graus Celsius
a.C	antes de Cristo
ACC	acetil-CoA carboxilase
ACL	Atp citrato liase
ADC	Albumina bovina, dextrose, catalase
6-NA	6- Aminonicotinamida
AKT	proteína quinase B
ASA	Ambulatório Souza Araújo
ATP	adenosina trifosfato
ATP6	Gene para ATP sintase subunidade 6
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BB	“borderline borderline”
BL	“borderline” lepromatoso
BSA	albumina sérica bovina
BT	“borderline” tuberculóide
CCCP	cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona
cDNA	ácido nucleico complementar
CD163	Grupamento de diferenciação 163
CD4	Grupamento de diferenciação 4
cGAS	cGAMP sintase
CNSHA	Anemia hemolítica não esferocítica crônica
CoA	Coenzima A
COX2	citocromo c oxidase subunidade 2
CS	Célula de Schwann
CYTB	Citocromo b
DMSO	Dimethyl sulfóxido
DNA	ácido Desoxirribonucléico
D.O.	densidade óptica
ESAT-6	antígeno de secreção precoce de 6-kDa
ENH	Eritema nodoso hansênico

EUA	Estados Unidos da América
ErBB2	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine-kinase 2</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FAZ	Ácido graxo sintase
FPP	Farnesil pirofosfato
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLUT	Transportador de glicose
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HIF-1	Hypoxia-inducible factor 1
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HK	Hexocinase
IGF-1	Fator semelhante à insulina I
IGF1R	receptor de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
iNOS	Óxido nítrico sintase
LAM	Lipoarabinomanana
LDH	Lactato desidrogenase
LL	Lepromatosos lepromatoso
LRRK2	quinase rica em repetições de leucinas 2
M	Molar
M.	Mycobacterium
MAG	Glicoproteína associada a mielina
MBP	Proteína básica mielínica
Mb	mega pares de base
MB	Multibacilar
MCF7	Human breast adenocarcinoma cell line
MCT	Transportador de Monocarboxilato
mL	Mililitro
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MOI	multiplicidade de infecção
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro

mtDNA	DNA mitochondrial
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAD	dinucleótido de nicotinamida e adenina
2- NBDG	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d- <i>glucose</i>
NF2	Nuclear fator erytroid 2-related fator 2
NO	Óxido Nítrico
NOD	domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo
nM	Nanomolar
Nm	Nanômetros
OMS	Organização mundial da saúde
OASL	oligoadenilato sintetase “like”
PABA	ácido para-amino-benzóico
PARK	gene que codifica a proteína parkina
PB	Paucibacilar
PBS	tampão salina fosfato
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PACRG	gene coregulado com Parkina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFK	6-fosfofruto-1-cinase
6PGL	6-Fosfogluconato desidrogenase
PGL-I	glicolípídeo fenólico I
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PK	Piruvato cinase
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PQT	Poliquimioterapia
P ₀	Proteína zero
qRT-PCR	RT-PCR quantitativo (em tempo real)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RAF	<i>proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
Ras	<i>guanosine-nucleotide-binding protein subfamily</i>
RD	região de diferença
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	rotações por minuto

SFB	soro fetal bovino
SNP	polimorfismo de base única
TALDO	Transaldolase
Th	linfócitos T auxiliares (T helper)
TLR	receptores do tipo Toll
TMRM	Tetrametil rodamina éster
TNF	fator de necrose tumoral
TOOS	N- Ethyl-N-[2-hydroxy-3-sulfopropyl]-3-methylaniline
Treg	células T reguladoras

Lista de figuras

Figura 1.1: Taxas da incidência mundial de hanseníase em 2017	3
Figura 1.2: Modelo espectral das formas clínicas da hanseníase baseada na classificação de Ridley e Jopling	5
Figura 1.3: Modelo esquemático da parede celular do <i>M. leprae</i>	13
Figura 1.4 Cultivo de <i>M. leprae</i> em camundongos Balb C Foxn1 nu (nude).....	14
Figura 1.5: Esquema demonstrando o suporte metabólico oferecido pelas células gliais ao axônio	17
Figura 1.6: Modelo de vida intracelular do <i>M. leprae</i> e sinalizações promovidas nas CS.....	20
Figura 1.7 Modelos bidimensionais de GLUTs de classe I, II e III	26
Figura 1.8: Visão geral do metabolismo de carboidratos.	31
Figura 1.9: O esquema geral da via das pentoses-fosfato e sua conexão com a glicólise	34
Figura 1.10: Papel do NADPH e da glutatona na proteção das células contra derivados de oxigênio altamente reativos	35
Figura 1.11: Características fenotípicas dos estados de polarização de macrófagos M1 e M2	42
Figura 1.12: Os patógenos e hospedeiros apresentam interações metabólicas que influenciam diretamente na sobrevivência de ambos ...	43
Figura 2.2.1. <i>M. leprae</i> é capaz de diminuir na quantidade de DNA mitocondrial em células de Schwann.....	68
Figura 2.2.2. <i>M. leprae</i> é capaz de diminuir na quantidade de DNA mitocondrial em lesão de nervo de pacientes	69
Figura 2.1: <i>M. leprae</i> é capaz de modular o metabolismo da célula hospedeira para se beneficiar	115
Figura 2.2: Hipótese para o mecanismo de sobrevivência do <i>M. leprae</i> em indivíduos portadores de mutações para G6PD em um sistema <i>in vivo</i> ..	117
Figura 3.1: A adição do neutralizante do receptor de IGF-1 diminui a captação de glicose em células ST8814 infectadas	158
Figura 3.2: <i>M. leprae</i> induz a expressão de mTOR e adição de seu inibidor específico (rapamicina) diminui a viabilidade do bacilo em 48 horas de infecção	159

Lista de tabelas

Tabela 1.1: Diferenciação entre os genomas de <i>M. leprae</i> e outras micobactérias	16
Tabela 1.2: Classificação das variantes de G6PD	38
Tabela 1.3: Características demográficas e dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo.....	65
Tabela 1.4: Identificação dos pacientes	65
Tabela 1.5: Sequência dos primers usados nas reações de qRT-PCR....	67

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Modulação metabólica induzida pelo *Mycobacterium leprae* e implicações para a suscetibilidade à hanseníase

RESUMO

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

O *Mycobacterium leprae*, patógeno intracelular causador da hanseníase, infecta com sucesso células da glia do sistema nervoso periférico, denominadas células de Schwann (CS). A interação entre o bacilo e sua célula hospedeira vem sendo alvo de muitos estudos de modulação imunológica, desmielinização e de metabolismo lipídico, porém as possíveis modulações no metabolismo energético destas células impostas pelo patógeno permaneceram negligenciadas durante anos. Para determinar estas modulações, estudamos o metabolismo energético de uma linhagem de células de Schwann humanas (ST8814) infectadas *in vitro* por *M. leprae* purificado a partir de extratos de coxim plantar de camundongos atímicos nu/nu. Em resultados anteriores, demonstramos que células de Schwann infectadas eram capazes de captar mais glicose e que este efeito estava atrelado ao aumento da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), primeira e principal enzima envolvida na oxidação da glicose-6-fosfato pela via das pentoses-fosfato (PPP). Em contrapartida ao aumento da captação de glicose, ocorreu diminuição drástica dos processos de fermentação e potencial elétrico mitocondrial. No presente trabalho, fomos capazes de detectar o aumento da expressão do transportador de glicose (GLUT-1), enzimas envolvidas na produção de NADPH e no combate a espécies reativas de oxigênio, como a glutathione redutase (GSR) e a enzima málica citosólica (ME-1). Ademais, a quantificação relativa de mtDNA mostrou uma diminuição relativa dos seus níveis nas células com 120 horas de infecção e em lesão de nervos de pacientes. A expressão de G6PD também demonstrou aumento em amostras provenientes de pacientes como lesão de pele e nervos. Além disso, inibidores específicos (6AN) e o silenciamento gênico de *G6PD*, foram capazes de reverter os efeitos anteriormente encontrados e diminuir a viabilidade intracelular do bacilo. Devido ao protagonismo de G6PD, um gene localizado no cromossomo X, avançamos em nossas análises com um estudo de associação caso-controle na hanseníase. Para isso, selecionamos SNPs candidatos para genotipagem em uma população do Rio de Janeiro. Nossos resultados mostraram que as SNPs G202A e A376G, são mais frequentes em pacientes do Rio de Janeiro, e a A376G (rs1050829) está modestamente associada à suscetibilidade a hanseníase no sexo masculino. Além disso, utilizando modelo *in vitro*, a viabilidade do *M. leprae* não variou entre os diferentes genótipos formados a partir dos SNPs de *G6PD* em monócitos. Porém, monócitos infectados apresentaram indução da expressão e atividade de G6PD, corroborando com os dados anteriores em células de Schwann. Assim, nossos dados apontam para alterações metabólicas no hospedeiro contribuindo para o melhor entendimento da hanseníase e identificação de possíveis interferentes que gerem promissoras alternativas para o tratamento da doença.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Metabolic modulation induced by *Mycobacterium leprae* and implications for susceptibility to leprosy

ABSTRACT

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

Mycobacterium leprae, an intracellular pathogen that causes leprosy, successfully infects glial cells of the peripheral nervous system, called Schwann cells (SC). The interaction between bacillus and host cell has been the subject of many studies of immunological modulation, demyelination and lipid metabolism but the possible modulations in the energy metabolism of these cells imposed by the pathogen remained neglected for years. To determine these modulations, we studied the energetic metabolism of a strain of human Schwann cells (ST8814) infected *in vitro* by *M. leprae* purified from plantar cushion extracts of nu / nu athymic mice. In previous results, we demonstrated that infected Schwann cells were capable of capturing more glucose and that this effect was linked to increased activity of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the first and main enzyme involved in the oxidation of glucose in pentose-phosphate pathway (PPP). In contrast to the increase in glucose uptake, there was a drastic decrease in fermentation processes and mitochondrial electrical potential. In the present work, we were able to detect increased expression of the glucose transporter (GLUT-1), enzymes involved in the production of NADPH and in combat to reactive oxygen species, such as glutathione reductase (GSR) and cytosolic malic enzyme (ME-1). In addition, relative mtDNA quantification showed a relative decrease in their levels in cells with 120 hours of infection and in nerve damage in patients. The G6PD expression also increased in samples from patients such as skin and nerve damage. In addition, specific inhibitors (6AN) or the gene silencing of G6PD, were able to reverse the previously encountered effects and to decrease the intracellular viability of the bacillus. Due to the prominence of G6PD, a gene located in X chromosome, in our analyzes, we proceeded with a case-control association study on leprosy. To perform this, we selected candidate SNPs for genotyping in a population of Rio de Janeiro. Our results showed that G202A and A376G are more frequent in patients from Rio de Janeiro, and A376G (rs1050829) is associated with male leprosy susceptibility. Beyond that, using *in vitro* model, the *M. leprae* viability did not vary between the different genotypes that are formed from SNPs of G6PD in monocytes. However, the infected monocytes presented an induction of expression and activity of G6PD, corroborating with previous Schwann cells data. Thus, our data point to metabolic changes in the host, contributing to a better understanding of leprosy and to the identification of possible interferents that could generate promising alternatives for disease treatment.

***Capítulo I: Introdução, Justificativa e
Objetivos***

1. INTRODUÇÃO

1.1– A hanseníase

1.1.1- Breve histórico e epidemiologia

A hanseníase é uma doença humana crônica com consequências neurológicas potencialmente debilitantes (1,2). De acordo com textos antigos, as primeiras descrições de sua existência ocorreram em 600 aC na China, na Índia e no Egito (3). Em 2005, Monot e seus colaboradores demonstraram, através de análises em genômica comparativa utilizando diferentes cepas de *M. leprae*, que a origem da hanseníase ocorreu no leste africano, em nossos ancestrais hominídeos, e se dispersou seguindo as migrações de nossa espécie (3). Porém, em 2018, Benjak e colaboradores detectaram a predominância de cepas ancestrais de *M. leprae* no leste asiático, sugerindo ser esta a região de origem da doença (4). Nas Américas, a doença é atribuída à colonização do território realizada por europeus e africanos por volta dos séculos XVI e XVII (5). No Brasil, os primeiros casos da doença foram notificados no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro, onde, anos mais tarde, seria criado o primeiro leprosário, estabelecimento para o qual as pessoas contaminadas com a doença eram enviadas, a fim de isolá-las do resto da população e conter a sua contaminação (5).

Durante a progressão da doença, as lesões cutâneas e neurais características podem promover a deformação de partes do corpo do paciente acarretando na segregação dos indivíduos infectados da sociedade (1). Esta segregação impulsionou a desvalorização social dos pacientes e, por isso, a terminologia lepra foi substituída por hanseníase em 1976 no Brasil. A troca teve como objetivo amenizar o preconceito e a rejeição sob a qual os pacientes eram submetidos ao serem designados como “leprosos”. Entretanto, somente em 1995, com a lei federal 1.010/95, foi terminantemente proibida a utilização do termo lepra. A substituição do termo “lepra” por hanseníase também teve como objetivo homenagear o descobridor do patógeno causador da doença, Gerhard Hansen (6).

Embora a descrição da doença seja muito antiga, a hanseníase ainda é considerada um grave problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. Dados da organização mundial de saúde (OMS) demonstraram uma incidência de 192.713 casos em 2017, um acréscimo de 20.765 casos em relação ao ano de 2016, sendo endêmica em países como Índia e o Brasil (7). O Brasil é o segundo país com o maior número de novos casos no mundo, ficando atrás apenas da Índia (**Figura 1.1**), que apresentou cerca de 127 mil novos casos reportados em 2017, enquanto no Brasil, foram reportados cerca de 27 mil novos casos (7). As maiores taxas de prevalência e incidência da hanseníase são encontradas nos estados do Mato Grosso do Sul, Maranhão e Tocantins e estão relacionadas com a pobreza e as péssimas condições de vida nos quais essas pessoas estão inseridas (8) .

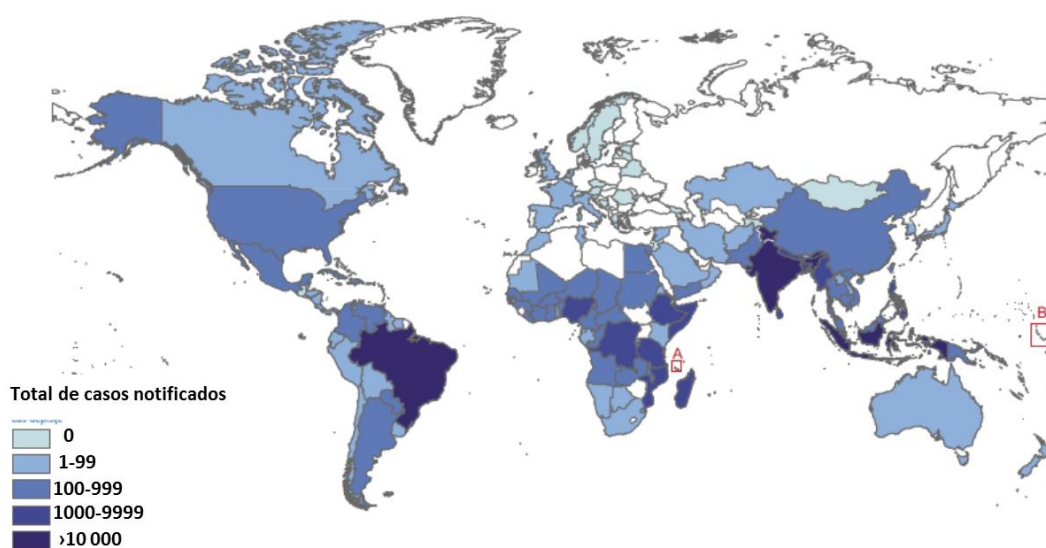


Figura 1.1 – Taxas da incidência mundial de hanseníase no ano de 2017. As taxas de novos casos referem-se a cada 100.000 habitantes. Adaptado de OMS, 2018.

A hanseníase pode afetar pessoas em todas as idades e de ambos os sexos. Um fato interessante sobre a epidemiologia da doença é que ocorre um leve aumento na proporção de homens afetados na população brasileira. No período de 2012 a 2016 foram diagnosticados 151.764 casos novos de hanseníase no Brasil, o que equivale a uma taxa média de detecção de 14,97 casos novos para cada 100 mil habitantes. Entre estes, 84.447 casos novos

ocorreram no sexo masculino, o que corresponde a 55,6% do total. Além disso, nesse período, observou-se que a taxa de detecção por 100 mil habitantes na população masculina foi maior que na população feminina em todas as faixas etárias, sobretudo a partir dos 15 anos de idade. Quando avalia-se a quantidade de indivíduos que desenvolveram incapacidades físicas após afetados pela doença, percebemos que a proporção no sexo masculino atingiu 15,17 casos por 1 milhão de homens, enquanto no sexo feminino a taxa foi de 6,07 casos para cada 1 milhão de mulheres (9). Alguns autores correlacionam essa diferença ao menor cuidado de indivíduos do sexo masculino com a saúde, porém os mecanismos exatos da influência do sexo na predisposição a hanseníase ainda não são totalmente elucidados (9,10).

1.1.2 Classificação das formas clínicas e episódios reacionais

A hanseníase é uma neuropatia periférica infecciosa causada por *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório que apresenta tropismo por macrófagos e células de Schwann (1,11). As principais manifestações da doença incluem lesões na pele, mucosas e nos nervos periféricos as quais podem variar de acordo com o espectro de formas clínicas (1). A classificação das formas clínicas da doença foi estabelecida por Ridley e Jopling em 1966 e combina parâmetros clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos (12). Esta classificação apresenta dois grandes pólos. Em um pólo encontram-se os pacientes lepromatosos (LL) que apresentam alta carga bacilar com ausência de uma resposta celular contra o patógeno, apesar de apresentarem altos títulos de anticorpos contra o mesmo. No outro pólo encontramos os pacientes tuberculóides (TT) que apresentam uma forte resposta celular ao *M. leprae* e por isso, apresentam baixa carga bacilar, apesar de apresentarem baixos títulos de anticorpos contra o mesmo. Em geral os tuberculóides apresentam uma única lesão enquanto os lepromatosos, várias. Entre esses dois extremos encontram-se as formas intermediárias que denominamos *borderline*: *borderline* lepromatoso (BL), *borderline borderline* (BB) e *borderline* tuberculóide (BT), onde a resposta imune celular e humoral é maior ou menor de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide ou lepromatoso.

Cerca de 95% dos indivíduos que entram em contato com o bacilo não desenvolvem a doença. Os que desenvolvem, primeiramente entram em um estágio inicial e transitório que denominamos como indeterminado (I) e posteriormente evoluem para uma das cinco classificações mencionadas anteriormente (13)

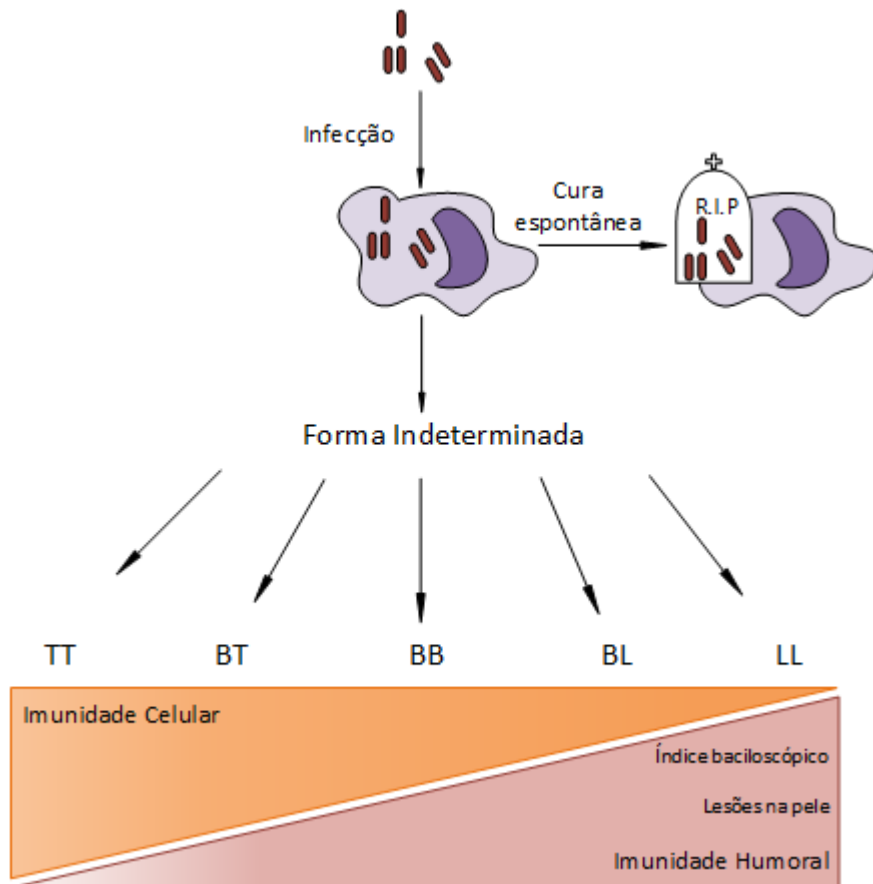


Figura 1.2: Modelo espectral das formas clínicas da hanseníase baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966. Esquema demonstra o perfil do espectro da doença. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966: TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão esquematizados aspectos da resposta imune do paciente, número de lesões na pele e índice baciloscópico.

Com relação a resposta imune, os polos opostos das formas clínicas da hanseníase, como o tuberculóide e o lepromatoso foram divididos pela literatura ao longo do tempo por uma grande dicotomia (14–16). O polo tuberculóide está mais relacionado com uma resposta Th1 (*T helper 1*), onde existe a grande produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF (fator de necrose tumoral), IFN- γ (interferon gama), IL-12 (Interleucina-12) e culmina na potencialização da atividade antimicrobiana de macrófagos. Assim, este tipo de resposta torna-se

muito importante para conter a proliferação de bacilos e diminuir o número de lesões nos pacientes. Já o outro extremo da doença, denominado lepromatoso, está mais relacionado com uma resposta imunológica do tipo Th2 (*T helper 2*), apresentando baixa imunidade celular, associado à elevada produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (interleucina 10) (16–18). Apesar de predominar em grande parte dos achados clínicos, esse modelo polarizado na hanseníase já foi descrito como inconsistente por alguns autores. Como exemplo, já foram relatados alguns pacientes que apresentaram um perfil Th0 caracterizado por uma combinação dos padrões de citocinas Th1 e Th2 (19). Outros trabalhos não observaram uma associação clara entre forma clínica da doença e perfis Th1 e Th2 e outras respostas como a de produção de IL17 por linfócitos Th17 tem sido bastante estudado na diminuição da inflamação em indivíduos com poucos bacilos. Além disso, em pacientes com grande quantidade de bacilos já foi descrito o aumento de FOXP3, um regulador transcricional das células T reguladoras (Tregs). Essas células acabam por inibir a resposta Th1, e conseqüentemente prejudica a liberação de mediadores pró-inflamatórios propiciando um nicho adequado para o crescimento micobacteriano e formação de lesões (20,21).

Para facilitar o esquema terapêutico a OMS em 1987 estabeleceu uma classificação operacional em dois grupos: multibacilares (MB) e paucibacilares (PB) (22). Os paucibacilares (PB) compreendem as formas clínicas TT, BT e I, devido aos limitados números de bacilos encontrados nas lesões. As formas BB, BL e LL constituem os pacientes multibacilares que apresentam uma elevada carga bacilar (23,24). Visando uma identificação mais rápida dos pacientes, o ministério da saúde fez uma adaptação nesta classificação incluindo a baciloscopia, o número e a distribuição das lesões cutâneas e o número de troncos nervosos atacados (13).

Durante a evolução da doença cerca de metade dos pacientes desenvolvem episódios reacionais (25,26). Essas reações são caracterizadas por episódios fortes de resposta inflamatória e imunológica que podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento. As reações podem ser do tipo I (Reação reversa- RR) ou Reação do tipo II (Eritrema nodoso hansênico- ENR). As

reações de tipo I são mais comuns nas formas *borderline* (26,27) e estima-se que um terço desses pacientes podem apresentar esse tipo de episódio reacional, principalmente nos primeiros seis meses de tratamento (28). Este tipo reacional caracteriza-se por algumas sintomatologias, como: infiltração de lesões antigas associada ao surgimento de novas lesões em forma de manchas ou placas infiltradas, eritema, dor, lesões vésico-bolhosas, ulcerações, hiperestesia, parestesia, dor ou espessamento de nervos periféricos com perda da função sensitivo-motora e, mais raramente, febre, déficit da função neural acometendo principalmente os nervos ulnar e tibial posterior (1,29)

A reação do tipo II ou eritrema nodoso hansênico (ENH) ocorre com maior frequência entre pacientes multibacilares, principalmente na forma lepromatosa (26). Estes episódios acontecem, principalmente, durante o segundo e o terceiro ano após o início do tratamento (30). Este episódio reacional é determinado pelo aparecimento de nódulos que podem variar de poucos a inúmeros, de coloração rósea e que podem evoluir para necrose, nas formas mais graves do eritrema nodoso hansênico (ENH). Também, vem acompanhadas de sintomatologia relacionada ao acometimento ocular, hepático, esplênico, de linfonodos, peritônio, testículos, articulações, tendões, músculos, ossos e rins. Em alguns casos pode ocorrer febre e leucocitose (29). É importante ressaltar, que o uso de corticoides e da talidomida é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o tratamento dos pacientes com hanseníase que sofreram essas reações inflamatórias ou episódios reacionais (1,29)

1.1.3 Lesão Neural na Hanseníase

A lesão neural na hanseníase está presente em todas as formas clínicas sendo relacionada à capacidade do *M. leprae* invadir os nervos periféricos (2), alojando-se preferencialmente nas células de Schwann (CS) (31). Essa é uma das mais importantes consequências da doença, ocasionada por uma neuropatia periférica que em estágios mais avançados pode ser irreversível mesmo após o tratamento e a cura da doença. Em alguns casos específicos, os pacientes apresentam apenas a neuropatia sem o comprometimento cutâneo apresentando perda de função e insensibilidade dos nervos e caracterizando a forma clínica denominada de neural pura da hanseníase (32).

A forma neural pura é mais rara ocorrendo em aproximadamente 8% dos pacientes e com um maior aparecimento no sul Índia que obtém 18% dos novos casos notificados (33). A não existência de manifestações cutâneas faz a forma neural pura destoar ou não ser inserida nas classificações mencionadas e ser considerada como um subtipo da hanseníase. Além disso, mesmo que de forma rara, já foi descrito que é possível o aparecimento de lesões de pele em alguns pacientes que utilizaram a monoterapia através da dapsona e em casos de reação do tipo I em que o surgimento de novas lesões já é recorrente. Este fato favorece a idéia de que a hanseníase é basicamente neural no início e que todas as outras formas emergem dela (32).

Na neural pura o nervo afetado é significativamente mais espesso e as vezes pode ser nodular e em alguns casos, observa-se a formação de abscesso (34). É importante ressaltar que os nervos dos membros superiores estão mais comumente envolvidos, como o ulnar (34). Sem inicialmente lesões cutâneas, o grande desafio destas formas clínicas é o diagnóstico. O diagnóstico exige a identificação do patógeno 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) (33). Além disso, faz-se necessário a observação das características histológicas da biópsia (34), e eventualmente é necessário metodologias adicionais para confirmar o diagnóstico, como sorologia anti-PGL-I (glicolípido fenólico) (35) ou imunohistoquímica (36).

O comprometimento neural se caracteriza pela inflamação no tecido perineural e em alguns casos relacionado a atrofia do nervo, demonstrando diminuição do calibre das fibras (2). Os mecanismos exatos de formação da lesão neural na doença ainda não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que alguns fatores estão envolvidos como a resposta imune local desencadeada pela liberação de mediadores inflamatórios no nervo como TNF- α , IL-6, e IL-17 e a formação de um edema inflamatório que pode induzir degeneração de fibras neurais. Além disso, estudos cada vez mais tem associado as alterações na expressão de genes e a bioquímica da célula de Schwann diferencial ocorridas

na infecção pelo *M. leprae* com a lesão neural ocorrida durante a evolução da doença (37,38).

Um estudo realizado por Kirchheimer e Storrs na década de 70 demonstrou que o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) era susceptível à infecção por *M. leprae* e capaz de desenvolver um processo patológico semelhante ao encontrado em tecidos e nervos de pacientes com hanseníase (39,40). Atualmente, o tatu de nove bandas representam um importante modelo experimental para o entendimento dos mecanismos de dano neural ocasionados pelo *M. leprae* (41).

1.1.4 Transmissão

O mecanismo exato de transmissão do patógeno da hanseníase ainda é um enigma que precisa ser totalmente desvendado pela ciência. Acredita-se que a transmissão se dá pelo contato direto entre pessoas, principalmente pelas vias respiratórias superiores e que o nariz é a estrutura principal que determina o início da infecção e a transmissão para outros indivíduos (42–44) . O grupo de Silva e colaboradores em 2013 foi capaz de detectar que o bacilo é capaz de infectar células epiteliais alveolares e nasais humanas e que a inserção de *M. leprae* no septo nasal de camundongos resulta em infecção de macrófagos e células epiteliais no tecido pulmonar, sustentando a idéia de que as vias aéreas constituem uma importante rota de entrada do *M. leprae* no corpo humano (45). Além disso, estudos anteriores já demonstraram que pacientes hanseníacos com alta carga bacilar podem expelir, através de suas secreções nasais, cerca de 1 milhão de bacilos viáveis por dia (44,46). Um estudo promovido por Job e seus colaboradores permitiu a percepção de que 80% de pacientes multibacilares não tratados apresentavam bacilos viáveis na epiderme lesionada e indicaram com este resultado que as lesões de pele podem servir como fonte de contaminação, uma ideia já propagada ao longo de décadas. De fato, uma exacerbação do contato próximo e prolongado, como convivência intradomiciliar, com indivíduos infectados e não tratados representa um fator crucial para a disseminação do patógeno (47) .

Atualmente sabe-se que o homem não é o único hospedeiro natural do bacilo. Na década de 70 foram relatados nos Estados Unidos tatus naturalmente infectados (39). Além disso, na mesma região alguns pacientes apresentavam o patógeno com a sequência de genes idêntica aos dos tatus, começando assim a suspeita que estes poderiam ser uma importante fonte para a dispersão do *M. leprae* (48). De forma extremamente interessante foi identificado esquilos-vermelhos (*Sciurus vulgaris*) naturalmente infectados por *M. leprae* caracterizando assim um novo hospedeiro e uma possível fonte de contaminação (49).

Recentemente um estudo indicou uma possível via de transmissão da doença através de insetos vetores, ao demonstrar que barbeiros (*Rhodinus prolixus*) poderiam liberar *M. leprae* viável em suas fezes após alimentação artificial com sangue infectado (50). Além disso, apesar da sua dependência obrigatória do hospedeiro, o material genético do bacilo já foi encontrado em solos e águas de áreas endêmicas da Índia e da Indonésia, levando a acreditar em forma de transmissão do bacilo por amostras ambientais (51,52)

1.1.5 Diagnóstico, tratamento e prevenção da doença

O diagnóstico da doença é baseado em exames clínicos e laboratoriais. Na ausência de infraestrutura laboratorial, o reconhecimento se dá basicamente por sinais clínicos com a consequente análise dos sintomas. Os sinais mais claros da doença envolvem falta de sensibilidade, lesões cutâneas e espessamento dos nervos. Para detecção do patógeno, exames baciloscópicos e histopatológicos podem ser realizados utilizando esfregaços cutâneos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões) e biópsias cutâneas ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos. Além disso, em casos extremamente difíceis, podem ser utilizados ensaios moleculares baseados na técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) empregando amostras clínicas como linfa, sangue, secreção nasal e fragmentos de pele e nervos (53–55).

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 (1). Em outro teste, o cutâneo da lepromina ou Mitsuda, o antígeno do *M. leprae* é injetado e avalia-se a resposta imunológica e formação do edema após 4 semanas (56). 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 (1)

O tratamento para os pacientes com hanseníase é o primeiro passo para conter os avanços e interromper a cadeia de transmissão da doença. O primeiro medicamento eficaz utilizado contra a hanseníase foi a dapsona, um antibiótico que é capaz de inibir a divisão bacteriana (57–59). Porém o aumento de cepas resistentes ao medicamento fez com que, em 1982, a organização mundial de saúde (OMS) implementasse o tratamento através da poliquimioterapia (PQT), onde o paciente era submetido a uma associação de três diferentes drogas: dapsona, rifampicina e clofazimina (22). Esta associação dificulta a proliferação de patógenos resistentes aos medicamentos e promove uma ampla capacidade de cura. Para a administração medicamentosa a separação dos pacientes em paucibacilares e multibacilares torna-se fundamental. Para os pacientes paucibacilares é utilizada uma combinação de rifampicina e dapsona com duração de 6 meses, já para os multibacilares a combinação de rifampicina, dapsona e clofazimina se faz durante o período de 12 meses (60,61). Como já mencionado anteriormente, ocorre o uso de imunomoduladores, como a talidomida, em pacientes que evoluem para episódios reacionais como o ENH (62).

Ainda não existem vacinas específicas para a hanseníase, mas estudos apontam que a vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) pode conferir proteção ao *M. leprae* (63). A cepa vacinal BCG é amplamente utilizada para a prevenção da tuberculose e é proveniente da atenuação de outra espécie dentro do gênero *Mycobacterium*, denominada de *Mycobacterium bovis* (64). Realmente, esta micobactéria apresenta inúmeros antígenos com grande homologia em relação ao *M. leprae* e estudos no Brasil mostram que o uso da BCG pode ser bastante relevante para proteção dos casos de contatos próximos de pacientes

hansênicos (65). Desde 1991, é recomendado pela OMS a revacinação de contatos intradomiciliares com o intuito de reforçar a primeira dose da vacina, uma vez que, esses indivíduos representam o principal grupo de risco para o desenvolvimento da doença (65,66).

1.1.6 *Mycobacterium leprae*

O agente causador da hanseníase foi observado pela primeira vez em 1871 pelo médico norueguês Hansen a partir de fluidos teciduais provenientes de pacientes (6). Hansen observou hastes que eram resistentes ao álcool e a ácido. Apesar da excelência de sua descoberta, a publicação só ocorrera anos mais tarde, em torno de 1873, uma vez que o cultivo do patógeno e sua inoculação em animais experimentais era extremamente ineficaz. Gerard Hansen foi um dos pioneiros na ideia de que microrganismos poderiam causar doenças em humanos (6,67).

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que apresenta tropismo descrito para dois tipos celulares do corpo humano: macrófagos de pele e células de Schwann (11,68). É um bacilo gram-positivo, reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. É considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois quando corado pelo método de coloração por Ziehl-Nilsen não descora pela ação da solução álcool-ácida (1). O seu crescimento é lento fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias. A temperatura ótima para o seu crescimento é abaixo de 37°, sendo então o motivo pelo qual o bacilo apresenta preferência pelos arredores do corpo humano, ocupando os nervos periféricos (69)

O gênero *Mycobacterium* apresenta atualmente 188 espécies descritas (70,71) e pertence a ordem dos Actinomycetales e a família Mycobacteriaceae. Além do *M. leprae* outro importante patógeno deste gênero pode ser citado é o *Mycobacterium tuberculosis*, que causa tuberculose em humanos (72). O *M. leprae* compartilha com outras micobactérias características como a abundância de lipídeos na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em seu envelope celular, conforme pode ser observado na **figura 1.3**. Além disso, mais externamente, apresenta

glicolípídeos como o glicolípídeo fenólico I (PGL-1) específico de *M. leprae* (73). O PGL-1 têm despertado interesse de inúmeros pesquisadores acerca de sua relevância na interação patógeno e célula hospedeira. Esta estrutura única da parede é fundamental para todas as micobactérias, pois impede a passagem de várias drogas, acarretando em resistência a muitos medicamentos. (73–75) .

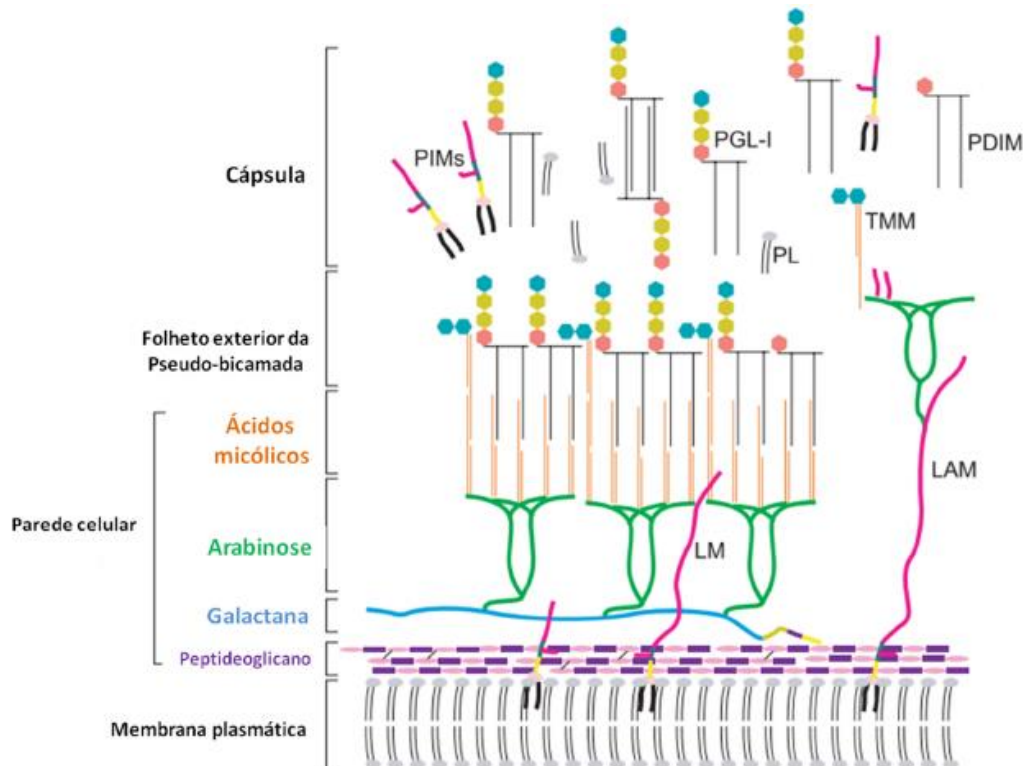


Figura 1.3 Modelo esquemático da parede celular do *M. leprae*. A membrana plasmática é envolvida por uma parede celular composta por peptidoglicana ligada covalentemente a araginogalactana. Ácidos micólicos estão ligados aos resíduos terminais de arabinose. A camada mais externa apresenta: monomicolato trealose (TMM), glicolípídeo fenólico 1 (PGL-1), monossídeos fosfatidilinositol (PIMs), dimicocerosato ftiocerol (PDIM) e fosfolípídeos (PL). Adaptado de Adaptado de Vissa e Brennan, 2001 (75).

Até o momento, não foi possível desenvolver um método de cultivo *in vitro* do *M. leprae* e esta impossibilidade desafiou cientistas ao longo de muitos anos na busca de promover formas de obtenção do patógeno viável para ensaios experimentais. Shepard, na década de 60, demonstrou um crescimento local e limitado do patógeno em coxim plantar de camundongos, permitindo a abertura de campos de estudos neste sentido (69). Porém, inicialmente o crescimento de

bacilos foi bem limitado e provavelmente essa limitação foi promovida pela resposta imune do hospedeiro e, devido a isso, iniciou-se o manejo ou manipulação do sistema imunológico de camundongos na tentativa de disseminação efetiva de bacilos (76–78). Atualmente a utilização de camundongos com timos rudimentares (*nude*), com severa deficiência da produção de linfócitos T, permite uma grande quantidade de bacilos viáveis para serem utilizados em diversos fins experimentais, uma vez que estes camundongos são altamente susceptíveis a infecção pelo *M. leprae* (78). Padronizações posteriores da técnica permitiram a obtenção de cerca de 10^{10} bacilos em períodos de 6 meses após a inoculação (79,80).



Figura 1.4. Cultivo de *M. leprae* em patas de camundongos BalbC Foxn1 *nunu* (*nude*). Demonstração da pata do animal 6 meses após inoculação com 5×10^7 bacilos. Aumento: 1000X. Fonte: Scollard, 2006(1).

Apesar da descrição do patógeno ter ocorrido há mais de cem anos, a impossibilidade do cultivo *in vitro* dificulta a análise acerca da sua biologia pela ciência. Acredita-se que o patógeno tenha sido submetido a uma evolução reductiva do genoma em relação a outra micobactéria, como o *Mycobacterium tuberculosis* (81,82). O genoma completo do *M. leprae* possui 3,27 megabases (Mb) e um conteúdo médio G+C de 57%, valores muito menores do que os encontrados no genoma do *M. tuberculosis* (81), que contém 4,41 Mb, 65,6% G+C e aproximadamente 4000 genes codificantes. Além disso, o genoma do *M. leprae* possui características únicas, como o baixo número de genes codificantes

(somente 49,5% do genoma), o elevado número de pseudogenes (27%) e regiões não codificantes (23,5%). Essa redução adaptativa do seu genoma resultou na eliminação de várias vias metabólicas, tornando-o um patógeno com necessidades metabólicas muito específicas, consequentemente impossibilitando o seu crescimento *in vitro*, demonstrando sua longa adaptação ao nicho intracelular (82). Em relação ao *M. tuberculosis*, o *M. leprae* apresenta uma redundância menor ou um menor número de cópias no genoma de genes cruciais de diversas vias, principalmente vias catabólicas que estão truncadas ou extremamente resumidas. Apesar disto, a via glicolítica apresenta-se intacta e o ciclo de Krebs é funcional na micobactéria. Entretanto, inúmeros genes que codificam o complexo I da cadeia respiratória do *M. leprae* estão ausentes (82) levando-se a discussão de que esta poderia estar truncada na bactéria. Porém a produção de uma NADH desidrogenase do tipo II a partir do gene *ndh* deu indícios de que este importante processo não está truncado no *M. leprae*. Em *M. tuberculosis*, este gene seria o principal envolvido na produção de ATP, tornando o complexo I secundário (83). Em adição, as vias anabólicas como síntese de purinas, pirimidinas, a maioria dos aminoácidos, nucleotídeos e a maioria das vitaminas e cofatores, parecem estar intactas no patógeno (84).

Recentemente, novas micobactérias patogênicas com redução genômica brusca e impossibilidade de crescimento *in vitro* foram detectadas (85,86). Nestes novos seres vivos descritos, encontramos o *Mycobacterium lepromatosis*, que apresenta grande similaridade genômica com o *M. leprae* e é capaz de desenvolver em humanos manifestações clínicas condizentes com a disseminação da hanseníase (86). Alguns casos notificados demonstram a sua disseminação principalmente em regiões da América Central (87). Assim, atualmente, este microorganismo é considerado como um novo agente etiológico da doença (86). Outro patógeno micobacteriano, o *Mycobacterium uberris*, é o causador de dermatite nodular em bovinos e caprinos e recentemente foi descrita a sua semelhança genômica em relação ao *M. leprae* e *M. lepromatosos* (85). Em um comprimento de sequência de 3.206,741 (*M. lepromatosos*) e 3.112,721 (*M. uberris*) o genoma destes indivíduos são tão reduzidos quanto ao do *M. leprae*, e com um grande aparecimento de pseudogenes (85). Além das similaridades genômicas já mencionadas, a detecção de um gene- o proS que

codifica uma protil tRNA sintetase, na mesma posição genômica nestes microorganismos permitiu com que autores sugerissem que estas espécies apresentam um ancestral recente comum (85). A **tabela 1.1** compara os genomas das micobactérias *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. lepromatosos* e *M. uberis* mencionadas neste tópico do trabalho.

Tabela 1.1: Diferenciação entre os genomas de *M. leprae* e outras micobactérias. Adaptado de Cole et al, 2001 e Benjak et al, 2018 (82,85)

Características	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. lepromatosis</i>	<i>M. uberis</i>
Tamanho (pb)	3.268,212	4.411,532	3.206,741	3.122,721
Genes codificantes (No)	1.609	3.959	1.477	1.759
Pseudogenes	1.309	6	1.334	1.081
Conteúdo G-C (%)	57.80	65.51	57.89	57.49

1.1.7 As células de Schwann e interações entre o *M. leprae* e suas células hospedeiras

O sucesso do bacilo durante a infecção está totalmente interligado com as relações que este apresenta com as suas células hospedeiras. As células de Schwann (CS) são células gliais do sistema nervoso periférico e o seu nome provém da homenagem à Theodor Schwann, fisiologista alemão responsável por sua descrição (88). Nos períodos iniciais de sua descoberta, eram vistas apenas como “colas” que mantinham o sistema nervoso periférico unido, porém atualmente é conhecida a benéfica dependência entre estas células e os axônios no desenvolvimento e funcionamento normal da fibra nervosa (88). As CS apresentam atividade análoga aos oligodendrócitos no sistema nervoso central, produzindo uma membrana que envolve as porções alongadas dos neurônios,

denominada bainha de mielina. Esta tem como característica alta concentração lipídica e poucas proteínas, permitindo sua atuação como isolante elétrico, facilitando à rápida propagação dos potenciais de ação das sinapses nervosas ao órgão alvo (89,90).

Para além da sua função como produtora de mielina, as CSs são relacionadas ao abastecimento metabólico dos axônios. Angus e colaboradores, em 2013, demonstraram que estas células são capazes de armazenar glicogênio e este representa o principal suporte energético para axônios. Em processos catabólicos, o glicogênio das CS é convertido em glicose, que pode ser oxidada pela via glicolítica e possivelmente convertida em lactato através da fermentação. O lactato gerado será transportado do compartimento glial para o axônio, onde é convertido em piruvato, utilizado para a produção de ATP, conforme mostra a **figura 1.5**. Dessa forma a produção e a exportação de lactato tornam-se fundamentais para o suporte energético dos axônios (91).

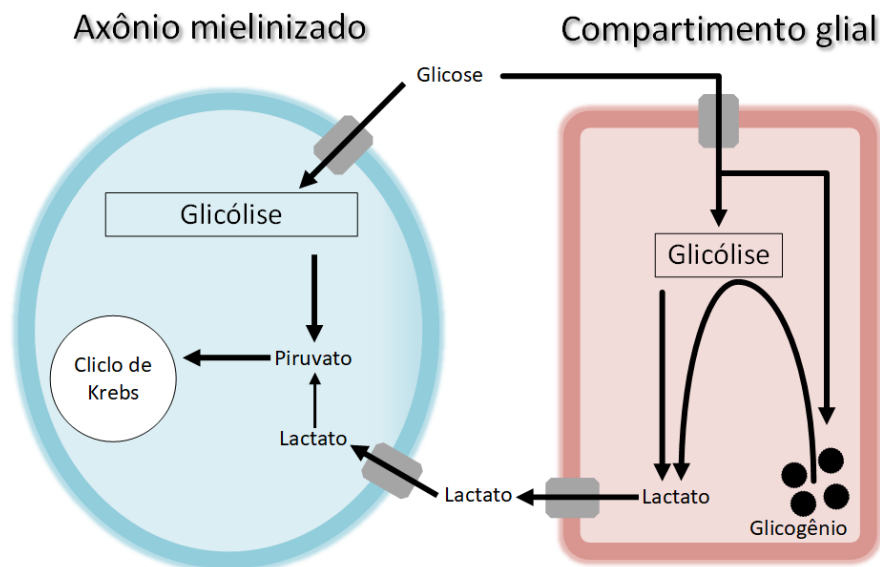


Figura 1.5: Esquema demonstrando o suporte metabólico oferecido pelas células gliais ao axônio. Lactato é exportado do compartimento glial para suprir a demanda metabólica do axônio. Adaptado de Angus, 2013(91)

Os axônios são capazes de induzir o crescimento e a diferenciação das CS a partir da secreção de neuroregulinas, assim, células da crista neural passam dos estágios de CS precursora e CS imatura para CS diferenciada, que

por sua vez podem apresentar fenótipo mielinizante ou não mielinizante no nervo maduro (88). Um estudo seminal do grupo de Annura Rambukkana demonstrou que a interação do bacilo com a CS inicia-se a partir da sua interação ao domínio globular da cadeia $\alpha 2$ da laminina 2, a isoforma mais abundante de laminina presente na lâmina basal e que envolve as CS no nervo periférico (92,93). Esta interação parece ocorrer através de duas moléculas que existem na superfície do bacilo: O PGL-1 e a proteína Hlp (*histone-like protein*) (94,95). Em adição, Acosta e colaboradores em 2018 demonstraram que o PGL I é essencial para a adesão bacteriana e internalização nas CS, uma vez que a micobactéria *M. bovis* BCG recombinante expressando o glicolípido fenólico é capaz de aderir e ser internalizada pela CS, enquanto o mesmo não ocorre com o *M. bovis* BCG selvagem (96).

As CS apresentam uma grande plasticidade fenotípica, sendo capazes de se desdiferenciar de um fenótipo produtor de mielina para um amielínico (97). Apesar de ser internalizado pelos dois tipos fenotípicos, o bacilo é encontrado em vasta quantidade em CS não mielinizadas de pacientes lepromatosos demonstrando que este perfil de célula é mais permissivo a sua sobrevivência (98,99). Além disso, Rambukkana e colaboradores em 2010 mencionaram que a mielina pode funcionar como uma barreira para a instalação da micobactéria, dado que CSs mielinizadas são mais resistentes a invasão realizada pelo patógeno (100,101). O *M. leprae*, então, parece aproveitar a plasticidade das CS e induzir o dano da mielina (desmielinização) como um mecanismo adaptativo para gerar CSs desdiferenciadas que são mais favoráveis à colonização e manipulação bacteriana (102). O gatilho para a desmielinização ocorre ainda por *M. leprae* fora da célula com a ativação do receptor tirosina quinase ErbB2 expresso em CS(103). Após a ativação ocorre a consequente fosforilação de Erk1/2 por uma via dependente de Ras/Raf/MEK que vai ocasionar a degradação mielínica (103).

Diferentemente dos neurônios do sistema nervoso central, os do sistema nervoso periférico são capazes de se regenerar e este efeito está ligado diretamente a proliferação dentre outras propriedades das CS (104–106). Diante de uma injúria, as CSs adultas sofrem proliferação com consequente aumento

de ciclina D₁ (107). Essas respostas do nervo levam a geração de novas células de Schwann desdiferenciadas, que facilitam a remielinização e regeneração dos axônios danificados (105,108). O bacilo dentro da célula parece mimetizar essa resposta uma vez que ocorre aumento nos níveis de ciclina D₁ e consequente aumento da divisão celular em CS infectadas (107). Esta ativação foi descrita por Tapinos e colaboradores em 2005 e ocorre intracelularmente pelo bacilo com a ativação de Erk1 / 2 por uma via dependente de Lck e independente da via canônica de Raf/MEK (107). Quando novas CSs desdiferenciadas são formadas, são infectadas pelo *M. leprae* que prejudica o processo de remielinização (100). O modelo de vida intracelular e as sinalizações causadas por *M. leprae* nas CS mencionadas neste tópico estão resumidas na **figura 1.6**.

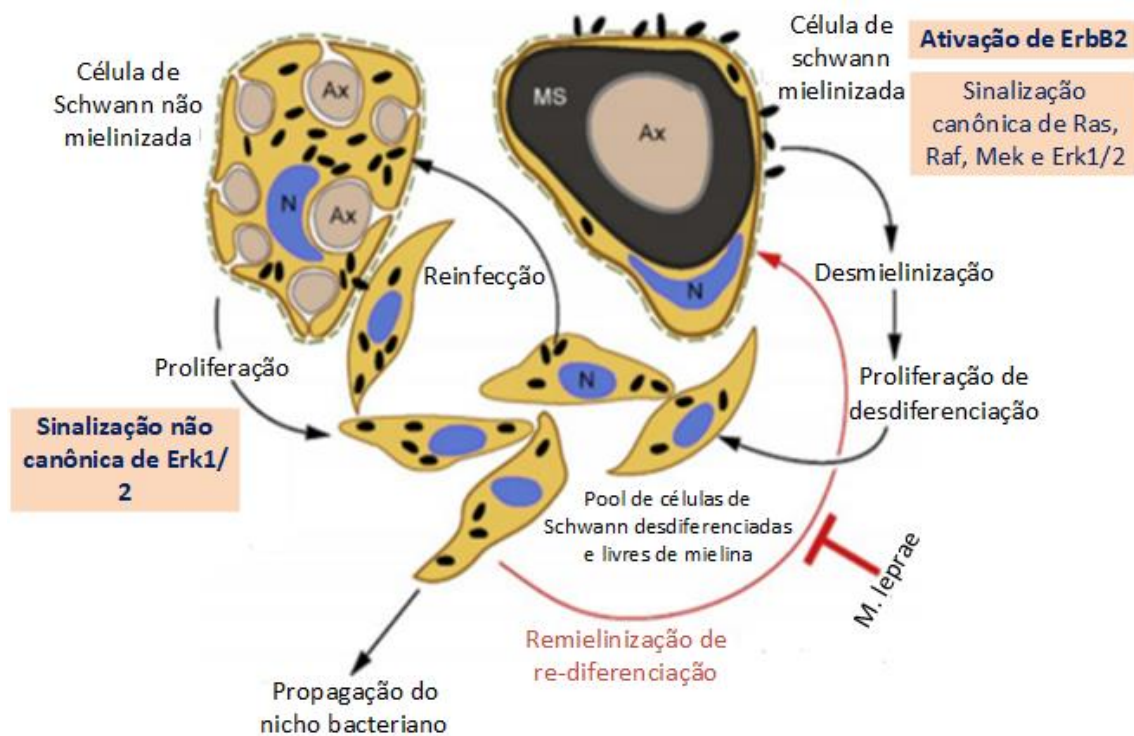


Figura 1.6: Modelo de vida intracelular do *M. leprae* e sinalizações promovidas nas CS.

Após a infecção, o *M. leprae* é capaz de se ligar às CS mielinizantes e não mielinizantes, duas importantes unidades funcionais do SNP. Porém invadem preferencialmente fenótipos não mielinizados onde se multiplicam, saem e re-infetam células de Schwann não mielinizadas induzindo-as a proliferação. Para continuar este ciclo de vida intracelular dentro de seu nicho preferido e estabelecer uma infecção produtiva, o *M. leprae* se adaptou para gerar um pool de células de Schwann livres de mielina induzindo a desmielinização. Múltiplas vias de sinalização, predominantemente a sinalização de Erk1 / 2 através de vias canônicas e não-canônicas, a jusante da ativação direta de ErbB2 estão envolvidas em diferentes estágios do processo infeccioso. Adaptado de Rambukkana, 2010 (100)

Dados posteriores do mesmo grupo de pesquisa demonstraram que a infecção de CS pelo *M. leprae* leva a uma reprogramação do perfil de expressão gênica destas células ocasionado uma desdiferenciação para um perfil semelhante a de células progenitoras/tronco (102). Além disso, em 2010, Rodrigues e colaboradores demonstraram que a infecção de CS pelo *M. leprae* promove a sobrevivência da célula *in vitro* através da indução da produção do fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) que é capaz de ativar vias de sobrevivência celular através de uma ampla sinalização envolvendo PI3K (phosfoinositol- 3- quinase) e AKT (109).

A utilização de CSs primárias para ensaios *in vitro* torna-se extremamente difícil e complexo uma vez que necessita da purificação de nervos periféricos de mamíferos. A linhagem celular humana de schwanoma ST88-14 tem sido amplamente utilizada como modelo para estudos de interação patógeno-célula hospedeira e se assemelha às CSs amielínicas (110). 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 (96). Além disso, nessas células, Alves e colaboradores detectaram bactérias viáveis em vesículas pouco acidificadas o que pode favorecer a sobrevivência do patógeno (111). São células de fácil cultivo podendo funcionar como bom modelo para ensaios experimentais.

A outra célula preferencialmente infectada pelo bacilo, o macrófago, está entre os leucócitos mais numerosos e diversos do corpo. Suas funções variam em um amplo espectro de ações como a detecção de patógenos, digestão de restos celulares, produção de citocinas e outros fatores regulatórios em todo o corpo (112). Para este tipo celular foi proposta a interação com outros receptores de superfície, como o receptor de manose (113,114) e o receptor de complemento C3 (115). De forma extremamente interessante, Madigan e colaboradores em 2017 utilizando um modelo de Zebrafish, demonstraram que a desmielinização e morte axonal inicial na infecção poderia ocorrer indiretamente pela infecção de macrófagos que patrulham os axônios e não pelo contato direto do *M. leprae* na CS (116). Além disso, o trabalho foi capaz de indicar o protagonismo de PGL-1 nestes efeitos, uma vez que o mesmo promoveu a produção de óxido nítrico nestes macrófagos ocasionando a formação de espécies reativas de oxigênio que afetavam diretamente as mitocôndrias axonais gerando a desmielinização e morte axonal (116).

Em estudos anteriores, o nosso grupo foi capaz de demonstrar que o *M. leprae* (117), assim como o *Mycobacterium tuberculosis* (118), é capaz de ativar nestas células a via de IFN- do tipo I, a partir do reconhecimento do seu DNA por sensores citoplasmáticos de ácidos nucleicos de dupla fita, como o cGAS (MB21D1) (119,120). Após a detecção do DNA citoplasmático, cGAS catalisa a produção do mensageiro secundário endógeno 2' 3'-GMP-AMP cíclico (cGAMP).

Essa molécula, por sua vez, é um potente indutor de IFN- β através da ativação da sinalização STING/TBK1/IRF3, um caminho de ativação da via de IFN tipo I conhecido como sinalização de DNA citosólico independente de receptores TLR (121,122). Em macrófagos e monócitos infectados com o bacilo, a ativação dessa via promove o aumento da expressão gênica de *OASL*. O gene *OASL* codifica a proteína 2' 5' oligoadenilato sintetase *like* que foi descrita por Hartmann e colaboradores, em 1998, e faz parte família das oligoadenilato sintetases (123). Toledo-Pinto e colaboradores em 2016, demonstraram o *OASL* na infecção pelo *M. leprae* é capaz de regular negativamente mecanismos inatos de defesa contra bactérias intracelulares, como a produção de peptídeos antimicrobianos, autofagia, e aumento da quimiona CCL2 (124). Apesar de atuar na sobrevivência do bacilo, as implicações na ativação de CCL2 na infecção são desconhecidas. Acredita-se que esta ativação possa modular o metabolismo lipídico do hospedeiro ou atuar na atração de macrófagos permissivos para o sítio da infecção e servir como um meio de dispersão da bactéria atuando como reservatórios da bactéria (124).

Assim, uma vez invadindo as células, o bacilo utiliza estratégias que promovem a sobrevivência, diminuição da resposta microbicida e rejuvenescimento das células hospedeiras a fim de manter as células infectadas em estágio ativo e de modo que os fatores essenciais do hospedeiro, críticos para a sobrevivência bacteriana, possam ser adquiridos.

1.1.8 *M. leprae* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira

Em 1863, o médico e patologista alemão, Rudolf Virchow descreveu a presença de macrófagos espumosos em lesões de pacientes lepromatosos. Essas células apresentavam grande quantidade de corpúsculos lipídicos e bacilos e o seu crescimento se dava como um “tumor”, podendo acarretar na desfiguração do hospedeiro (125,126). Mesmo após esta descoberta, os mecanismos moleculares responsáveis por esta modulação ficaram desconhecidos durante mais de um século (127). Por também serem detectados

em infecções causadas por outras micobactérias, como o *M. tuberculosis*, esses corpúsculos lipídicos são considerados atualmente como fundamentais para o entendimento da patogênese micobacteriana (124,128,129).

Trabalhos realizados por Mattos e colaboradores permitiram a detecção dos mecanismos moleculares de formação destes corpúsculos lipídicos e a sua relação com o sucesso da infecção (130). Em CS a presença do bacilo viável gera a ativação do receptor TLR6 (*Toll-like receptor 6*), acarretando na indução da via de PI3K ativando a síntese de lipídeos, envolvendo ativação do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e reorganização do citoesqueleto. Além disso, os corpúsculos são recrutados e acumulados em fagossomos contendo a bactéria (131,132)

Apesar das duas células preferencialmente infectadas pelo bacilo apresentarem esta indução durante a infecção, ela não ocorre igualmente nos dois tipos celulares. Diferentemente de macrófagos, Mattos e colaboradores demonstrou que a formação de corpúsculos lipídicos nas CS é dada apenas na presença da bactéria viva e não é determinada de forma parácrina, uma vez que meios condicionados não foram capazes de induzir corpúsculos em outras células (132). Além disso, essa formação é dependente apenas de TLR6 (*Toll-like receptor 6*) diferentemente dos macrófagos em que a ligação a TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e a TLR6 parece ser realizada de forma dependente, pois a deleção destes dois receptores em ensaios experimentais impediu a formação de corpúsculos neste tipo celular (130) .

A formação de corpúsculos lipídicos em infecções micobacterianas atualmente têm sido relacionado ao aumento da expressão do PPAR γ (133) que é um membro da superfamília de receptores nucleares ativados por lipídios. PPAR γ desempenha um papel reconhecido na regulação transcricional da proliferação celular, diferenciação e inflamação, além da regulação metabólica de lipídios (134,135). Este receptor é capaz de regular a expressão de numerosos genes envolvidos no metabolismo, como o gene para a acil-CoA sintetase, uma importante enzima que atua na biogênese lipídica (136). Em 2018, Acosta e colaboradores demonstraram que após a sua internalização através de PGL-1,

o bacilo é capaz de ativar PPAR γ que amplifica a produção de receptor de manose (MR / CD206) (96). O aumento de receptores na superfície das CS permite que o *M. leprae* extracelular se ligue a esses receptores que são capazes de aumentar a expressão de PPAR γ induzindo a formação de corpúsculos lipídicos (96). A formação destes agregados durante a infecção é provavelmente uma estratégia do bacilo para da sua infecção bem-sucedida e persistência nas células hospedeiras. Corpúsculos lipídicos são relacionados à produção de imunomoduladores como a prostaglandina E2, que no modelo de hanseníase funciona como um imunossupressor modulando um perfil de resposta imunológica Th2, mais “branda” à infecção (130,137). Bloqueando a sua formação, células como os macrófagos são capazes de matar as bactérias invasoras *in vitro* (127).

Um estudo de Marques e colaboradores do ano de 2015 demonstrou que o *M. leprae* não é capaz de utilizar o colesterol como fonte de carbono devido a drástica diminuição de genes funcionais no seu genoma. Apesar disto, o bacilo foi capaz de manter a enzima 3 β -Hidroxiesterol desidrogenase (3 β -HSD), que participa do catabolismo de colesterol, catalisando a oxidação do colesterol à colestenoa (138). Trabalhos adicionais realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento com o inibidor da enzima 3 β -HSD diminuiu a viabilidade intracelular do *M. leprae* em CSs infectadas. Dessa forma, a conversão de colesterol em colestenoa parece ser um passo fundamental para tornar a CS permissiva à sobrevivência do patógeno.

Apesar da não utilização de esteroides, como o colesterol, para substrato energético (138), outros compostos de natureza lipídica podem servir como fontes nutricionais para a bactéria. Ao longo dos anos, estudos demonstram que existe uma predileção das micobactérias em metabolizar e utilizar lipídios ao invés de glicídios como fonte de energia (139). O primeiro fundamento para esta afirmação apoia-se no método de respirometria para avaliar a viabilidade do bacilo que consiste na propriedade de degradar ácidos graxos através da β -oxidação a CO₂ e água (140,141). O sequenciamento do genoma do *M. leprae* também é uma grande evidência uma vez que demonstrou um grande repertório de genes envolvidos na degradação lipídica, como a β -oxidação, além de muitos

pseudogenes relacionados à glicólise (1,84). Além disso, pacientes lepromatosos apresentam um aumento na expressão de genes envolvidos com o metabolismo de lipoproteínas e ácidos graxos, demonstrando a capacidade do patógeno em modular o metabolismo lipídico do seu hospedeiro (142). A modulação lipídica gerada pelo bacilo na célula hospedeira também pode ser importante como fonte de carbono para a formação de lipídios da micobactéria como o PGL-I (143) e o PDIM que pode ser considerado como um importante fator de virulência para o bacilo (144).

Assim, tanto a formação de corpúsculos lipídicos quanto reações catabólicas envolvendo estas macromoléculas nas células hospedeiras, tornam-se fundamentais para o sucesso do bacilo na infecção.

1.2. Metabolismo de glicose

1.2.1 A entrada passiva de glicose na célula

A difusão facilitada de glicose nas células é mediada por transportadores proteicos específicos denominados de GLUT (“Glucose Transporter” - transportadores de glicose). Estes transportadores compreendem uma família de proteínas integrais da membrana que apresentam 12 domínios hidrofóbicos transmembranas com peso molecular variando entre 50-60 kDa, com regiões amino e carboxila terminal no citosol e um grande domínio extracelular que apresenta um sítio de glicosilação. Existem já descritos, quatorze membros da família GLUT separados em três classes principais com base na homologia de sequência e similaridade estrutural, refletindo suas preferências de substrato. A classe de GLUTs I (1-4 e 14) facilita a captação de diferentes hexoses com uma grande especificidade à glicose. A classe de GLUTs II (GLUTs 5, 7, 9 e 11) têm especificidade relativamente alta em relação à frutose, enquanto os Gluts de classe III GLUTs (6, 8, 10, 12 e 13) são membros mais estruturalmente atípicos da família GLUT (145). A figura abaixo mostra os modelos bidimensionais dos transportadores de glicose(146,147).

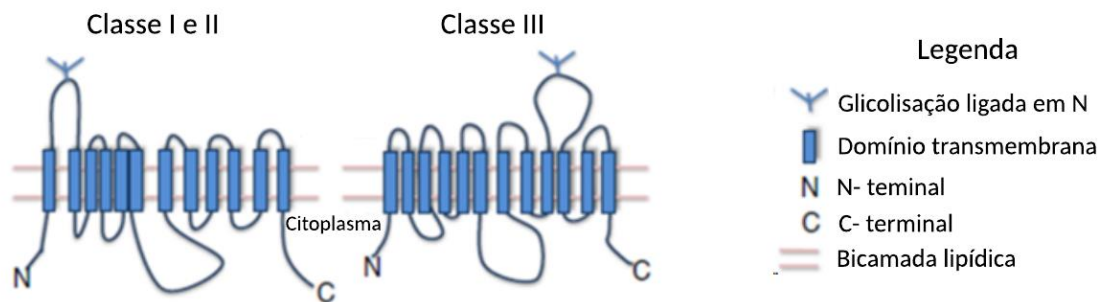


Figura 1.7: Modelos bidimensionais de GLUTs de classe I, II e III. Todas as isoformas possuem 12 segmentos transmembrana, hidrofóbicos, inseridos na porção lipídica da membrana plasmática, cujos aminoácidos formam alfa-hélices. Os segmentos transmembrânicos estão ligados por alças de conexão, e as terminações NH₂ e COOH localizam-se no meio intracelular. Nos GLUTs, as seqüências transmembranas são mais conservadas, enquanto as alças de conexão e as terminações são altamente muito variáveis, determinando as especificidades de cada isoforma. Adaptado de Barron, 2016, metabolism (148)

A expressão dos diferentes transportadores são tecidos-específicos e refletem os requisitos metabólicos para cada tipo de célula (148). O transportador de glicose do tipo 1 (GLUT1 ou SLC2A1) é uma isoforma altamente conservada que exibe de 74% a 98% de identidade sequencial entre peixes, galinhas, humanos, vacas, ratos e camundongos (149). Este transportador tem uma alta afinidade pela glicose e também pode transportar outros carboidratos como a manose e a glucosamina (150). O GLUT1 é responsável pela captação basal da glicose e é expresso em praticamente todos os tecidos que estão em condições normais (149). É amplamente expresso em células sanguíneas como eritrócitos e macrófagos, olho, placenta, glândula mamária em lactação e nos nervos periféricos (146,149,151).

A expressão e a distribuição subcelular de vários GLUTs são reguladas por diferentes moléculas e vias de sinalização. A via de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e Akt é uma via intracelular efetora estabelecida a partir da ativação de muitos receptores tirosino-quinases, como o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) e o receptor de insulina (148). Já é bem conhecido o papel desta via na indução da translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática em células oriundas de tecidos responsivos à insulina

(152,153) . Porém, recentemente, foi demonstrado que o fator semelhante a insulina do tipo 1 (IGF-1), ativando esta rota, é capaz de causar a translocação de GLUT1 de um compartimento intracelular para a membrana plasmática e aumentar a captação de glicose em células musculares (154). A PI3K é membro de uma família de proteínas quinases ativadas por fatores de crescimento, e é responsável pela regulação do crescimento e sobrevivência celular (155).

O fator 1-alfa indutível por hipóxia, também conhecido como HIF-1, é um fator transcricional conhecido por intensificar a expressão de genes glicolíticos incluindo a expressão de genes de transportadores passivos de glicose, como o GLUT-1 (156–158). Normalmente, a ação de HIF-1 é regulada em resposta à diminuição do aporte de oxigênio nos tecidos. O HIF-1 é um heterodímero que consiste em uma subunidade HIF-1 α e HIF- β . Apesar de HIF-1 α ser encontrado em condições normais de oxigênio na célula, geralmente ele é hidroxilado e conseqüentemente reconhecido pelo supressor de tumor von Hippel Lindau (VHL) e degradado posteriormente. A diminuição de oxigênio, ou hipóxia, leva a estabilização das duas subunidades. Recentemente foi descrito que a ativação de mTOR (“*mammalian target of rapamycin*”) em condições de normóxia em células tumorais é capaz de estabilizar as subunidades de HIF-1 por promover aumento dos níveis de tradução de HIF-1 α (159). A ativação do complexo mTOR pode ocorrer pela ativação da via PI3K-Akt, mencionada anteriormente (160).

1.2.2 Uma visão geral do metabolismo de glicose

A glicose é um substrato energético fundamental para os seres vivos e suas rotas bioquímicas dentro de células vivas é altamente complexa. Neste ponto do trabalho faremos uma breve síntese das vias clássicas do metabolismo de glicose que são importantes para o entendimento deste projeto científico.

Ao entrar na célula, a glicose pode ser fosforilada pela ação da enzima hexocinase (HK) e o produto desta reação é a glicose-6-fosfato (G6P) (161,162). A G6P pode apresentar variáveis destinos como vias anabólicas ou catabólicas. Em vias anabólicas pode ser incorporada a outras moléculas como o glicogênio ou outros glicoconjugados ou seguir vias catabólicas como a glicólise e a via das pentoses (PPP) (161).

O caminho glicolítico foi totalmente desvendado entre 1913 e 1938 por Gustav Embden, Otto Meyerhoff e Jakub Parnas e por isso também é conhecida como via de Embden-Meyerhoff-Parnas (163–165). A oxidação da glicose pela via glicolítica é um caminho metabólico importante e conservado em grande parte dos organismos (161). Esta via citosólica, separada em duas fases, gera como produto duas moléculas de piruvato através de dez reações sequenciais realizadas por diferentes enzimas. Na primeira fase, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) são utilizadas para converter uma molécula de glicose em duas de gliceraldeído-3-fosfato. Na segunda, o gliceraldeído-3-fosfato é degradado em piruvato, com a produção de quatro equivalentes de ATP e dois equivalentes de nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzidos (NADH). No final do processo são produzidos duas moléculas de piruvato e dois equivalentes de ATP e NADH (161).

O piruvato formado na glicólise pode ser convertido em lactato, sendo reduzido através da oxidação do NADH pela atuação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta redução pode ser necessária para a regeneração de NAD^+ (nicotinamida adenosina dinucleotídeo forma oxidada) e manutenção de da própria via, uma vez que é essencial para a conversão de gliceraldeído-3-fosfato para 1,3-bifosfoglicerato, promovida pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (161). O lactato é transportado passivamente através da membrana por transportadores específicos, os transportadores de monocarboxilato, ou proteínas MCTs. Estes, constituem uma família de proteínas transmembrana com 14 membros descritos na literatura e que são codificados pela família de genes denominada SLC16 (166,166). Células da glia, como os oligodendrócitos e células de Schwann, são capazes de expressar MCT1, MCT2 e MCT4 (167,168). Youngjin e colaboradores demonstraram que a expressão (MCT1) no sistema nervoso central é exclusiva aos oligodendrócitos, co-localizando com proteínas de mielina e o seu silenciamento gera morte neuronal (169).

O piruvato, proveniente da glicólise pode ser metabolizado em algumas reações químicas, dentre estas, encontra-se a ação do complexo piruvato desidrogenase (PDH), catalisando a formação de Acetil-coA diante de NAD^+ e

coenzima A livre (CoA) (161). É importante ressaltar que esta reação ocorre dentro da matriz mitocondrial por onde o piruvato pode ser carregado via transportador de piruvato mitocondrial (MPC) (170). O acetil-CoA gerado condensa com uma molécula de oxalacetato formando ácido cítrico o qual sofre sucessivas descarboxilações com o objetivo principal de produzir equivalente de GTP e reduzir coenzimas como NAD⁺ e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Estas descarboxilações sofridas pelo ácido cítrico ou citrato configuram o que denominam de ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Em cada ciclo completo de reações utilizando uma molécula de acetil-CoA são gerados quatro co-substratos reduzidos: três NADH e um FADH₂ (161). As coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) são utilizadas como fonte de poder redutor para iniciar o transporte de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTE) (171) que representa uma série de complexos de proteínas que residem na membrana interna mitocondrial (MIM) (161,172,173). Como resultado do transporte de elétrons, os prótons (H⁺) são translocados para o espaço intermembranar da mitocôndria criando um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna. Este gradiente é a base para a formação do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) (174) e é necessário para impulsionar a produção de ATP via ATP sintase (171).

O acetil-CoA que não é utilizado para a produção de ATP, torna-se um importante precursor de ácidos graxos e colesterol (161). Como é incapaz de atravessar a membrana mitocondrial, é necessária sua combinação com a molécula de oxaloacetato, formando o citrato, que por sua vez pode ser transportado para o citosol através do carreador de citrato (SLC25A1) (170,175). A enzima ATP citrato liase (ACL) é caracterizada como uma ligação direta entre o metabolismo da glicose e a formação de lipídios (176) Esta é capaz de converter o citrato citosólico em acetil CoA e oxaloacetato, utilizando a hidrólise de ATP. Na via de síntese dos ácidos graxos, acetil-CoA é carboxilado em malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). Em seguida, a ácido graxo sintase (FAS) realiza a condensação de acetil - CoA e a malonil- CoA para produzir palmitato. Acetil-CoA também pode ser um precursor para a via do mevalonato sendo conduzido à síntese de farnesil - pirofosfato (FPP) que está envolvido na biossíntese do colesterol (162). O destino do oxaloacetato gerado a partir da ação

da enzima ATP citrato liase pode ser a conversão em piruvato, por ações sequenciais de enzimas como a malato desidrogenase e a enzima málica citosólica. A enzima málica é uma oxidoredutase que permite a formação de poder redutor na forma de dinucleotídeo fosfato (NADPH) (161).

A **figura 1.8** mostra um esquema representativo adaptado do trabalho de Buchakijan e Kornbluth apresentando uma visão geral do metabolismo glicolítico sintetizando rotas bioquímicas clássicas mencionadas neste tópico.

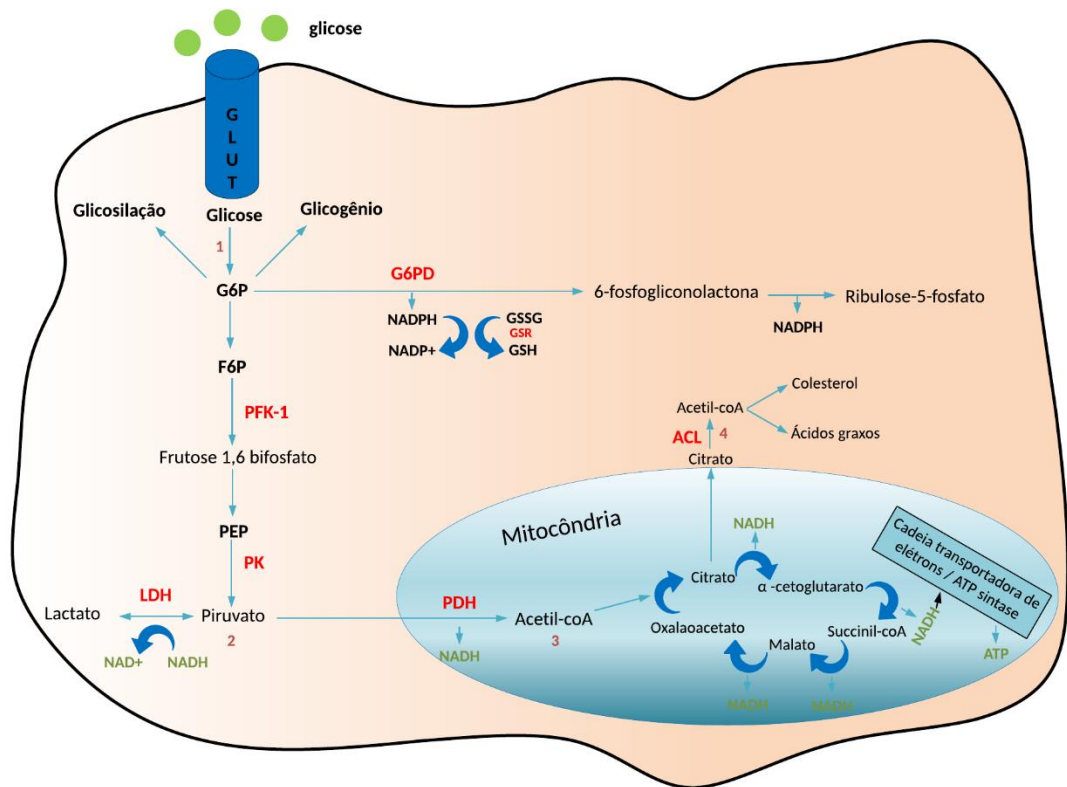


Figura 1.8: Visão geral do metabolismo de carboidratos. (1) A glicose entra na célula por receptores tipo GLUT e através de reações catabólicas pode ser oxidada na glicólise ou encaminhar-se para a via das pentoses-fosfato; (2) O piruvato, produto final da glicólise apresenta inúmeros destinos, um possível é a redução a lactato pela LDH. Outro é sofrer a ação da PDH na mitocôndria, gerando acetil-CoA; (3) O acetil-CoA formado entra no ciclo do ácido cítrico(Krebs) gerando NADH e FADH₂, que será utilizado para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa; (4) O acetil-CoA se combina com o oxaloacetato gerando citrato, que é transportado para o citosol onde sofre ação da ACL gerando novamente acetil-CoA. (5) O acetil-CoA que não é utilizado na produção de ATP é utilizado como precursor para a síntese de ácidos graxos; (6) ou se condensa para a biossíntese de colesterol através da via do mevalonato no citosol. GLUT transportador de glicose; G6P, glicose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; HK, hexocinase; PFK1, 6-fosfofruto-1-cinase; PK, piruvato cinase; LDH, lactato desidrogenase; PDH, piruvato desidrogenase; ACL, ATP citrato liase. Adaptado de Buchakijan e Kornbluth, 2010, nature review (162)

1.2.3 A via das pentose-fosfato

A via das pentoses fosfato (PPP) é um destino metabólico alternativo para a glicose-6-fosfato que leva a formação de produtos essenciais para a célula como a ribose-5-fosfato para fazer RNA, DNA e coenzimas como ATP, NADH, FADH₂ e coenzima A. Inúmeras células que apresentam grandes necessidades anabólicas e crescimento rápido como as da epiderme, medula óssea ou de tumores utilizam essa via como fonte para a produção destas moléculas (177). O delineamento quase completo e clássico da via apresenta mais de 60 anos e sua elaboração contou com nomes importantes da ciência, como Otto Warburg e Bernard Horecker (178). Porém novos metabólitos e enzimas têm sido adicionadas, como a sedoheptulokinase (SHPK) em humanos (179) e sedoheptulose 1,7 bisfosfatato em leveduras (180).

Horecker e sua equipe na década de 50 detectou que a via apresentava duas fases e as designou como oxidativa e não oxidativa (178). A fase oxidativa é marcada pela produção de poder redutor e intermediários metabólicos para diferentes vias biossintéticas (181). A primeira reação da fase oxidativa é a oxidação da glicose-6-fosfato pela glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) para formar 6-fosfoglicona- δ -lactona, um éster intramolecular (177,181). Nesta reação, o NADP é acceptor final de elétrons, convertendo-se na sua forma reduzida NADPH. A lactona é hidrolisada ao ácido livre 6-fosfogliconato por uma lactonase específica, que sofre oxidação e descarboxilação pela 6-fosfogliconato-desidrogenase para formar a ribulose-5-fosfato (177,181,182). Nesta reação ocorre a formação de uma segunda molécula de NADPH (181). Em muitas células, a fase oxidativa é fundamental, uma vez que o NADPH participa de vias anabólicas essenciais como a síntese de ácidos graxos e esteróis, além de manter o potencial redox da célula necessário para protegê-la contra o estresse oxidativo (178,183,184).

As duas fases da via são capazes de produzir ribulose-5-fosfato, porém apenas na fase oxidativa ocorre a produção de NADPH (177,185,186). Em tecidos onde a produção deste equivalente (NADPH) é fundamental, a fase não-oxidativa é normalmente caracterizada pela reciclagem das pentoses-fosfato

produzidas na primeira fase em glicose-6-fosfato, através principalmente da atividade de enzimas específicas denominadas transcetolases e transaldolases (TALDO) (177). De forma geral, essa etapa vai atuar na produção de frutose-6-fosfato, Sedoeptulose-7 fosfato, gliceraldeído-3-fosfato e eritrose 4-fosfato, que é um precursor de aminoácidos como a histidina (177,178).

No citosol da célula, a PPP e glicólise são dinâmicas e altamente interconectadas apresentando diversos intermediários e enzimas compartilhadas (163). A dinâmica é coordenada por disponibilidade de substrato, atividades enzimáticas e a demanda da célula (185). Como um exemplo, em uma das etapas da via não-oxidativa, ocorre a formação de gliceraldeído-3-fosfato pela ação da transcetolase que é prontamente convertido à diidroxiacetona-fosfato pela enzima glicolítica triose-fosfato-isomerase e pode seguir as oxidações da via para a formação de piruvato (178). O destino dos metabólitos é determinado pelas necessidades relativas das células. A figura abaixo mostra o esquema geral da via determinando as diferentes fases e os produtos formados.

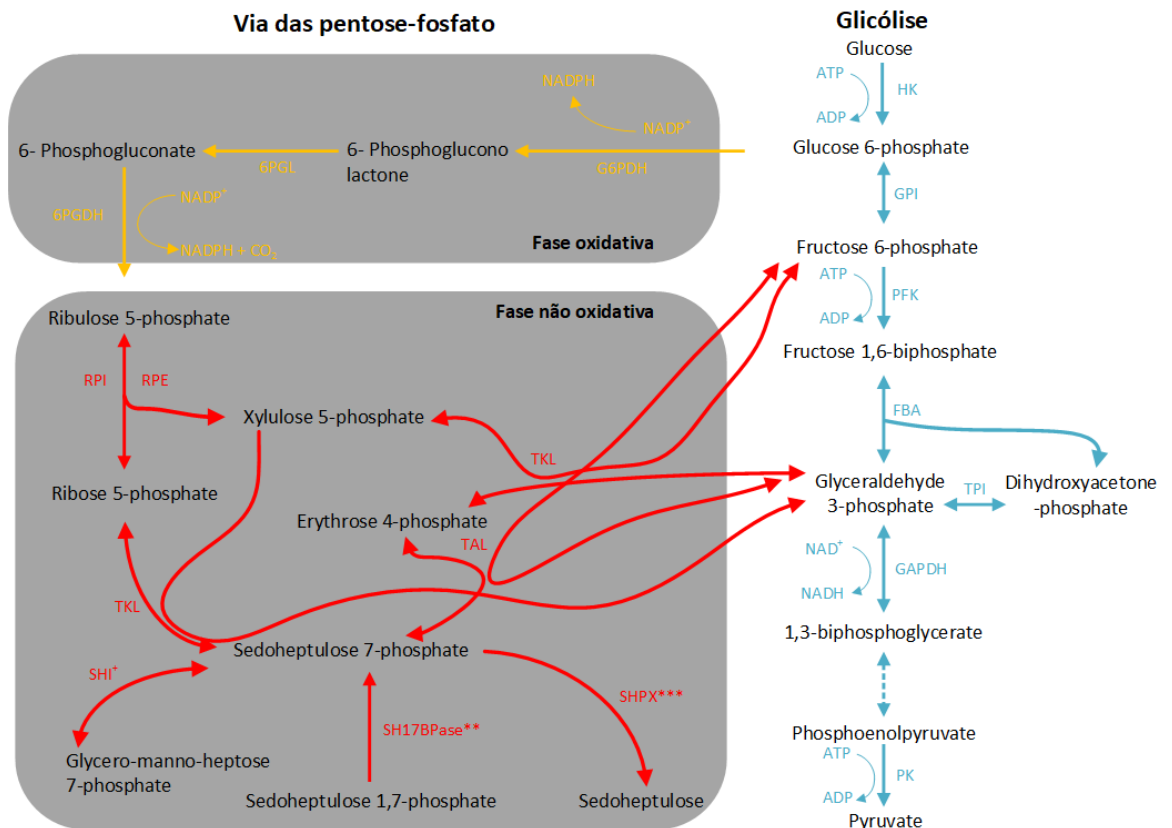


Figura 1.9. Representação esquemática da via das pentoses (PPP, esquerda) e sua conexão com a glicólise(direita). As reações enzimáticas que constituem as duas vias são representadas por setas duplas ou únicas, de acordo com a reversibilidade das reações. Os ramos oxidativo e não oxidativo da PPP são destacados pela coloração de fundo. Enzimas de conversão de Sedoheptulose encontradas em * bactérias; ** fungos (*S. cerevisiae*) e plantas, *** mamíferos. G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, 6PGL - 6-fosfogluconato desidrogenase, RPI - Ribose 5-fosfato isomerase, RPE- Ribulose 5-fosfato de epimerase, TKL- Transcetolase, TAL-Transaldolase, SHPK- Sedoheptulokinase, SH17BPase- Sedoheptulose 1,7-bisfosfatase, SHI- Sedoheptulose 7-phosphate isomerase, GPI- Glucosephosphate isomerase, TPI- Triosephosphate isomerase, GAPDH- Glyceraldehide 3-phosphate dehydrogenase. Adaptado de Stincone, 2015 (185).

O poder redutor na forma de NADPH também é fundamental para o equilíbrio redox da célula, sendo chave para a regeneração do sistema glutatona no controle de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical superóxido (O₂). Esse sistema atua na remoção de H₂O₂ através da sua redução em H₂O, utilizando elétrons provenientes da forma reduzida da glutatona (GSH). A glutatona oxidada originada a partir dessa reação é regenerada pela glutatona redutase, que por sua vez depende de

NADPH, em sua maioria produzido na reação catalisada pela primeira enzima da via, a G6PD. O estresse oxidativo é uma das principais causas de danos às macromoléculas e pode levar a morte celular (185). Os danos na molécula de DNA podem levar a mutações e instabilidade genômica (185).

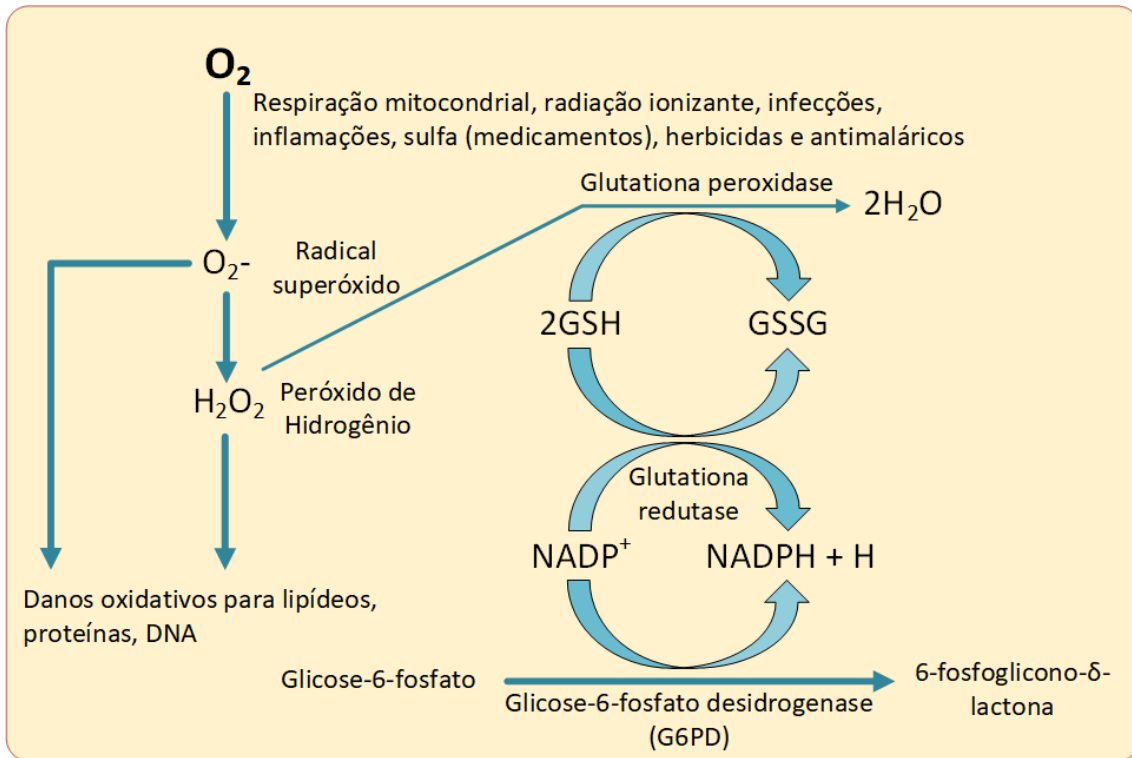


Figura 1.10. Papel do NADPH e da glutatona na proteção das células contra derivados de oxigênio reativos. A glutatona reduzida (GSH) protege a célula por destruir o peróxido de hidrogênio. A regeneração de GSH a partir de sua forma oxidada (GSSG) requer a produção de NADPH na reação da glicose-6-fosfato-desidrogenase. Adaptado de Nelson & Cox, 2015 (177)

A regulação transcricional das enzimas da via é fortemente influenciada pelo estresse oxidativo ou pela necessidade da célula por intermediários para a síntese lipídica e de nucleotídeos (187–189). Logo, diferentes fatores podem regular a PPP dependendo da demanda específica da célula ou do tecido. Por exemplo, a regulação da via para a síntese lipídica é alcançada pelos fatores de transcrição de classe de ligantes de elemento regulador de esteróis (SREBPs), enquanto a regulação durante o estresse oxidativo é mediada pelo fator de transcrição Nrf 2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (185). Interessantemente, uma abordagem genômica demonstrou que o complexo de

mTOR induz uma série de genes pertencentes ao metabolismo de glicose, incluindo as duas fases da via das pentose-fosfato (190).

Finalmente, a PPP têm apresentado um papel importante no estudo de células-tronco e na patologia do câncer (191–194). Análises em expressão gênica de células-tronco pluripotentes humanas demonstram um aumento da expressão de genes da via e a depleção de G6PD tornou o crescimento destas células lento, com indução de apoptose quando submetida a estresse oxidativo (195,196). Além disso, o uso de um inibidor específico da via, 6-aminonicotinamida (6-AN)(197) permitiu a mudança do estado de auto-renovação para a diferenciação celular (198). A avaliação da atividade enzimática e metabólica, no entanto, aponta para o fluxo aumentado de PPP no câncer. Estas análises demonstraram um aumento da PPP na linhagem de células de câncer de mama humano MCF7 quando comparadas com células epiteliais mamárias não transformadas (193). Resultados semelhantes foram obtidos no carcinoma de células renais, onde a atividade alterada da PPP foi identificada como uma característica metabólica fundamental do estado do câncer (194). O aumento da PPP em células-tronco pluripotentes e no câncer podem fornecer mais precursores para a produção de nucleotídeos e aprimorar o equilíbrio redox da célula dando suporte para a proliferação (185).

Para além do envolvimento com o câncer e células-tronco pluripotentes, a via apresenta na literatura um importante papel no entendimento da interação patógeno e hospedeiro. Recentemente, a sedoheptulokinase (SHPK) foi identificada como um modulador da ativação de macrófagos durante a infecção por lipopolissacarídeos (LPS). A redução de SHPK induz ao macrófago um perfil M1, pró-inflamatório, por atuar na produção de TNF (199). Em contrapartida, metabólitos da via como ribulose-5-fosfato e 7-fosfato de sedoheptulose têm sido utilizada por microorganismos para a biossíntese de estrutura de suas paredes celulares (200–202). O segundo metabólito atua como o primeiro passo na biossíntese do LPS em bactérias Gram-negativas (201). Em micobactérias, como o *Mycobacterium smegmatis*, foi detectado que a ribulose-5-fosfato produzida pela via das pentoses serve de precursor para a produção de arabinogalactana,

um polissacarídeo que atua mantendo a integridade da parede micobacteriana (203,204).

Através da análise do genoma e metabolitos é possível identificar a via das pentoses de *M.leprae* (84). Em contrapartida, um trabalho de 2016 mostrou que a maioria dos metabólitos relacionados ao metabolismo do carbono reduz drasticamente no *M. leprae* em comparação ao *M. bovis*, incluindo a ribose-5-fosfato (205). Esse resultado confirma a dificuldade do bacilo em manter a sua vida isolado do hospedeiro e demonstra que a utilização de metabólitos da via das pentoses da célula infectada pode ser obrigatória para a sua sobrevivência e proliferação.

1.2.5. A enzima G6PD e sua deficiência (G6PDd)

A G6PD é uma enzima constitutiva, sendo expressa em todas as células do corpo e foi caracterizada bioquimicamente por Otto Warburg e Walter Christian em 1932 a partir de leveduras e glóbulos vermelhos. Em humanos, o gene que a codifica está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq28) e é constituído por 13 éxons que codificam um monômero de 515 resíduos de aminoácidos que apresenta peso molecular superior a 59 kDa (206). Já é bem descrito na literatura que a forma ativa da enzima é um dímero ou um tetrâmero de uma única subunidade polipeptídica variando de acordo com o pH celular (207). Cada subunidade tem uma molécula de NADP fortemente ligada, além de locais de ligação para os seu substratos glicose-6-fosfato e NADP (208). A distribuição dos éxons mais os íntrons (aproximadamente 12) distribuem-se por 20 Kb de DNA genômico (209,210).

A deficiência em G6PD é a enzimopatia humana mais comum e afeta 400 milhões de pessoas em todo o mundo (208,211). Acredita-se que o locus para G6PD seja o mais polimórfico entre os humanos, com quase 400 variantes alélicas relatadas (212). A maioria das mutações conhecidas, aproximadamente cento e cinquenta e nove, são ditas *missense* e afetam um único nucleotídeo gerando substituição de um aminoácido (184). Essas mutações podem acarretar deficit enzimático mais ou menos grave, mas nunca inativação completa da atividade, afinal a depleção de G6PD é letal para a fase embrionária (213). Não

surpreendentemente, diferentes mutações podem ocasionar alterações tanto quantitativas como qualitativas na enzima. Assim, a classificação das variantes de G6PD é baseada no grau de deficiência e as manifestações clínicas em cinco classes. Um grupo de mutações, a maioria delas no exon 10, codifica aminoácidos que estão no domínio de dimerização e afetam marcadamente a estabilidade do dímero, produzindo variantes de classe I bem severas, com anemia hemolítica não esferocítica crônica (CNSHA) sem nenhum fator externo (184). A tabela abaixo mostra exemplos de variantes genéticas em G6PD e suas respectivas classificações.

Tabela 1.2. Classificação das variantes de G6PD

Classe	Atividade residual de G6PD (% da normal)	Manifestação clínica	Exemplos de variantes genéticas
I	<10	anemia hemolítica não esferocítica crônica	Guadalajara, Nara, Sunderland
II	<10	Nenhuma	Mediterranean, Canton, Union
III	10 -60	Nenhuma	A ⁻ , Mahidol, Seattle
IV	100	Nenhuma	A, B
V	>100	Nenhuma	-

Apesar de serem assintomáticas (**Tabela 1.2**), as variantes de classe II e III são importantes clinicamente, uma vez que podem desenvolver a anemia hemolítica induzida por fatores exógenos, como fármacos (184,214–217). A primaquina, um antimalárico e a dapsona, um antibiótico amplamente utilizado para eliminação da hanseníase, já estão descritos na literatura como indutores de hemólise (215–217).

Originados na África subsaariana (218), os polimorfismos do gene G6PD na posição 376 (exon 5) e 202 (éxon 4) formam o haplótipo A⁻ de deficiência para G6PD (219,220). O primeiro polimorfismo é reconhecido como variante negróide ou A e promove uma alteração do nucleotídeo adenina (A) para uma

guanina (G) na posição 376. Essa variação resulta na mudança do aminoácido asparagina (Asn) para o aminoácido ácido aspárgico (Asp) na posição 126 da proteína. Já o outro polimorfismo (posição 202) corresponde à troca da base (A) por (G) na posição 202, com alteração do aminoácido valina para o aminoácido metionina na posição 68 da proteína (219,221). O primeiro polimorfismo encontra-se inserido na classe IV e os dois unidos formando o haplótipo A⁻ encontram-se na classe III, apresentando uma atividade residual de aproximadamente 10-60% em relação a enzima selvagem denominada de B (**Tabela 1.2**). Devido a frequência das mutações que causam deficiência em G6PD serem raras nas Américas (184), a alta frequência destas variações (376G/202G) encontradas na América latina (218) tornam essas mutações um bom alvo para ensaios de associação com a doença e seus impactos na infecção causada pelo *M. leprae*.

1.2.6 Interação metabólica entre patógenos e hospedeiros

As células de mamíferos têm sensores na superfície e no citosol como os receptores Toll-like (TLRs) e do tipo NOD (NLRs) que respondem a uma gama de produtos microbianos como LPS e peptidoglicano (222). Já foi descrito que a estimulação desses sensores pode levar as células a diferentes perfis metabólicos de acordo com a sua função imunológica. As células com ativação pró-inflamatória (Macrófagos M1, CD4⁺ linfócitos Th17) apresentam uma resposta semelhante ao efeito Warburg, determinante em alguns tipos de células cancerosas (223–225). Este efeito foi caracterizado por Otto Warburg em 1930 e é determinado pela indução da captação de glicose, aumento da taxa glicolítica e fermentação na célula mesmo em condições de normóxia, ao mesmo tempo que evidencia a respiração celular como danificada ou prejudicada (226,227).

Assim, nos últimos anos, a correlação entre imunidade e alterações metabólicas ganhou grande importância no entendimento de doenças infecciosas (228–230). Estes estudos fazem parte de um novo ramo da imunologia conhecido por imunometabolismo e baseia-se na reprogramação metabólica de células do sistema imune (231). É importante ressaltar que por ser um tema implementado recentemente muitas reprogramações e fatores que as regulam ainda não estão totalmente elucidados na ciência. Como exemplos de modulações descritas, o paradigma clássico da polarização de macrófagos M1

e M2 tem sido amplamente explicado sob os aspectos do metabolismo (229,232). O perfil M1, pró-inflamatório, induzido *in vitro* por TNF, IFN γ (interferon gama) ou LPS, metabolicamente, é caracterizado por um perfil semelhante ao efeito descrito por Warburg (223). Essa mudança metabólica parece ocorrer, segundo dados combinados de transcriptômica e metabolômica, no contexto de um ciclo de Krebs interrompido (223). Duas quebras foram descritas pela literatura (233): a primeira baseia-se na regulação negativa da isocitrato desidrogenase (IDH), uma importante enzima do ciclo de krebs envolvida na descarboxilação do ácido isocítrico. Este efeito intensifica o acúmulo de citrato. Proveniente da metabolização de citrato, o ácido itacônico pode se acumular nestas células com perfil M1 (232). Este ácido é um potente inibidor da isocitrato liase (IDH), uma enzima do ciclo do glioxilato, que é essencial para o crescimento de muitas bactérias (234). Além disso, o acúmulo de citrato pode permitir o aumento da produção de eicosanóides, como as prostaglandinas, com perfil pró-inflamatório reconhecido (223,233). A outra quebra no ciclo, ocorre após a formação do succinato (233). No ciclo de Krebs, o succinato é convertido fumarato, que é então convertido malato (235). Um acúmulo em succinato foi observado em macrófagos com perfil M1. No entanto, um grande aumento no malato foi observado também, indicando que a conversão de succinato a fumarato foi ineficiente e que a produção de malato ocorre através do circuito arginino-succinato, uma via ligada ao ciclo de krebs e da uréia e que está enriquecida em macrófagos com perfil M1(223). Essa via, a partir da formação de arginina, também está envolvida na produção de NO (236). Além disso, a inibição de uma enzima chave do circuito, a aspartato aminotransferase, suprimiu a produção de NO e também de IL-6 (Interleucina-6), importantes agente microbicidas.

O aumento do succinato evidenciado nestas células, atua também na estabilização de HIF1 α em condições de normóxia, através da inibição da prolil-hidroxilase. Com a estabilização deste fator transcricional, ocorrerá o aumento da expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo de glicose (237). Além disso, HIF1 α está relacionado a indução da citocina pró-inflamatória IL-1 β (Interleucina- 1-beta) (237,238). Altos níveis de succinato e sua oxidação, de fato, parece um marco na ativação de macrófagos por LPS para um perfil pró-

inflamatório, uma vez que a inibição farmacológica da succinato desidrogenase em macrófagos derivados da medula óssea é capaz de diminuir a produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β (238,239). Além disso, esta inibição diminuiu os níveis de ROS produzidos pela mitocôndria, que participam da eliminação de patógenos intracelulares, e de IL-1 β demonstrando que o succinato têm importância significativa no perfil microbicida do macrófago (239). De forma a adicionar, estes macrófagos com perfil M1 apresentam aumento da atividade da PPP, o que é discutido pela literatura como uma forma de suportar certas reações anabólicas, como a produção de lipídios pró-inflamatórios, ou controlar a morte celular diante da produção de ROS (232).

Em contraste, os macrófagos M2, que são induzidos por estimulação com IL-4 (Interleucina 4) e IL-13 (Interleucina 13), têm um ciclo de Krebs intacto e atividade aumentada de fosforilação oxidativa mitocondrial. Além disso, em macrófagos do perfil M2, ocorreu aumento nos níveis de açúcares nucleotídicos, como a difosfato de uridina N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc) (232). Este aumento demonstra a importância dos eventos de glicolisação para o perfil anti-inflamatório uma vez que trabalhos já mostram que macrófagos M2 apresentam receptores de manose altamente glicosilados (240). De maneira geral, os autores discutem a produção rápida de ATP via glicólise em células pró-inflamatórias como um mecanismo de se gerar uma resposta rápida para infecções agudas, como inúmeras infecções bacterianas. Enquanto que nos macrófagos M2, a indução da fosforilação oxidativa pode caracterizar um perfil de resposta em longo prazo, como uma resposta imunológicas contra helmintos, imunoregulador e de reparo tecidual (233). As principais diferenças metabólicas e funcionais entre os estados de polarização dos macrófagos M1 e M2 *in vitro* são resumidas na **Figura 1.11**

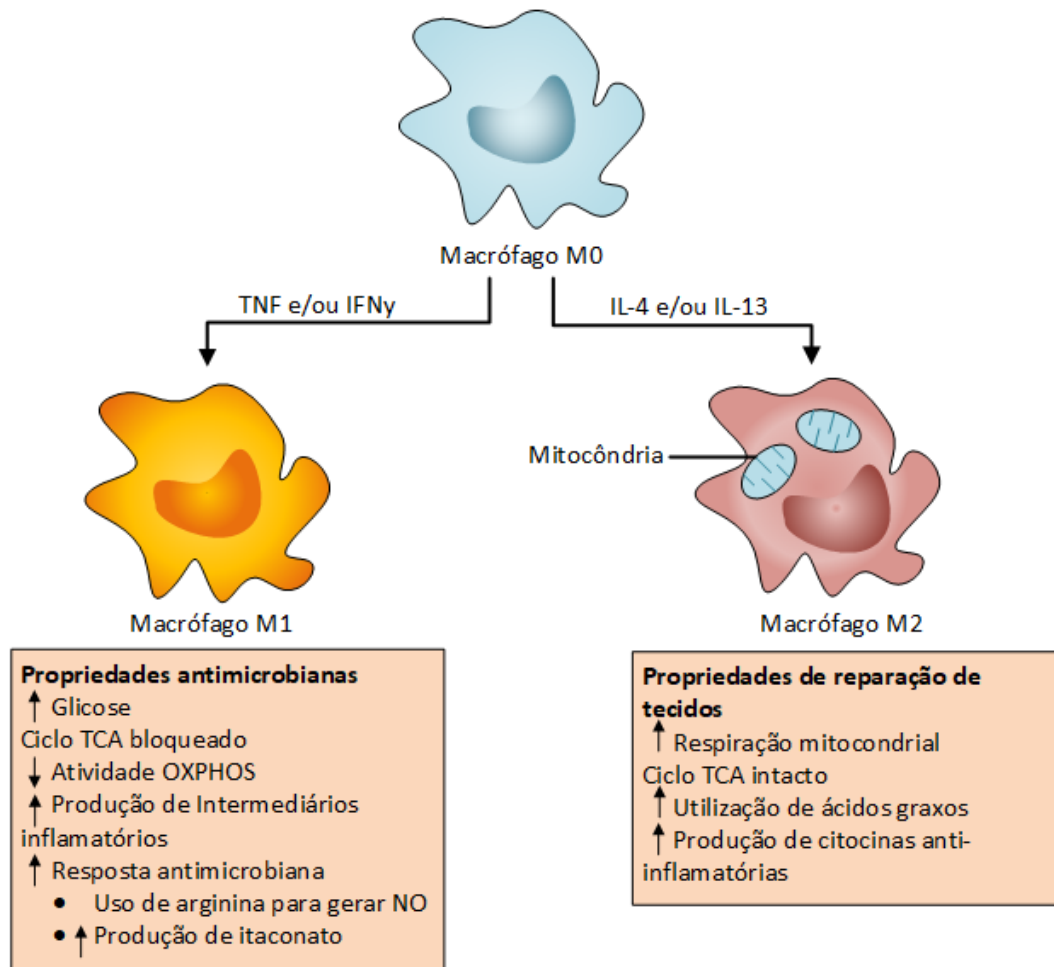


Figura 1.11. Características fenotípicas dos estados de polarização de macrófagos M1 e M2. Em resumo, os macrófagos M0 são ativados, *in vitro* para um estado macrofágico tipo M1 pela exposição a IFN γ , TNF ou LPS, enquanto macrófagos tipo M2 são induzidos por tratamento com IL-4 ou IL-13. . Macrófagos do tipo M1 são mais ativados glicoliticamente e ativam positivamente as atividades que estão associadas às respostas microbicidas. Em contraste, os macrófagos semelhantes a M2 aumentam a respiração mitocondrial, melhoraram o metabolismo dos ácidos graxos e aumentam as atividades que estão associadas à remodelação tecidual. NO- nitric oxide, OXPHOS- fosforilação oxidativa; TCA- ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de krebs). Adaptado de Russell, 2019 nature reviews (232).

A utilização de células da resposta imune como modelo para explicar alterações metabólicas induzidas por patógenos, não descarta a possibilidade de modulações em vias de carbono central afetarem outros tipos celulares na presença dos microorganismos. Inúmeros patógenos são capazes de alterar vias metabólicas centrais em diferentes células hospedeiras (241–243). Além disso, no local da infecção, o hospedeiro e o patógeno vão compartilhar substratos nutricionais e gerar resíduos metabólicos comuns para o uso e sobrevivência de ambos (**Figura 1.12**). Assim, este local pode ser considerado como um sistema fechado no qual as capacidades metabólicas dos dois organismos estão trabalhando em paralelo e alterações mesmo que modestas no sistema metabólico interligado podem acarretar em efeitos substanciais no resultado final de uma infecção (243).

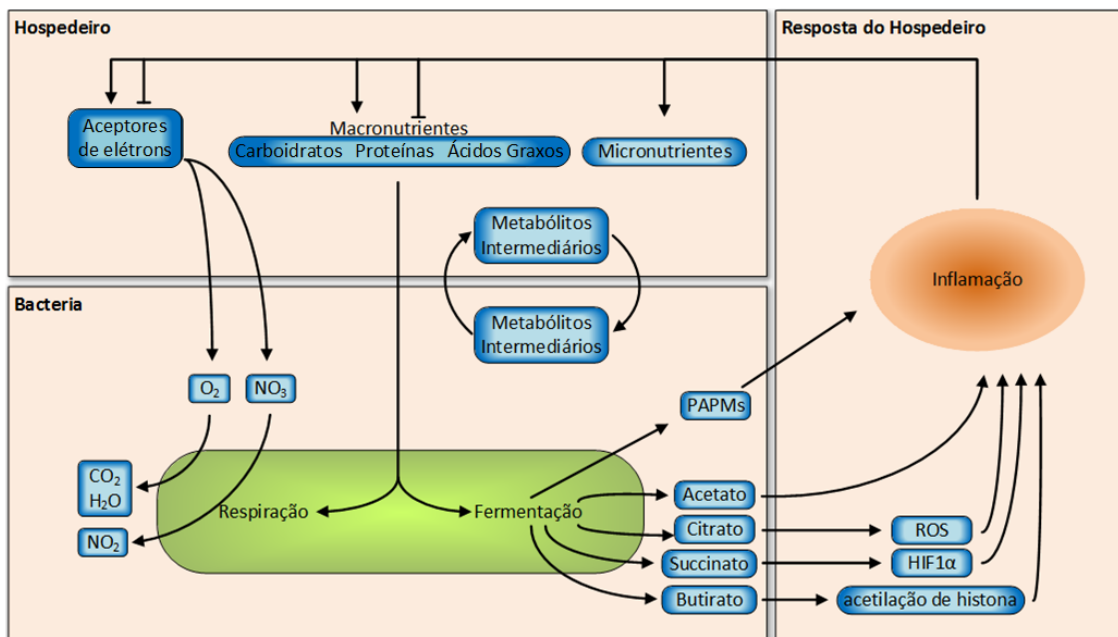


Figura 1.12. Os patógenos e hospedeiros apresentam interações metabólicas que influenciam diretamente na sobrevivência de ambos. Durante uma infecção bacteriana, as interações metabólicas entre o hospedeiro e o patógeno são dinâmicas e mudam com o estado imune do hospedeiro. Este, inicialmente fornece ao patógeno vários micronutrientes, macronutrientes e receptores de elétrons para a respiração. As bactérias usam esses nutrientes para impulsionar seu próprio crescimento e replicação. Além disso, diferentes estados metabólicos bacterianos produzem subprodutos distintos no local da infecção que influenciam diretamente na resposta imune do hospedeiro. Como exemplo, o succinato pode estabilizar o fator de transcrição HIF-1 α que atua modulando a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose e promovendo a inflamação. Adaptado de Olive, 2016, nature review (243)

Os patógenos intracelulares são totalmente dependentes desta conexão metabólica para o sucesso da infecção. Nessa circunstância, os patógenos competem diretamente por nutrientes na célula hospedeira, como fontes de carbono e os subprodutos do metabolismo do patógeno são liberados diretamente no hospedeiro no qual podem ativar respostas e alterar o estado metabólico do hospedeiro (243). A asparagina é um aminoácido que atua como fonte de nitrogênio contribuindo tanto para o crescimento de bactérias quanto na ativação da resposta imune celular. De fato, a competição por esse substrato pode apresentar um papel importante no desfecho da infecção (244,245). Outro aminoácido, a arginina, é um importante substrato da iNOS (Óxido nítrico sintetase) para a produção de derivados de nitrogênio como o óxido nítrico (NO), em fagócitos (246). Esses derivados podem atuar como potentes microbicidas dentro destes fagócitos (247,248). A enzima arginase 1 (ARG1) compete por arginina e alimenta uma via alternativa que gera poliaminas contribuindo para a cicatrização de feridas. A *Chlamydia trachomatis*, bactéria intracelular causadora da clamidíase, promove ativamente a síntese de poliamina privando a iNOS de substrato determinado seu escape dos mecanismos microbicidas do hospedeiro (249).

Como mencionado anteriormente, no metabolismo celular dos seres vivos, os carboidratos se apresentam como principal combustível e fonte de carbono representando grande reserva de energia potencial (177). Além disso, carboidratos como a glicose são altamente versáteis como precursores de aminoácidos, coenzimas, ácidos graxos, colesterol, dentre outros (161). Para além das modulações do metabolismo de glicose pela via das pentoses, patógenos intracelulares podem induzir as suas células hospedeiras a aumentarem a demanda de glicose e utilizarem esse monossacarídeo como fonte de ATP e precursor de moléculas cruciais. A literatura já demonstra que alguns vírus podem induzir o aumento de captação e a utilização de glicídios propiciando a formação de precursores biossintéticos para a sua replicação (250–252). Como exemplo, a replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) causa um aumento no fluxo glicolítico em linfócitos T CD4+. A glicólise parece ser particularmente necessária para a produção de novos vírus e, adicionalmente, aumenta a sensibilidade da célula infectada à morte celular

induzida por vírus (252,253). Além do vírus HIV, outros vírus, como o causador da hepatite B (HBV), é capaz de regular positivamente a expressão de enzimas da glicólise e da enzima G6PD em hepatócitos (241). Os autores discutem a importância de G6PD na PPP e a produção de nucleotídeos que serviriam para a proliferação viral (254).

Em infecções bacterianas também já está claro que alterações no metabolismo de glicose da célula hospedeira pode ser crucial para o crescimento e replicação do parasita ou para o desfecho da infecção (243). Os macrófagos com função glicolítica amplamente ativa apresentam uma maior capacidade microbicida, já mencionada anteriormente. Porém alguns patógenos bacterianos são capazes de se beneficiar com este efeito. A replicação intracelular de *Lysteria monocytogenes* é aumentada pelo acréscimo da captação de glicose em macrófagos primários infectados (255). Além disso, a sua toxina formadora de poros- listeriolisina O (LLO)- usada para a bactéria escapar do fagossoma e acessar o citosol, é capaz de induzir a fragmentação mitocondrial e diminuir a respiração celular (256). Os autores sugerem que esta fragmentação seja fundamental para o início da infecção causada pela bactéria uma vez que a infecção é prejudicada em células com mitocôndrias previamente fissionadas (256). A infecção causada por *Brucella abortus* em células humanas da linhagem THP-1 também leva a uma redução da atividade da cadeia respiratória mitocondrial e aumento da produção de ATP via glicólise (257). Por ser o principal substrato energético da bactéria, o lactato acumulado via fermentação, permite um crescimento robusto do microorganismo dentro da célula hospedeira (257).

Outro patógeno intracelular. o *M. tuberculosis* tem sido alvo de inúmeros estudos a cerca de imunometabolismo. Um trabalho *in vitro* demonstrou que macrófagos da linhagem THP-1 ao serem expostos a uma cepa avirulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) ou a bactéria irradiada configuram um perfil metabólico também semelhante ao efeito Warburg (258). Em concordância, esta mesma alteração foi detectada através de perfil transcriptômico e imagem confocal em pulmões de camundongos infectados por uma cepa virulenta de *mtb* (H37Rv). Em 2016, Lachmandas e colaboradores também encontraram a

mesma alteração metabólica em ensaios *in vitro* a partir de polimorfonucleares de sangue periférico (PBMC) quando estimulado com lisado de mtb. Além disso, detectaram que a ativação deste perfil é dependente de TLR2 e é mediado em parte através da via AKT (serine/threonine-specific protein kinase) - mTOR (mammalian target of rapamycin) (259). A inibição da ativação de m-TOR mediado por rapamicina diminuiu a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que levou os autores a sugerirem que este gatilho seria uma importante resposta do hospedeiro frente à infecção. Em contraste, durante o ano de 2018, Cumming e colaboradores demonstraram que a infecção causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* gerava um perfil quiescente nos macrófagos *in vitro*, com diminuição do fluxo glicolítico e do ciclo do ácido cítrico e do consumo basal de oxigênio (260). Os autores do último trabalho sugerem que a mudança no estado metabólico pode ser um caminho decisivo para a infecção persistente causada pelo patógeno.

Experimentos *in vivo*, utilizando infecção intranasal de camundondos demonstraram que *M. tuberculosis* apresenta grande crescimento em macrófagos alveolares (261), com um perfil M2 com características metabólicas de um aumento na fosforilação oxidativa e biossíntese lipídica (261–263). Em contrapartida, macrófagos intersticiais apresentaram regulação positiva da glicólise com consequente perfil M1. De forma extremamente interessante, o tratamento de camundongos infectados com inibidor da metabolização de glicose- 2-deoxyglicose (2-DG)- diminuiu seletivamente o tamanho da população de macrófagos intersticiais, resultando em um aumento na carga bacteriana (262). Esses achados foram verificados por experimentos *in vitro* mostrando que o tratamento de macrófagos derivados de medula óssea infectados com *M. tuberculosis* e submetidos ao 2-DG promoveu o crescimento bacteriano, enquanto que o tratamento com entomoxir, um inibidor da biossíntese lipídica, restringiu o crescimento micobacteriano (262).

Desta forma, fica claro a importância do estudo da associação metabólica entre patógeno-hospedeiro onde a determinação da metabolização de glicose e análise de vias metabólicas clássicas das células hospedeiras frente a infecção

torna-se crucial para o melhor entendimento da doença e descobertas de novas rotas como adjuvantes para o tratamento de pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

A interação entre o bacilo da hanseníase e sua célula hospedeira vem sendo alvo de muitos estudos de modulação imunológica, desmielinização e de metabolismo lipídico, porém as possíveis modulações no metabolismo energético destas células impostas pelo patógeno permaneceram negligenciadas durante anos. A regulação negativa, obtida através de microarranjo, de genes mitocondriais envolvidos na fosforilação oxidativa como *ND1*, *CYTB*, *COX2* instigou o nosso grupo a buscar modulações no metabolismo do hospedeiro em vias clássicas, como glicólise, via das pentoses, fermentação e fosforilação oxidativa. Em ensaios anteriores demonstramos que células de Schwann infectadas eram capazes de captar mais glicose e que este efeito estava atrelado ao aumento da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Em contrapartida, ocorreu diminuição drástica dos processos de fermentação e potencial elétrico mitocondrial. No presente trabalho procuramos dar continuidade a esses achados e caracterizar a importância do metabolismo de glicose e de G6PD para a infecção causada por *M. leprae*. Para isso, avaliamos a sua expressão com diferentes abordagens, como células infectadas e amostras provenientes de pacientes como lesão de pele e nervos. Além disso, avaliamos a relevância de G6PD para o desfecho da infecção, observando sua participação nos efeitos anteriormente encontrados, bem como a sobrevivência micobacteriana após o *knockdown* de G6PD. Por fim, avaliamos a importância de mutações genéticas em *G6PD* para o desfecho da hanseníase e o impacto funcional destas na sobrevivência do bacilo. Dessa maneira, acreditamos que os achados do nosso estudo contribuem não só para o entendimento das interações metabólicas entre o patógeno e suas células hospedeiras, mas também para o entendimento dos mecanismos que regulam susceptibilidade/proteção a uma doença infecciosa.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Determinar alterações metabólicas induzidas pelo *Mycobacterium leprae* em sua célula hospedeira destacando a metabolização de glicose e via das pentoses e caracterizar as suas implicações para a suscetibilidade à hanseníase

3.2 - Objetivos específicos

1. Avaliar o envolvimento de transportadores de glicose (GLUT-1), enzimas envolvidas na metabolização de glicose, poder redutor e combate a espécies radicalares: glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), glutathione redutase e enzima málica citosólica em células infectadas e amostras provenientes de pacientes (lesão de pele e nervos);

2. Determinar a importância da via das pentoses-fosfato na infecção utilizando inibidores como 6-AN (6-aminonicotinamide), BSO (sulfoximina de butionina) e silenciamento gênico para a enzima G6PD em SCs infectadas;

3. Determinar a morfologia e quantidade de mitocôndrias e o impacto da produção de ATP em células infectadas e amostras de pacientes

4. Estudar a contribuição de SNPs em G6PD para desfechos de susceptibilidade ou resistência a hanseníase.

5. Traçar uma relação entre genótipo-fenótipo, avaliando o papel de variações em *G6PD* na expressão do gene e na sobrevivência do bacilo na célula hospedeira.

**Capítulo II: Subversão do metabolismo
de glicose das células de Schwann
realizada pelo *Mycobacterium leprae*.**

A regulação negativa, obtida através de microarranjo, de genes mitocondriais envolvidos na fosforilação oxidativa como *ND1*, *CYTB*, *COX2* e *ATP6* em amostras provenientes de nervos de pacientes da forma lepromatosa(264), instigaram a nossa equipe a procurar possíveis modulações no metabolismo energético da célula hospedeira durante a infecção. Durante o período em que realizei o mestrado (2012-2014) fomos capazes de detectar que as células de Schwann da linhagem ST8814 infectadas eram capazes de captar mais glicose e que este efeito estava atrelado ao aumento da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), primeira e principal enzima envolvida na oxidação da glicose pela via das pentoses. Em contrapartida ao aumento da captação de glicose, ocorreu diminuição drástica dos processos de fermentação e potencial elétrico mitocondrial. Ao longo do meu doutoramento experimentos adicionais foram realizados com a finalidade de responder questões ainda não esclarecidas. Dentre os resultados gerados, detectamos um aumento da expressão do transportador de glicose GLUT-1(SL2A1), da expressão de G6PD, enzima málica (ME-1) e da Glutathione redutase (GSR). A expressão de G6PD também foi analisada em amostras provenientes de pacientes como lesão de pele e nervos. Além disso, analisamos a quantidade de ATP produzido na célula infectada. Nós também conduzimos experimentos em microscopia eletrônica de transmissão para analisar as mitocôndrias de lesão de nervos de pacientes com neural pura e avaliamos a quantidade de mtDNA em células de Schwann infectadas e lesão de nervos de pacientes. Por fim, utilizamos inibidores específicos (6-AN) e silenciamento gênico para G6PD realizado por RNA de interferência para reverter os efeitos anteriormente encontrados, como diminuição do potencial elétrico mitocondrial, e diminuir a viabilidade intracelular do bacilo de forma significativa. Nosso grupo também foi capaz de detectar que o efeito protetor ocasionado pelo *M. leprae* na célula hospedeira quando exposta ao peróxido é dependente da via das pentoses. Todos os resultados anteriormente citados compõem o artigo anexado a seguir, publicado em 2016 na revista “The Journal of biological chemistry”. Os dados de quantificação de mtDNA estão anexados após o artigo de forma a complementar os achados desta parte do trabalho.

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *Mycobacterium leprae**

Received for publication, March 2, 2016, and in revised form, August 11, 2016 Published, JBC Papers in Press, August 23, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.725283

Rychelle Clayde Affonso Medeiros[‡], Karina do Carmo de Vasconcelos Girardi[‡], Fernanda Karlla Luz Cardoso[‡], Bruno de Siqueira Mietto[§], Thiago Gomes de Toledo Pinto[§], Lilian Sales Gomez[¶], Luciana Silva Rodrigues^{||}, Mariana Gandini[‡], Julio Jablonski Amaral^{**}, Sérgio Luiz Gomes Antunes[§], Suzana Corte-Real^{‡‡}, Patricia Sammarco Rosa^{§§}, Maria Cristina Vidal Pessolani[‡], José Augusto da Costa Nery[§], Euzenir Nunes Sarno[§], Leonardo Ribeiro Batista-Silva[§], Mauro Sola-Penna[¶], Marcus Fernandes Oliveira^{¶¶}, Milton Ozório Moraes[§], and Flavio Alves Lara^{‡1}

From the Laboratório de [‡]Microbiologia Celular, ^{‡‡}Biologia Estrutural, and [§]Hanseníase, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro-RJ, the Laboratório de [¶]Enzimologia e controle do metabolismo and ^{||}Imunopatologia, Medical Science Faculty, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro-RJ, the ^{**}National Institute of Metrology, Quality and Technology INMETRO, Rio de Janeiro-RJ, the ^{§§}Department of Biology, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru-SP, and the ^{¶¶}Laboratório de Bioquímica de Resposta ao Estresse, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Mycobacterium leprae, the intracellular etiological agent of leprosy, infects Schwann promoting irreversible physical disabilities and deformities. These cells are responsible for myelination and maintenance of axonal energy metabolism through export of metabolites, such as lactate and pyruvate. In the present work, we observed that infected Schwann cells increase glucose uptake with a concomitant increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity, the key enzyme of the oxidative pentose pathway. We also observed a mitochondria shutdown in infected cells and mitochondrial swelling in pure neural leprosy nerves. The classic Warburg effect described in macrophages infected by *Mycobacterium avium* was not observed in our model, which presented a drastic reduction in lactate generation and release by infected Schwann cells. This effect was followed by a decrease in lactate dehydrogenase isoform M (LDH-M) activity and an increase in cellular protection against hydrogen peroxide insult in a pentose phosphate pathway and GSH-dependent manner. *M. leprae* infection success was also dependent of the glutathione antioxidant system and its main reducing power source, the pentose pathway, as demonstrated by a 50 and 70% drop in intracellular viability after treatment with the GSH synthesis inhibitor buthionine sulfoximine, and aminonicotinamide (6-ANAM), an inhibitor of G6PDH 6-ANAM, respectively. We concluded that *M. leprae* could modulate host cell glucose metabolism to increase the cellular reducing power generation, facilitating glutathione regeneration and consequently free-radical control. The impact of this regulation in leprosy neuropathy is discussed.

According to the World Health Organization, the number of new individuals diagnosed with leprosy in 2014 remained stable at 213,899 worldwide (1). Although it is an ancient disease, the

* The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ To whom correspondence should be addressed: Pavilhão Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, sala 27. 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: 5521-2562-1552; E-mail: flavioalveslara2000@gmail.com.

molecular and cellular mechanisms underlying leprosy are still poorly understood. Moreover, this disease encompasses a complex and broad clinical and immunopathological spectrum, characterized by severe peripheral nerve demyelination and extensive axonal loss, the most recognized hallmarks of the disease, resulting in impairment of neural function, disfigurement, and deformities. Leprosy is not considered a fatal disease, but it is still responsible for more than 14,000 cases of irreversible motor disability and deformity globally per year (1).

The constant increase in the numbers of dapsone-resistant *Mycobacterium leprae* isolates along decades led the World Health Organization to implement multidrug therapy in 1982, using a rifampicin, dapsone, and clofazimine combination to treat leprosy. Although implementation of multidrug therapy by World Health Organization reduced the prevalence of the disease worldwide, its eradication appears distant, mainly because the number of new cases reported annually in endemic areas remains stable (2). The development of an improved multidrug therapy using not only antibiotics but also drugs that act by modulating the host metabolism against infection, such as addition of statins to the current multidrug therapy could be a promising strategy to reduce disease burden (3).

Evolutionary analysis indicates that *M. leprae* underwent a large reduction in gene content along with its specialization to primarily infect human cells, specifically Schwann cells and macrophages. This genetic decay resulted in the loss of almost half of its genome, although spared genes related to energy metabolism, specifically those involved in glucose anabolism and catabolism and lipid anabolism (4). The loss of genes required for growth using lipids as the sole carbon source is believed to cause the *M. leprae* dependence on host glucose intermediates to survive (4). Recently we have demonstrated that *M. leprae* infection in Schwann cells activates Toll-like receptor-6, resulting in induction of the PI3K pathway and *de novo* lipid synthesis and uptake from the medium (5). It is believed that the subversion of host cell lipid metabolism and formation of droplets is a *M. leprae* strategy for infection and persistence (6) based on the fact that lipid bodies are related to the production of immunomodulators such as prostaglandin E₂ (7).

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *M. leprae*

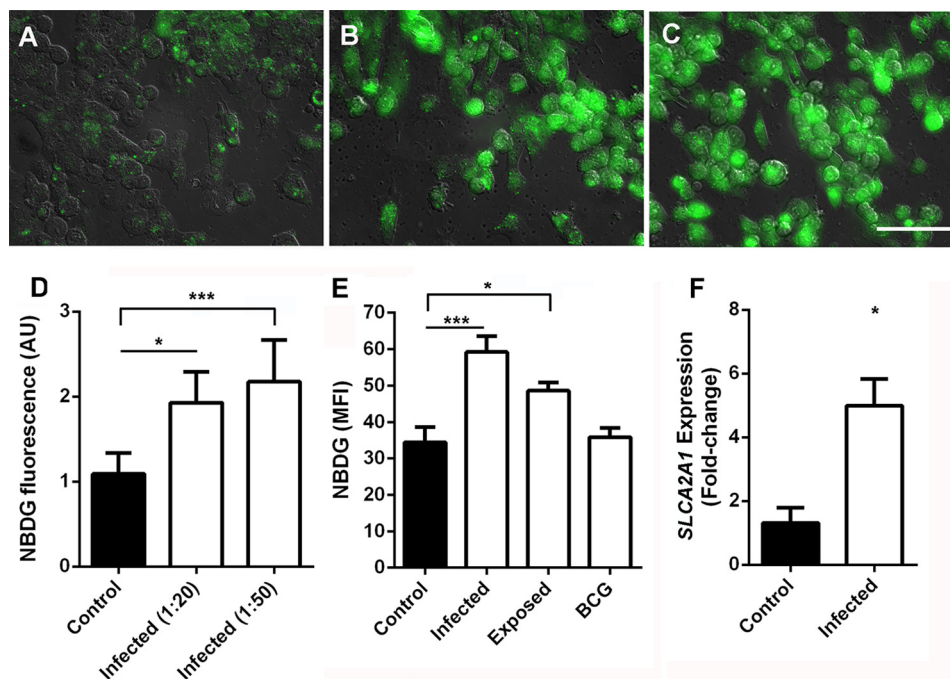


FIGURE 1. *M. leprae* infection increases glucose uptake by Schwann cells. Glucose uptake was determined by measuring 2-NBDG (a glucose analog) fluorescence intensity by fluorescence microscopy (A–D) and flow cytometry (E). Representative fields from control Schwann cell cultures (A), *M. leprae*-infected cells at an m.o.i. of 20:1 (B) and 50:1 (C) were acquired, and the rate between fluorescence mean and number of cells was determined (D). In E, fluorescence intensity medians were obtained by flow cytometry of infected, lethally irradiated *M. leprae*-stimulated Schwann cells or live BCG. Nonspecific binding of the glucose analog was observed as minimal at 4 °C and was deducted from the uptake at 37 °C. F, Glut-1 transporter (SLC2A1) expression induction by *M. leprae* in Schwann cells. The results are expressed as the mean \pm S.E. from three normalized independent biological replicates. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by the Bonferroni test where, ***, $p < 0.001$, and *, $p < 0.05$ are shown in comparison to the control. Scale bar = 50 μ m.

The pentose phosphate pathway (PPP,² also called phosphogluconate pathway or hexose monophosphate shunt) is a metabolic signaling pathway parallel to glycolysis that generates NADPH and ribose 5-phosphate as the main products, representing the source of cellular reducing power responsible for lipid synthesis and glutathione antioxidant system maintenance as well as generation of DNA and RNA precursors. There are two distinct phases in the pathway: the oxidative, in which glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity is the limiting enzyme required to generate NADPH, and the second phase, represented by the non-oxidative synthesis of carbon sugars (8). There are numerous mutations that can cause a G6PDH deficiency resulting in neonatal jaundice and hemolytic anemias induced by drugs, diabetes, and infections (9). Some of these variations are relatively frequent among human population due to the positive impact on a large number of pathogens, conferring natural resistance against *Chlamydia trachomatis* and *Plasmodium falciparum* infections (10, 11). On the other hand, the PPP is related to increased cellular tolerance to *Staphylococcus aureus* and *Helicobacter pylori* (12, 13).

²The abbreviations used are: PPP, pentose phosphate pathway; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; CCCP, carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazone; 2-NBDG, 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose; AMA, antimycin A; LL, lepromatous leprosy; BT, borderline tuberculoid; GSR, glutathione-disulfide reductase; DHE, dihydroethidium; 6-ANAM, aminonicotinamide; BCG, bacille Calmette-Guerin; ROS, reactive oxygen species; BSO, buthionine sulfoximine; m.o.i., multiplicity of infection; PI, propidium iodide; ANOVA, analysis of variance.

There is growing evidence for the crucial role of Schwann cells as the main support for energy production in axons (14). During catabolic processes, Schwann cell glycogen is converted into lactate, which is transported to the axon by monocarboxylate transporters (MCTs), oxidized to pyruvate, and inserted in the axonal Krebs cycle for ATP production (15).

In the present work, we demonstrated that *M. leprae* infection was able to modulate Schwann cell glucose metabolism, generating a marked increase in glucose uptake and the PPP oxidative cycle key enzyme G6PDH. In addition, *M. leprae* infection also reduced mitochondrion membrane potential and lactate release by Schwann cells. These alterations resulted in free-radical control. We also observed that inhibition of host G6PDH or glutathione reductase activity reduced *M. leprae* viability to 70 and 60%, respectively, demonstrating the potential of this pathway in the control of leprosy and possibly other mycobacterial infections, such as extensively drug-resistant tuberculosis.

Results

***M. leprae* Infection Changes Glucose Uptake and Mitochondrial Metabolism in Schwann Cells**—To observe possible modulation in glucose uptake by Schwann cells during *M. leprae* infection, we determined cellular uptake of the green fluorescent glucose analog (2-NBDG) by fluorescence microscopy (Fig. 1, A–D) in *M. leprae*-infected Schwann cells. The results showed a dose-response correlation between *M. leprae* multiplicity of infection (m.o.i.) and increase in 2-NBDG cellular uptake (Fig. 1D). We were able to more precisely analyze 2-NBDG uptake by deducting unspecific membrane binding

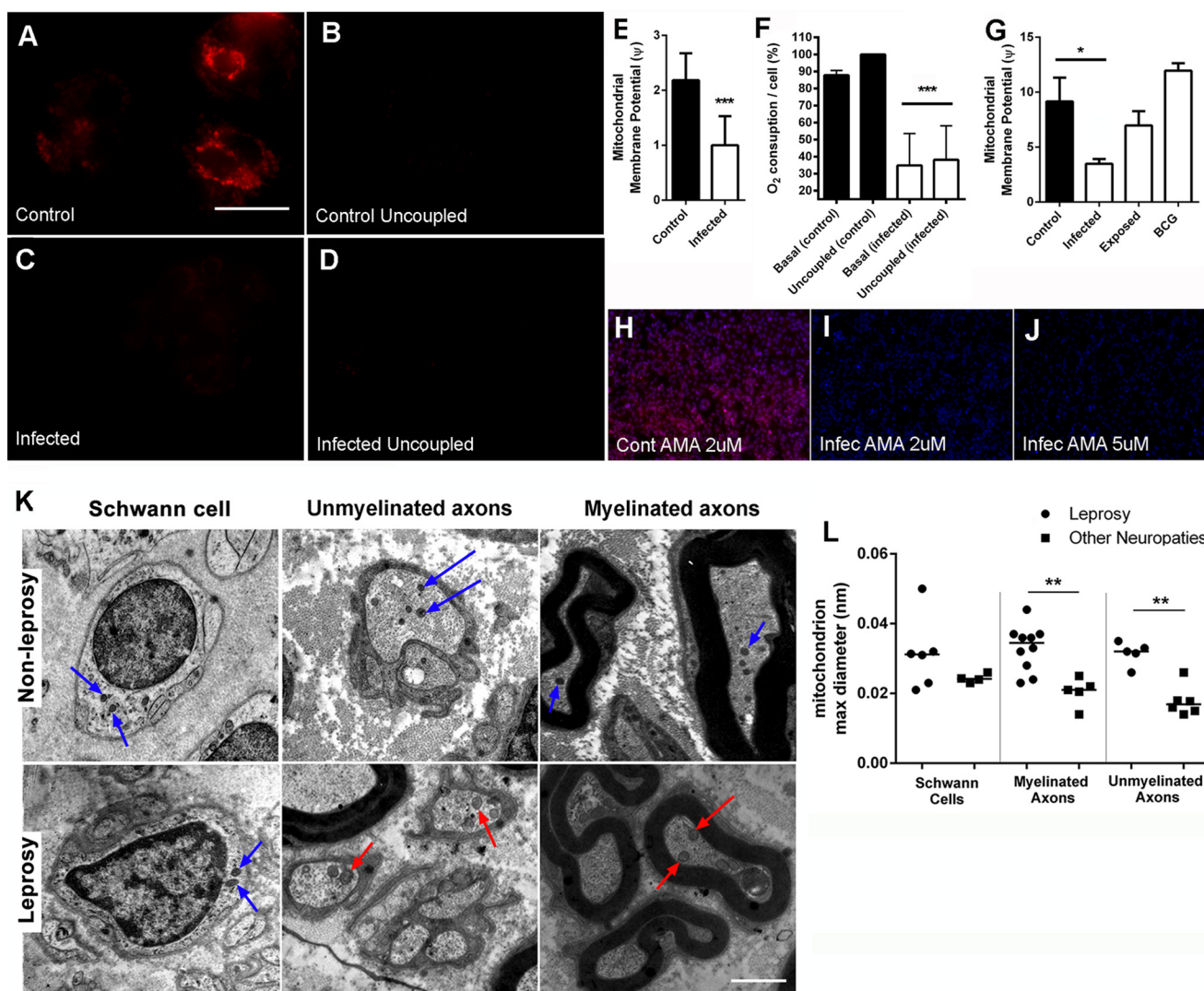


FIGURE 2. *M. leprae* infection promotes mitochondrial membrane potential depolarization. Mitochondrial membrane potential was determined by TMRM fluorescence intensity observed by fluorescence microscopy as coupled (A–C) and uncoupled by CCCP (B–D). Representative images from 120 fields were observed in three different replicates. Scale bar = 20 μm. The ratio between the coupled and uncoupled signal is a measure of the mitochondrial membrane potential (ψ) shown in E, F, normalized oxygen consumption was determined with an oxygraph, where basal and uncoupled (CCCP) respiration rates were determined, assuming uncoupled control oxygen consumption as the maximal respiration rate in all experiments (100%). G, mitochondrial membrane potential was determined by measuring the fluorescence intensity ratio between cells exposed to TMRM and TMRM plus CCCP (uncoupled) by flow cytometry. The reduction in mitochondrial membrane potential induced by *M. leprae* infection is reflected as antimycin A desensitization by infected cells (H–J). Necrotic cell nuclei were stained by propidium iodide (red), and all nuclei were stained by DAPI (blue). As expected, control cells die after treatment with 2 μM antimycin A (H). In contrast, infected cells resist up to 5 μM antimycin A (I and J). Representative images were from 90 fields observed in three different replicates. Scale bar = 20 μm. Normal (blue arrows) and swelled mitochondria (red arrows) were observed by electron transmission microscopy (K). Mitochondria radii were determined in leprosy patients and patients suffering from other neuropathies, demonstrating that mitochondrial swelling could be observed in both myelinated and unmyelinated leprosy patient axons. Differences observed in Schwann cell mitochondria radius between leprosy and other non-leprosy neuropathy patients were not statistically significant. Scale bar = 1 μm. The mean mitochondria radii were determined by ImageJ (L). The results are expressed as the mean ± S.E. from three normalized independent biological replicates. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test where: ***, $p < 0.0001$, and *, $p < 0.01$.

(4 °C), from global uptake (37 °C), determining the fluorescence intensity medians by flow cytometry, identifying a role of *M. leprae* metabolites in this process, as cells stimulated by γ -irradiation-inactivated *M. leprae*, which preserves all antigens, was not able to generate the same stimulus with equal magnitude, nor was a non-pathogenic mycobacteria such as BCG (Fig. 1E). As indicated by real-time PCR analysis (Fig. 1F), the increase in glucose analog uptake during *M. leprae* infection is related to the increase in *SLC2A1* mRNA expression, which encodes the main glucose receptor in Schwann cells, the glucose transporter protein type 1 (Glut-1).

Many years ago, the German scientist Otto Warburg revealed that tumors have a reduction in aerobic metabolism and a parallel increase in glycolysis. This phenomenon has since been recognized as the Warburg effect, characterized as a metabolic shift that tumor cells display toward increased glycolysis along with a reduction in aerobic metabolism (16). We used the mitochondria potential membrane-sensible probe tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) to assess the mitochondrial depolarization resulting from *M. leprae* infection to measure mitochondrial activity (Fig. 2, A and C). To demonstrate that the TMRM signal is specific to mitochondria in our model, we

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *M. leprae*

successfully eliminated TMRM fluorescence by uncoupling Schwann cell mitochondria using the ionophore CCCP (Fig. 2, *B* and *D*). Using the TMRM signal ratio between both stimuli (TMRM/TMRM + CCCP), we estimated the mitochondrial membrane potential (Ψ) of these cells (Fig. 2*E*), which showed that *M. leprae*-infected Schwann cells had a substantial Ψ reduction. This observation was confirmed using a Clark electrode to determine oxygen consumption during *M. leprae* infection. We observed that infected Schwann cells showed ~65% less oxygen consumption than the control cells and that this respiration drop was insensible to uncoupling by CCCP, indicating a deficiency in the respiratory chain complex proteins or substrates (Fig. 2*F*). A flow cytometry analysis corroborated these observations, indicating again that only live *M. leprae* is able to generate this Warburg-like effect in Schwann cells (Fig. 2*G*). In fact, respiration appeared to be almost abandoned by infected Schwann cells. We observed a high incidence of death in uninfected cells when exposed to 2 μM of the complex III inhibitor antimycin A (AMA), in contrast with *M. leprae*-infected cells, which showed high levels of resistance to 5 μM AMA (Fig. 2, *H–J*).

As shown in Fig. 2*K*, mitochondria in non-myelinated and myelinated axons in peripheral nerves of patients suffering from other non-leprosy neuropathies are relatively normal compared with leprosy patients. Morphometric analysis showed that the length of the mitochondrial major axis of myelinated and unmyelinated axons is statistically higher in the leprosy group, indicating mitochondrial swelling among these patients. In contrast, this difference was not observed in leprosy patients Schwann cells mitochondria (Fig. 2*L*).

***M. leprae* Infection Does Not Promote a Classical Warburg Effect**—The classical Warburg effect, observed during *Mycobacterium avium* infection, for example (17), is followed by an increase in lactate generation and subsequent release to the medium (16). We assessed lactate release by Schwann cells infected by *M. leprae*, BCG, or stimulated by γ -inactivated *M. leprae* (Fig. 3*A*). Surprisingly, lactate levels did not increase in infected cells. On the contrary, we observed an ~50% decrease in lactate secretion in the supernatants by infected Schwann cells when compared with uninfected or unstimulated controls (Fig. 3*A*). Curiously, irradiated *M. leprae* or BCG-infected cells showed no alterations in lactate secretion. This effect was also detected in serum from multibacillary leprosy patients (LL), which presents a substantial amount of bacilli infecting the nerves and skin. A reduced level of lactate was noticed among these patients compared with either healthy volunteers or paucibacillary leprosy patients (BT), with reduced or even undetectable bacilli.

To understand the mechanism involved in *M. leprae* modulation of lactate levels, we determined the activity of both isoforms of lactate dehydrogenase, the LDH-H, able to convert lactate to pyruvate, and the LDH-M isoform, able to convert pyruvate to lactate (Fig. 3, *C* and *D*). Although there was no difference observed in LDH-H activity, LDH-M activity is reduced in infected cells, and this could be an explanation for the reduction in lactate generation and release observed in these cells. The most feasible method to assess this phenomenon *in vivo* is to determine *LDH-B* and *LDH-A* gene expression

levels in leprosy patients' skin lesion biopsies. These genes encode the LDH-H and LDH-M enzyme isoforms, respectively.

As shown in Fig. 3, *E* and *F*, LL patients present high levels of *LDH-B* and low levels of *LDH-A* when compared with BT patients. To corroborate this data, *LDH-A* gene expression from neural leprosy patients and patients suffering from other non-leprosy neuropathies nerve biopsies was determined (Fig. 3*G*). As expected, *LDH-A* expression was reduced in leprosy patient nerves. To confirm that the lactate levels drop in infected Schwann cells is related to a reduction in lactate production, and not lactate membrane transport inhibition, we determined the monocarboxylate transporters MCP 1, 2, and 4 expression, through determination of *SLC16A1*, -3, and -7 mRNA abundance by real-time PCR (Fig. 3*H*). We observed that infected Schwann cells increased the expression of all three lactate transporters. Nerve fragments from leprosy patients showing high expression of *SLC16A7* compared with nerves biopsies from non-leprosy neuropathies patients (Fig. 3*I*).

***M. leprae* Infection Increases Glutathione Reductase Activity through Induction of the PPP**—After the observation that *M. leprae*-infected Schwann cells present a glucose uptake increase followed by reduction in mitochondrial respiratory chain activity and a drop in lactate generation, we speculated that glucose would be diverted to the PPP in infected cells. To test this hypothesis, we determined G6PDH, the step-limiting enzyme of the PPP oxidative phase, expression (Fig. 4*A*) and activity (Fig. 4*B*) *in vitro* and *in vivo* (Fig. 4, *C* and *D*). *M. leprae* infection generated a 10-fold increase in *G6PDH* expression, resulting in doubled activity *in vitro*, indicating that glucose-6-P was more easily converted to ribulose 5-phosphate, a nucleic acid and amino acid precursor, than pyruvate and consequently lactate, generating NADPH during the process. The same seems to be true *in vivo*, where *G6PDH* expression was also increased in LL skin lesions compared with BT skin biopsies (Fig. 4*C*). *G6PDH* expression is also increased in peripheral nerves from leprosy patients when compared with other non-leprosy neuropathies nerve biopsies (Fig. 4*D*), corroborating the up-regulation of this pathway in the disease.

Phosphofructokinase 1 catalyzes the first committed step of glycolysis, and for this reason, its activity was determined *in vitro* (Fig. 4*E*). Phosphofructokinase 1 activity was not modulated during infection, indicating that glycolysis was not induced by *M. leprae*, similar to ATP abundance (Fig. 4*F*). On the other hand, malic enzyme, another important source of Schwann cell NADPH, showed up-regulated expression and activity *in vitro* (Fig. 4, *G* and *H*). Malic enzyme expression was also increased in peripheral nerves from leprosy patients compared with nerve biopsies from patients presenting non-leprosy-related neuropathies (Fig. 4*I*).

Lipid synthesis, one of the main destinations of cellular NADPH, is known to be increased during Schwann cell infection by *M. leprae* (6). ATP citrate lyase, which converts citrate to acetyl-CoA, is involved in the first step of the lipid synthesis pathway and is also increased in infected Schwann cells (Fig. 4*J*). The enzyme glutathione-disulfide reductase (GSR), which is involved in regeneration of oxidized glutathione to its reduced form, a crucial low molecular weight redox buffer in mammal cells, also utilizes NADPH and would potentially confer an

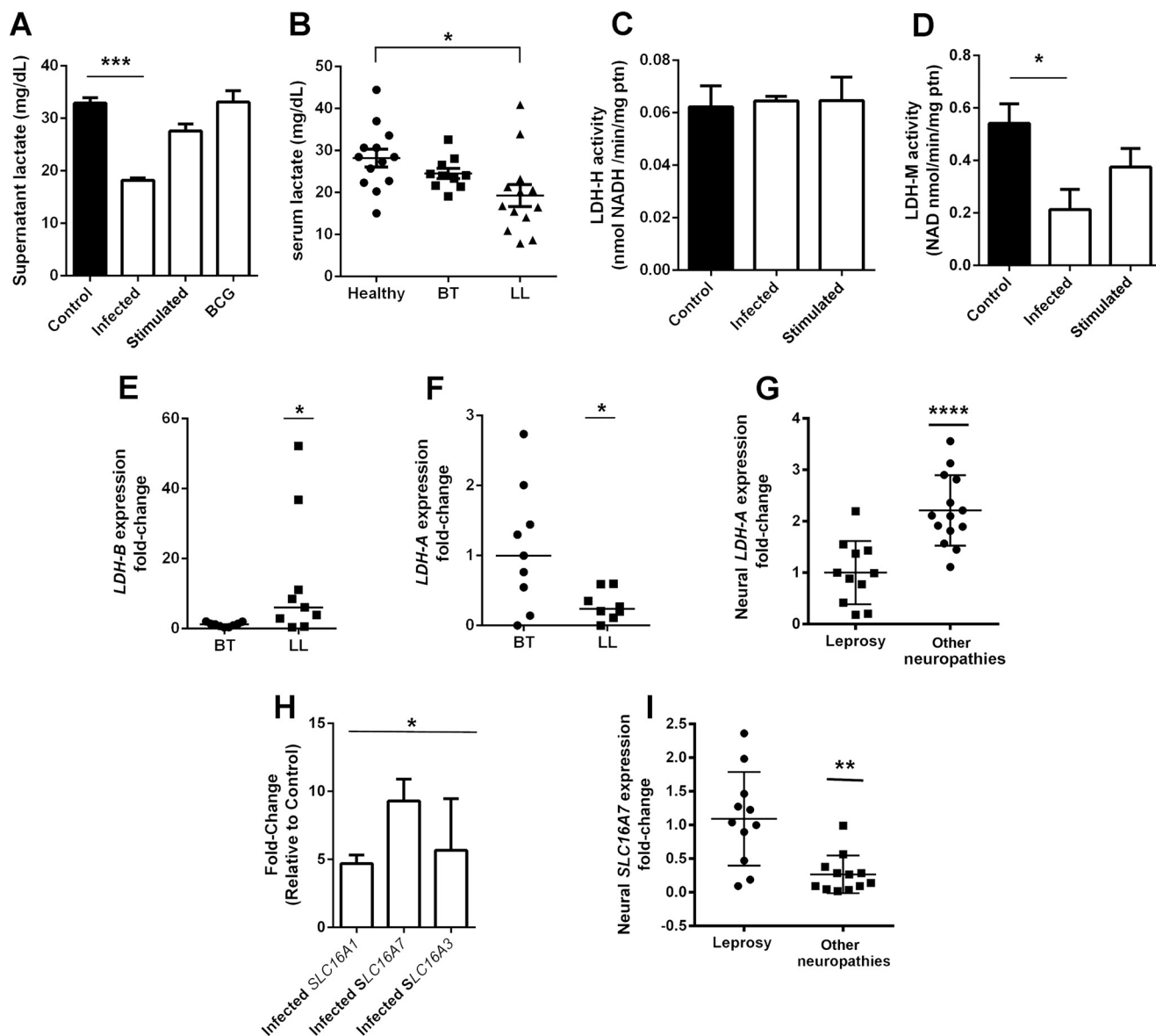


FIGURE 3. Schwann cell lactate release is affected during *M. leprae* infection. Lactate release in infected Schwann cell supernatant is reduced by half in comparison to control cells (A). Cells stimulated to BCG or *M. leprae* inactivated by radiation showed no reduction in lactate. Leprosy patients from the lepromatous pole of the disease (LL) also demonstrated a 30% reduction in serum lactate levels (B). Although Schwann cell lactate dehydrogenase isoform H activity is not affected (C), isoform M activity is reduced during *M. leprae* infection (D). LDH-B and LDH-A mRNA expression were determined in skin lesions from leprosy tuberculoid (BT) and lepromatous (LL) patients (E and F). LDH-A gene expression was determined in peripheral nerves biopsies from pure neural leprosy patients and patients suffering from other neuropathies (G). As expected, the LDH-A gene is repressed in leprosy patients. The monocarboxylate transporters SLC16A1, 16A3, and 16A7 are up-regulated in infected Schwann cells (H), whereas SLC16A3 is increased in peripheral nerves from leprosy patients in comparison to nerve biopsies from other neuropathies (I). The results are expressed as the mean \pm S.E. from three normalized independent biological replicates. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test where: ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$; and *, $p < 0.01$ in comparison to control.

advantage for intracellular *M. leprae* growth (18). *GSR* mRNA expression was up-regulated *in vitro* and *in vivo* in Schwann cells, multibacillary (LL) skin lesions, and nerve biopsies (Fig. 4, K–M), indicating that *M. leprae* infection induces the glutathione generation system.

M. leprae Intracellular Viability Is Dependent on Host Cell Free-radical Defenses Maintained by Glutathione-disulfide Reductase and the PPP—Due to the increase in *GSR* activity during *M. leprae* infection, the next step was to determine whether infected Schwann cells are more resistant to oxidative insults due to the up-regulated PPP, which stimulates the glutathione system. We therefore monitored ST88-14 oxidative stress through the dihydroethidium (DHE) signal using FACS (Fig. 5).

M. leprae and BCG infection *per se* do not generate oxidative stress in ST88-14 Schwann cells. However, treatment with 10 μ M hydrogen peroxide induced a higher DHE signal in control and BCG than *M. leprae*-infected Schwann cells, indicating that *M. leprae* infection increase cellular antioxidant defenses. Host cell free-radical protection was totally abolished when *GSR* or *G6PDH* activity was inhibited by buthionine sulfoximine (BSO) or 6-ANAM, respectively (Fig. 6, A and B).

By blocking PPP using 6-ANAM or glutathione regeneration using BSO, we successfully reverted the metabolism modulation mediated by *M. leprae*, rescuing infected cells' lactate production and mitochondrial membrane potential to normal levels (Fig. 6, A and B). Host cell viability was not impacted by any

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *M. leprae*

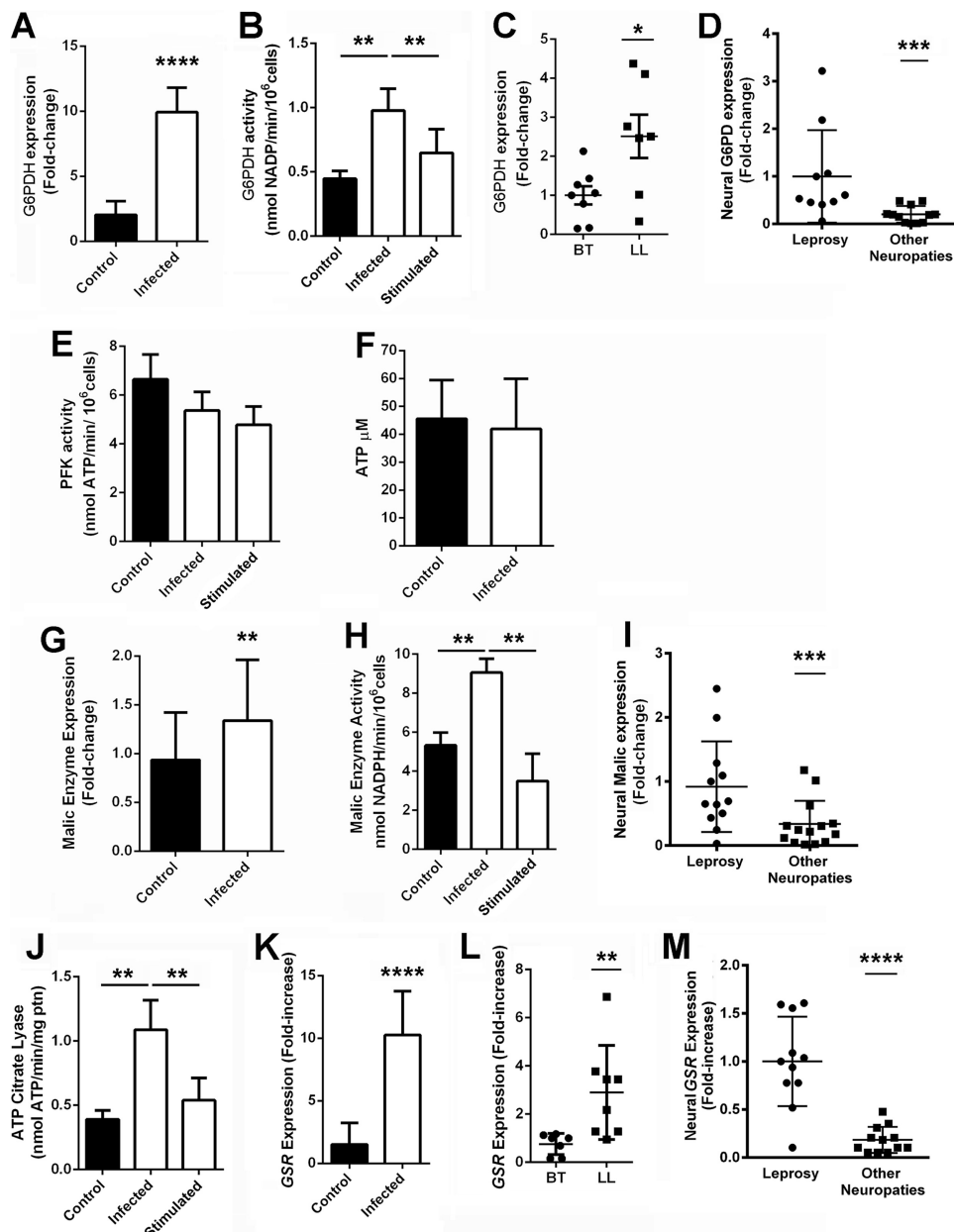


FIGURE 4. *M. leprae* induces the Schwann cell pentose pathway oxidative phase. G6PDH activity (A) and expression (B) is increased in infected Schwann cells. G6PDH expression is also increased in lepromatous leprosy skin lesions (LL), where *M. leprae* is abundant, compared with tuberculoid ones (BT) (C). G6PDH is also increased in peripheral nerves from leprosy patients when compared with nerve biopsies of other neuropathies (D). The PFK (E) and cellular ATP abundance (F) are not altered in infected Schwann cells. On the other hand, malic enzyme, another important source of Schwann cell reducing power, presented increased expression (G) and activity (H) during infection. Malic enzyme is also increased in peripheral nerves from leprosy patients when compared with nerve biopsies from patients diagnosed with other neuropathies not related with leprosy (I). ATP citrate lyase, the first enzyme of the lipid synthesis pathway, is also increased in infected Schwann cells (J). Glutathione reductase, the main destination of cell reducing power, is also increased during *M. leprae* infection in human Schwann cells (K), skin (L), and nerves (M). Cells incubated with γ -inactivated *M. leprae* are identified as stimulated. The results are expressed as the mean \pm S.E. from three normalized independent biological replicates. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test where: ****, $p < 0.0001$; ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; and *, $p < 0.05$ in comparison to controls.

stimulus (data not shown), in contrast with *M. leprae* intracellular viability in Schwann cells. We observed that *M. leprae* viability is partially dependent on both host cell metabolic activities, observing a 50 and 70% drop in viability after 4 days of treatment with BSO and 6-ANAM, respectively (Fig. 6C). The impact of host cell G6PDH inhibition over *M. leprae* viability was confirmed by siRNA knockdown of the enzyme (Fig. 6D). Knockdown using siRNA 1 and 2 reduced *M. leprae* viability to 46 and 32%, respectively, in comparison with the scrambled

siRNA control. These data demonstrate that host G6PDH is a new potential therapeutic target to control leprosy.

Discussion

In the present work, we described a profound metabolism modulation displayed by Schwann cells during *M. leprae* infection. We determined that this intracellular pathogen is able to subvert host cell metabolism by increasing cellular reducing power sources such as the PPP oxidative phase and malic

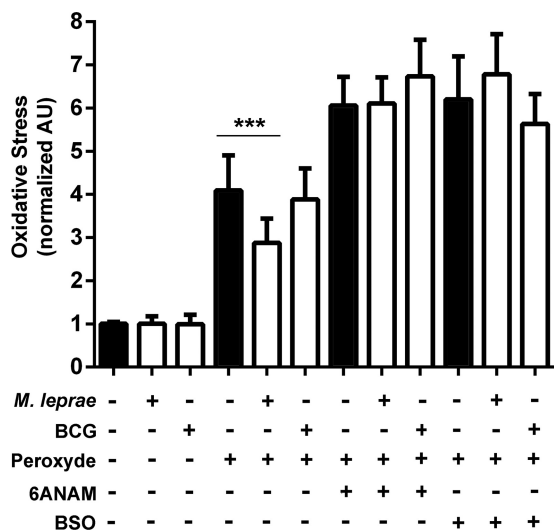


FIGURE 5. *M. leprae* infection increases oxidative defenses of Schwann cells in a pentose pathway-dependent manner. Schwann cells were infected by *M. leprae* or BCG (white bars) and challenged by hydrogen peroxide. Oxidative stress was measured by dihydroethidium fluorescence as determined by flow cytometry. Mycobacterial infection *per se* does not increase ROS in Schwann cells. On the contrary, *M. leprae* infection partially protects Schwann cells from hydrogen peroxide oxidative damage. The ROS protection was eliminated by G6PDH inhibitor 6-ANAM. The results are expressed as the mean \pm S.E. from five normalized independent biological replicates. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test where: ***, $p < 0.0001$.

enzyme, down-regulating mitochondrial activity and drastically reducing lactate production by infected Schwann cells (Fig. 7).

The increased glucose utilization through aerobic glycolysis described by Warburg in neoplastic cells was subsequently found to occur *in vivo* in macrophages composing the granulomas of tuberculosis, as well as lymphocytes, an aerobic respiration to aerobic glycolysis switch (19). This observation is in accordance with the reduced oxygen tension expected to occur in nonvascularized caseating tuberculosis granulomas. The Warburg-like effect observed in *M. leprae*-infected Schwann cell was a surprise. Despite the drop in lactate released by infected cells, which is in contrast with the classical Warburg effect, *M. leprae*-infected Schwann cells displayed a reduction in mitochondrial membrane potential and respiration, presenting a mainly fermentative metabolism, as demonstrated by antimycin A resistance during infection.

It is likely that the mitochondria shutdown could be an *M. leprae* adaptation to reduce intracellular oxidative stress. In fact, a down-regulation of the mitochondrial respiratory chain genes after *M. leprae* infection has been reported (20). Despite the presence of various antioxidant defenses, the mitochondrion is recognized as the main intracellular source of reactive oxygen species (21). Various respiratory complexes leak electrons to oxygen, producing primarily superoxide anion and consequently raising hydrogen peroxide and peroxynitrite levels, which are both strong oxidants that indiscriminately react with nucleic acids, lipids, and proteins (22, 23). It is well known that uncoupling of mitochondria oxidative phosphorylation by uncoupling proteins strongly reduces mitochondrial ROS emission (24). By limiting electron pumping via citrate deviation to lipid synthesis, *M. leprae* drastically reduced host cell

mitochondrial membrane potential and avoided ROS generation. This strategy could also be related to the early demyelination described in leprosy neuropathy because the Schwann cell Krebs cycle activity is important in differentiation and the myelination process (25).

Mitochondrial swelling is a hallmark of ultrastructural change occurring in damaged cells and is one of the most important indicators of the opening of the mitochondrial permeability transition pore, an event that, depending of the intensity of the insult, can lead to apoptosis (26–28). Although all mitochondrial modulations observed in the present work were performed in infected Schwann cells, we failed to observe mitochondrial swelling in ulnar and sural Schwann cells from leprosy patients. These data were expected because it is well known that *M. leprae* develops a series of mechanisms to avoid host cell apoptosis, such as insulin-like growth factor 1 up-regulation, for example (29). On the other hand, we observed swelling in myelinated and unmyelinated axonal mitochondria from leprosy patients' axonal fibers without any sign of inflammatory infiltrates, demyelination, or fibrosis, indicating that the mitochondria transition pore is opened and that this event may represent the first insult, which will result in neuronal death, the leprosy hallmark.

Probable ROS control is also involved in *M. leprae* adaptation to increase the activity of host G6PDH and malic enzyme, which together represent the main cellular sources of NADPH. The NADPH reducing power is consumed by glutathione reductase, which is also up-regulated during *M. leprae* infection, to maintain the glutathione antioxidant system. By inducing these two linked pathways, this obligatory intracellular pathogen is able to avoid host cell oxidative stress. This protection was eliminated by γ -glutamylcysteine synthetase or G6PDH inhibition by BSO or 6-ANAM, respectively, resulting in lactate regeneration and mitochondrial membrane potential restoration along with *M. leprae* loss of viability. Both pathways seem to be crucial to *M. leprae* infection, presenting potential new targets to control leprosy.

An important challenge to avoid leprosy demyelinating neurodegenerative neuropathy is to understand the cellular and molecular events that underlie the different phases of this process. *M. leprae* induces an intrinsic demyelination mechanism for nerve damage in leprosy, a process attributed to the immune response until then (30). Currently, leprosy neuropathy development is divided into two phases: the early events involving Schwann cell infection and intrinsic injury mechanisms and late events represented by the immune response mediating axonal damage and fibrosis (31).

We hypothesize that Schwann cells' lactate reduction could be an explanation for the axonal mitochondria swelling, representing a new mechanism of demyelination and neuronal death in leprosy neuropathy. The importance of glial cells' lactate to neuronal physiology has been largely characterized. Lee and collaborators (32), for example, observed axon damage and neuron loss *in vivo* and *in vitro* after disruption of glial cells' lactate transport to neurons in monocarboxylate transporter 1 knock-out animals. In addition to its well known metabolic role in sustaining synaptic function (33) and axonal activity (34),

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *M. leprae*

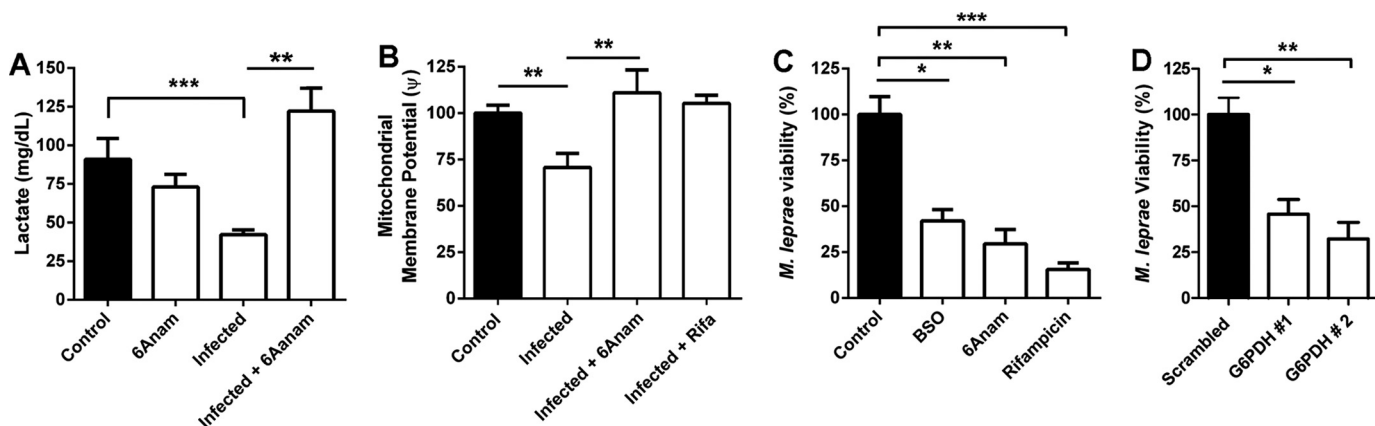


FIGURE 6. *M. leprae* viability in Schwann cells is dependent on the pentose pathway. *A*, the G6PDH inhibitor 6-ANAM recovers lactate production in *M. leprae*-infected Schwann cells. *B*, mitochondrial membrane potential, determined by the ratio of TMRM/TMRM + CCCP fluorescence signal by flow cytometry, was also recovered in infected Schwann cells by 6-ANAM and rifampicin. *C*, *M. leprae* intracellular viability was determined by real-time PCR 16S rRNA quantification. Schwann cells exposed to 6-ANAM or BSO were not able to maintain *M. leprae* infection *in vitro* for 5 days, similar to results in rifampicin. *D*, *M. leprae* viability was similarly impaired by G6PDH siRNA knockdown, after 2 days of infection. The results are expressed as the mean \pm S.E. from three normalized independent biological replicates. Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test where: ***, $p < 0.0001$; **, $p < 0.001$; and *, $p < 0.01$ in comparison to controls or between conditions when indicated.

lactate has been proposed to act as a neurotransmitter through specific receptors (35).

The difference between the classical Warburg effect, when an fermentative phenotype is followed by an increase in lactate generation, and the *M. leprae*-induced Warburg-like effect, represented by a reduction in respiration and lactate release by infected cells, could be explained by the decrease in lactate dehydrogenase M activity (Fig. 3, *D*, *F*, and *G*) and the increase in ATP citrate lyase activity. These results combined with the commitment of these carbons to pyruvate, citrate, and finally lipid synthesis, which is highly induced in infected Schwann cells under insulin-like growth factor-1/insulin signaling (6, 29), discarded the possibility of lactate consumption in gluconeogenesis.

More recently, it was demonstrated that *M. leprae* is able to generate neuropathy with consequent axonal death by down-regulating Schwann cell differentiation and myelination genes such as MBP, MPZ/P0, and Krox 20 (36). These observations could also be linked to the lactate synthesis drop observed in Schwann cells during *M. leprae* infection because it has already been demonstrated that myelination genes such as Krox20 and P0 are down-regulated in lactate-depleted Schwann cells (37). Hypophosphorylation in *M. leprae*-infected sciatic nerve neurofilament subunits results in a loss of axonal caliber and nerve conduction velocity (38). We believe that these observations could also be related to the reduction in lactate production in Schwann cells, which results in axonal lower Krebs cycle activity and a subsequent mitochondrial loss of function and swelling, leading to lower axonal energy production, global axonal metabolism reduction, neurofilament hypophosphorylation, and loss of neural conductivity (39).

To sum up, our data open the path to understanding the complex metabolic modulation of the host Schwann cells during *M. leprae* infection. The fermentative phenotype imposed on the host cell represents an increase in the oxidative defenses, likely associated with demyelination, due to the reduction in Schwann cell mitochondrial respiration and neuronal loss of conductivity due to lactate deprivation. We successfully reverted these effects in infected Schwann cells using 6-ANAM,

with an impressive impact over *M. leprae* viability by silencing G6PDH. Curiously, both drugs are applied in cancer therapy (40). The potential of these new targets in leprosy neuropathy mitigation should be investigated. Our model pinpointed Schwann cell and *M. leprae* infection, but it could be hypothesized that other host cells could similarly respond to either *M. leprae* or other mycobacteria like *M. tuberculosis* in a way that XDR *M. tuberculosis*-infected patients could be benefited from this type of treatment.

Experimental Procedures

Cell Culture and Infection—The ST88-14 human Schwann cell line (kindly provided by Dr. Jonathan Fletcher, Harvard University, Boston, MA) was cultured in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml of penicillin, and 100 g/ml of streptomycin and maintained in a 5% CO₂ atmosphere. In all assays, unless otherwise stated, we carried out infection with *M. leprae* or *Mycobacterium bovis* BCG (*Moreau* strain) using a m.o.i. of 50 bacteria per cell (50:1) for 48 h at 33 °C in a 5% CO₂ atmosphere.

Treatment with Drugs—For reversing the effects of *M. leprae* infection, cells were exposed to different drugs interfering in fundamental metabolic pathways 24 h before infection: 5 μ M 6-ANAM, an inhibitor of G6PDH; 400 μ M BSO, an inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase; or antimycin A (2 μ g/ml), an inhibitor of the electron transfer at complex III. All drugs, substrates, and fluorochrome used in the present work, unless otherwise stated, were purchased from Sigma.

Patients—A total of 84 not-treated patients: 20 paucibacillary (BT), 22 multibacillary (LL), 22 patients presenting pure neural leprosy, and 20 patients suffering from other non-diagnosed neuropathies, consisting of 44 males and 40 females from 25 to 88 years of age, were recruited from the Souza Araújo Service at the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, and classified according to the Ridley-Jopling scale and included in this study (Table 1). Ulnar and sural nerves biopsies were analyzed. The number of samples tested is not the same in different analysis because some of them did not present PCR amplification or did

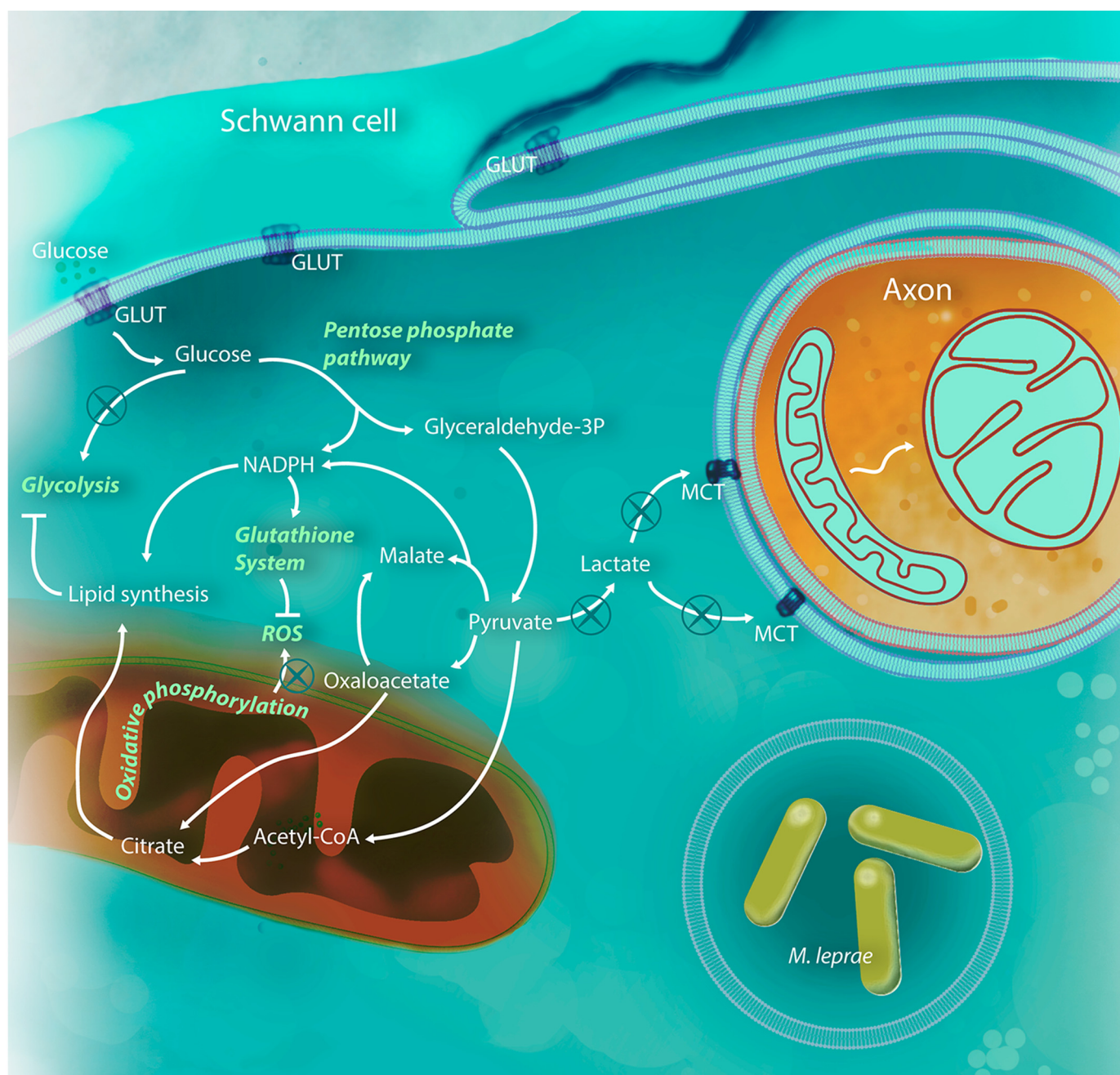


FIGURE 7. *M. leprae* is able to modulate Schwann cell metabolism for its benefit. After infection, Schwann cells increase glucose uptake, feeding the PPP with carbon, in detriment to glycolysis, probably due to phosphofructokinase inhibition by the increased levels of acyl-CoA in the cytoplasm. Pyruvate generated by PPP is converted to malate and acetyl-CoA instead of lactate, compromising axonal mitochondria physiology. Pyruvate is rapidly converted to citrate, increasing lipid synthesis and virtually stopping the Schwann cell tricarboxylic acid cycle and consequently respiratory chain and mitochondria energy potential. The NADPH generated by the oxidative phase of the PPP will maintain an up-regulated lipid synthesis and glutathione system. All three pathways are crucial to the success of *M. leprae* infection and could be used in new host-target therapy strategies.

not generate mitochondrial high resolution microscopic images in all three compartments: Schwann cells, myelinated and unmyelinated axons.

Mycobacteria Strains—Live *M. leprae* Thai-53 was prepared from athymic nu/nu mouse footpads immediately before use and was provided by Dr. Patricia Sammarco Rosa (Department of Biology, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru-SP, Brazil). *M. leprae* preparation, viability determination, and purity were performed as described elsewhere (3). Part of the *M. leprae* suspension was killed by γ -irradiation in the Acelétron Facility

(Rio de Janeiro, Brazil). *M. bovis* BCG Moreau was kindly provided by Carolina Cavareze (Fundação Aatoulo de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil) and cultured in 7H9 Middlebrook medium supplemented with 0.02% glycerol, 10% ADC Middlebrook (BD Bioscience), and 0.05% Tween 80 (Difco Laboratories). Cultures were kept under constant agitation at 37 °C for 2 weeks. BCG was harvested in the mid-log phase, counted in a Petroff-Hausser chamber, and kept frozen at -70 °C until use.

Glucose Uptake and Lactate Measurement—Glucose uptake was monitored using the fluorescent glucose analog 2-NBDG

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *M. leprae*

TABLE 1
Demographic and epidemiological data of individuals included in the study

Group	Samples	Assay	Individuals	Male	Female	Age (median)
Healthy	Serum	Lactate quantification	13	5	8	38.3
Pure neural leprosy	Nerve lesions	qRT-PCR	12	7	5	55.5
		TEM ^a	10	5	5	62
		Quantitative RT-PCR	14	6	8	58
Other neuropathies	Nerve lesions	TEM	6	3	3	42
		Lactate quantification	11	4	7	48
BT	Serum	Lactate quantification	11	4	7	48
LL	Skin lesions	Quantitative RT-PCR	9	6	3	45
		Serum	13	9	4	36.5
		Skin lesions	9	4	5	46

^a TEM, transmission electron microscopy.

(Sigma). After 48 h infection, round coverslip-adherent cells were exposed to the fluorophore at a concentration of 500 nM for 30 min in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Ten random fields per sample were acquired using a Zeiss AxioObserver inverted microscope with a Colibri illuminating system with Plan-Neofluar $\times 40$ objective and a numerical aperture of 1.4 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The green signal from NBDG was acquired by monochrome camera HMR AxioScan controlled by Axiovision software version 3.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The illumination system used a 470-nm LED and Zeiss fluorescence filter 61. The cytometry analysis was performed as follow: after labeling and washing, cells were removed from the well with 0.125% trypsin and resuspended in cytometry buffer (10% FBS in PBS), placed on ice, and immediately subjected to the acquisition of 10,000 events with an AcuriC6 cytometer (BD Biosciences) in FL1 channel fluorescence. The results represent the rate between the fluorescence signal from 4 °C uptake (unspecific NBDG-2 membrane binding) and 37 °C uptake. Lactate quantification was performed from ST88-14 supernatants after 48 h infection by a m.o.i. of 50:1, using the Liquiform lactate kit (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) according to the manufacturer's instructions.

Electrical Potential Analysis of the Mitochondrial Membrane (ψ)—The electric mitochondrial membrane potential was determined by exposing ST88-14 cells to TMRM at 0.5 nM (Sigma). The results were shown by the ratio of the probe fluorescence signal to the same signal from a culture preincubated with the proton ionophore CCCP (Sigma). CCCP, titrated in our model using a curve from 5 to 70 μ M, at 15 μ M was recognized as the lower concentration able to deplete the TMRM signal, and for that reason, it was established as the concentration of choice. CCCP and antimycin A (2 mg/ml) were incubated 10 min prior to TMRM exposure. Cells were exposed to the probe for 10 min. For microscopy, we captured 10 random fields per sample using a Zeiss AxioObserver inverted microscope with a Colibri illuminating system and a Plan-Neofluar $\times 40$ objective with a numerical aperture of 1.4 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The red signal from TMRM was acquired by the monochrome camera HMR AxioScan controlled by Axiovision software version 3.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The illumination system used a 530-nm LED and Zeiss fluorescence filter 50. Flow cytometry analysis were performed as follow: after labeling and washing, cells were then removed from the well with 0.125% trypsin and resuspended in cytometry buffer (10%

FBS in PBS), placed on ice and immediately subjected to the acquisition of 10,000 events on FACSCalibur (BD Biosciences) FL2-fluorescence channel A.

Enzymatic Activity and ATP Quantification—Enzyme activities were assayed with 3×10^6 cells lysed in hypotonic buffer (25 mM KH_2PO_4 , 10 mM MgCl_2 , pH 7.4). Cell extracts were used 1:2 with enzyme-specific reaction medium, which changes depending on the enzyme being evaluated. All media contain 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) with 5 mM MgCl_2 , plus 1 mM glucose 6-phosphate and 0.2 mM NADH to evaluate G6PDH activity; 0.2 mM NADP^+ with 1 mM malate to determine malic enzyme activity; 0.2 or 1 mM sodium pyruvate to determine LDH isoform M activity; 0.2 mM NAD^+ and 1 mM sodium lactate to determine LDM isoform activity; 0.1 mM NADH with 100 mM ATP, 1 mM fructose 6-phosphate, and 0.1 mM of a mixture of enzymes (aldolase, triose-phosphate isomerase, and glycerophosphate dehydrogenase) to determine PFK activity; 0.15 mM NADH with 100 mM ATP, 20 mM citrate, 10 mM 2-mercaptoethanol, 2 units/ml of malate dehydrogenase, and 0.3 mM of coenzyme-A to determine citrate lyase activity. We measured the presence of reduced NADP (G6PDH and malic), reduction of NAD^+ (LDH), or oxidation of NADH (PFK, citrate lyase) by determining absorbance at 340 nm. To quantify intracellular ATP, cell lysates were subjected to an ATP determination kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

Activities were normalized by cell number or protein mass, following the standard in the literature. Protein quantification of cell lysates was performed by the colorimetric method with a Pierce[®] BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) following the manufacturer's instructions. Samples were read at 562 nm, and results were analyzed by the SoftMax[®] data acquisition and analysis software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Host Gene Expression and *M. leprae* Viability Analysis by Real-time RT-PCR—Host and Mycobacterial RNA extraction ST88-14 cells were harvested and lysed using TRIzol[®] reagent, followed by DNase treatment following the manufacturer's instructions (Life Technologies). DNA was extracted as described (41). Nucleic acid samples were quantified using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer, and RNA integrity was analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis.

One microgram of RNA obtained from all cell cultures was reverse transcribed using VILO following the manufacturer's instructions (Life Technologies) in a final volume of 20 μ l. Real-time PCR was performed using the SYBR Green PCR Master

Mix (Applied Biosystems, Forster City, CA) following the manufacturer's instructions. All primers used in real-time RT-PCR in the present work were designed by our group from sequences of each reference gene using the Primer3 software version 0.4.0. Sequences were validated by the Primer-Blast tool using the human gene bank of the NCBI. The housekeeping hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) primer pair was the only exception, bought from Real Time Primers (Elkins Park, PA). To normalize the relative expression of the genes of interest, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, RPL13 (human ribosomal protein L13), and GAPDH were used as reference genes. Expression values were corrected and quantified by converting the cycle threshold (C_t) value into a numerical value using the following formula: expression value = $2^{(-\Delta C_t)}$.

M. leprae viability was determined as described elsewhere (41) by the 16S rRNA/16S rDNA ratio determined by real-time PCR performed and read in an ABI StepOne Plus Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Evaluation of the Production of Radical Species Using DHE—Schwann cells were maintained in culture under the conditions mentioned above in the absence or presence of 10 μM hydrogen peroxide, 5 μM 6-ANAM, 400 μM BSO, and 50 μM DHE. After being cultured and expanded, 40,000 ST88-14 cells were distributed per well in 24-well plates. After 24 h, cells were exposed to 6-ANAM (inhibitor of G6PDH) or BSO (γ -glutamylcysteine synthetase inhibitor). After 48 h, cells were infected with *M. leprae* or *M. bovis* Moreau with a m.o.i. of 50:1. Seventy hours after seeding, cells were challenged with hydrogen peroxide. Two hours later, cultures were labeled with DHE for 30 min at 37 °C. After 3 washes with cold PBS, cells were harvested with 1% trypsin and transported to a BD FACSAria II (BD Biosciences) in ice-cold PBS plus 10% FBS. Cell suspensions were filtered through a 40- μm net before acquisition. Five thousand events per condition were acquired, and DHE detection was analyzed in PE-A channel after exclusion of events in lumps and dead cells.

Cell Viability—To determine cellular viability, we used two different methods, propidium iodide (PI) microscopy detection and lactate dehydrogenase (LDH) supernatant release. To analyze AMA-treated cells with microscopy, after 36 h of *M. leprae* infection using a m.o.i. of 50:1, coverslip-adherent cells were exposed to AMA at different concentrations for 12 h. After that, 500 nM PI was added to the culture, which was fixed in 4% paraformaldehyde and DAPI stained after 3 PBS washes. We captured 10 random fields per sample using a Zeiss Axio-Observer inverted microscope equipped with a Colibri illuminating system and Plan-Neofluar 40X objective with a numerical aperture of 1.4 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The PI red signal was acquired by a monochrome camera HMR AxioCam controlled by Axiovision software version 3.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany). The illumination system used a 530-nm LED and Zeiss fluorescence filter 50. Metabolism inhibitor toxicity was determined by LDH release in the culture medium supernatant after treatment at the same conditions used in the experiments: 24 h incubation with 400 μM BSO or 5 μM 6-ANAM, using a Quantification Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit (Labtest, MG, Brazil), according to the manufacturer's protocol.

Electron Microscopy of Human Sciatic Nerve Biopsies—Nerve biopsy samples were obtained from leprosy patients and patients suffering from other neuropathies not related with leprosy, at the Souza Araújo Service at the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, and were kept frozen at -70 °C until use. For transmission electron microscopy studies, nerve segments were fixed in 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M cacodylate buffer followed by post-fixation in 1% osmium tetroxide diluted in the same buffer. The segments were then dehydrated in graded increasing acetone concentrations (from 30 to 100%) and embedded in an Epon resin. Ultrathin transverse sections (60 nm thick) of each nerve were obtained using a Reichert ultramicrotome (Heidelberg, Germany), and sections were collected on copper grids and stained for 30 min in uranyl acetate followed by 10 min in lead citrate. For mitochondrial identification and morphometric analysis, electron micrographs were randomly imaged on a transmission electron microscope Zeiss M-10C operating at 60 KV by a blinded investigator. Five different fields from each nerve were acquired at a $\times 5,000$ magnification, and mitochondria profiles were measured in each field using NIH ImageJ software (42). A total of 127 and 157 mitochondrial profiles were analyzed in nerves obtained from leprosy patients and other non-leprosy neuropathy patients, respectively.

G6PDH Silencing—G6PDH knockdown was achieved in ST88-14 cells by transfection with predesigned small interfering RNAs (siRNA s5446 and s5448) (Life Technologies), here identified as G6PDH#1 and #2, respectively. Cells were transfected with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Six hours after transfection, cells were infected with *M. leprae* for 48 h. Both siRNAs were able to reduce G6PDH expression in $\sim 90\%$. In contrast, Schwann cell viability was decreased by 10% only. Silencing efficiency, ST88-14 and *M. leprae* viability were determined as described previously in this section.

Statistical Analysis—The results were represented as the mean \pm S.E. and statistically evaluated by analysis of variance (ANOVA). The values were considered significant when p was equal to or less than 0.05 ($p < 0.05$). For the statistical analysis of this study, we used GraphPad Prism 5 software.

Ethics Statement—All biopsies were acquired for diagnostic purposes before treatment. The acquisition of all samples was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), license number 170/2012. Written informed consent was voluntarily obtained from each participant.

Author Contributions—R. C. A. M. conducted most of the experiments and analyzed the results. L. R. B. S., K. C. V. G., and F. K. L. C. conducted the oxidative stress and *M. leprae* viability experiments shown in Figs. 5 and 6 and analyzed the results. B. S. M., T. G. T. P., and L. R. B. S. contributed to RT-PCR experiments design and data analysis shown in Figs. 1, 3, and 4. L. S. G., L. S. R., M. G., J. J. A., S. L. G. A., S. C. R., and P. S. R. contributed in experiments design, capture, and analysis in FACS, MALDI, and transmission electron microscopy. E. N. S. and J. A. C. N. recruited and diagnosed leprosy patients, collected samples, and contributed to the study design. M. C. V. P., M. S. P., M. F. O., and M. O. M. contributed to the study design. F. A. L. contributed to the study design, coordination, and wrote the paper.

Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *M. leprae*

Acknowledgments—We thank Rudolf Barth, Electron Microscopy Platform of the Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, and Prof. Andre Pedrosa for critical reading and revision.

References

1. WHO. (2015) Weekly epidemiological record. *Wkly. Epidemiol. Rec.* **90**, 461–474
2. Lockwood, D. N., and Suneetha, S. (2005) Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull. World Health Organ.* **83**, 230–235
3. Lobato, L. S., Rosa, P. S., Ferreira Jda, S., Neumann Ada, S., da Silva, M. G., do Nascimento, D. C., Soares, C. T., Pedrini, S. C., Oliveira, D. S., Monteiro, C. P., Pereira, G. M., Ribeiro-Alves, M., Hacker, M. A., Moraes, M. O., Pessolani, M. C., Duarte, R. S., and Lara, F. A. (2014) Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5766–5774
4. Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., et al. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**, 1007–1011
5. Mattos, K. A., Oliveira, V. G., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Pinheiro, R. O., Sarno, E. N., Pessolani, M. C., and Bozza, P. T. (2011) TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J. Immunol.* **187**, 2548–2558
6. Mattos, K. A., Lara, F. A., Oliveira, V. G., Rodrigues, L. S., D'Avila, H., Melo, R. C., Manso, P. P., Sarno, E. N., Bozza, P. T., and Pessolani, M. C. (2011) 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
7. de Mattos, K. A., Sarno, E. N., Pessolani, M. C., and Bozza, P. T. (2012) Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **107**, 156–166
8. Nagy, C., and Haschemi, A. (2015) Time and demand are two critical dimensions of immunometabolism: the process of macrophage activation and the pentose phosphate pathway. *Front. Immunol.* **6**, 164
9. Beutler, E. (1996) G6PD: population genetics and clinical manifestations. *Blood Rev.* **10**, 45–52
10. Siegl, C., Prusty, B. K., Karunakaran, K., Wischhusen, J., and Rudel, T. (2014) Tumor suppressor p53 alters host cell metabolism to limit *Chlamydia trachomatis* infection. *Cell Rep.* **9**, 918–929
11. Luzzatto, L., Usanga, F. A., and Reddy, S. (1969) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science* **164**, 839–842
12. Hsieh, Y. T., Lin, M. H., Ho, H. Y., Chen, L. C., Chen, C. C., and Shu, J. C. (2013) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient epithelial cells are less tolerant to infection by *Staphylococcus aureus*. *PLoS One* **8**, e79566
13. Matthews, G. M., and Butler, R. N. (2005) Cellular mucosal defense during *Helicobacter pylori* infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter* **10**, 298–306
14. Brown, A. M., Evans, R. D., Black, J., and Ransom, B. R. (2012) Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. *Ann. Neurol.* **72**, 406–418
15. Beirowski, B., Babetto, E., Golden, J. P., Chen, Y. J., Yang, K., Gross, R. W., Patti, G. J., and Millbrandt, J. (2014) Metabolic regulator LKB1 is crucial for Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nat. Neurosci.* **17**, 1351–1361
16. Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927) The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530
17. Appelberg, R., Moreira, D., Barreira-Silva, P., Borges, M., Silva, L., Dinis-Oliveira, R. J., Resende, M., Correia-Neves, M., Jordan, M. B., Ferreira, N. C., Abrunhosa, A. J., and Silvestre, R. (2015) The Warburg effect in mycobacterial granulomas is dependent on the recruitment and activation of macrophages by interferon- γ . *Immunology* **145**, 498–507
18. Diaz-Vivancos, P., de Simone, A., Kiddle, G., and Foyer, C. H. (2015) Glutathione-linking cell proliferation to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 1154–1164
19. Palsson-McDermott, E. M., and O'Neill, L. A. (2013) The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *BioEssays* **35**, 965–973
20. Guerreiro, L. T., Róbottom-Ferreira, A. B., Ribeiro-Alves, M., Toledo-Pinto, T. G., Rosa Brito, T., Rosa, P. S., Sandoval, F. G., Jardim, M. R., Antunes, S. G., Shannon, E. J., Sarno, E. N., Pessolani, M. C., Williams, D. L., and Moraes, M. O. (2013) Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One* **8**, e64748
21. Turrens, J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**, 335–344
22. Douki, T., and Cadet, J. (1996) Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic. Res.* **24**, 369–380
23. Stocks, J., and Dormandy, T. L. (1971) The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br. J. Haematol.* **20**, 95–111
24. Mailloux, R. J., and Harper, M. E. (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 1106–1115
25. Pooya, S., Liu, X., Kumar, V. B., Anderson, J., Imai, F., Zhang, W., Ciruolo, G., Ratner, N., Setchell, K. D., Yoshida, Y., Yutaka, Y., Jankowski, M. P., and Dasgupta, B. (2014) The tumour suppressor LKB1 regulates myelination through mitochondrial metabolism. *Nat. Commun.* **5**, 4993
26. Solenski, N. J., diPierro, C. G., Trimmer, P. A., Kwan, A. L., and Helms, G. A. (2002) Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke* **33**, 816–824
27. Halestrap, A. P. (1989) The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria *in vivo* and *in vitro* and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **973**, 355–382
28. Zoratti, M., Szabó, I., and De Marchi, U. (2005) Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim. Biophys. Acta* **1706**, 40–52
29. Rodrigues, L. S., da Silva Maeda, E., Moreira, M. E., Tempone, A. J., Lobato, L. S., Ribeiro-Resende, V. T., Alves, L., Rossle, S., Lopes, U. G., and Pessolani, M. C. (2010) *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell. Microbiol.* **12**, 42–54
30. Wisniewski, H. M., and Bloom, B. R. (1975) Primary demyelination as a nonspecific consequence of a cell-mediated immune reaction. *J. Exp. Med.* **141**, 346–359
31. Scollard, D. M., Truman, R. W., and Ebenezer, G. J. (2015) Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin. Dermatol.* **33**, 46–54
32. Lee, Y., Morrison, B. M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M. H., Hoffman, P. N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P. W., Pellerin, L., Magistretti, P. J., and Rothstein, J. D. (2012) Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* **487**, 443–448
33. Pellerin, L. (2003) Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem. Int.* **43**, 331–338
34. Tekkök, S. B., Brown, A. M., Westenbroek, R., Pellerin, L., and Ransom, B. R. (2005) Transfer of glycogen-derived lactate from astrocytes to axons via specific monocarboxylate transporters supports mouse optic nerve activity. *J. Neurosci. Res.* **81**, 644–652
35. Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J. F., Gourine, A. V., Kasparov, S., and Teschemacher, A. G. (2014) Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat. Commun.* **5**, 3284
36. Masaki, T., Qu, J., Cholewa-Waclaw, J., Burr, K., Raaum, R., and Rambukkana, A. (2013) Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell* **152**, 51–67
37. Domènech-Estévez, E., Baloui, H., Repond, C., Rosafio, K., Médard, J. J., Tricaud, N., Pellerin, L., and Chrast, R. (2015) Distribution of monocarboxylate transporters in the peripheral nervous system suggests putative roles in lactate shuttling and myelination. *J. Neurosci.* **35**, 4151–4156
38. Save, M. P., Shetty, V. P., and Shetty, K. T. (2009) Hypophosphorylation of NF-H and NF-M subunits of neurofilaments and the associated decrease in

- KSPXK kinase activity in the sciatic nerves of Swiss white mice inoculated in the foot pad with *Mycobacterium leprae*. *Leprosy Rev.* **80**, 388–401
39. Chiu, S. Y. (2011) Matching mitochondria to metabolic needs at nodes of Ranvier. *Neuroscientist* **17**, 343–350
40. Bohl, L. P., Liaudat, A. C., Picotto, G., Marchionatti, A. M., Narvaez, C. J., Welsh, J., Rodriguez, V. A., and Tolosa de Talamoni, N. G. (2012) Buthionine sulfoximine and 1,25-dihydroxyvitamin D induce apoptosis in breast cancer cells via induction of reactive oxygen species. *Cancer Invest.* **30**, 560–570
41. Martínez-Gutierrez, M., Castellanos, J. E., and Gallego-Gómez, J. C. (2011) Statins reduce dengue virus production via decreased virion assembly. *Intervirology* **54**, 202–216
42. Abramoff, M. D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J. (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–42

2.1. METODOLOGIA DOS RESULTADOS COMPLEMENTARES CITADOS NO CAPÍTULO II.

Pacientes

O recrutamento de pacientes ocorreu voluntariamente no centro de referência para o tratamento do Ambulatório de Hanseníase Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz-RJ. Os procedimentos incluídos no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fiocruz (Protocolo nº 976.330)

Tabela 1.3. Características demográficas e dados epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo

Grupo	Amostra	Indivíduos(n)	Ensaio	Mulheres	Homens	Idade (Median)
Pacientes com outras neuropatias	Lesão de nervo	8	q-PCR	2	6	61
Pacientes com hanseníase	Lesão de nervo	10	q-PCR	4	6	48

Tabela 1.4 Identificação dos pacientes

ID	Sexo	Idade (anos)	Forma da doença	Ensaio	Amostra
PNH1	H	79	Sem diag.	q-PCR	Nervo Sural
PNH2	H	33	Sem diag.	q-PCR	Nervo Sural
PNH3	H	65	Sem diag.	q-PCR	Nervo Sural
PNH4	M	46	Sem diag.	q-PCR	Nervo Sural
PNH5	H	48	Sem diag.	q-PCR	Nervo Sural
PNH6	H	72	Sem diag.	q-PCR	Nervo Sural
PNH7	M	51	Sem diag.	q-PCR	Nervo Ulnar

PNH8	H	57	Sem diag.	q-PCR	Nervo Ulnar
PNH9	H	67	Sem diag.	q-PCR	Nervo Ulnar
PH1	M	54	Hanseníase	q-PCR	Nervo Sural
PH2	H	20	Hanseníase	q-PCR	Nervo Ulnar
PH3	H	48	Hanseníase	q-PCR	Nervo Sural
PH4	H	67	Hanseníase	q-PCR	Nervo Sural
PH5	H	34	Hanseníase	q-PCR	Nervo sural
PH6	H	X	Hanseníase	q-PCR	Nervo Ulnar
PH7	H	61	Hanseníase	q-PCR	Nervo Fibular
PH8	M	33	Hanseníase	q-PCR	Nervo Sural
PH9	H	43	Hanseníase	q-PCR	Nervo Sural
PH10	M	53	Hanseníase	q-PCR	Nervo Ulnar

*PNH- Pacientes não hansênicos/ *PH- Pacientes com hanseníase

Quantificação de mtDNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o reagente TRIzol. As amostras de ácido nucleico foram quantificadas usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000. A quantificação do mtDNA foi realizada pela adaptação do método descrito por Nicklas et al.(265). O qPCR foi feito usando SYBR Green no StepOne (Life Technologies). Duas regiões foram simultaneamente amplificadas, a mitocondrial (mtCYB) e uma genômica (GAPDH). O mtDNA foi amplificado usando primers para a região mtCYB enquanto a região GAPDH foi usada como housekeeping. A quantificação foi realizada a partir do ciclo limite delta Ct (ΔCt) para obter o número relativo de cópias de mtDNA por amostra.

Tabela 1.5. Sequência de primers usados nas reações de qRT-PCR

Gene	Sequencia (5`-3`)
mtCyB(F)	CTGGGTTTCTTGCTGCATGT
mtCyB(R)	GCCCACATACTTATTGAGAG
GAPDH (F)	AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT
GAPDH(R)	CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA

2.2. RESULTADOS COMPLEMENTARES CITADOS NO CAPÍTULO II

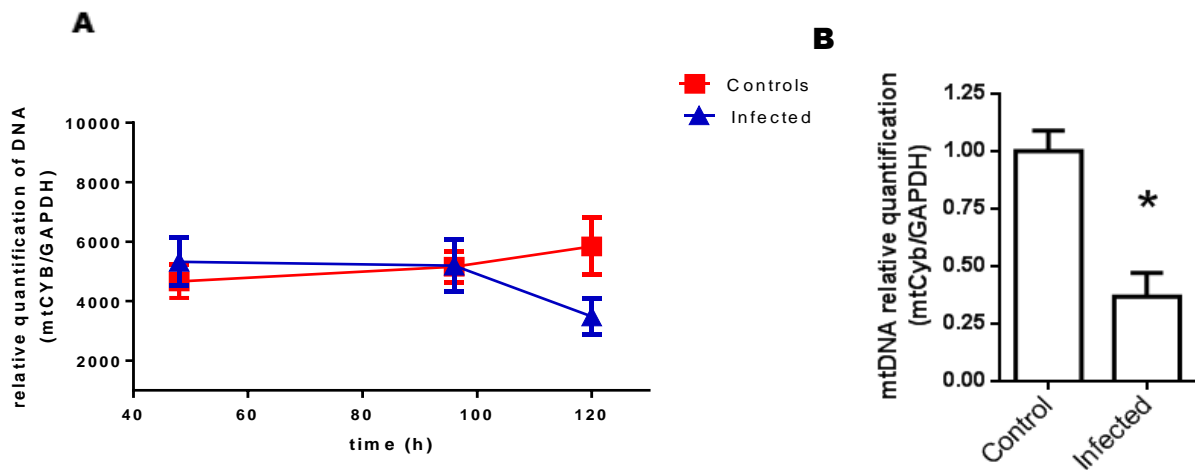


Figura 2.2. *M. leprae* é capaz de diminuir na quantidade de DNA mitocondrial em células de Schwann em 120 horas de infecção. (A) Análise relativa da quantidade de mtDNA utilizando a relação entre um gene mitocondrial (mtCyB) e um genômico (GAPDH) em células infectadas em 48, 96 e 120 horas de infecção **(B)** Análise da quantidade de mtDNA em 120 horas de infecção. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (Erro padrão da média) de três experimentos realizados de forma independente em triplicata. A significância estatística foi calculada por Wilcoxon test (* $p < 0.05$).

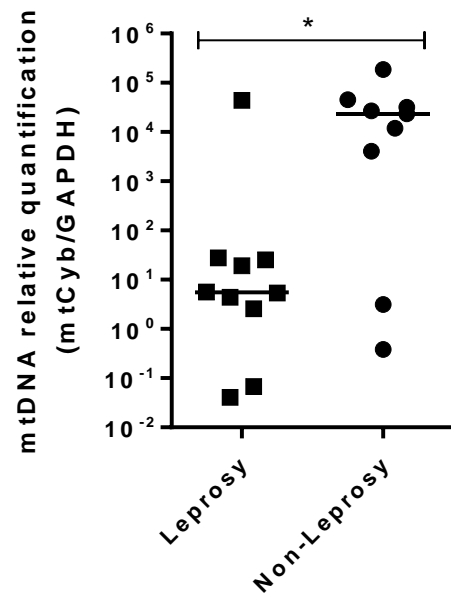


Figura 2.2.2 Diminuição de mtDNA em lesão de nervos de pacientes hansênicos em relação a outras neuropatias. A significância estatística foi calculada por Mann-Whitney test (* p<0.05).

***Capítulo III: Estudo sobre as
variantes de G6PD e potenciais
impactos funcionais na infecção pelo *M.
leprae****

Inúmeras evidências já demonstram que o perfil genético do hospedeiro é crucial para o desenvolvimento da hanseníase (266–268). No presente trabalho, resolvemos avaliar o gene *G6PD* e caracterizar a sua importância para o desfecho da doença. Assim, selecionamos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) candidatos para realizar um estudo de associação caso-controle na hanseníase. Originados na África Subsaariana, as duas variantes selecionadas da *G6PD*, rs1058028 (G202A) e rs1058029 (A376G), mostraram alta frequência na América Latina e juntas formam o haplótipo *G6PD* A⁻. Este, diminuiu drasticamente a estabilidade intracelular da proteína, acarretando 10-60% de diminuição da atividade residual da enzima em relação a enzima selvagem em eritrócitos. É importante ressaltar que este decréscimo é potencializado com a utilização de indutores de ROS como a primaquina. Nossos estudos detectaram que mutações em *G6PD* são mais frequentes em pacientes do Rio de Janeiro, e a variação A376G (rs1050829) está modestamente associada à suscetibilidade à hanseníase no sexo masculino. Interessantemente, usando um modelo *in vitro*, mostramos que os monócitos infectados induziram a expressão e atividade da *G6PD*; no entanto, monócitos com haplótipo A⁻ já apresentam uma expressão basal da enzima aumentada. Detectamos também que os diferentes genótipos de *G6PD* não alteraram significativamente a viabilidade do bacilo. Em resumo, nosso estudo indica que a via *G6PD* é relevante na infecção pelo *M. leprae* também em monócitos, uma vez que observamos maior expressão de *G6PD*, bem como maior atividade da *G6PD* em monócitos infectados pelo patógeno. Além disso, é possível que a manutenção de maiores níveis de RNAm de *G6PD* em monócitos A⁻ sustente a viabilidade do bacilo independentemente do genótipo hospedeiro. No entanto, apesar da modesta associação encontrada na variação A376G em homens, os achados genéticos, pelo menos para os SNPs de *G6PD* testados aqui, não regularam ou impactaram de forma importante os desfechos para a doença. Os dados mencionados anteriormente fazem parte do manuscrito em preparação para submissão apresentado a seguir.

1 **Characterization of human glucose-6-phosphate**
2 **dehydrogenase gene polymorphisms during *Mycobacterium***
3 ***leprae* infection and leprosy predisposition**

4

5 **Rychelle Clayde Affonso Medeiros^{1a}, Ohanna Cavalcanti de Lima-**
6 **Bezerra^{1a}, Leonardo Ribeiro Batista-Silva¹, Fernanda de Souza Gomes**
7 **Kehdy¹, Robertha Mariana Rodrigues Lemes², Karina Girardi de**
8 **Vasconcelos², Thyago Leal Calvo¹, Antonio Guilherme Pacheco³, Flávio**
9 **Alves Lara² and Milton Ozório Moraes¹**

10

11 ¹Laboratório de hanseníase, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, 21040-
12 900, RJ, Brazil. ²Laboratório de Microbiologia Celular, Oswaldo Cruz Institute,
13 Rio de Janeiro, 21040-900, RJ; ³Programa de Computação Científica
14 (PROCC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 21040-900, RJ, Brazil. ^a These authors
15 contributed equally to this work.

16

17 **Corresponding Author**

18 Dr. Milton Ozório Moraes

19 Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz,

20 Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-RJ,

21 Rio de Janeiro, Brazil

22

23 Email: milton.moraes@fiocruz.br

24

25 **Abstract**

26 The rate-limiting of the oxidative part of pentose phosphate pathway
27 (PPP), glucose 6 phosphate (G6PD), is a key component of cellular glucose
28 metabolism. PPP is important to provide precursors for nucleotide biosynthesis,
29 amino acids and reductive power as NADPH to control oxidative stress, lipid
30 synthesis and another anabolic process. Previously, we demonstrate that G6PD
31 gene plays a critical role in *Mycobacterium leprae* survival during Schwann cell
32 infection. Here, we extended these previous findings and selected the G202A
33 (V68M) and A376G (N126D) single nucleotide polymorphisms (SNPs), that
34 generate decreased G6PD activity, to perform a case-control association study
35 with leprosy. Furthermore, we tested whether G6PD SNPs could contribute to
36 decrease in *M. leprae* intracellular survival and regulation of G6PD activity and
37 expression. Contrary to expected, a high frequency of both mutations
38 (G202A=3-8% and A376G=13-16%) were observed in patients (331 men and
39 265 women) from Rio de Janeiro and a modest association with leprosy
40 susceptibility was detected for A376G in males (OR=2.16 (1.02-4.58), $p=0.04$).
41 Besides that, using an *in vitro* model, *G6PD* mutant alleles did not impact the
42 bacillus viability *in vitro*. Interestingly, we showed that *M. leprae* infected
43 monocytes induced *G6PD* expression and elevated G6PD activity. Moreover,
44 monocytes from men carrying both mutant alleles (G202A-A376G) presented a
45 compensatory 4-fold increase in basal enzyme expression. Thus, the present
46 data suggest that an increase of mRNA levels and enzyme activity may
47 maintain *M. leprae* viability in monocytes independent of *G6PD* genotypes
48 highlighting the relevant role of *G6PD* in leprosy infection and importance in
49 future host-target-therapy.

50

51 **Keywords:** leprosy, pentose pathway, G6PD, genetic association,
52 *Mycobacterium leprae*

53

54 **Introduction**

55 Leprosy is a chronic neuropathic disease caused by *Mycobacterium*
56 *leprae* that leads to physical disabilities generated from the relationship
57 between the host cells-bacillus interaction (1,2). *M. leprae* is an intracellular
58 non-cultivable pathogen that undergone genome reduction compared to other
59 mycobacteria and consequently loss many important metabolite pathways (3,4),
60 which led to a dependence on the host metabolic pathways to its survival.
61 Previously, we reported that *M. leprae* activates of glucose-6-phosphate
62 dehydrogenase (G6PD) enzyme, and its pharmacological inhibition or silencing
63 presented a strong impact over bacillus intracellular survival in Schwann cells
64 [\(5\)](#). The *G6PD* is a critical enzyme of the pentose-phosphate pathway (PPP),
65 generating NADPH and ribulose-5 phosphate as main products that can help
66 the bacillus to evade oxidative stress and obtain nucleotides for its replication
67 **(1–4)**.

68 *G6PD* gene is located on X chromosome and presents a high diversity
69 among different populations **(5,6)**. Although most of G6PD mutations do not
70 change the enzyme function, some variants may decrease enzyme activity,
71 leading to G6PD deficiency (G6PDd) **(7)**. This X-linked disorder is very
72 common worldwide. It is characterized by a certain range of enzyme activity
73 where the most severe leads to acute hemolysis, which can be elicited by
74 exposition to oxidative stressors, such as drugs or infection **(8)**. Due to its vital

75 function against oxidative stress in erythrocytes, mutations for G6PDd have
76 been naturally selected among humans as an adaptation against plasmodium
77 infection **(9,10)**. Indeed, the highest frequency of G6PDd is reported in Africa,
78 Mediterranean and Southeast Asia, where populations have endemic malaria
79 **(11)**.

80 The G6PD mutations at positions 202 (exon 4) and 376 (exon 5) is
81 related to activity deficiency and results in the enzyme variant G6PD A⁻
82 (G202A/A376G), characterized by two amino acid substitutions, V68M and
83 N126D (7,12,13). The G6PD A⁻ haplotype reduces the protein intracellular
84 stability and decrease the enzyme activity promoting an deficiency phenotype *in*
85 *vivo* (12,14). This G6PD deficiency may lead to hemolysis, impairing the
86 erythrocytes lifespan and have been selected to protect against malaria in
87 africans endemic areas (15). Thus, these mutations are the most common
88 polymorphic variants associated with G6PD deficiency in Africa population and
89 are increased in Brazil due to colonization patterns (12,15). Furthermore, high
90 frequency of these variants is also reported in the Brazilian population where
91 Plasmodium sp. is endemic, but few studies on the prevalence of these variants
92 have been reported (15).

93 In this present study, we investigated whether variants in G6PD gene
94 could influence leprosy susceptibility. To evaluate this hypothesis, we selected
95 G6PD A⁻ variants - rs1058028 (V68M) and rs1058029 (N126D)- and performed
96 a case-control study stratifying for male and female, since the gene is located at
97 the X chromosome, and tested the association in a Rio de Janeiro population.
98 Finally, we performed functional analysis to investigate a genotype-phenotype

99 correlation by characterizing the influence of G6PD A⁻ haplotype on the survival
100 of *M. leprae* in host cell.

101

102 **Materials and Methods**

103

104 **Subjects and study design**

105 For the case-control study, we used DNA samples from 1.229 individuals
106 including 633 leprosy cases (196 men- mean age 40.3 and 153 women- mean
107 age 43.0) from the Souza Araújo outpatient unit at Oswaldo Cruz Foundation
108 (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil), and 596 unrelated healthy bone marrow
109 donors (331 men- mean age 33.8 and 265 women- mean age 33.8) from the
110 same geographical area as previously reported (16). Leprosy diagnosis was
111 confirmed by clinical, histological and serological features for each patient,
112 which were then classified according to Ridley and Jopling (17) and treated as
113 recommended by World Health Organization. Demographic and clinical
114 characteristics of our sample is summarized in **Supplementary Table 1**. The
115 procedures included in the present study were approved by Human Research
116 Ethics Committee of Fiocruz (Protocol no. 976.330).

117 **SNPs selection and linkage disequilibrium (LD) analysis**

118 In order to select variants with biological relevance in *G6PD* gene, we
119 firstly retrieved SNPs annotation using *ANNOVAR* (18) with refGene hg19 (11
120 dec 2015) from 1000 Genomes phase 3 populations: African (ENS, GWD, LWK,
121 MSL and YRI), Europeans (CEU, FIN, GBR, IBS and TSI) and Amerindians.
122 Then, we performed Principal Components Analysis (PCA) using *EIGENSOFT*

123 4.2 to search for functional SNPs from the main clusters created for PC1 and
124 PC2. Linkage disequilibrium (LD) analysis and haplotype inferences in
125 Europeans and Africans were analyzed by *HAPLOVIEW* (19). SNPs were
126 selected by decreasing values of “SNP weight” for the principal component 1
127 (PC1) and together with the functional annotation based on genomic position,
128 allelic frequency (MAF>5%), LD ($r^2<0.8$) and non-synonymous mutations sorted
129 from literature. Thus, also based on the SNP frequency in Latin American
130 populations (10), we selected the non-synonymous mutations rs1050828 and
131 rs1050829. In addition, the three Brazilian cohort-specific from EPIGEN
132 consortium (90 individuals from Salvador, 88 from Bambuí and 87 from Pelotas)
133 (<https://epigen.grude.ufmg.br>) were consulted to compare haplotype
134 frequencies (20–22).

135 **SNP genotyping and case-control statistical analysis**

136 Genomic DNA (gDNA) was extracted from frozen blood samples by the
137 salting out method (23). Variants (rs1058028 and rs1058029) were genotyped
138 using TaqMan[®] Genotyping Assays designed for allelic discrimination in
139 StepOnePlus[®] Real-Time PCR System (StepOne 2.1 software) following
140 manufacturer’s instructions (Thermo Fisher Scientific). Samples were run in a
141 final volume of 5 μ L (2.5 μ L of the TaqMan Genotyping Master Mix and 0.125
142 μ L of the TaqMan primers and probes). Genotypic, allelic and minor allele
143 carrier frequencies between cases and controls were compared by logistic
144 regression adjusted for covariates gender and ancestry, as described previously
145 (16,24). Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was estimated by Chi-
146 square and it was in agreement in both groups. Odds Ratio (OR) were used to
147 estimate association with leprosy and was calculated in *R* software v. 3.3.1(16),

148 using the package *genetics*. Genomic ancestry from individuals was inferred by
149 46 Indel-Ancestry Informative Markers (AIMs) (25), genotyped in a single
150 multiplex PCR followed by capillary electrophoresis in ABI 3500 Genetic
151 Analyzer (Thermo Fisher), according to the protocol previously described
152 (PKLR, 2018). Individual and population ancestral contributions were estimated
153 by *Structure* v.2.3.3 (26). Individuals with missing genotypes or ancestry
154 information were excluded from the analysis.

155 **Functional assays**

156 **Subjects and study design**

157 For the functional assays, we used DNA samples from 163 health
158 subjects (47 men and 116 women) employees or students of the Oswaldo Cruz
159 Foundation-RJ. The frequencies of the G6PD SNPs and the individuals
160 recruited for the functional assays are summarized in **Supplementary Table 3**.
161 Genotyping for the G6PD SNPs in these samples was according to the
162 methodology described in case-control study. The procedures included in the
163 present study were approved by Human Research Ethics Committee of Fiocruz
164 (Protocol no. 976.330).

165 ***Mycobacterium leprae* purification**

166 *M. leprae* Thai-53 strain (27), originally donated by Dr. James
167 Krahenbuhl (National Hansen's Disease Program, Laboratory Research
168 Branch, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA) was used to infect
169 athymic nude mice bred in the Lauro de Souza Lima Institute (Bauru', São
170 Paulo, Brazil) under germ-free conditions with 10 bacilli in each posterior
171 footpad. After six months the mice were sacrificed by a lethal dose of ketamine

172 (300 mg/Kg) associated with xylazine (30 mg/Kg) (Syntec, São Paulo, Brazil),
173 skin and bones were removed from the footpads aseptically in RPMI medium,
174 and the remaining tissues were cut into small pieces with sterilized scissors and
175 tweezers. The tissues were then gently dissociated for 2 h at 33°C in a solution
176 comprising 15 mg/mL collagenase type I, 7 mg/mL dispase, 50 µg/ mL DNase
177 and 100 µg/mL ampicillin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) dissolved in
178 Milli-Q (Millipore, Darmstadt, Germany) ultrapure water. After digestion, the
179 resultant suspension was transferred to 1.5 mL tubes, centrifuged at 12,000 x g
180 for 5 min and the supernatant was discarded. The pellet was washed twice with
181 1.5 mL water at 12,000 x g for 5 min, resuspended in 0.1 N sodium hydroxide
182 (Sigma, St. Louis, MI, USA) and immediately centrifuged at 12,000 x g for 5
183 min. The purified bacilli were washed twice with 1.5 mL RPMI medium (LGC,
184 Cotia, SP, Brazil) and the pellet was mechanically dissociated by passing the
185 suspension through a 26-gauge needle. *M. leprae* preparations supplemented
186 with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cripion, Andradina, SP, Brazil) were stored
187 for up to 3 days at 4°C. The viability of *M. leprae* was determined by assessing
188 membrane integrity using the LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit (Life
189 Technologies, CA, USA), performed according to the manufacturer's
190 instructions. Bacilli were quantified by direct counting as described by Shepard
191 and McRae (1968) (28).

192

193 **Primary monocytes isolation and infection**

194 Primary monocytes were isolated from healthy donors previously
195 genotyped for our SNPs of interest. The cells were obtained from peripheral
196 blood mononuclear cells (PBMCs) under endotoxin-free conditions by density

197 sedimentation over Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Science, United
198 Kingdom). PBMCs were allowed to adhere in culture flasks (Nunc, USA) for 2h
199 in serum-free RPMI medium at 37 °C. Non-adherent cells were removed by
200 washing with phosphate buffered saline (PBS) solution. Adherent peripheral
201 blood monocytes were cultivated in complete RPMI 1640 medium at 37 °C with
202 5% CO₂. After two hours, cells were infected with *M. leprae* (MOI = 50:1
203 [bacteria/cell]) for 48h.

204 **Total RNA extraction and reverse transcription**

205 Total RNA from primary monocytes was isolated using TRIzol® reagent
206 according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). RNA
207 was DNase-treated by DNA-free kit following the instructions of Thermo Fisher
208 Scientific. RNA integrity was assessed by 1.2% agarose gel electrophoresis.
209 Five hundred nanograms of total RNA were reversely transcribed into cDNA by
210 SuperScript VILO master mix synthesis kit following the manufacturer's
211 instructions (Thermo Fisher Scientific). Before use, cDNA was diluted 50 times
212 in water.

213 **Gene expression analysis by real time RT-PCR**

214 Real time qPCR was performed using Fast SYBR Green master mix
215 according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Primers
216 sequences used are available in the **supplementary table 2**. Data analysis for
217 relative gene expression was carried out using the comparative Ct method (29).

218

219

220 **Molecular determination of *M. leprae* intracellular survival**

221 Intracellular survival of *M. leprae* was estimated by a real time PCR-
222 based method as described elsewhere (30). Briefly, *M. leprae* 16S RNA was
223 detected using the same cDNA generated above. The levels of *M. leprae* 16S
224 RNA were then normalized by the 16S DNA, which was obtained from the
225 preparation used for RNA isolation following the DNA extraction protocol by
226 Thermo Fisher Scientific.

227 **G6PD Activity in primary monocytes**

228 G6PD activity was assayed with 1×10^6 cells after 48 hours of infection in
229 culture and lysed in hypotonic buffer (25 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, pH 7.4).
230 Cell extracts were used 1:2 with enzyme-specific reaction medium containing
231 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) with 5 mM MgCl₂, plus 1 mM glucose 6-phosphate
232 and 0.2 mM NADP⁺. We measured the presence of reduced NADP by
233 determining absorbance at 340 nm using eon high performance microplate
234 Spectrophotometer (BIOTEK).

235

236 **Results**

237 **G6PD A376G (rs1058029) association with leprosy in males**

238 We observed that female leprosy patients from Rio de Janeiro carry
239 higher frequency of heterozygous (AG and GA) compared to controls for both
240 SNPs G202A and A376G (Table 1). However, no significant association with
241 leprosy were observed after ancestry adjustments in this group. Minoritarian
242 alleles were rare, as expected (0% for G202A and 1-2% for A376G). In the male
243 group, the frequency of hemizygous for the mutant allele was not different for

244 G202A but were increased in leprosy patients (16%) for A376G SNP comparing
245 to controls (6%). After covariate adjustment, hemizygous G- (A376G) was
246 associated with leprosy susceptibility (OR=2.16, CI=1.02-4.58, p=0.04),
247 suggesting that G6PD has a modest role on leprosy predisposition in this group.
248 Also, to evaluate the G6PD SNPs in other Brazilian cohorts we assessed the
249 frequency of both variants in EPIGEN and 1000Genomes. Population with
250 higher African ancestry, (Salvador), have the highest frequency for both variants
251 compared to European cohorts (Bambu  and Pelotas) (**Supplementary Table 4**
252 **and 5**).

253 ***M. leprae* induces G6PD expression dependent on the host genotype**

254 Our previous findings demonstrated that G6PD activity is crucial for the
255 intracellular survival of *M. leprae* in Schwann cells. On the present work we
256 observed that *G6PD* expression was also upregulated during infection of
257 macrophages (**Figure 1A**). We also described association between A376G
258 genotype and with leprosy in males (**Table 1**). To address the genotype-
259 phenotype correlation, we isolated primary monocytes from healthy donors
260 previously genotyped for *G6PD* mutations (G202A and A376G), which were
261 clustered in two haplotype groups (G6PD variant A⁻). The female group were
262 represented by those wild-type individuals (GG/AA) and the heterozygous
263 (AG/AG), while the male group compared the wild-type individuals with the
264 hemizygous A-/G-. As expected, mycobacteria significantly increased *G6PD*
265 expression in infected monocytes (**Figure 1A**). However, G6PD expression
266 levels were not significantly different among females GG/AA in comparison to
267 heterozygous AG/AG haplotype (**Figure 1B**). In contrast, primary monocytes
268 from males carrying the haplotype A-/G- exhibited a higher basal G6PD

269 expression (**Figure 1C**). However, it is possible that to maintain active enzyme
270 levels the individuals carrying the haplotype A⁻ increase basal G6PD expression
271 Furthermore, to complete the data, we analyzed the expression of glucose
272 transporter SLC2A1 (GLUT-1) in female monocytes. We detected an extremely
273 significant increase of induction of this transporter in infected monocytes
274 (**Supplementary figure 2**)

275 ***M. leprae* infection in human monocytes upregulate glucose-6-phosphate**
276 **dehydrogenase (G6PD) activity and viability in primary monocytes.**

277 To confirm if the augmented *G6PD* expression was linked with the
278 enzyme activity, we performed an assay to evaluate monocytes G6PD activity
279 by NADPH generation from the same individuals. As expected, mycobacteria
280 significantly increased G6PD activity in infected monocytes (**Figure 2A**).
281 However, G6PD activity levels were not modulated by the different haplotypes
282 among males and females (**Figure 2B**).

283 To address the impact of host haplotypes on antimicrobial mechanisms against
284 mycobacteria, monocytes cells were infected with *M. leprae* with MOI 50:1
285 (**Figure 3 A and B**). G6PD haplotypes did not interfere with bacillus intracellular
286 viability in female (**Figure 3A**) or male primary monocytes (**Figure 3B**) primary
287 monocytes after 48 hours of infection.

288

289

290

291

292 Discussion

293 As intracellular pathogen, *Mycobacterium leprae* is dependent on the
294 host cell metabolism, since key central metabolism genes were evaluatively
295 purged compared during *M. leprae* specialization (31,32). Previously, we
296 showed that *G6PD* increase in expression and activity is crucial for bacillus
297 survival in Schwann cells, suggesting a dependence of the host pentose-
298 phosphate pathway for *M. leprae* growth. Here, in this work, two *G6PD* selected
299 SNPs (G202A and A376G), which generates a decrease of enzyme activity by
300 10-60%, had no association for resistance to leprosy as we expected. On the
301 contrary, a high frequency of both mutations was observed in patients from Rio
302 de Janeiro and a modest association with leprosy susceptibility was detected for
303 A376G in males. Besides that, *G6PD* mutant alleles did not impact the bacillus
304 viability *in vitro*. We believe that a growth of *G6PD* activity caused by bacillus
305 and the increase of the basal expression in monocytes from men carrying both
306 mutant alleles (G202A-A376G) generated a compensatory effect on the number
307 of enzymes active in the A⁺ monocyte.

308 The *G6PD* gene plays a central role in glucose metabolism for living
309 organisms. Here, we evaluate the two most common variants for *G6PD*
310 deficiency in sub-Saharan Africa populations. Although missense, none of the
311 variations induce complete loss of enzyme activity (34), but impact in the
312 intracellular enzyme stability (12)(14,33). *G6PD*-deficient erythrocytes are
313 unable to maintain glutathione reductase homeostasis (GSH) raising an
314 uncontrolled oxidative stress, especially in the presence of reactive oxygen
315 species inducers, such as the antimalarial drug primaquine (15,42,43). Due to
316 the hemolysis, malaria parasite is not able to reproduce inside RBCs (36,37).

317 Thus, mutations in the *G6PD* gene are well described as protective for malaria
318 in Africa (10,11,35) (14,34–36). So, we hypothesized that malaria resistant
319 polymorphism could be associated with leprosy susceptibility. Indeed, a modest
320 risk association for SNP rs1050829 (A376G) with leprosy was observed in our
321 male case-control studies after ancestry adjustments.

322 The hemolysis leads to the release of hemoglobin (Hb) to the blood
323 plasma, which is captured by acute phase proteins such as haptoglobin,
324 forming the Hp-Hb complex (34). The literature already demonstrates that this
325 complex can be internalized in macrophages by the CD163 receptor, protecting
326 the cells from oxidative damage caused by cell-free Hb (35–37). Our previous
327 data indicate that Hb, Hp and CD163 grows in patients with severe lepromatous
328 leprosy (LL) inducing anti-inflammatory pathways and favoring the survival of *M.*
329 *leprae* (38). Within the macrophages, the enzyme heme-oxygenase can act in
330 the heme break and iron release to be used by the mycobacteria. Iron is
331 recognized as a crucial component for mycobacterial survival inside
332 macrophage (39). These hypotheses may help explain the increased frequency
333 of polymorphisms in the patients and the association with the disease
334 demonstrated by SNP1050829 in men. We believe that in the purification of
335 monocytes for *in vitro* experiments, we a number of structures involved in this
336 process, such as haptoglobin. Hence, we did not find significant differences in
337 the viability *in vitro* assays.

338 Our findings revealed that *M. leprae* increased both *G6PD* expression
339 and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity demonstrating that this
340 pathway is also activated in monocytes, where *G6PD* mutations are little or
341 hardly studied (44). The induction of *G6PD* expression did not occur in

342 hemizygous haplotype A- (A-/G-) compared to wild-type, which may be justified
343 because the basal expression of *G6PD* is already high in male group. In
344 general, the variant *G6PD* A⁻ was not able to decrease monocytes *G6PD*
345 expression and enzymatic activity *in vitro*. This may have occurred because
346 monocytes preserve protein synthesis and are able to supply the cell with active
347 enzyme, unlike RBCs, which besides lost dehydrogenases during erythroid cell
348 differentiation (39). However, it is possible that to maintain active enzyme levels
349 the individuals carrying the haplotype A⁻ increase basal *G6PD* expression.
350 Finally, the variant A- did not interfere with intracellular bacillus viability. This is
351 possible since monocytes (A-/G-) and infected cells have higher levels of *G6PD*
352 mRNA, which maintain the level of active enzymes and support the increase in
353 enzyme activity, allowing *Mycobacterium leprae* to survive.

354 In summary, our study indicates that *G6PD* pathway is relevant in *M.*
355 *leprae* infection since we observe higher *G6PD* expression as well as higher
356 *G6PD* activity in monocytes infected with mycobacteria. Regardless of the
357 A376G susceptibility association found in males from Rio de Janeiro, it is
358 possible that the maintenance of higher glucose-6-phosphate dehydrogenase
359 levels / activity in monocytes maintain the viability of the bacillus independently
360 of the host genotype. However, it is clear that *G6PD* play a role during *M. leprae*
361 infection, but it seems that genetic findings and genetic modulation, at least for
362 the SNPs tested here, were not regulating and impacting importantly leprosy
363 outcome.

364

365

366 **References**

- 367 1. Medeiros RCA, Girardi K do C de V, Cardoso FKL, Mietto B de S, Pinto TG
368 de T, Gomez LS, et al. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism
369 by *Mycobacterium leprae*. J Biol Chem. 7 de outubro de
370 2016;291(41):21375–87.
- 371 2. Cho ES, Cha YH, Kim HS, Kim NH, Yook JI. The Pentose Phosphate
372 Pathway as a Potential Target for Cancer Therapy. Biomol Ther. 1º de
373 janeiro de 2018;26(1):29–38.
- 374 3. Horecker BL. The pentose phosphate pathway. J Biol Chem. 13 de
375 dezembro de 2002;277(50):47965–71.
- 376 4. Luzzatto L, Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase
377 Deficiency. N Engl J Med. 15 de 2018;378(11):1068–9.
- 378 5. Yoshida A, Beutler E, Motulsky AG. Human glucose-6-phosphate
379 dehydrogenase variants. Bull World Health Organ. 1971;45(2):243–53.
- 380 6. Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L. DNA sequence abnormalities of
381 human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. J Biol Chem. 5 de
382 março de 1991;266(7):4145–50.
- 383 7. Dombrowski JG, Souza RM, Curry J, Hinton L, Silva NRM, Grignard L, et
384 al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western
385 Brazilian Amazon. Malar J. 15 de 2017;16(1):253.
- 386 8. Beutler E. G6PD deficiency. Blood. 1º de dezembro de 1994;84(11):3613–
387 36.
- 388 9. Ruwende C, Khoo SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkowski D, Gupta S, et
389 al. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in
390 Africa by resistance to severe malaria. Nature. julho de
391 1995;376(6537):246–9.
- 392 10. Howes RE, Piel FB, Patil AP, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al.
393 G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in
394 malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. PLoS Med.
395 2012;9(11):e1001339.
- 396 11. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, Hall SA, Beutler E. The global
397 prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: A
398 systematic review and meta-analysis. Blood Cells Mol Dis. 1º de maio de
399 2009;42(3):267–78.
- 400 12. Gómez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. Structural Defects
401 Underlying Protein Dysfunction in Human Glucose-6-phosphate
402 Dehydrogenase A⁻ Deficiency. J Biol Chem. 31 de março de
403 2000;275(13):9256–62.
- 404 13. Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons JL, Prchal JT. Molecular heterogeneity of
405 glucose-6-phosphate dehydrogenase A⁻. Blood. 15 de novembro de
406 1989;74(7):2550–5.
- 407 14. Babalola O, Cancedda R, Luzzatto L. Genetic Variants of Glucose 6-
408 Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes: Unique Properties
409 of the A⁻ Variant Isolated from “Deficient” Cells. Proc Natl Acad Sci. 1º de
410 abril de 1972;69(4):946–50.
- 411 15. Avalos S, Mejia RE, Banegas E, Salinas C, Gutierrez L, Fajardo M, et al.
412 G6PD deficiency, primaquine treatment, and risk of haemolysis in malaria-
413 infected patients. Malar J. 8 de novembro de 2018;17(1):415.
- 414 16. Marques C de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral

- 415 EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide
416 polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune
417 activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis.* julho de
418 2013;208(1):120–9.
- 419 17. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A
420 five-group system. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.*
421 setembro de 1966;34(3):255–73.
- 422 18. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic
423 variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.*
424 setembro de 2010;38(16):e164.
- 425 19. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization
426 of LD and haplotype maps. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 de janeiro de
427 2005;21(2):263–5.
- 428 20. Victora CG, Barros FC. Cohort profile: the 1982 Pelotas (Brazil) birth
429 cohort study. *Int J Epidemiol.* abril de 2006;35(2):237–42.
- 430 21. Barreto ML, Cunha SS, Alcântara-Neves N, Carvalho LP, Cruz AA, Stein
431 RT, et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other
432 allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal
433 study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA
434 study). *BMC Pulm Med.* 23 de junho de 2006;6:15.
- 435 22. Lima-Costa MF, Firmo JOA, Uchoa E. Cohort profile: the Bambui (Brazil)
436 Cohort Study of Ageing. *Int J Epidemiol.* agosto de 2011;40(4):862–7.
- 437 23. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for
438 extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 11 de
439 fevereiro de 1988;16(3):1215.
- 440 24. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy
441 susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity,
442 and disease outcome. *Future Microbiol.* maio de 2011;6(5):533–49.
- 443 25. Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de
444 Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the
445 genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PloS One.*
446 2013;8(9):e75145.
- 447 26. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure
448 using multilocus genotype data. *Genetics.* junho de 2000;155(2):945–59.
- 449 27. Matsuoka M. The history of *Mycobacterium leprae* Thai-53 strain. *Lepr*
450 *Rev.* junho de 2010;81(2):137.
- 451 28. Shepard CC, McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J*
452 *Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* março de 1968;36(1):78–82.
- 453 29. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the
454 comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101–8.
- 455 30. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et
456 al. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of
457 Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 1º de julho de 2009;47(7):2124–30.
- 458 31. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et
459 al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 22 de fevereiro de
460 2001;409(6823):1007–11.
- 461 32. Miyamoto Y, Mukai T, Matsuoka M, Kai M, Maeda Y, Makino M. Profiling of
462 Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic
463 Physiology of *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis [Internet].* 1º de
464 agosto de 2016 [citado 13 de outubro de 2018];10(8). Disponível em:

- 465 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968842/>
- 466 33. Babalola MO, Imaga NA, Samuel TA, Diriwari IP, Kolade O, Ezeamalu I, et
467 al. Genetic Polymorphisms of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in
468 Lagos, Nigeria. *Hemoglobin*. 2 de janeiro de 2018;42(1):47–50.
- 469 34. Andersen CBF, Torvund-Jensen M, Nielsen MJ, de Oliveira CLP, Hersleth
470 H-P, Andersen NH, et al. Structure of the haptoglobin-haemoglobin
471 complex. *Nature*. 20 de setembro de 2012;489(7416):456–9.
- 472 35. Kosman DJ. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *J Biol*
473 *Chem*. 27 de agosto de 2010;285(35):26729–35.
- 474 36. Mendonça VRR, Luz NF, Santos NJG, Borges VM, Gonçalves MS,
475 Andrade BB, et al. Association between the haptoglobin and heme
476 oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and
477 severity of human malaria. *Infect Immun*. abril de 2012;80(4):1445–54.
- 478 37. Thomsen JH, Etzerodt A, Svendsen P, Moestrup SK. The haptoglobin-
479 CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid Med*
480 *Cell Longev*. 2013;2013:523652.
- 481 38. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V,
482 et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by
483 promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J*
484 *Immunol*. novembro de 2012;42(11):2925–36.
- 485 39. Surgenor DM. *The Red Blood Cell*. Academic Press; 2013. 783 p.

Supplementary Table 1. Demographic and clinical characteristics of the individuals from the case-control study in Rio de Janeiro.

	Female		Male	
	Control (<i>n</i> = 272)	Case (<i>n</i> = 325)	Control (<i>n</i> = 363)	Case (<i>n</i> = 335)
Age, years				
Mean (\pm SD) ^a	26.8 \pm 15.7	43.0 \pm 14.4	33.8 \pm 11.7	40.3 \pm 14.2
Ancestry, <i>n</i>^b (%)	<i>n</i> = 258	<i>n</i> = 141	<i>n</i> = 320	<i>n</i> = 206
African	0.17	0.29	0.18	0.30
European	0.71	0.58	0.70	0.56
Native-american	0.12	0.13	0.11	0.13
WHO classification, <i>n</i>^b (%)				
Paucibacillary	-	0.53 (173)	-	0.37 (124)
Multibacillary	-	0.47 (152)	-	0.63 (211)

^a Standard deviation

^b Number of individuals with available information. The number of genotyped individuals may be different from the total number due to missing information.

Table 1. Logistic regression for SNPs G202A and A376G in population from Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro									
G202A (rs1050828)					A376G (rs1050829)				
Male	CONTROLS N = 321	CASES N = 196	OR (IC) <i>p</i> value	OR (IC) <i>p</i> value*	Male	CONTROLS N = 331	CASES N = 159	OR (IC) <i>p</i> value	OR (IC) <i>p</i> value*
G-	311 (0.97)	184 (0.94)	-	-	A-	310 (0.94)	134 (0.84)	-	-
A-	10 (0.03)	12 (0.06)	2.02 (0.85-4.78) 0.10	1.31 (0.46-3.73) 0.60	G-	21 (0.06)	25 (0.16)	2.75 (1.48-5.09) 0.001	2.16 (1.02-4.58) 0.04
Female	CONTROLS N = 264	CASES N = 125	OR (IC) <i>p</i> value	OR (IC) <i>p</i> value*	Female	CONTROLS N = 265	CASES N = 153	OR (IC) <i>p</i> value	OR (IC) <i>p</i> value*
GG	241 (0.91)	104 (0.83)	-	-	AA	225 (0.85)	114 (0.75)	-	-
GA	22 (0.08)	21 (0.17)	2.21 (1.16-4.19) 0.01	1.17 (0.44-3.14) 0.74	AG	36 (0.14)	36 (0.24)	2.00 (1.18-3.39) 0.009	1.37 (0.65-2.90) 0.40
AA	1 (0.00)	0 (0.00)	NA	NA	GG	4 (0.02)	3 (0.02)	1.09 (0.19-6.05) 0.91	0.69 (0.06-6.94) 0.75
Allele G	504 (0.95)	229 (0.92)	-	-	Allele A	486 (0.92)	264 (0.86)	-	-
Allele A	24 (0.05)	21 (0.08)	1.92 (0.81-4.53) 0.13	1.07 (0.29-3.99) 0.91	Allele G	44 (0.08)	42 (0.14)	1.71 (0.88-3.29) 0.10	1.18 (0.47-2.95) 0.72
A carrier	23 (0.08)	21 (0.17)	2.11 (1.12-3.99) 0.02	1.13 (0.42-3.00) 0.80	G carrier	40 (0.16)	39 (0.26)	1.91 (1.14-3.18) 0.01	1.29 (0.62-2.68) 0.48

Male study presented 363 controls and 335 patients. Female study have 272 controls and 325 patients.

**p*-value adjusted for sex and ancestry. Significant *p*-values are in bold.

NA=logistic regression was not possible due to low frequency of the SNP

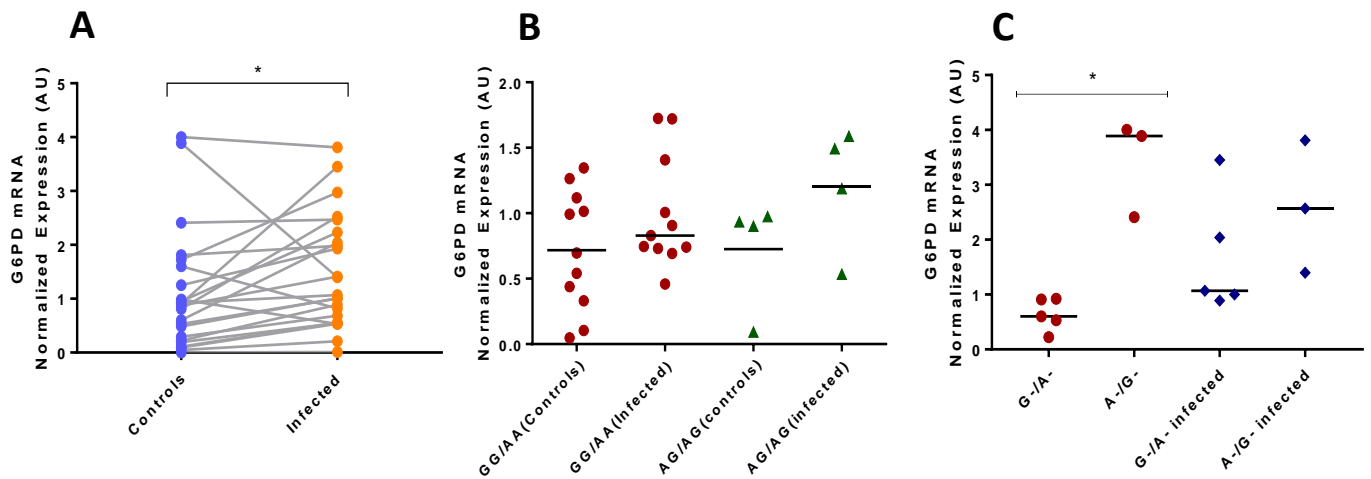


Figure 1. *M. leprae*-infected human monocytes increase the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) depended of host genotype. (A) G6PD expression in human primary monocytes isolated from healthy donors after 48 hours of *M. leprae* infection (MOI 50.1) **(B)** G6PD expression in female infected-monocytes comparing the G6PD SNPs - rs1050828/rs1050829 genotypes **(C)** G6PD expression in male infected-monocytes comparing the G6PD SNPs - rs1050828/rs1050829 genotypes. Comparisons between control and infected were performed using the Wilcoxon test (* $p = 0.05$). Comparisons between genotypes were performed using the Mann Whitney test (* $p = 0.05$).

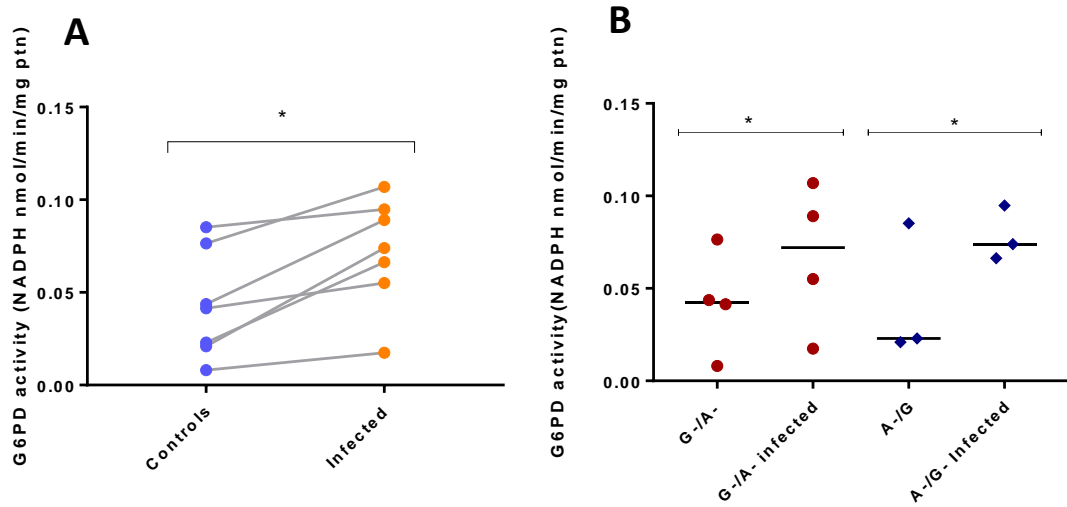


Figure 2. *M. leprae*-infected human monocytes increase the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) independent of host genotype. (A) G6PD expression in human primary monocytes isolated from healthy donors after 48 hours of *M. leprae* infection (MOI 50.1) **(B)** G6PD expression in men human primary monocytes comparing the G6PD SNPs - rs1050828/rs1050829 genotypes. Comparisons between control and infected were performed using the Wilcoxon test (* $p = 0.05$)

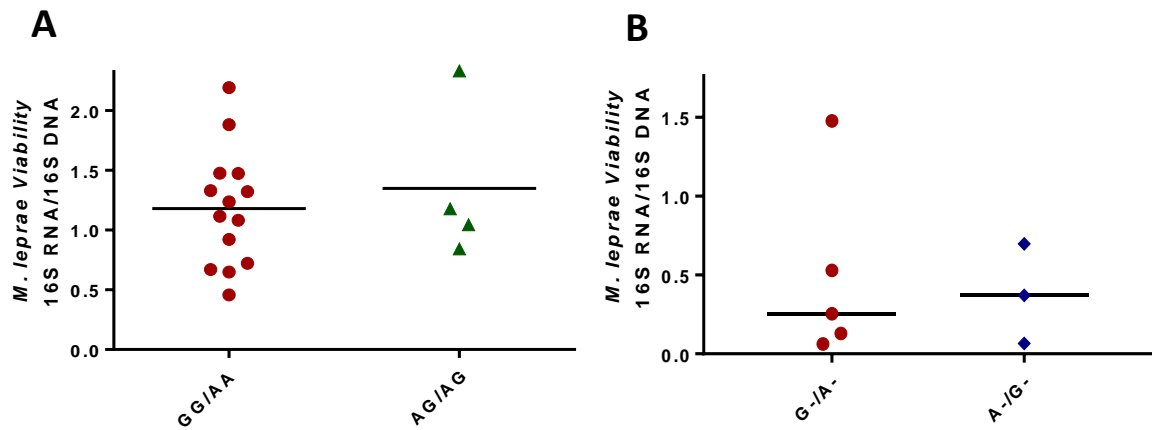


Figure 3. The host genotype does not interfere with the viability of the bacillus in primary monocytes. Intracellular survival of *M. leprae* in human primary monocytes isolated from healthy donors after 48 hours of infection (MOI 50.1) **(A)** In women primary monocytes comparing different G6PD SNPs (*rs1050828/ rs1050829*) **(B)** In men primary monocytes comparing different G6PD SNPs (*rs1050828/ rs1050829*).

Supplementary Table 2. Primers sequences used in qRT-PCR reactions

Primer (5'-3')	Forward	Reverse
16S	GCATGTCTTGTGGTGGAA AGC	CACCCCACCAACAAGCTGAT
G6PD	AGAGCTTTTCCAGGGCGAT	CACCAGATGGTGGGGTAGAT
SLC2A1	TCTGGCATCAACGCTGTCTT	TGACGATACCGGAGCCAATG

Supplementary Table 3. Frequency of G6PD SNPs (rs1050828/ rs1050829) in health subjects of Oswaldo Cruz foundation and individuals recruited for functional assays.

rs1050828					rs1050829				
Males	Alleles	Individuals ^a = 47	functional assays ^b = 9	Mean Age ^c	Males	Alleles	Individuals ^a = 46	functional assays ^b = 9	Mean Age ^c
G6PD Normal	G-	44 (0.93)	6	37.6	G6PD Normal	A-	39 (0.84)	6	37.6
Hemizygous	A-	3 (0.06)	3	32.3	Hemizygous	G-	10 (0.152)	3	32.3
Females	Genotype	Individuals ^a = 116	functional assays ^b = 18	Mean Age ^c	Females	Genotype	Individuals ^a = 18	functional assays ^b = 18	Mean Age ^c
Homozygous	GG	101 (0.87)	13	30.85	Homozygous	AA	91 (0.78)	13	30.85
Heterozygous	GA	10(0.08)	4	29.75	Heterozygous	AG	21 (0.18)	4	29.75
Homozygous	AA	1 (0.008)	-	-	Homozygous	GG	1(0.08)	-	-

^aTotal genotyped individuals

^b Individuals recruited for functional assays

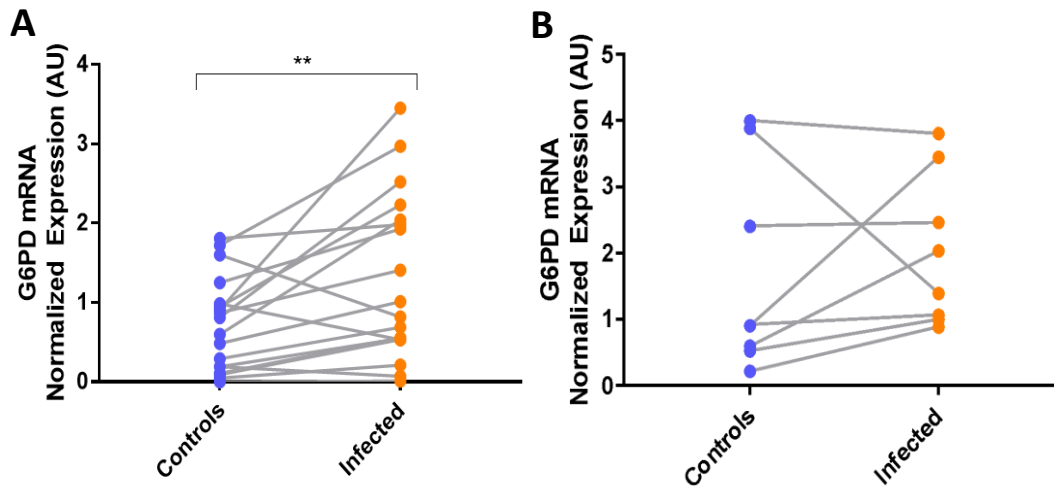
^c Mean age of the individuals recruited for the functional assays

Supplementary Table 4. Frequency of G6PD rs1050828 (pVal98Met) genotype in different populations from *1000 genomes* and *Epigen* databases

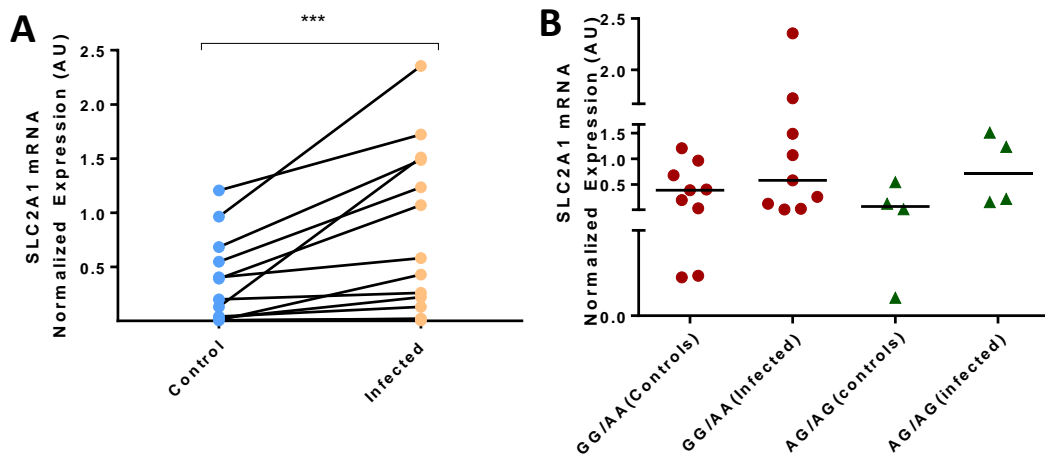
		1000 Genomes		Epigen		
Males	Genotype/ Allele	AFR (YRI) N_{TOT} = 52	EUR (CEU) N_{TOT} = 49	BambuÍ (N=52)	Salvador (N=47)	Pelotas (N=47)
G6PD Normal	G-	40 (0.76)	49 (1.00)	0.98	0.91	0.99
Hemizygous	A-	12 (0.23)	0 (0.00)	0.02	0.09	0.01
Females		AFR (YRI) N_{TOT} = 56	EUR (CEU) N_{TOT} = 50	BambuÍ (N=52)	Salvador (N=47)	Pelotas (N=47)
Homozygous	GG	36 (0.64)	50 (1.00)	0.96	0.81	0.98
Heterozygous	GA	18 (0.32)	0 (0.00)	0.04	0.19	0.02
Homozygous	AA	2 (0.03)	0 (0.00)	0.00	0.00	0.00
Allele	G	90 (0.45)	100 (1.00)	0.98	0.91	0.99
Allele	A	22 (0.55)	0 (0.00)	0.02	0.09	0.01

Supplementary Table 5. Frequency of G6PD **rs1050829** (p. Asn126Asp) genotype in different populations from *1000 genomes* and *Epigen* databases

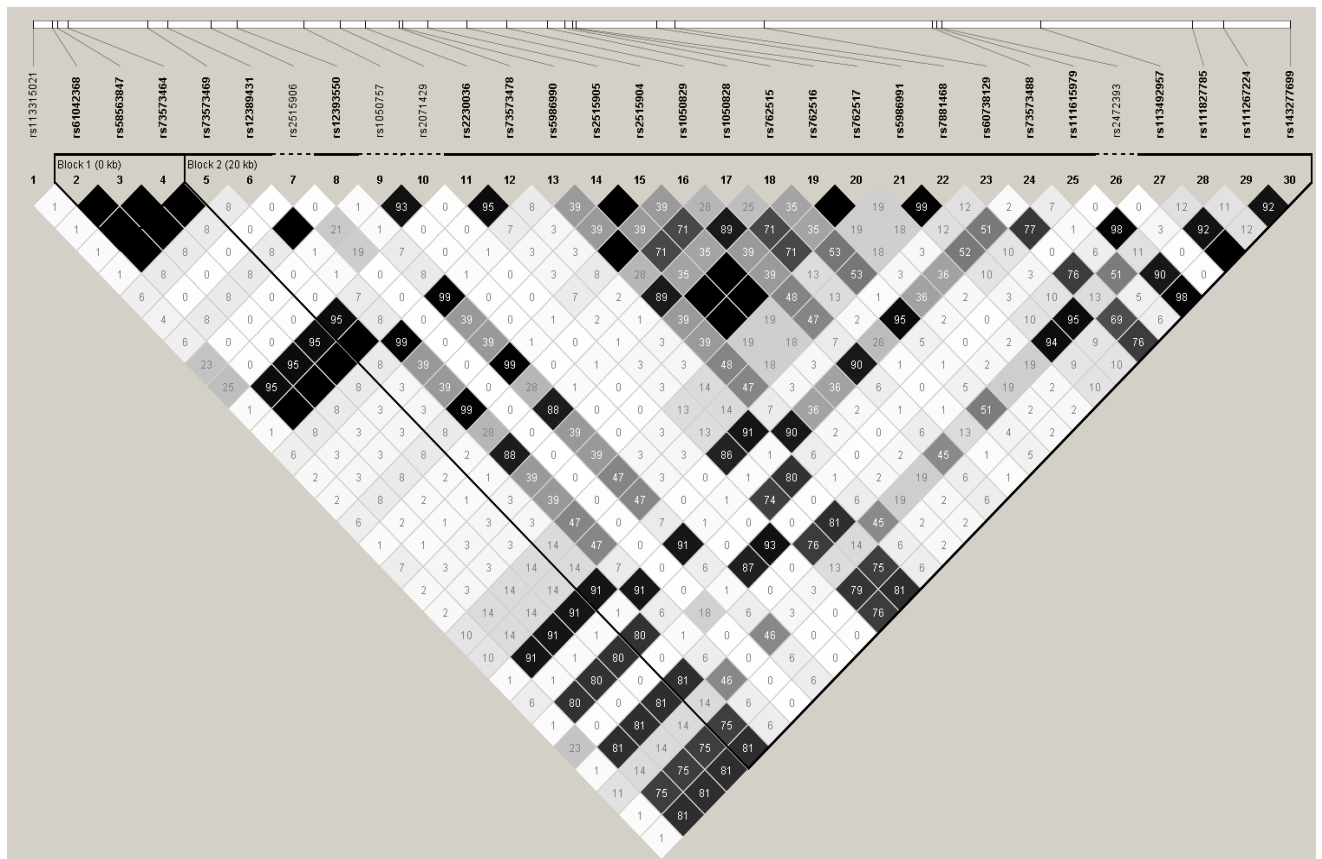
		1000Genomes		Epigen		
Males	Genotype/Allele	AFR (YRI) N _{TOT} = 52	EUR (CEU) N _{TOT} = 49	BambuÍ (N=52)	Salvador (N=47)	Pelotas (N=47)
G6PD Normal	A-	31 (0.59)	49 (1.00)	0.94	0.79	0.95
Hemizygous	G-	21 (0.40)	0 (0.00)	0.06	0.21	0.05
Females		AFR (YRI) N _{TOT} = 56	EUR (CEU) N _{TOT} = 50	BambuÍ (N=52)	Salvador (N=47)	Pelotas (N=47)
Homozygous	AA	22 (0.39)	50 (1.00)	0.90	0.60	0.92
Heterozygous	AG	27 (0.48)	0 (0.00)	0.10	0.38	0.08
Homozygous	GG	7 (0.12)	0 (0.00)	0.00	0.02	0.00
Allele	A	71 (0.63)	100 (1.00)	0.95	0.79	0.96
Allele	G	41 (0.37)	0 (0.00)	0.05	0.21	0.04



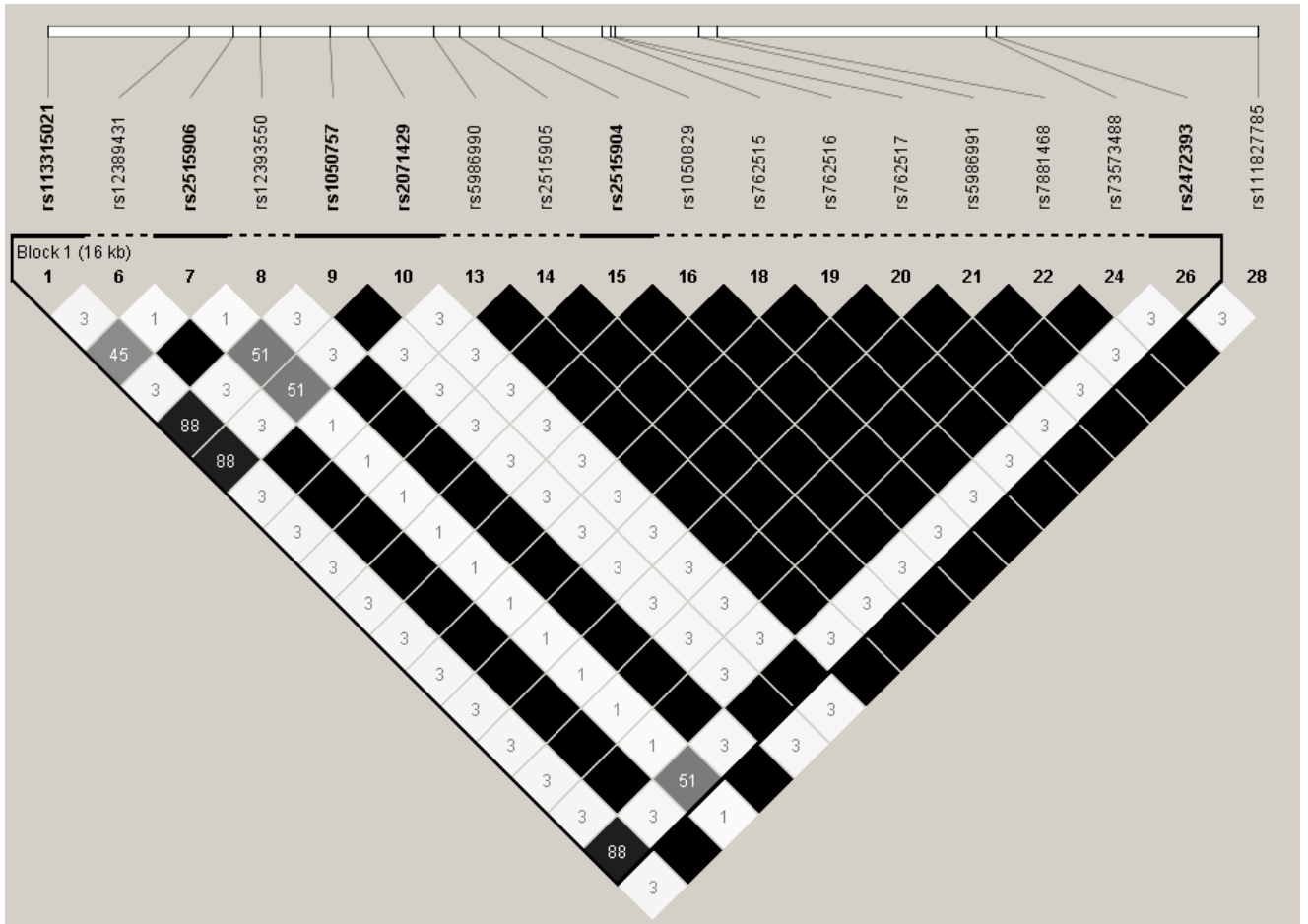
Supplementary figure 1. G6PD expression in primary monocytes. (A) G6PD expression in female primary monocytes **(B)** G6PD expression in man primary monocytes. Comparisons between control and infected were performed using the Wilcoxon test (** $p < 0.05$).



Supplementary figure 2. *M. leprae*-infected human monocytes increase the expression of glucose transporter GLUT-1 (*SLC2A1*). (A) SLC2A1 expression in female human monocytes after 48 hours of *M. leprae* (MOI 50.1) infection. (B) SLC2A1 expression in female infected-monocytes comparing the G6PD SNPs - rs1050828/rs1050829 genotypes. Comparisons between control and infected were performed using the Wilcoxon test (***p < 0.0005).



Supplementary Figure 3. Linkage disequilibrium analysis of *G6PD* candidate SNPs in African



Supplementary Figure 4. Linkage disequilibrium analysis of *G6PD* candidate SNPs in European

Capítulo IV: Discussões e conclusões

1. DISCUSSÃO

O *Mycobacterium leprae* é capaz de promover inúmeras alterações no perfil característico de suas células hospedeiras (100–103,109). A infecção das células de Schwann sabidamente promove a sobrevivência, mudança para um estágio amielínico e rejuvenescimento (102). Apesar de todos esses aspectos serem extremamente abordados pela literatura, alterações do metabolismo destas células que acompanham essa plasticidade fenotípica durante a infecção foram pouco ou nada abordados durante mais de cem anos de detecção do patógeno.

Apesar do seu reconhecido e clássico papel na manutenção dos níveis de ATP celular, a mitocôndria é uma organela multifuncional atuando em diversas atividades da célula (269). De fato, fomos pioneiros em avaliar as alterações desta organela decorrentes da presença do *M. leprae* na célula. A mitocôndria é uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio nas células (270). Vários complexos respiratórios vazam elétrons ao oxigênio, produzindo principalmente ânion superóxido e conseqüentemente elevando os níveis de peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, ambos oxidantes fortes que reagem indiscriminadamente com DNA, proteínas e lipídeos (271,272). É possível que o *bacilo* na tentativa de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (127), permita o desacoplamento mitocondrial para se proteger do estresse oxidativo na célula, uma vez que proteínas desacopladoras, como a UCP-1 (uncoupling protein 1) diminui drasticamente as emissões de ROS e que é reconhecidamente ativada por ácidos graxos (273,274). Essa macromolécula (UCP-1) é amplamente expressa e tem importância reconhecida no tecido adiposo marrom (275) e elucubramos que o *M. leprae* possa de certa forma influenciar nos níveis desta proteína nas CS.

Acompanhando a diminuição do potencial elétrico mitocondrial, detectamos uma diminuição de DNA mitocondrial em 120 horas de infecção (**Figura 2.1A** apresentada no capítulo II). De certa forma, acreditamos que os problemas ocasionados nas mitocôndrias podem estar relacionados com a desmielinização característica da doença, uma vez que o ciclo de Krebs está envolvido com a produção de mielina (276). Além disso, estudos recentes

demonstraram que prejuízos ou falta de uma maquinaria ideal de mitofagia podem levar danos mitocondriais liberarem mtDNA (277). Não fomos capazes ainda de determinar todos os mecanismos mitofágicos nas CS, porém reconhecemos que uma possível liberação de mtDNA poderia ser uma forma interessante do bacilo promover um nicho favorável à sua sobrevivência pela intensificação da indução de IFN tipo I (278). O *M. leprae* é capaz de ativar a via através reconhecimento de DNA por sensores citoplasmáticos de ácidos nucleicos como cGAS (117,124). A indução da via de IFN- tipo I é normalmente crítica para formação de uma resposta antiviral, porém, a sua participação em infecções por bactérias intracelulares parece ser essencial para a sobrevivência desses organismos (264). Os sensores citoplasmáticos de DNA como o cGAS são promíscuos, ligando-se a qualquer DNA dupla fita incluindo o mitocondrial.

Para os mecanismos que geram a diminuição do potencial elétrico mitocondrial (**Figura 2G** do artigo apresentado no capítulo II) apresentados outras hipóteses baseadas na observação dos nossos resultados. Nosso grupo observou o efeito de forma mais significativa em células expostas ao *M. leprae* viável, o que direcionou a análise dos mecanismos de virulência do bacilo envolvidos com seu metabolismo / mecanismos de escape. A primeira hipótese envolve o fator de virulência ESAT-6 (279). A RD-1 é uma região do genoma micobacteriano responsável por codificar fatores intrínsecos à sua virulência. Esta região é responsável por codificar as proteínas CFP-10 (do inglês 10- KDa culture filtrate protein) e ESAT-6 (“6kDa early secreted antigenic”) (280). A Cepa de BCG não apresenta essa região, não sendo capaz de atingir o citosol da célula hospedeira e por esse motivo é considerada não patogênica (281). Estudos já demonstraram que ESAT-6 é capaz de abrir poros nas membranas dos fagossomos contendo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo este um mecanismo utilizado pelo bacilo para evadir de ambientes hostis, característica já demonstrada também pelo *M. leprae* (282). Infecções em células HeLa com *Lysteria monocitogenes* revelaram modulação e disfunção mitocondrial através da toxina formadora de poros listeriolisina O, de função homóloga à ESAT-6 do *M. leprae* (256). Acreditamos então que o bacilo, ao ativar os seus fatores de virulência pode abrir poros na membrana interna mitocondrial através da ESAT-6, provocando dessa forma desacoplamento, queda do potencial elétrico

mitocondrial e posterior diminuição das mitocôndrias, gerando pôr fim a redução nos níveis de DNA mitocondrial e expressão dos genes mitocondriais observados por nosso grupo anteriormente (264).

Apesar dos dados *in vitro* demonstrarem modulações na fisiologia mitocondrial das células de Schwann, não encontramos modulações nas CS de nervo sural ou ulnar de pacientes hansênicos. Em princípio esse efeito já era esperado por nós uma vez que o bacilo é capaz de induzir IGF-1 nas células infectadas e impedir a apoptose (109). Em contrapartida a esses achados, observamos inchaço nas mitocôndrias axonais mielinicas e não mielínicas das fibras axonais dos pacientes com hanseníase sem qualquer sinal de infiltrado inflamatório, desmielinização ou fibrose (**Figura 2K e 2L** do artigo apresentado no capítulo II). Resultados adicionais do nosso grupo demonstraram uma diminuição de DNA mitocondrial em nervos de pacientes com hanseníase em detrimento a outras neuropatias (**Figura 2.2** apresetnada no capítulo II). O inchaço mitocondrial é marca da abertura de poros de permeabilidade mitocondrial, que dependendo do insulto, pode ocasionar apoptose (283–285), assim, acreditamos que os impactos causados na mitocôndria podem direcionar outros mecanismos envolvidos na lesão neural que é característica da hanseníase. Como as células de Schwann são responsáveis pelo envio de metabólitos, como lactato para os axônios, acreditamos que a diminuição do envio de lactato pode estar promovendo o inchaço e perda de DNA mitocondrial (**Figura 3.3B**- Anexos) e propiciando a morte axonal.

Acompanhando a atuação de *M. leprae* nas mitocôndrias das células infectadas, detectamos a diminuição dos níveis de lactato no sobrenadante das células infectadas (**Figura 3A** do artigo apresentado no capítulo II). Esta diminuição pode ser considerada impactante e inesperada pelo nosso grupo. Diante do fenótipo mitocondrial danoso (**Figura 2C e 2G** do artigo apresentado no capítulo II) e modulações ocasionadas por patógenos discutidas na introdução deste trabalho, acreditávamos em uma reprogramação da célula infectada para o famoso efeito Warburg. Além disso, os transportadores de lactato apresentaram aumento nos níveis de RNAm nas CS infectadas pelo *M. leprae* (**Figura 3H** do artigo apresentado no capítulo II). De fato, não sabemos

se este aumento é uma forma de compensar a diminuição de lactato produzido dentro da célula, tentando exportar o máximo possível de moléculas (lactato), ou de transportar mais lactato do meio extracelular para o meio intracelular estabelecendo os requisitos metabólicos da célula. Este último tópico só entra em discussão porque os transportadores de monocarboxilatos (MCTs) são capazes de fazer o transporte de lactato em ambas as direções. De toda forma, resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa utilizando lactato radioativo demonstrou que grande parte dos carbonos provenientes do lactato foram detectados em glicerídeos como diacilgliceróis e triacilgliceróis. Dessa forma, acreditamos que o carbono a ser exportado na forma de lactato está sendo reutilizado na exacerbada síntese de lipídeos sabidamente modulada pelo patógeno (127,131,132).

O aumento da captação de glicose avaliada pela internalização de 2-NBDG e acompanhada pelo aumento da expressão do receptor GLUT-1 em células de Schwann infectadas foi um dos grandes efeitos detectados neste trabalho (**Figura 1** do artigo apresentado no capítulo II). A magnitude do IGF-1 na infecção demonstrada em estudos anteriores ao nosso, nos fez questionar a relevância deste na modulação metabólica direcionada pelo bacilo. O IGF-1 faz parte do grupo de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFS), podendo apresentar efeitos em crescimento, proliferação, prevenção de apoptose, diferenciação celular e metabolismo energético (286,287). Estudos já comprovaram sua participação no aumento de transportadores de glicose do tipo GLUT-1 e GLUT-4 (154). Ensaio do nosso grupo demonstraram que o IGF-1 recombinante foi capaz de induzir em 24 horas o aumento da captação de glicose e expressão de GLUT-1(SLC2A1) nas células de Schwann da linhagem ST8814 (**Figura 3.1**- anexos). Além disso, resultados preliminares demonstraram que o efeito foi revertido com a utilização do neutralizante do receptor do tipo 1 de IGF-1 (IGF-IR) (**Figura 3.1D** -anexos). Assim, acreditamos que a sinalização por IGF-1 está relacionada ao aumento da captação de glicose e aumento da expressão do receptor GLUT-1 em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. Nós analisamos também de forma preliminar a atuação de mTOR nestas células infectadas. Para além da sua importância no controle do crescimento celular, o mTOR tem sido relacionado a inibição da autofagia e aumento da captação e

metabolização de glicose (288,289). Nós detectamos que as células de Schwann infectadas apresentaram indução da expressão de mTOR (**Figura 3.2A-** anexos) e que a utilização de rapamicina, seu potente inibidor, foi capaz de diminuir a viabilidade do bacilo (**Figura 3.2B-** anexos). Além disso, utilizamos como comparação a metformina (**Figura 3.2B-**anexos), um fármaco amplamente utilizado para diabetes tipo II e que é capaz de inibir fracamente o complexo mTOR através da ativação de AMPK (290). A princípio acreditamos que a participação da metformina no aumento da captação de glicose da célula tenha sido favorável a sobrevivência do bacilo e por isso a viabilidade se manteve. É importante ressaltar que o receptor IGF-1R e mTOR já estão vinculados na literatura científica através da via IGF-1R- PI3K-Akt- mTOR já descrita na ativação e migração de células cancerosas (291,292). De fato, acreditamos que a ativação destas moléculas pode estar interligada e o bacilo pode estar modulando o metabolismo celular, a apoptose ao mesmo tempo que foge de mecanismos microbicidas, como a autofagia. Além disso, é imprescindível discutir que alguns estudos já demonstram a participação do fator de virulência ESAT-6 encontrado em *M. tuberculosis* e *M. leprae* nestes processos de internalização de glicose (129,293). O estímulo com ESAT-6 recombinante é capaz de aumentar os níveis de captação de 2-NBDG e expressão de GLUT-1 em macrófagos da linhagem THP-1 (293). Os mecanismos de ativação dessa captação ainda continuam pouco conhecidos, mas tornam ESAT-6 também um bom alvo para futuros estudos que procurem desvendar os mecanismos que ativam as modulações encontradas por nós neste trabalho.

A infecção pelo *M. leprae* já é reconhecida por induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF (14,294–297), que por sua vez induzem ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Ao longo de 50 anos, a literatura demonstrou a importância de ROS na morte de patógenos intracelulares (298). Assim, torna-se interessante o *M. leprae*, sendo um patógeno intracelular, controlar os níveis de ROS para a sua sobrevivência. A partir destas considerações, conseguimos explicar os dados referentes ao aumento de atividade e expressão de G6PD e enzima málica (**Figura 4A, C, D, G e I** do artigo apresentado no capítulo II) tanto em amostras oriundas de células como em lesões de pele e nervo de pacientes. Essas enzimas são grandes

produtoras de poder redutor na forma de NADPH, que pode ser utilizado por GSR (**Figura 4K** do artigo apresentado no capítulo II) para manter o sistema glutationa e controlar ROS intracelular. A partir destes resultados, o nosso grupo investiu em determinar a importância de G6PD para a infecção utilizando inibidores enzimáticos (6-AN) e silenciamento gênico. O silenciamento de aproximadamente 80% do gene, foi capaz de diminuir em 50% a viabilidade do bacilo e demonstrou a sua importância na infecção em CS, uma célula que apresenta a expressão de outras desidrogenases, como a enzima málica para a produção de NADPH. A dependência da via das pentoses foi claramente perceptível no efeito protetor ao estresse oxidativo ocasionado pela infecção na presença de peróxido (**Figura 5** do artigo apresentado no capítulo II). Além disso, utilização de do inibidor 6AN foi capaz de reverter os efeitos anteriormente encontrados, como diminuição da liberação de lactato (**Figura 6A** do artigo apresentado no capítulo II) e potencial elétrico mitocondrial (**Figura 6B** do artigo apresentado no capítulo II), e diminuiu a viabilidade intracelular do bacilo em aproximadamente 70% (**Figura 6C e 6D** do artigo apresentado no capítulo II).

A indução de G6PD nas células de Schwann está em conformidade com a plasticidade fenotípica causada pelo bacilo nestas células. Como já discutido na introdução, o bacilo induz as CS para um perfil de célula tronco, proliferativo e, assim, o aumento de G6PD permite mais recursos, como nucleotídeos e diminuição do estresse oxidativo, para a proliferação (107). É possível que o bacilo utilize esses nucleotídeos produzidos pela célula hospedeira para a sua própria replicação, uma vez que um estudo demonstrou a diminuição de metabólitos da via das pentoses, como a ribulose-5-fosfato no *M. leprae* em relação ao *M. Bovis* (205). A ribulose-5-fosfato, produto da via das pentoses, tem grande relevância na formação de D-arabinose que é um importante componente da arabinogalactana, e desta forma participa da formação da parede de micobactérias (203). Em *Mycobacterium smegmatis* foi comprovado que este metabólito é produzido pela via das pentoses fase não oxidativa (204). Porém, seria crucial detectar os possíveis destinos desta molécula no *M. leprae* e determinar se a ribulose-5 fosfato produzida pelo hospedeiro pode ser direcionada para a síntese da parede celular do bacilo.

Como já mencionado anteriormente, a G6PD pode ser induzida pela alta demanda de lipídios na célula. A formação de corpúsculos lipídicos é essencial para a sobrevivência do patógeno, sendo assim, esta indução, também entra em conformidade com a necessidade da formação destes compostos na célula infectada. Muitos estudos nos últimos trinta anos mostraram que a G6PD é altamente regulada ao nível transcrição, tradução, pós-tradução e localização intracelular, para que seja a alvo a jusante de muitas vias de sinalização (189). Como reguladores positivos do gene, encontramos os fatores de transcrição de classe de ligantes de elemento regulador de esteróis (SREBPs) (189,190). O interessante é que um estudo anterior demonstrou níveis mais elevados da forma ativa destes fatores em biópsias de pele de pacientes da forma lepromatosa (LL) (299). Os SREBPs são os principais reguladores da biossíntese lipídica e captação de colesterol (300) e sua atuação na indução de G6PD é mediada pela ativação do complexo mTORC 1(190). O mTOR tem sido cada vez mais relacionado como modulador da infecção causada pelo *M. tuberculosis* (259,301) e já encontramos seus níveis aumentados em células infectadas (**Figura 2.2-** anexos)

Devido ao seu protagonismo nos nossos resultados e o desbalanço epidemiológico com mais homens detectados com a doença, G6PD, tornou-se um excelente alvo para estudos de proteção/ susceptibilidade a hanseníase. Estudos anteriores já demonstraram que a relevância do genótipo do hospedeiro para a hanseníase é fundamental com numerosos genes como NOD2, PARK2 / PARCG, LRRK2 e TNF / LTA / HLA apresentando um papel importante na suscetibilidade à doença (267,268). Porém em consequência do papel central da enzima no metabolismo, não encontramos na literatura mutações que geram perda total da funcionalidade da enzima, apenas que diminuem a atividade e que principalmente afetam os glóbulos vermelhos (eritrócitos) (184). Os polimorfismos avaliados neste trabalho (376G / 202A) influenciam a estabilidade intracelular da enzima e são a deficiência mais comum nas populações da África subsaariana (211,219,220). A distribuição geográfica dessas mutações é altamente variável porque reflete os dois principais fatores na epidemiologia de uma anormalidade genética: seleção ambiental e migração(184). Uma vasta gama de estudos associa esses polimorfismos como protetores para a malária (302–304) Essas

variações também são encontradas nas Américas em regiões que nunca apresentaram a malária. Isto é largamente explicado por migrações da África, voluntárias ou não, porque a deficiência de G6PD não tem frequência significativa nas populações nativas americanas (184). De certa forma é imprescindível constatar que as amostras provenientes do nosso banco de pacientes apresentaram maior porcentagem de ancestralidade africana do que as amostras de controles saudáveis, o que pode explicar a alta frequência de portadores de alelos minoritários (portadores de G e portadores de A) para os SNPs rs1058028 e rs1058029 em pacientes do Rio de Janeiro (**Tabela 1-** do artigo apresentado no capítulo III). No entanto, a associação com a doença em homens para o SNP rs1050829 permaneceu mesmo após a drástica normalização por ancestralidade.

Na literatura, o comportamento desses SNPs no eritrócito e sua relação com a malária é bem explorada (302,303). Os eritrócitos deficientes em G6PD são incapazes de manter a homeostase da glutathione redutase (GSH) porque as outras enzimas produtoras de NADPH são sacrificadas no decurso da diferenciação das células eritróides (305). O estresse oxidativo gerado, afeta a integridade dos eritrócitos e a sobrevivência do parasita da malária (306). O interessante de todo esse efeito é que a lise de eritrócitos ou hemácias (hemólise) acarreta em liberação de hemoglobina (HB) para o plasma sanguíneo, o que é captado por proteínas de fase aguda como a haptoglobina formando o complexo Hp-HB (307). A literatura já demonstra que esse complexo pode ser internalizado em macrófagos pelo receptor CD163, protegendo as células do dano oxidativo causado pela HB livre (308–310). Estudos anteriores demonstraram que Hb, Hp e CD163 são aumentados nos pacientes com lepra lepromatosa severa (LL) (311), induzindo vias anti-inflamatórias e favorecendo a sobrevivência do *M. leprae*. Dentro dos macrófagos a enzima heme-oxigenase pode atuar na quebra de heme e liberação de ferro para ser usado pela micobactéria (312). Essas hipóteses podem nos ajudar a explicar o aumento da frequência das mutações na população de casos e associação com a doença demonstrada para o SNP1050829 em homens. Níveis de haptoglobina já estão sendo avaliados na população para os diferentes SNPs de G6PD avaliados.

A herança de deficiência em G6PD é ligada ao X (313) e isso gera algumas implicações, uma vez que o homem apresenta dois genótipos e a mulher, três. Para a deficiência em G6PD, os homens podem ser hemizigotos normais ou hemizigotos deficientes e as mulheres homozigotas normais, homozigotas deficientes e heterozigotas (184). Como resultado da inativação as mulheres são um mosaico, em geral, com metade dos glóbulos vermelhos deficientes e a outra metade, normal (184). Apesar da alta frequência de mulheres heterozigotas em pacientes do Rio de Janeiro (**Tabela 1**- do artigo apresentado no capítulo III), a associação com a doença foi mantida apenas em homens hemizigóticos. Acreditamos que isso deve-se ao fato destes indivíduos apresentarem todos os seus eritrócitos deficientes e assim o risco de hemólise e o enriquecimento de ferro no plasma sanguíneo ser maior. Além disso, o número de mulheres homozigotas deficientes foi irrelevante, o que impediu a análise de associação com a doença (**Tabela 1** – do artigo apresentado no capítulo III). Um estudo interessante, demonstrou que o haplótipo A⁻ é capaz de proteger homens hemizigotos mas não mulheres heterozigotas e isso entra em acordo com nossas análises (302).

Além da análise de associação, gostaríamos de determinar o impacto dessas mutações na sobrevivência do *M. leprae*. Nossa correlação genótipo-fenótipo foi baseada no uso de monócitos primários humanos, porque a obtenção de CS primárias humanas é muito difícil. Além disso, ao ser ativado, essas células apresentam um perfil altamente dependente do metabolismo de glicose para a formação de ATP, o que se assemelha as hemácias e torna o modelo interessante. Conforme esperávamos, os monócitos infectados apresentaram uma indução da expressão e atividade da G6PD demonstrando que a via também é ativada nesse tipo celular (**Figura 1 e 2** do artigo apresentado no capítulo III). Interessantemente, a indução da expressão de G6PD não ocorreu nos homens hemizigotos que apresentaram o haplótipo A⁻ (A⁻ / G⁻) e os níveis basais de RNAm eram significativamente maiores em relação ao outro grupo de estudo (**Figura 1C** do artigo apresentado no capítulo III). Talvez, diante deste alto nível, a suplementação de G6PD ocasionada pela infecção não tenha sido perceptível. Nos leucócitos, essas mutações são pouco ou dificilmente estudadas. Um estudo da década de 50 menciona que os níveis da proteína não

se alteram em leucócitos mutantes, mas acreditamos que uma posterior análise de dosagem proteica de G6PD nos indivíduos com haplótipo A⁻ selecionados pelo nosso grupo seja interessante para o melhor entendimento das nossas análises.

As alterações causadas pelo haplótipo G6PD A⁻ (376G / 202A) não afetam o sítio ativo da proteína mutante, mas afetam o dobramento de proteínas e resultam em instabilidade intracelular. Essa instabilidade permite, segundo Babalola e colaboradores, uma maior tendência à oxidação e inativação, causando deficiência nas hemácias principalmente na presença de indutores de espécies reativas de oxigênio, como a droga antimalárica primaquina (19,43,44). Ao avaliarmos a expressão e atividade da enzima entre os genótipos não encontramos diferenças significativas nos ensaios *in vitro* (**Figura 1 B, C e Figura 2 B-** do artigo apresentado no capítulo III). De toda forma, nossas análises *in vitro* não apresentam um N amostral significativo, até mesmo por não encontrarmos uma frequência alta dessas mutações em controles sadios da Fiocruz, mas os monócitos, diferentemente das hemácias apresentam síntese proteica e assim estão sempre fornecendo níveis ativos da enzima. No entanto, é possível que, para manter os níveis ideais de enzima ativa, os indivíduos portadores do haplótipo A⁻ aumentem a expressão basal da G6PD (**Figura 1C-** do artigo apresentado no capítulo III). A infecção pelo *M. leprae* além de aumentar os níveis da enzima e a sua atividade ainda pode ter gerado um efeito protetor a formação de ROS nos monócitos o que de certa forma, pode ter diminuído a degradação destas enzimas e garantido a manutenção da sua estrutura nos monócitos independentemente do genótipo (**Figura 3 A e B-** do artigo apresentado no capítulo III). Além disso, esses fatores podem permitir que outras variáveis, como o enriquecimento de ferro para a micobactéria, atuem para promover efeito benéfico dos polimorfismos no estabelecimento da doença.

2. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma conjunta, nossos dados demonstram uma intensa alteração do metabolismo em CS causados pelo *M. leprae*. Nós, aqui neste trabalho, discutimos de que forma o patógeno é capaz de utilizar-se destas modulações em prol da sua persistência na célula ou como estes podem interferir na patogenia da hanseníase. De forma interessante, fomos capazes de subverter alterações ocasionadas pelo patógeno ao utilizarmos o inibidor de G6PD (6AN). É bem certo que as alterações encontradas podem servir de alicerce para descobertas de novos alvos farmacológicos que as revertam e atuem como adjuvantes no tratamento da hanseníase. De forma didática, preparamos uma figura (**figura 2.1**) pontuando os principais resultados obtidos e nossas hipóteses. Esta figura encontra-se também no artigo apresentado no capítulo II.

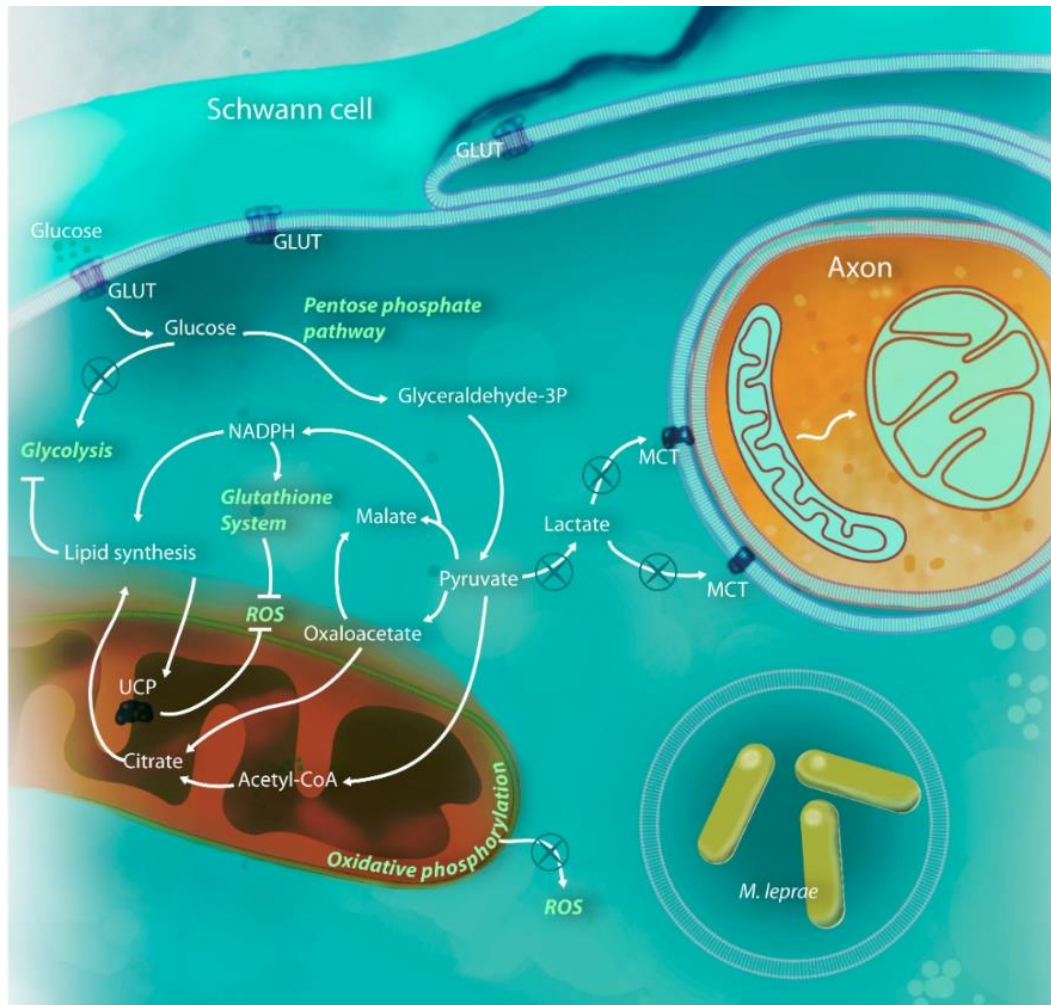


Figura 2.1 *M. leprae* é capaz de modular o metabolismo da célula hospedeira para se beneficiar.

Após a sua internalização o *M. leprae* induz o aumento da captação de glicose e conseqüentemente aumento da expressão e atividade da G6PD, e da enzima málica. A glicose oxidada pela via das pentoses pode gerar gliceraldeído 3-fosfato que alimentará as vias glicolíticas com conseqüente formação de piruvato. Este é convertido em malato e Acetil-coA em vez de lactato, o que pode comprometer a fisiologia mitocondrial axonal. O piruvato é rapidamente convertido a citrato, aumentando a síntese de lipídios o que pode afetar o funcionamento das mitocôndrias. O NADPH gerado pela ação da G6PD e da enzima málica é utilizado pela GSR para a regeneração do sistema glutathiona e combate a ROS. A inibição da via das pentoses através do 6-AN ou do silenciamento gênico foi capaz de diminuir a viabilidade do bacilo tornando esta, fundamental para a sua sobrevivência.

Apesar das mutações não sinônimas em G6PD selecionadas por nós não acarretarem efeito na viabilidade do *M. leprae*, a importância de G6PD para a infecção parece não ter sido alterada, uma vez que os monócitos utilizados na nossa correlação genótipo-fenótipo aumentaram a sua atividade frente a exposição ao bacilo. Estes resultados ainda reafirmam a enzima G6PD e a via das pentoses como um bom alvo para futuros estudos a cerca da doença. Além disso, dados do nosso trabalho evidenciaram um aumento da expressão de GLUT-1 também em monócitos infectados (**Figura suplementar 2** do artigo apresentado no capítulo III). Esses dados combinados são importantes e podem servir como passos iniciais para o entendimento da reprogramação do metabolismo de monócitos/macrófagos causados pelo bacilo. Obviamente, é necessário expandir os conhecimentos a cerca destas modulações, e determinar os mecanismos e efeitos do aumento da demanda de glicose nestas células, tanto para a resposta imunológica, quanto para a sobrevivência do patógeno.

Embora a associação para a doença com os SNPs em G6PD avaliados neste trabalho, não tenham sido tão significativos na nossa população de estudo, A frequência alta dos polimorfismos na população de casos e uma modesta associação em homens no SNP rs1050829, demonstraram uma possível susceptibilidade para hanseníase. Assim, construímos uma gama de hipóteses para explicar este efeito e testá-las posteriormente. Nosso grupo sugere que os indivíduos portadores dos polimorfismos, por apresentarem maior propensão a sofrer hemólises, podem permitir a abundância de ferro em monócitos/macrófagos em um sistema *in vivo*, onde existe um grande aporte de macromoléculas como a haptoglobina e ferritina. Esse aumento de ferro pode permitir uma melhora da sobrevivência do patógeno nestas células. A **figura 2.2** demonstra um esquema que visa tornar as nossas hipóteses a cerca do enriquecimento de ferro mais facilmente entendidas.

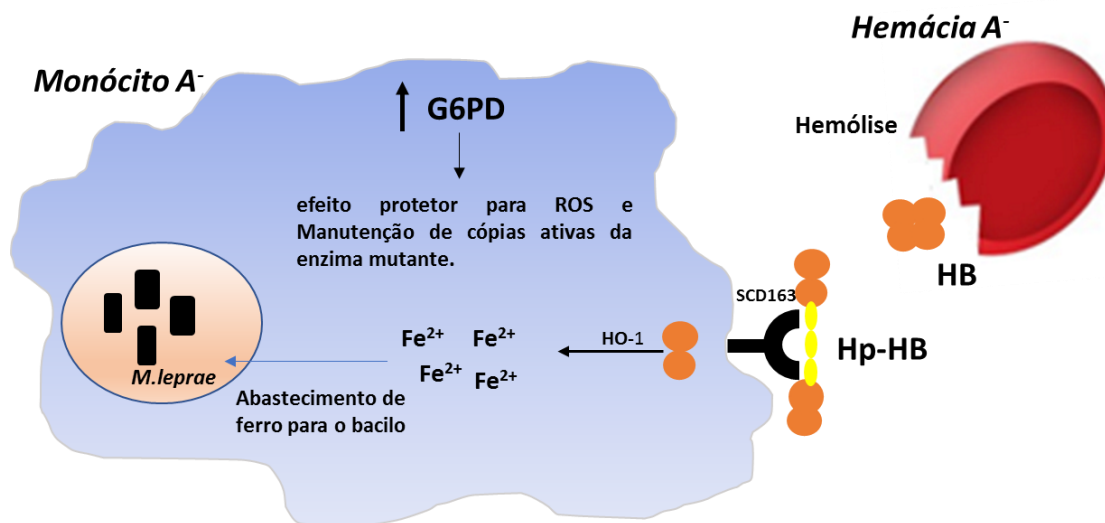


Figura 2.2. Hipótese para o mecanismo de sobrevivência do *M. leprae* em indivíduos portadores de mutações para G6PD. O esquema ilustra um conjunto de hipóteses do nosso grupo para explicar a alta frequência das mutações encontradas nos pacientes e associação com o SNP encontrada no sexo masculino. Hemácias de indivíduos com as mutações rs1050828 (G202A) e rs105029 (A376G) apresentam maior tendência a sofrer hemólise pelo estímulo de indutores de ROS como primaquina e dapsona. O grupo prostético heme liberado pode estar sendo internalizado nos monócitos através da haptoglobina, onde pode estar sendo convertido a ferro por enzimas como a hemi-oxigenase (HO-1). Esse aumento de ferro pode ser determinante para a melhoria da sobrevivência da bactéria. O *M. leprae* nos monócitos aumenta a expressão e atividade de G6PD. Isto acarreta aumento de enzimas ativas e maior proteção contra espécies reativas de oxigênio, o que dificulta a degradação de enzimas mutantes e mantêm a sobrevivência do bacilo. Acreditamos que os efeitos de aumento de ferro em monócitos são retirados em um experimento *in vitro*, uma vez que fatores como a hemólise e haptoglobina são descartados do modelo.

3. CONCLUSÕES

Baseados nos achados demonstrados no presente estudo, podemos concluir que:

1. *M. leprae* foi capaz de aumentar a expressão do transportador GLUT-1 (SLC2A1), G6PD, enzima málica citosólica (ME-1) e da glutathione redutase (GSR) em células de Schwann da linhagem ST8814. Além disso, lesões de pele e nervo de pacientes hansênicos da forma lepromatosa possuem um aumento da expressão de *G6PD* quando comparados com aqueles da forma tuberculóide.
2. A utilização de inibidor de G6PD (6-AN) foi capaz de reverter efeitos anteriormente encontrados como a diminuição do potencial elétrico mitocondrial e diminuir a viabilidade do bacilo de forma significativa. O efeito específico de G6PD foi confirmado pela utilização de silenciamento gênico através de RNA de interferência;
3. O DNA mitocondrial diminuiu após 120 horas de infecção em células de Schwann infectadas e em nervos de paciência hansênicos em detrimento a outras neuropatias. Porém os níveis de ATP não foram alterados durante 48 horas de infecção
4. Os SNPs candidatos no gene *G6PD* (rs1050828 e rs1050829) apresentaram alta frequência na população de casos do Rio de Janeiro e o SNP 1050829 apresentou associação de risco com a doença em homens;
5. Monócitos primários aumentaram a expressão e atividade de G6PD na presença do *M. leprae*. Os indivíduos hemizigotos deficientes, com o haplótipo A⁻, apresentam uma alta expressão basal de G6PD em detrimento aos hemizigotos normais. Além disso, a viabilidade do *M. leprae* em monócitos não variou entre os diferentes genótipos formados a partir dos SNPs de G6PD (rs1050829/rs1050828)

4. ARTIGO DE REVISÃO

Tendo em vista a relevância de nossos achados para o entendimento da doença decidimos discutir sobre as nossas recentes hipóteses acerca da modulação metabólica imposta pelo patógeno e como isso poderia contribuir para a sobrevivência do *M. leprae* na célula infectada. Nós também associamos hipóteses recentes sobre a ativação de IFN- tipo I a outros fatores críticos envolvidos no sucesso da infecção micobacteriana e progressão para doença ativa, seja hanseníase ou tuberculose. Essa discussão faz parte do artigo de revisão anexado a seguir, publicado em 2018 na revista “Frontiers in Immunology



Type I Interferons, Autophagy and Host Metabolism in Leprosy

Thiago Gomes Toledo Pinto¹, Leonardo Ribeiro Batista-Silva¹,
Rychelle Clayde Affonso Medeiros¹, Flávio Alves Lara² and Milton Ozório Moraes^{1*}

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil, ²Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Annemieke Geluk,
Leiden University Medical
Center, Netherlands

Reviewed by:

Elsa Anes,
Universidade de Lisboa, Portugal
Sumana Sanyal,
University of Hong Kong,
Hong Kong

*Correspondence:

Milton Ozório Moraes
milton.moraes@fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 18 December 2017

Accepted: 03 April 2018

Published: 23 April 2018

Citation:

Toledo Pinto TG, Batista-Silva LR,
Medeiros RCA, Lara FA and
Moraes MO (2018) Type I
Interferons, Autophagy and Host
Metabolism in Leprosy.
Front. Immunol. 9:806.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00806

For those with leprosy, the extent of host infection by *Mycobacterium leprae* and the progression of the disease depend on the ability of mycobacteria to shape a safe environment for its replication during early interaction with host cells. Thus, variations in key genes such as those in pattern recognition receptors (*NOD2* and *TLR1*), autophagic flux (*PARK2*, *LRRK2*, and *RIPK2*), effector immune cytokines (*TNF* and *IL12*), and environmental factors, such as nutrition, have been described as critical determinants for infection and disease progression. While parkin-mediated autophagy is observed as being essential for mycobacterial clearance, leprosy patients present a prominent activation of the type I IFN pathway and its downstream genes, including *OASL*, *CCL2*, and *IL10*. Activation of this host response is related to a permissive phenotype through the suppression of IFN- γ response and negative regulation of autophagy. Finally, modulation of host metabolism was observed during mycobacterial infection. Both changes in lipid and glucose homeostasis contribute to the persistence of mycobacteria in the host. *M. leprae*-infected cells have an increased glucose uptake, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate generation by pentose phosphate pathways, and downregulation of mitochondrial activity. In this review, we discussed new pathways involved in the early mycobacteria–host interaction that regulate innate immune pathways or metabolism and could be new targets to host therapy strategies.

Keywords: leprosy, tuberculosis, innate immunity, autophagy, type I interferon, metabolism, host-directed therapy

INTRODUCTION

Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* or *Mycobacterium lepromatosis*. Here, we will discuss mechanisms of infection and host–pathogen interaction mediated by *M. leprae*. The heaviest exposed population, including the household and family members and social contacts of patients, is considered to have the highest risk of developing leprosy, but the disease will not necessarily progress during their lifetime. Thus, mycobacterial infection is a necessary, but not sufficient cause of leprosy progression. During the natural course of the disease, it has been suggested that once *M. leprae* infects an individual through the airways, the bacteria can come into the lungs and be phagocytosed by resident macrophages. The mycobacteria can infect epithelial cells in the nasal mucosa and penetrate the organism, while host cells initiate an innate response to eliminate the pathogen (1). Intracellular mycobacteria are able to use different strategies to circumvent potential bactericidal peptides: (i) mimic a viral response; (ii) upregulate lipid metabolism; or (iii) downregulate pro-inflammatory cytokines, which is generally associated with a cascade of pro-mycobacteria events (2–4). These virulence strategies are related to other pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis*, suggesting that virulent mycobacteria can share common mechanisms of host colonization (5–7). Thus, by understanding the critical pathways related to the subversion

of antimicrobial responses, researchers can understand the conditions for successful mycobacterial infection and, perhaps, the disease progression. Actually, these novel pathways, which use different strategies during *M. leprae* infection have already been described, but a better understanding of these phenomena could help us interfere, reverse or halt the disease progression.

In this regard, the *M. leprae* genome is highly conserved, and the strain circulating worldwide has remained basically the same for the past 1,000 years (8). So, the decline of leprosy in Europe does not account for genetic changes in *M. leprae* that could impact bacterial virulence. Currently, it is clear that very few differences are observed between strains isolated from different clinical forms of the disease. One possible conclusion is that the various stages and clinical forms observed in cases of leprosy are similar due to the host genetics (9).

Large-scale studies have contributed to the identification of new candidate genes and pathways to help understand this complex puzzle. These strategies provide insights not only about leprosy but also about other immune-based and/or infectious diseases. In fact, the most successful genome-wide association studies (GWASs; or genomic scans) were performed in leprosy, as compared, for example, to tuberculosis studies, in which no genes were consistently pinpointed. Several genes have been associated with leprosy, such as *NOD2*, *PARK2/PARG*, *LRRK2*, *RIPK2*, *TNF/LTA/HLA*, *LACC1*, *IL10*, *TLR1*, and microRNA (miR)-146a (10–14). Single-nucleotide polymorphisms in these genes were replicated consistently in different populations and have been assigned a functional role in leprosy susceptibility. Whole exome sequencing and rare variant analysis have implicated several novel candidates that still need to be validated. Most of these confirmed associations have a modest odds ratio value, but few other infectious diseases have a clear association with key genes that demonstrate consistent results, which can be replicated in populations with different ethnic backgrounds. Interestingly, the most important genes or pathways that emerge after *M. leprae* infections in studies using microarray gene expression are type I interferon (IFN), autophagy and mitochondrial, and lipid metabolism (15). Therefore, different large-scale approaches in the literature are revealing distinct, but complementary pathways that clearly outline the strategies used by *M. leprae* to destabilize antimicrobial responses and establish a safe environment for continuous bacterial replication. We have depicted main pathways associated with disease susceptibility in a way that how could we potentially regulate lipid and mitochondrial metabolism and immuno-inflammatory responses toward a reversion of the phenotype to accelerates treatment and develop new prevention strategies? Hence, in this article, we will discuss seminal findings that reveal critical mechanisms of innate immunity and host metabolism with a direct impact on the disease outcome where modulation could be path toward disease control.

TLR-2/1-MEDIATED ANTIMICROBIAL RESPONSE IN LEPROSY

In the early stages of mycobacterial infection, macrophages and other cells of the innate immune system are able to rapidly

recognize pathogen-associated molecular patterns through exposure to an extensive repertoire of pattern recognition receptors (PRRs). These transmembrane receptors mediate the activation of several signaling pathways in response to intracellular pathogens and initiate important immune events, such as cell differentiation and antimicrobial programs (16). The most recognized toll-like receptors (TLRs) have been observed to mediate the immune recognition of mycobacteria (17). Among these, the TLR-2/1 heterodimer was responsible for recognizing mycobacterial lipoproteins, activating a pro-inflammatory response and releasing vitamin-D-dependent antimicrobial peptides (18). Genetic analysis has demonstrated that polymorphisms in the *TLR1* gene are associated with leprosy susceptibility, and these variations have a functional effect that includes structural modifications to the protein and alterations to TNF/IL-10 log ratio values in the supernatants of *M. leprae*-stimulated peripheral blood mononuclear cells (13, 16). These individual variations exemplify the ability of the host's immune system to initiate an efficient antimicrobial response against mycobacteria.

Other components also contribute to TLR-2/1 signaling. miR-21, which is highly expressed in the disseminated form of leprosy, it is a suppressive mechanism of host antimicrobial TLR-2/1-mediated genes that affect the production of critical cytokines, such as IL-1 β and IL-10 (19). Recently, a novel component of a TLR-2/1-mediated antimicrobial programme has been described. The *S100A12* gene, which encodes the calgranulin C protein, is highly expressed in response to the activation of the TLR-1 receptor. This gene codifies an antimicrobial peptide that is able to kill *M. leprae* directly (20). Also, *S100A12* is more expressed in skin lesions of tuberculoid (TT) patients than in those of lepromatous (LL) patients (20). Since TLR-2/1 signaling pathways regulate this gene, differences in disease susceptibility could be linked to variations of *TLR1* expression and the activation of this signaling pathway among patients and healthy volunteers. Thus, pattern recognition is essential for controlling mycobacterial growth by regulating optimum levels of the TNF/IL-10 ratio during the period of infection, while miR-21 levels could counterbalance or impair an adequate antimicrobial response (19).

NOD2 SIGNALING PATHWAY

In the past few years, independent GWASs in leprosy and inflammatory diseases such as Crohn's disease (CD) have revealed a common genetic fingerprint and a considerable overlap of susceptibility mechanisms among these pathologies (10, 21, 22). As demonstrated in mycobacterial diseases, the risk variants of inflammatory bowel disease (IBD) comprise genes that are active in the early stages of the host response suggesting that the continuous interaction between host and pathogens shapes genetic factors that are predisposed to IBD (23). An important signaling pathway identified by a GWAS was the nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2)-mediated immune response, where variants of genes involved in this signaling pathway are also implicated in susceptibility to *M. leprae* infection and CD (10).

NOD2 is an intracellular component of NOD-like receptors that detects muramyl dipeptide (MDP), which is a cell wall

structure. *M. leprae* presents a distinct MDP compared with other mycobacteria (24). However, even with these structural modifications, *M. leprae* MDP maintains the capacity to trigger the NOD2 response. Upon recognizing MDP, NOD2 is able to initiate a leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)-dependent pro-inflammatory response, as well as other cellular processes, such as autophagy (25). LRRK2 is a downstream component of NOD2 signaling, which enhances the inflammatory cytokine production that is required for antimicrobial activity in the presence of macrophages (25). For this reason, the *LRRK2* gene is similar to the many critical genes involved in the NOD2-mediated response that is associated with leprosy susceptibility, CD, and Parkinson's disease (PD) (10). Unbalanced LRRK2 activity is related to excessive inflammation, which leads to tissue damage. It has been reported that a specific mutation in the *LRRK2* gene is associated with acute inflammation in both leprosy and CD cases, supporting the assumption that these diseases share common pathological mechanisms (26). Furthermore, a recent study has found that functional variations in *LRRK2* genetically link CD to PD, affecting cellular processes such as kinase activity and autophagy (27).

In like manner, genetic variation at *NOD2* is reported to be associated with exacerbated inflammatory responses in leprosy reactions that could modulate downstream pathways, such as

LRRK2 activation (28). Notably, NOD2 activation induces the differentiation of monocytes into dendritic cells (DCs) in an IL-32-dependent manner (29). This DC activation triggers autophagy, a process required for bacterial handling, antigen presentation and generation of CD4 T cell response (30). Individuals suffering from CD present a defective activation of these processes, which are still poorly investigated in leprosy. In addition to the genetic relevance of the NOD2 response to leprosy susceptibility, some advances in functional studies have demonstrated that this signaling pathway is upregulated in patients with paucibacillary leprosy when compared with those that manifest the disseminated (multibacillary) form of the disease (29). These findings show that the activation of the NOD2 response is an essential link between innate and adaptive immunity, and aberrant NOD2 signaling results in impairment of antimicrobial activity and defective antigen presentation in leprosy (Figure 1).

TYPE I IFN AND AUTOPHAGY: THE HETEROGENEITY OF DNA SENSING IN MYCOBACTERIAL INFECTIONS

In parallel, other mycobacterial components trigger innate immune responses. A classical view of phagocyte–mycobacteria

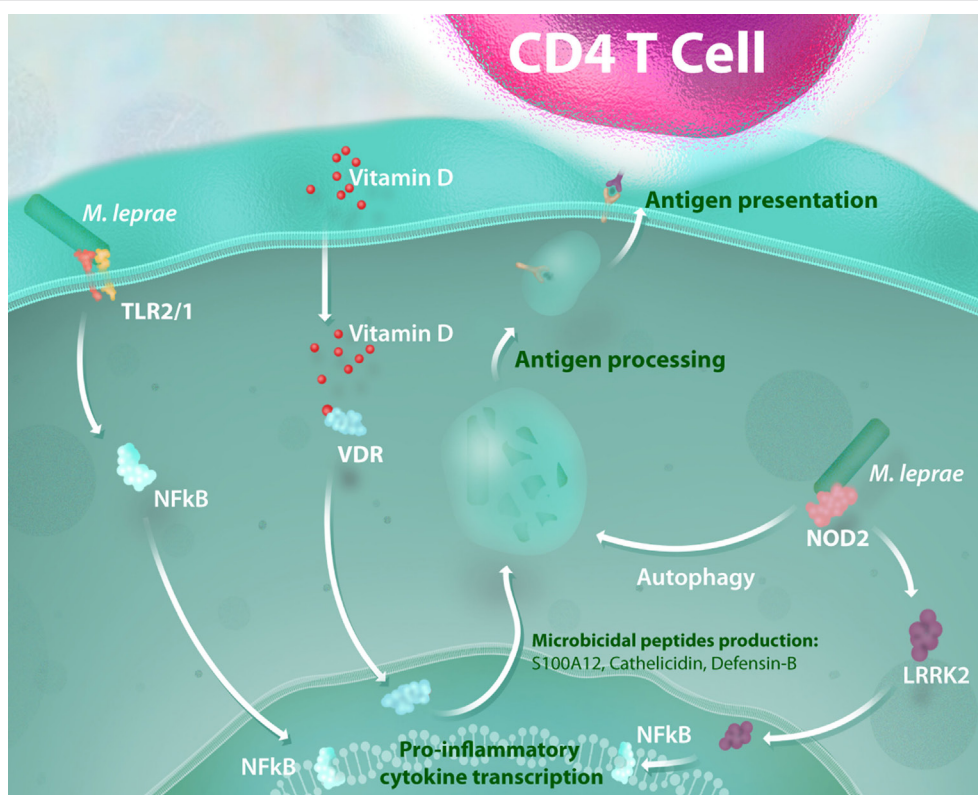


FIGURE 1 | Antimicrobial activity and NOD2-induced autophagy mediate the link between innate and adaptive immunity in mycobacterial infection. The recognition of mycobacterial lipoproteins by the TLR-2/1 heterodimer is a critical way to initiate a pro-inflammatory response and activation of a vitamin-D antimicrobial program against intracellular pathogens such as *Mycobacterium leprae*. Mycobacterial muramyl dipeptide sensing by NOD2 receptors enhances the inflammatory response in a leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)-dependent manner and activates autophagic mechanisms. All of these processes lead to mycobacterial killing and are essential for bacterial handling, antigen presentation, and consequent generation of an effective CD4 T cell response.

interaction supports the view that virulent bacilli are able to persist within phagosomes, preventing their fusion with lysosomes to achieve a safe environment for replication (31, 32). This interpretation has been extended and updated in light of new data, which suggest that a breach in the phagosomal membrane and cytosol contamination during the course of an infection leads to a permissive response (6). Mechanisms of phagosome maturation are arrested and punctured during mycobacterial infection, which involves virulence factors that manipulate important host response against intracellular infection.

The ESX-1 secretion system is a determinant of mycobacterial virulence that is presented in pathogenic mycobacteria, such as *M. tuberculosis* and *M. leprae*, and it is responsible for the secretion of (CFP-10) and early secreted antigenic target 6 kDa (ESAT-6) proteins (5). The absence of this secretion system in virulent mycobacteria such as *Mycobacterium bovis* BCG supports the importance of those proteins for the success of mycobacterial infection (33). Just after infection, virulent mycobacteria express the ESX-1 system, exporting ESAT-6, which is able to create a fissure in the phagosomal membrane (34). Consequently, ESX-1-mediated pore formation allows an equalization of phagosomal and cytosol content. This process is essential for bacteria to acquire nutrients from the host cell and deliver virulence factors capable of downregulating host responses against the pathogen (5, 35). The leakage of mycobacterial DNA from phagosomes into the cytosol strongly activates the host cell cytosolic surveillance pathways, triggering both a type I IFN response (6) and autophagy (36, 37), which comprise pro- and antibacterial responses, respectively (6). Furthermore, ESX-1 activity and cytosolic recognition of mycobacterial DNA is also involved in the activation of caspase-1, promoting the formation of the inflammasome complex and regulation of IL-1 β secretion (38, 39).

Type I IFN (IFN- α/β) activation was originally characterized as a pathway involved in controlling virus infection. However, in the past decade, a number of reports have described a type I IFN transcriptional signature in the pathogenesis and progression of tuberculosis (40) among other mycobacterial diseases. The production of IFN- β may inhibit IL-1 β activation, which plays a critical role in the elimination of *M. tuberculosis* (41). IFN- β -mediated suppression of the host bactericidal mechanisms is also noticed in leprosy. An inverse correlation between IFN responses (type I and II) is observed in the clinical spectrum of leprosy. Paucibacillary patients preferentially express type II IFN (IFN- γ) and, consequently, its downstream antimicrobial genes, preventing the spread of mycobacteria; by contrast, the IFN- β program is prominent in multibacillary patients (42). The IFN- β response can induce IL-27-dependent IL-10 activation, which in leprosy, is a well-known immune suppressive mechanism that favors mycobacterial growth and dissemination (43).

Interferon- β induction is redundant, and it involves a large repertoire of nucleic acid sensors (44). *M. tuberculosis* models have been used to generate most of the existing data on type I IFN trigger mechanisms for infections, and this area has not been fully explored in leprosy studies. Once released into the cytosol, extracellular mycobacterial DNA ligates to a double-strand DNA sensor (6). In this context, different studies reported that cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) is the primary sensor

for mycobacterial DNA (39, 45, 46). After DNA recognition, cGAS is able to produce the second messenger cyclic GMP-AMP, a potent ligand of the stimulator of interferon genes (STING), TANK-binding kinase 1 (TBK1), interferon regulatory factor 3 (IRF3) signaling pathway exhibiting a transcriptional profile of the type I IFN response that antagonizes the host's antimicrobial programmes (6).

Conversely, cGAS-mediated DNA sensing and STING/TBK1 activation is also required for mycobacterial targeting of the ubiquitin-dependent autophagy pathway, an efficient mechanism that eliminates intracellular pathogens and links innate and adaptive immune responses by enhancing antigen presentation (37, 45, 47). However, only one-third of the intracellular mycobacteria in the host are delivered for autophagic degradation, suggesting that virulent mycobacteria have an active mechanism to evade autophagy (36). The paradoxical mechanisms of DNA sensing during mycobacterial infection are not clearly understood, but they involve a type of bifurcation that could be dependent on multiplicity of infection. Thus, it is likely when infected by a low number of mycobacteria, the host can preferentially load autophagy and control the infection. If a higher mycobacterial burden is presented during infection, a pro-mycobacteria response is directed.

Many factors may be involved in the heterogeneity of DNA sensing following infection. Determining the immunological status of a host at the early stages of host–pathogen is critical to define the course of infection. An initially permissive environment favors bacterial colonization and triggers virulent mechanisms. The increase of the mycobacterial burden and consequent virulence released into the host cell contribute to an imbalance of the DNA-mediated response, driving type I IFN production that, in turn, leads to an impairment of the host antimicrobial mechanisms (2, 6). Host genetic variation in the PRRs of genes that mediate mycobacterial interactions could also modulate the bacilli uptake (9), as well as the activation of an inflammatory response that directly affects downstream signaling pathways, such as cGAS/STING signaling. However, in large-scale screenings, no evidence has been found that major genes or consistent effects in this pathway are associated with leprosy. Mutations in *TMEM173*, which encode STING, are related to selective STING activity, and such activity is able to disrupt IRF3 phosphorylation without affecting other activities of TBK1 (48). These findings support the hypothesis that variation in genes that encodes key DNA sensing components may contribute to the heterogeneity of DNA-mediated responses. Previous research suggests that other cytosolic sensors, such as AIM2 inflammasome, may interact competitively with the mycobacterial DNA implicated in the balance of STING-mediated responses (49).

The targeting and delivery of *M. tuberculosis* for autophagic degradation occurs by a recruitment of the host's ubiquitin chains, a process that depends on Parkin (*PARK2*), an E3-ubiquitin ligase (37). Intracellular *M. tuberculosis* avoid ubiquitin or proteasomal host systems. More than one decade ago, the gene *PARK2*, which encodes Parkin, was associated with leprosy susceptibility (11); this suggests that Parkin also controls ubiquitination and autophagy levels during *M. leprae* infection. A more recent study

has showed that multibacillary patients demonstrated autophagy impairment, while paucibacillary ones exhibited strong autophagy upregulation (50). The research revealed how live *M. leprae* actively downregulates the autophagic machinery of human monocytes to generate a protected intracellular niche for bacterial replication. Following this research, our group described a transcription profile of the type I IFN response in both human Schwann cells and macrophages following *in vitro* infection with live *M. leprae*. OASL [2'-5'-oligoadenylate synthetase (OAS) like] was the most differentially expressed interferon-stimulated gene in our study (2). OASL is a member of the OAS family, a group of proteins with a recognized antiviral action, although its function in bacterial infections is poorly understood. OASL can play a dual role following activation: the ubiquitin-like domain of OASL can interact with RIG-I, a double-strand RNA sensor, leading to type I IFN activation enhancement (51). Conversely, viral double-stranded DNA can induce an OASL-mediated type

I IFN inhibitory effect by blocking cGAS/STING signaling (52). Upon *M. leprae* infection, macrophages are able to produce high levels of OASL in a STING-dependent manner. This production is associated with the persistence of *M. leprae* inside the cell as OASL inhibits autophagic mechanisms that are essential for mycobacterial clearance (2) (Figure 2). However, the mechanisms for the OASL-mediated blockage of autophagy need to be explained. The OASL-cGAS interaction, as it occurs during double-stranded DNA virus infection, could also be investigated in mycobacterial infection to improve our understanding of how OASL modulates cGAS/STING-mediated autophagy. Moreover, investigating the interactions of OASL with other molecules in its ubiquitin-like domain may help us understand the role of OASL in the regulation of immune responses against intracellular infections. Thus, these data suggest that OASL participates in the fine-tuning of infection outcomes by regulating DNA sensing pathways.

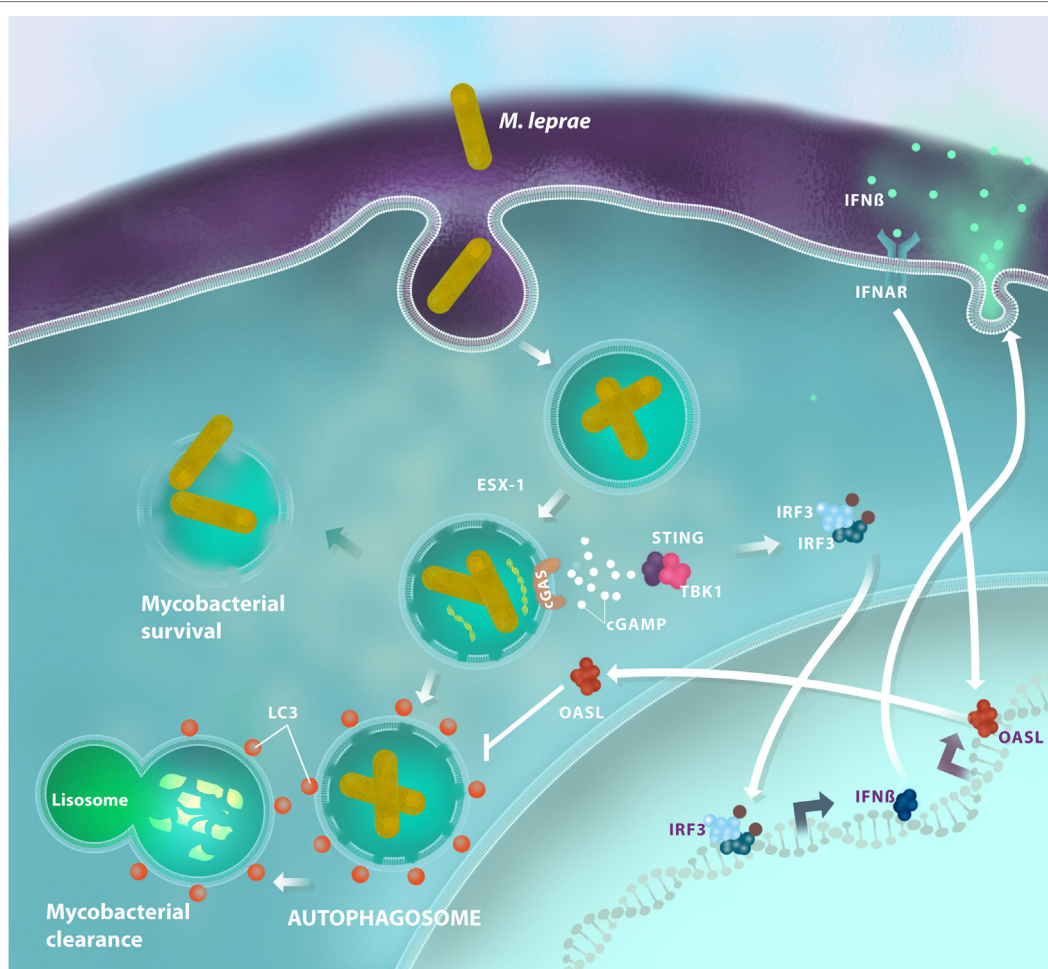


FIGURE 2 | Antimicrobial autophagy is inhibited in *Mycobacterium leprae* infections through the activation of the type I interferon (IFN) pathway. After being inside the host cell, *M. leprae* is able to disrupt the phagosomal membrane by a mechanism that is dependent on the mycobacterial ESX-1 secretion system. Then, bacterial DNA activates the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)/stimulator of interferon genes (STING)/TANK-binding kinase 1 (TBK1) pathway and promotes interferon regulatory factor 3 (IRF3) translocation, which induces IFN-β production. In response to an autocrine and/or paracrine IFN-β stimulus, macrophages increase OASL expression. OASL production inhibits bacterial clearance, blocking LC3-dependent autophagy, and promotes mycobacterial survival by creating a permissive microenvironment for sustainable growth and disease progression.

METABOLIC IMMUNITY IN LEPROSY

Using microarray analysis, researchers have pointed out important changes in metabolic pathways in bacterial infections such as *M. leprae* (15, 53). Determining the ability of intracellular pathogens to modulate the host metabolic pathways has provided an understanding of the infection in pathogenic terms (54). *M. leprae* must adjust the cytosol to its requirements, and the breach of the phagosomal membrane releases bacterial components that will trigger a metabolic switch.

When infected by intracellular pathogens, immune cells are able to increase nitric oxide synthetase inducible (iNOS) and indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1) activity. These enzymes catalyze the degradation of L-arginine and L-tryptophan, respectively, resulting in local amino acid deprivation (55). While iNOS generates nitric oxide radicals, IDO-1 leads to the production of kynurenine metabolites (56). This metabolite activates the aryl hydrocarbon receptor, promoting the conversion of naive CD4 T cells into Foxp3+ regulatory T cells (57). DCs are able to increase *IDO1* expression and activity in response to IFN- γ (56), and *IDO1* is highly activated in leprosy patients (58). Genetic variations in the *IDO1* gene are related to differential activation of regulatory T cell function and correlated with autoimmune disease development (59). IDO-1-mediated L-tryptophan deprivation is an innate response against viral replication. However, it is ineffective against mycobacterial infection. Despite the drastic

reductive evolution in the *M. leprae* genome, all enzymes involved in L-tryptophan anabolism have been maintained. *M. leprae* infection activates the IDO-1 signaling pathway (55, 60, 61) in an iron and IL-10-dependent manner. Thus, the L-tryptophan deprivation does not affect *M. leprae* survival (56). Transforming growth factor beta, which is highly expressed in leprosy patients (58), is able to maintain high IDO-1 expression in DCs through phosphorylation of its immune-based inhibitory tyrosine motifs, leading to a sustained immunoregulatory effect (62).

Glucose plays a central role in energy metabolism as a carbon source. In addition, glucose is a highly versatile precursor of amino acids, coenzymes, fatty acids, and cholesterol. After phosphorylation, this molecule can follow a catabolic pathway such as that of glycolysis, generating energy and carbon to be burned in the mitochondria. Alternately, it can follow an anabolic pathway, such as the pentose phosphate pathway (PPP), which generates carbons and reducing equivalents, in the form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to synthesize lipids, nucleotides, and aromatic amino acids (63). In both leprosy and tuberculosis, it was found that the bacilli increases glucose uptake in the infected host cells in a glucose transporter 1-dependent manner (64, 65). Modulation of glucose metabolism was noticed in *M. leprae*-infected Schwann cells (64) (**Figure 3**) while this event has been demonstrated in human macrophages infected by *M. tuberculosis* (65). The hypothesis that these mechanisms also occur in *M. leprae*-infected macrophages needs to be investigated.

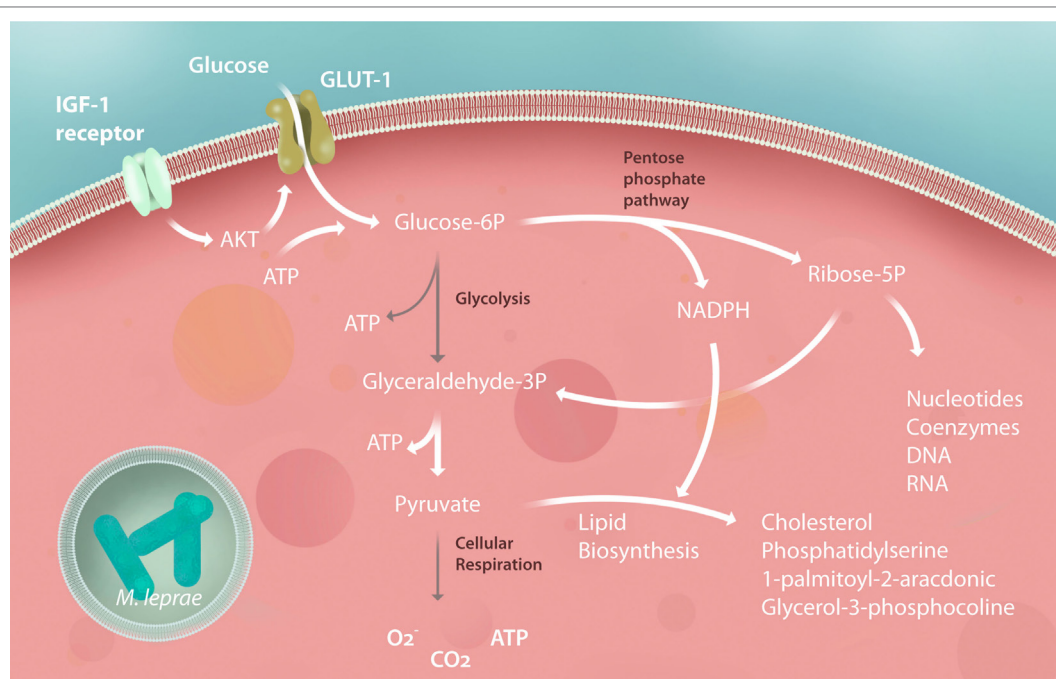


FIGURE 3 | Schwann cell central metabolism is subverted by *Mycobacterium leprae*. After infection, Schwann cells increase their insulin-like growth factor (IGF) expression, upregulating glucose transporter 1 (GLUT-1) and glucose uptake by Akt signaling. Glycolysis is downregulated, feeding the pentose phosphate pathway (PPP) with carbons used to synthesize building blocks to promote Schwann cell dedifferentiation and proliferation, generating during this process the reducing power [nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)] responsible for pumping up lipid biosynthesis. Pyruvate generated by the PPP is rapidly converted to citrate and subsequently converted to lipids, virtually stopping the tricarboxylic acid cycle, respiration and mitochondrial energy potential of the Schwann cells. All of these modulations are crucial for subverting the host immunity against the mycobacteria and, consequently, to the success of the *M. leprae* infection, representing potential for new host-target therapy strategies to halt leprosy progression. The gray arrows represent downregulated pathways.

Studies on the host carbohydrate metabolism during infection have demonstrated that many pathogens, including viruses such as immunodeficiency virus (HIV), hepatitis C virus (HCV), Mayaro, transmissible gastroenteritis virus, and human cytomegalovirus, can increase host cell glucose uptake to provide biosynthetic precursors for their replication (66–71). Furthermore, the synthesis of immune-active lipids, such as 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine, is able to generate a strong anti-inflammatory response when oxidized (72). In *M. leprae* infection, live bacteria are able to avoid free radical generation by using carbons from the electron transport chain (ETC) for lipid synthesis (64). To support the positive feedback of this pathway, *M. leprae* mediates an increase in the production of insulin-like growth factor (IGF)-1 in both macrophages and Schwann cells (73). IGF-1 is one of the main regulators of glycolysis metabolism. In macrophages, IGF-1 can impair the host antimicrobial activity and increase lipid metabolism (73). Otherwise, IGF-1 shares a high amino acid homology with insulin (74), and the structure of its receptors is closely related to post-receptor signaling (75). This signaling activation involves glucose uptake with subsequent lipid synthesis and storage in lipid bodies. Indeed, glucose uptake can be positively modulated by the IGF-1 receptor through the activation of the PI3K signaling pathway. Thus, virulent mycobacteria cause a metabolic switch that drives the cell toward the production of several micronutrients, macronutrients, and electron acceptors in response to infection.

After *M. leprae* infection, Schwann cells redirect glucose from the glycolysis pathway to the PPP through the activation of G6PD, increasing the carbon flux to lipid synthesis. The PPP generates ribose-5-phosphate and NADPH, as the main products that sustain cell proliferation, lipid biosynthesis, and the regeneration of oxidized glutathione, which is the main free radical scavenger of human cells (63). *M. leprae* is highly dependent on the host PPP because G6PD inhibition by pharmacological interference and RNA interference associated with G6PD knockdown decreases the viability of intracellular mycobacteria (64). During its adaptation, *M. leprae* has developed another mechanism to live inside human cells: shutting down the cell's mitochondria (64). The dissipation of the mitochondrial inner membrane electric potential after infection demonstrates the suppression of the ETC. This is probably due to the redirection of carbons to lipid synthesis for the formation of lipid bodies in infected cells, and it will increase long chain fatty acids in cytosol, responsible to mitochondrial permeability transition pore opening and consequent electric potential dissipation (3, 64, 76).

Gene expression analysis of skin lesions of lepromatous patients revealed upregulation of *SREBF1*, a host gene involved in lipid synthesis (77). Together with this observation, a mass spectroscopy analysis revealed that these patients' skin lesions were enriched with cholesterol (77) and other immune-active lipids, such as oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (oxPAPC), prostaglandins E2 and D2, lipoxin A₄, and omega-3 and omega-6 (72, 78). Live *M. leprae* can actively induce and support adipophilin, adipose differentiation related protein, and perilipin expression in macrophages, promoting lipid accumulation within the phagosome (77). In this

context, host lipid synthesis and its deposition in infected tissues have been associated with pathogenesis and infection success in leprosy (79), with special involvement of cholesterol. In contrast to *M. tuberculosis*, *M. leprae* is not able to use cholesterol as a carbon source (80). However, during the reductive evolution of the genome, *M. leprae* maintained an enzyme of paramount importance to its survival, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, which is a catalyst in the first step of cholesterol degradation: the oxidation of cholesterol to cholest-4-en-3-one (cholestenone) (80). In clinical applications, avoiding cholesterol synthesis by treating infected macrophages with statins, inhibitors of HMG-CoA reductase, has a strong impact on intracellular *M. leprae* and *M. tuberculosis* viability (81). Based on microscopy data from our previous study, in which we demonstrated the ability of *M. leprae* to recruit and surround itself with lipid bodies (3), we hypothesized that *M. leprae* could use lipids to cover and hide its surface antigens from innate immune receptors in the cytosol.

Altogether, these host metabolic alterations are essential for immune response modulation and infection success. For that reason, new strategies based on host metabolite identification could, in the near future, contribute to preclinical diagnosis. The development of fast, highly sensitive, and non-invasive diagnostic tests is paramount for the control of this disease. As an example, it was demonstrated that it is possible to identify leprosy patients through detection of leukotriene E4 by gently pressing silica plates against their skin for a few seconds (82). Based on the fact that *M. leprae*-infected Schwann cells increase their glucose uptake by about 40% (64), we propose, as another example, that full body imaging of the glucose analog fludeoxyglucose using positron emission tomography could represent a potential non-invasive alternative for diagnosing pure neural leprosy.

LIPID METABOLISM DEREGULATION ASSOCIATED WITH INFLAMMATION IN LEPROSY

Several diseases are associated with deregulation of the host lipid metabolism, favoring an exacerbated inflammatory process that contributes to immunopathogenesis. In an experimental model of arteriosclerosis, for example, the lipid accumulation process and atherosclerotic plaque development are mediated by the production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), which recruits monocytes to the inflammatory site. Largely differentiated from anti-inflammatory macrophages with an M2 profile, which has a foamy phenotype, these monocytes are rich in lipid droplets (83). MCP-1-mediated recruitment of peripheral monocytes was also observed in a zebra fish model of *Mycobacterium marinum* infection. In this model, MCP-1 produced by infected resident macrophages actively participated in the recruitment of monocytes to the infection site by a mechanism that was dependent on the STING signaling pathway (84). In the context of *M. leprae* infection, in the absence of *OASL*, a gene induced by type I IFN, there is a drastic decrease in the levels of MCP-1 and the intracellular viability of the bacilli in *M. leprae*-infected macrophages (2). Indeed, MCP-1 induction can be mediated by STING either by a type I IFN-dependent pathway or by an independent pathway

(85–87). These data, taken together, suggest a scenario in which the induction of the type I IFN pathway participates in MCP-1 induction. The enhancement of MCP-1 aids the recruitment of monocytes at the site of infection and promotes the differentiation of monocytes into macrophages with a M2 phenotype, exhibiting high levels of IL-10 and prostaglandin E2 (PGE2) (88). Lipid bodies are sites of production of eicosanoids, such as PGE2, leukotriene B4 (LTB4), and lipids, including cholesterol. This could explain the characteristic phenotype of foamy macrophages that present in the skin lesions of patients with lepromatous leprosy, as well as the abundance of immunological mediators, such as IL-10, IL-4, PGE2, and MCP-1, in these lesions (89).

In a *M. tuberculosis* murine model, IL-1 β triggered PGE2 production as a protective response toward mycobacterial clearance and it is also negatively regulated type I IFNs. Curiously, highly susceptible mice (IL-1 β knockouts, for example) can be rescued using PGE2 and zileuton, which is an inhibitor of 5-lipoxygenase that blocks LTB4 and, consequently, TNF (41, 90). Genetic polymorphisms of *LTB4* demonstrate an important association with the development of severe tuberculous meningitis, in which the inadequate balance of the inflammatory response that is mediated by TNF and LTB4 may aggravate the disease progression (90). The importance of the host's lipid metabolism regulation, which can affect the availability of nutrients to the pathogen as well as the production of inflammatory mediators, is increasingly evident. Host-based therapies are currently under development with the goal of metabolic drugs that could be interesting adjuvants in the mycobacterial diseases treatment, such as leprosy and tuberculosis.

Thus, ongoing mycobacterial survival is associated with enhancements to lipid metabolism. After infection takes place, mycobacteria cause a shift in the host cell gene expression that leads to lipid uptake through the receptor induction of cholesterol (15, 77) and the formation of lipid bodies (91). Strong modulation of lipid synthesis pathways in host cells by *M. leprae* or *M. tuberculosis* has been observed, and it has been suggested that lipid droplets work as a nutrient reservoir for *M. tuberculosis* (7). Although *M. leprae* are unable to remove carbons from cholesterol (80), both *M. leprae* and *M. tuberculosis* seem to take shelter within lipid bodies, which are formed abundantly by host cells (91). Therefore, as an example, a pharmacological approach to compensate for the induction of this crucial pathway for *M. leprae* survival would be the use of statins as an adjuvant in combination with multidrug therapy. Results from experimental models (81) suggest that modulation of autophagic mechanisms could also promote the antimicrobial response against *M. tuberculosis* and decrease inflammation-mediated immunopathology (31, 82, 83). Recently, mammalian target of rapamycin pharmacological agents, including rapamycin or AMPK targets such as metformin, have been tested in clinical trials as an

adjuvant therapy in tuberculosis; these tests have been successful and can be applied in leprosy (92–94).

CONCLUSION

An infectious disease is a result of a specific and successive combination of events that can only culminate in complete progression if the bacteria are able to block several restrictive antimicrobial mechanisms. The last 10 years of research have been remarkable for revealing novel genes associated with leprosy, including complementary approaches such as genomic scans or GWASs and microarray analysis. Combining these data produce a clear overview of the mechanisms induced by bacteria to survive within hostile and sterile cellular cytosol. Gene-sensing mycobacterial components such as *NOD2* and *TLR1* and pathways that regulate autophagy (*PARK2*, *LRRK2*, and *RIPK2*) are intrinsically antimicrobial, but they can be opposed and inhibited by the emergence of type I IFN induction. In this scenario, double-stranded DNA receptors and STING/TBK1/IRF3 signaling drive a pro-mycobacterial response.

The fact remains that it is very difficult to define the chronology of these events or even the precise moment when the disease progression takes place in the infected individual. The rationale here is that defining these steps carefully and observing the fine-tuning of genotypic influences on phenotypes can help to halt the disease progression in infected people. Consequently, the current challenge is to combine results from *in vitro* and genotype-to-phenotype studies toward the development of host-directed therapies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TP, LB-S, FL, and MM contributed equally to this manuscript. RM contributed with the “Metabolic immunity in leprosy” topic. All authors participated in the conception, design and writing of this review.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank you for Vorxy Media Lab's figures design and Scribendi Inc. for the English editing and proofreading.

FUNDING

Authors have grants from Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)—PAPES-VI—421852/2017-8, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) 400017/2017-2 and 226254, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 309397/2013-8 and Pos-Doutorado Junior (PDJ) 400852/2017-8. TP and RM are PhD fellows from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and FIOCRUZ, respectively.

REFERENCES

1. Silva CAM, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun* (2013) 81(7):2645–59. doi:10.1128/IAI.00147-13
2. de Toledo-Pinto TG, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ, et al. STING-dependent 2'-5' oligoadenylate synthetase-like production is required for intracellular *Mycobacterium leprae* survival. *J Infect Dis* (2016) 214(2):311–20. doi:10.1093/infdis/jiw144
3. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial

- survival in phagosomes. *Cell Microbiol* (2011) 13(2):259–73. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x
4. Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *Infect Immun* (2010) 78(1):293–300. doi:10.1128/IAI.00816-09
 5. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluittsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* (2007) 129(7):1287–98. doi:10.1016/j.cell.2007.05.059
 6. Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe* (2012) 11(5):469–80. doi:10.1016/j.chom.2012.03.007
 7. Gago G, Diacovich L, Gramajo H. Lipid metabolism and its implication in mycobacteria-host interaction. *Curr Opin Microbiol* (2017) 41:36–42. doi:10.1016/j.mib.2017.11.020
 8. Schuenemann VJ, Singh P, Mendum TA, Krause-Kyora B, Jäger G, Bos KI, et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. *Science* (2013) 341(6142):179–83. doi:10.1126/science.1238286
 9. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* (2011) 6(5):533–49. doi:10.2217/fmb.11.39
 10. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* (2009) 361(27):2609–18. doi:10.1056/NEJMoa0903753
 11. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* (2004) 427(6975):636–40. doi:10.1038/nature02326
 12. Santos AR, Suffys PN, Vanderborcht PR, Moraes MO, Vieira LMM, Cabello PH, et al. Role of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis* (2002) 186(11):1687–91. doi:10.1086/345366
 13. Marques Cde S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis* (2013) 208(1):120–9. doi:10.1093/infdis/jit133
 14. Cezar-de-Mello PFT, Toledo-Pinto TG, Marques CS, Arnez LEA, Cardoso CC, Guerreiro LTA, et al. Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) single nucleotide polymorphism is genetically and functionally associated with leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(9):e3099. doi:10.1371/journal.pntd.0003099
 15. Guerreiro LTA, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One* (2013) 8(6):e64748. doi:10.1371/journal.pone.0064748
 16. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* (2003) 9(5):525–32. doi:10.1038/nm864
 17. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol* (2010) 22(1):48–54. doi:10.1016/j.coi.2009.12.001
 18. Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, et al. Convergence of IL-1 β and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS One* (2009) 4(6):e5810. doi:10.1371/journal.pone.0005810
 19. Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med* (2012) 18(2):267–73. doi:10.1038/nm.2584
 20. Realegeno S, Kelly-Scumpia KM, Dang AT, Lu J, Teles R, Liu PT, et al. S100A12 is part of the antimicrobial network against *Mycobacterium leprae* in human macrophages. *PLoS Pathog* (2016) 12(6):e1005705. doi:10.1371/journal.ppat.1005705
 21. Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut* (2011) 60(12):1739–53. doi:10.1136/gut.2009.199679
 22. Schurr E, Gros P. A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease? *N Engl J Med* (2009) 361(27):2666–8. doi:10.1056/NEJMe0910690
 23. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* (2012) 491(7422):119–24. doi:10.1038/nature11582
 24. Schenk M, Mahapatra S, Le P, Kim HJ, Choi AW, Brennan PJ, et al. Human NOD2 recognizes structurally unique muramyl dipeptides from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* (2016) 84(9):2429–38. doi:10.1128/IAI.00334-16
 25. Yan R, Liu Z. LRRK2 enhances Nod1/2-mediated inflammatory cytokine production by promoting Rip2 phosphorylation. *Protein Cell* (2017) 8(1):55–66. doi:10.1007/s13238-016-0326-x
 26. Fava VM, Manry J, Cobat A, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. A missense LRRK2 variant is a risk factor for excessive inflammatory responses in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10(2):e0004412. doi:10.1371/journal.pntd.0004412
 27. Hui KY, Fernandez-Hernandez H, Hu J, Schaffner A, Pankratz N, Hsu N-Y, et al. Functional variants in the LRRK2 gene confer shared effects on risk for Crohn's disease and Parkinson's disease. *Sci Transl Med* (2018) 10(423):eaai7795. doi:10.1126/scitranslmed.aai7795
 28. Sales-Marques C, Cardoso CC, Alvarado-Arnez LE, Illaramendi X, Sales AM, Hacker MA, et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* (2017) 11(7):e0005754. doi:10.1371/journal.pntd.0005754
 29. Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RMB, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* (2012) 18(4):555–63. doi:10.1038/nm.2650
 30. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* (2010) 16(1):90–7. doi:10.1038/nm.2069
 31. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* (1971) 134(3 Pt 1):713–40. doi:10.1084/jem.134.3.713
 32. Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* (1975) 142(1):1–16. doi:10.1084/jem.142.1.1
 33. Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, de Jonge MI, Bottai D, Demangel C, et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* (2006) 74(1):88–98. doi:10.1128/IAI.74.1.88-98.2006
 34. Stanley SA, Johndrow JE, Manzanillo P, Cox JS. The type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J Immunol* (2007) 178(5):3143–52. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3143
 35. Houben D, Demangel C, van Ingen J, Perez J, Baldeón L, Abdallah AM, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* (2012) 14(8):1287–98. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01799.x
 36. Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* (2012) 150(4):803–15. doi:10.1016/j.cell.2012.06.040
 37. Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* (2013) 501(7468):512–6. doi:10.1038/nature12566
 38. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacothen N, Griffiths G, Moita LF, et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol* (2010) 12(8):1046–63. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01450.x
 39. Wassermann R, Gulen MF, Sala C, Perin SG, Lou Y, Rybniker J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* differentially activates cGAS- and inflammasome-dependent intracellular immune responses through ESX-1. *Cell Host Microbe* (2015) 17(6):799–810. doi:10.1016/j.chom.2015.05.003
 40. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature* (2010) 466(7309):973–7. doi:10.1038/nature09247
 41. Novikov A, Cardone M, Thompson R, Shenderov K, Kirschman KD, Mayer-Barber KD, et al. *Mycobacterium tuberculosis* triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 β production in human macrophages. *J Immunol* (2011) 187(5):2540–7. doi:10.4049/jimmunol.1100926
 42. Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human antimycobacterial responses. *Science* (2013) 339(6126):1448–53. doi:10.1126/science.1233665

43. Teles RMB, Kelly-Scumpia KM, Sarno EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, et al. IL-27 suppresses antimicrobial activity in human leprosy. *J Invest Dermatol* (2015) 135(10):2410–7. doi:10.1038/jid.2015.195
44. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* (2015) 15(2):87–103. doi:10.1038/nri3787
45. Watson RO, Bell SL, MacDuff DA, Kimmey JM, Diner EJ, Olivás J, et al. The cytosolic sensor cGAS detects *Mycobacterium tuberculosis* DNA to induce type I interferons and activate autophagy. *Cell Host Microbe* (2015) 17(6):811–9. doi:10.1016/j.chom.2015.05.004
46. Collins AC, Cai H, Li T, Franco LH, Li X-D, Nair VR, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune DNA sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe* (2015) 17(6):820–8. doi:10.1016/j.chom.2015.05.005
47. Franco LH, Nair VR, Scharn CR, Xavier RJ, Torrealba JR, Shiloh MU, et al. The Ubiquitin Ligase Smurf1 functions in selective autophagy of *Mycobacterium tuberculosis* and anti-tuberculous host defense. *Cell Host Microbe* (2017) 21(1):59–72. doi:10.1016/j.chom.2016.11.002
48. Tanaka Y, Chen ZJ. STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway. *Sci Signal* (2012) 5(214):ra20. doi:10.1126/scisignal.2002521
49. Liu C, Yue R, Yang Y, Cui Y, Yang L, Zhao D, et al. AIM2 inhibits autophagy and IFN- β production during *M. bovis* infection. *Oncotarget* (2016) 7(30):46972–87. doi:10.18632/oncotarget.10503
50. de Andrade Silva BJ, de Mattos Barbosa MG, Andrade PR, Ferreira H, da Costa Nery JA, C orte-Real S, et al. Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization. *PLoS Pathog* (2017) 13(1):e1006103. doi:10.1371/journal.ppat.1006103
51. Ibsen MS, Gad HH, Andersen LL, Hornung V, Julkunen I, Sarkar SN, et al. Structural and functional analysis reveals that human OASL binds dsRNA to enhance RIG-I signaling. *Nucleic Acids Res* (2015) 43(10):5236–48. doi:10.1093/nar/gkv389
52. Leisching G, Wiid I, Baker B. The Association of OASL and Type I Interferons in the Pathogenesis and Survival of Intracellular Replicating Bacterial Species. *Front Cell Infect Microbiol* (2017) 7:196. doi:10.3389/fcimb.2017.00196
53. Olive AJ, Sasseti CM. Metabolic crosstalk between host and pathogen: sensing, adapting and competing. *Nat Rev Microbiol* (2016) 14(4):221–34. doi:10.1038/nrmicro.2016.12
54. Beste DJV, N oh K, Niedenf uhr S, Mendum TA, Hawkins ND, Ward JL, et al. 13C-flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* (2013) 20(8):1012–21. doi:10.1016/j.chembiol.2013.06.012
55. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol* (2013) 34(3):137–43. doi:10.1016/j.it.2012.10.001
56. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* (2003) 24(5):242–8. doi:10.1016/S1471-4906(03)00072-3
57. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* (2006) 176(11):6752–61. doi:10.4049/jimmunol.176.11.6752
58. de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paix o de Oliveira JA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes Infect* (2017) 19:505–14. doi:10.1016/j.micinf.2017.06.006
59. Tardito S, Negrini S, Conteduca G, Ferrera F, Parodi A, Battaglia F, et al. Indoleamine 2,3 dioxygenase gene polymorphisms correlate with CD8+ Treg impairment in systemic sclerosis. *Hum Immunol* (2013) 74(2):166–9. doi:10.1016/j.humimm.2012.11.008
60. M uller A, Heselner K, Schmidt SK, Spekker K, Mackenzie CR, D aubener W. The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med* (2009) 13(6):1125–35. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00542.x
61. Obojes K, Andres O, Kim KS, D aubener W, Schneider-Schaules J. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol* (2005) 79(12):7768–76. doi:10.1128/JVI.79.12.7768-7776.2005
62. Albini E, Rosini V, Gargaro M, Mondanelli G, Belladonna ML, Pallotta MT, et al. Distinct roles of immunoreceptor tyrosine-based motifs in immunosuppressive indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *J Cell Mol Med* (2017) 21(1):165–76. doi:10.1111/jcmm.12954
63. Buchakjian MR, Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010) 11(10):715–27. doi:10.1038/nrm2972
64. Medeiros RCA, do Carmo de Vasconcelos Girardi K, Cardoso FKL, de Siqueira Mietto B, de Toledo Pinto TG, Gomez LS, et al. Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* (2016) 291(47):24803. doi:10.1074/jbc.M116.725283
65. Mehrotra P, Jamwal SV, Saquib N, Sinha N, Siddiqui Z, Manivel V, et al. Pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* is expressed by regulating metabolic thresholds of the host macrophage. *PLoS Pathog* (2014) 10(7):e1004265. doi:10.1371/journal.ppat.1004265
66. Abrantes JL, Alves CM, Costa J, Almeida FCL, Sola-Penna M, Fontes CFL, et al. Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1). *Biochim Biophys Acta* (2012) 1822(8):1198–206. doi:10.1016/j.bbadis.2012.04.011
67. Craveiro M, Clerc I, Sitbon M, Taylor N. Metabolic pathways as regulators of HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS* (2013) 8(3):182–9. doi:10.1097/COH.0b013e32835fc53e
68. Dai L, Hu WW, Xia L, Xia M, Yang Q. Transmissible gastroenteritis virus infection enhances SGLT1 and GLUT2 expression to increase glucose uptake. *PLoS One* (2016) 11(11):e0165585. doi:10.1371/journal.pone.0165585
69. El-Bacha T, Menezes MMT, Azevedo e Silva MC, Sola-Penna M, Da Poian AT. Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol Cell Biochem* (2004) 266(1–2):191–8. doi:10.1023/B:MCBI.0000049154.17866.00
70. Sorbara LR, Maldarelli F, Chamoun G, Schilling B, Chokekijcahi S, Staudt L, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of H9 cells induces increased glucose transporter expression. *J Virol* (1996) 70(10):7275–9.
71. Ripoli M, D'Aprile A, Quarato G, Sarasin-Filipowicz M, Gouttenoire J, Scrima R, et al. Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 alpha-mediated glycolytic adaptation. *J Virol* (2010) 84(1):647–60. doi:10.1128/JVI.00769-09
72. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest* (2008) 118(8):2917–28. doi:10.1172/JCI34189
73. Batista-Silva LR, Rodrigues LS, Vivarini Ade C, Costa Fda MR, Antunes de Mattos K, Costa MRSN, et al. *Mycobacterium leprae*-induced insulin-like growth factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages. *Sci Rep* (2016) 6:27632. doi:10.1038/srep27632
74. Gauguin L, Klaproth B, Sajid W, Andersen AS, McNeil KA, Forbes BE, et al. Structural basis for the lower affinity of the insulin-like growth factors for the insulin receptor. *J Biol Chem* (2008) 283(5):2604–13. doi:10.1074/jbc.M709220200
75. Rechler MM, Nissley SP. The nature and regulation of the receptors for insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* (1985) 47:425–42. doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.002233
76. Wieckowski MR, Wojtczak L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* (1998) 423(3):339–42. doi:10.1016/S0014-5793(98)00118-5
77. Mattos KA, Oliveira VCG, Berr edo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol* (2014) 16(6):797–815. doi:10.1111/cmi.12279
78. Amaral JJ, Antunes LCM, de Macedo CS, Mattos KA, Han J, Pan J, et al. Metabonomics reveals drastic changes in anti-inflammatory/pro-resolving polyunsaturated fatty acids-derived lipid mediators in leprosy disease. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7(8):e2381. doi:10.1371/journal.pntd.0002381
79. de Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MCV, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2012) 107 (Suppl 1):156–66. doi:10.1590/S0074-02762012000900023
80. Marques MAM, Berr edo-Pinho M, Rosa TLSA, Pujari V, Lemes RMR, Lery LMS, et al. The essential role of cholesterol metabolism in the intracellular survival

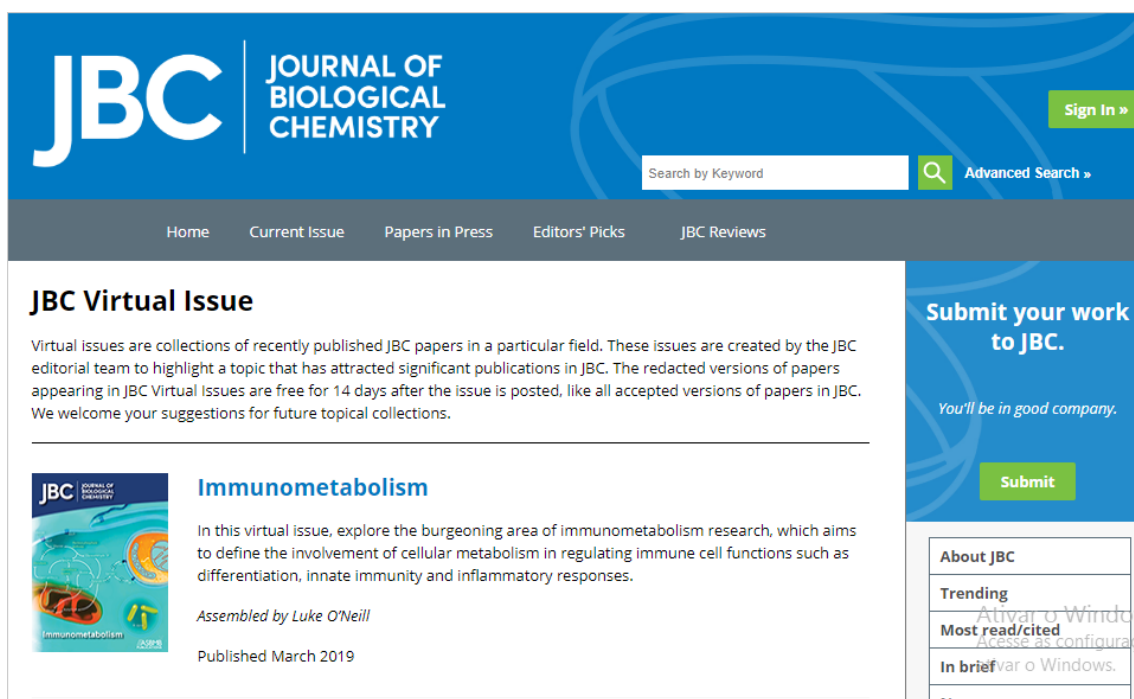
- of *Mycobacterium leprae* is not coupled to central carbon metabolism and energy production. *J Bacteriol* (2015) 197(23):3698–707. doi:10.1128/JB.00625-15
81. Lobato LS, Rosa PS, Ferreira Jda S, Neumann Ada S, da Silva MG, do Nascimento DC, et al. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob Agents Chemother* (2014) 58(10):5766–74. doi:10.1128/AAC.01826-13
 82. Lima Ede O, de Macedo CS, Esteves CZ, de Oliveira DN, Pessolani MCV, da Costa Nery JA, et al. Skin imprinting in silica plates: a potential diagnostic methodology for leprosy using high-resolution mass spectrometry. *Anal Chem* (2015) 87(7):3585–92. doi:10.1021/acs.analchem.5b00097
 83. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* (1999) 103(6):773–8. doi:10.1172/JCI5624
 84. Cambier CJ, O'Leary SM, O'Sullivan MP, Keane J, Ramakrishnan L. Phenolic glycolipid facilitates mycobacterial escape from microbicidal tissue-resident macrophages. *Immunity* (2017) 47(3):552–65.e4. doi:10.1016/j.immuni.2017.08.003
 85. Conrad WH, Osman MM, Shanahan JK, Chu F, Takaki KK, Cameron J, et al. Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(6):1371–6. doi:10.1073/pnas.1620133114
 86. Cepok S, Schreiber H, Hoffmann S, Zhou D, Neuhaus O, von Geldern G, et al. Enhancement of chemokine expression by interferon beta therapy in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* (2009) 66(10):1216–23. doi:10.1001/archneurol.2009.138
 87. Chen H, Sun H, You F, Sun W, Zhou X, Chen L, et al. Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity. *Cell* (2011) 147(2):436–46. doi:10.1016/j.cell.2011.09.022
 88. Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* (1995) 48(2):123–8. doi:10.1016/0165-2478(95)02455-7
 89. de Sousa JR, de Sousa RPM, de Souza Aarão TL, Dias LB, Carneiro FRO, Fuzii HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop* (2016) 157:108–14. doi:10.1016/j.actatropica.2016.01.008
 90. Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, McFarland R, Vickery TW, Ray JP, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* (2012) 148(3):434–46. doi:10.1016/j.cell.2011.12.023
 91. Kim M-J, Wainwright HC, Locketz M, Bekker L-G, Walther GB, Dittrich C, et al. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol Med* (2010) 2(7):258–74. doi:10.1002/emmm.201000079
 92. Restrepo BI. Metformin: candidate host-directed therapy for tuberculosis in diabetes and non-diabetes patients. *Tuberculosis (Edinb)* (2016) 101S:S69–72. doi:10.1016/j.tube.2016.09.008
 93. Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* (2007) 6(4):304–12. doi:10.1038/nrd2272
 94. Khan A, Jagannath C. Analysis of host-pathogen modulators of autophagy during *Mycobacterium tuberculosis* infection and therapeutic repercussions. *Int Rev Immunol* (2017) 36(5):271–86. doi:10.1080/08830185.2017.1356924

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Toledo Pinto, Batista-Silva, Medeiros, Lara and Moraes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. PUBLICAÇÃO EM EDIÇÃO ESPECIAL DA JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (JBC)

Devido a sua relevância para o entendimento das modulações metabólicas envolvendo patógenos e hospedeiros, o primeiro trabalho apresentado nesta tese foi escolhido para participar e ser capa de uma edição especial sobre imunometabolismo da revista JBC.



The screenshot displays the JBC (Journal of Biological Chemistry) website. The header features the JBC logo and the text "JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY". A search bar is present with the text "Search by Keyword" and a magnifying glass icon, followed by a link to "Advanced Search". Navigation links include "Home", "Current Issue", "Papers in Press", "Editors' Picks", and "JBC Reviews". A "Sign In" button is located in the top right corner.

The main content area is titled "JBC Virtual Issue". Below the title, a paragraph explains that virtual issues are collections of recently published JBC papers in a particular field, created by the JBC editorial team to highlight significant publications. It notes that redacted versions of papers appearing in JBC Virtual Issues are free for 14 days after the issue is posted, like all accepted versions of papers in JBC. It also welcomes suggestions for future topical collections.

The featured virtual issue is titled "Immunometabolism". It includes a small image of the issue cover, which shows a stylized cell and metabolic pathways. The text describes the issue as exploring the burgeoning area of immunometabolism research, which aims to define the involvement of cellular metabolism in regulating immune cell functions such as differentiation, innate immunity and inflammatory responses. It is assembled by Luke O'Neill and published in March 2019.

On the right side of the page, there is a blue sidebar with the text "Submit your work to JBC." and the tagline "You'll be in good company." Below this is a green "Submit" button. Further down, there is a section titled "About JBC" with sub-sections for "Trending", "Most read/cited", and "In brief".

Referências Bibliográficas

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338–81.
2. Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol.* 2015;33(1):46–54.
3. Monot M. On the Origin of Leprosy. *Science.* 13 de maio de 2005;308(5724):1040–2.
4. Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nat Commun.* 24 de 2018;9(1):352.
5. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde E Soc.* agosto de 2004;13(2):76–88.
6. Ellis H. Gerhard Hansen: discoverer of the organism of leprosy. *Br J Hosp Med Lond Engl* 2005. fevereiro de 2012;73(2):113.
7. World health organization(WHO) W. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. 2018.
8. Taxa de detecção geral de hanseníase por 100.000 habitantes Estados e regiões, Brasil, 1990 a 2017.
9. Boletim Epidemiológico - Ministério da Saúde 2018 - Hanseníase.
10. Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker M de A, Nery JA da C, Jerônimo SMB, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2):e0005364.
11. Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev.* dezembro de 1986;57 Suppl 2:199–202.
12. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* setembro de 1966;34(3):255–73.
13. Jopling WH, McDougall AC. *Handbook of leprosy.* Heinemann Professional; 1988. 206 p.
14. Yamamura M. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 3 de janeiro de 1992;255(5040):12.
15. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 11 de outubro de 1991;254(5029):277–9.

16. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology*. outubro de 1994;191(4–5):378–87.
17. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*. outubro de 1990;137(4):749–53.
18. Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br J Dermatol*. agosto de 2007;157(2):273–83.
19. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*. setembro de 1995;86(1):97–103.
20. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- β secreting CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T regulatory cells in anergic lepromatous leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):e2639.
21. CD4⁺CD25⁺ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 20 de novembro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Kumar+S%2C+Naqvi+RA%2C+Ali+R%2C+Rani+R%2C+Khanna+N%2C+Rao+DN.+CD4%2BCD25%2B+T+regs+with+acetylated+FoxP3+are+associated+with+immune+suppression+in+human+leprosy.+>
22. World Health Organization, WHO Expert Committee on leprosy : eighth report [Internet]. SEARO. [citado 24 de novembro de 2018]. Disponível em: http://www.searo.who.int/global_leprosy_programme/documents/WHO_expert_comm_8th_report/en/
23. Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol*. abril de 2014;89(2):205–18.
24. Teixeira MAG, Silveira VM da, França ER de. [Characteristics of leprosy reactions in paucibacillary and multibacillary individuals attended at two reference centers in Recife, Pernambuco]. *Rev Soc Bras Med Trop*. junho de 2010;43(3):287–92.
25. Spada C, Pirastu A. [Leprosy reactions]. *Rass Med Sarda*. junho de 1955;57(5–6):167–258.
26. Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. dezembro de 1998;40(6):363–70.

27. van Brakel WH. Comment: reversal reaction in multibacillary leprosy patients following MDT with and without immunotherapy with a candidate for an antileprosy vaccine, *Mycobacterium W. H. K. Kar* et al. *Lepr Rev.* dezembro de 1994;65(4):404–5.
28. Lienhardt C, Fine PE. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev.* março de 1994;65(1):9–33.
29. Teixeira MAG, Silveira VM da, França ER de. Características epidemiológicas e clínicas das reações hansênicas em indivíduos paucibacilares e multibacilares, atendidos em dois centros de referência para hanseníase, na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop.* junho de 2010;43(3):287–92.
30. Kumar B, Dogra S, Kaur I. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* junho de 2004;72(2):125–33.
31. Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev.* setembro de 2008;79(3):242–53.
32. Rao PN, Suneetha S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 5 de janeiro de 2016;82(3):252.
33. Da Cunha FMB, Werneck MCM, Scola RH, Werneck LC. Pure neural leprosy: Diagnostic value of the polymerase chain reaction. *Muscle Nerve.* 2006;33(3):409–14.
34. Antunes SLG, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA da C, Corte-Real S, et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(2):246–53.
35. Jardim MR, Antunes SLG, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JAC, Illarramendi X, et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev.* 2005;76(3):232–40.
36. Medeiros MF, Jardim R, Vital RT, Augusto J, Sales AM, Moraes MO De, et al. An attempt to improve pure neural leprosy diagnosis using immunohistochemistry tests in peripheral nerve biopsy specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(3):222–30.
37. Medeiros RCA, Girardi K do C de V, Cardoso FKL, Mietto B de S, Pinto TG de T, Gomez LS, et al. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* 7 de outubro de 2016;291(41):21375–87.
38. Aarão TL de S, de Sousa JR, Falcão ASC, Falcão LFM, Quaresma JAS. Nerve Growth Factor and Pathogenesis of Leprosy: Review and Update. *Front Immunol.* 2018;9:939.

39. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* setembro de 1971;39(3):693–702.
40. Balamayooran G, Pena M, Sharma R, Truman RW. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. *Clin Dermatol.* fevereiro de 2015;33(1):108–15.
41. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 13 de outubro de 2018]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sharma+R%2C+Lahiri+R%2C+Scollard+DM%2C+Pena+M%2C+Williams+DL%2C+Adams+LB%2C+et+al.+The+armadillo%3A+a+model+for+the+neuropathy+of+leprosy+and+potentially+other+neurodegenerative+diseases.+Dis+Model+Mech.+2013+Jan%3B6\(1\)%3A19%E2%80%93324](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sharma+R%2C+Lahiri+R%2C+Scollard+DM%2C+Pena+M%2C+Williams+DL%2C+Adams+LB%2C+et+al.+The+armadillo%3A+a+model+for+the+neuropathy+of+leprosy+and+potentially+other+neurodegenerative+diseases.+Dis+Model+Mech.+2013+Jan%3B6(1)%3A19%E2%80%93324).
42. Pallen MJ, McDermott RD. How might *Mycobacterium leprae* enter the body? *Lepr Rev.* dezembro de 1986;57(4):289–97.
43. Barton RP. A clinical study of the nose in lepromatous leprosy. *Lepr Rev.* junho de 1974;45(2):135–44.
44. Davey TF, Barton RP. Multiple nasal smears in early lepromatous leprosy. *Lepr Rev.* junho de 1974;45(2):158–65.
45. Silva CAM, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* julho de 2013;81(7):2645–59.
46. Shepard CC. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. *Int J Lepr.* março de 1962;30:10–8.
47. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* março de 2008;78(3):518–21.
48. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *N Engl J Med.* 28 de abril de 2011;364(17):1626–33.
49. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science.* 11 de 2016;354(6313):744–7.
50. Neumann A da S, Dias F de A, Ferreira J da S, Fontes ANB, Rosa PS, Macedo RE, et al. Experimental Infection of *Rhodnius prolixus*

- (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* Indicates Potential for Leprosy Transmission. *PloS One*. 2016;11(5):e0156037.
51. Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr*. março de 1999;71(1):61–7.
 52. Lavania M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis*. setembro de 2008;8(5):627–31.
 53. Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. *J Clin Microbiol*. 1º de setembro de 2006;44(9):3154–9.
 54. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. *J Clin Microbiol*. 1º de julho de 2009;47(7):2124–30.
 55. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. Ozcel MA, organizador. *PLoS Negl Trop Dis*. 11 de outubro de 2011;5(10):e1354.
 56. Mitsuda K. On the Value of a Skin Reaction to a Suspension of Leprous Nodules. *Int J Lepr*. 1953;21(3):347–58.
 57. Seydel JK, Wempe EG. Bacterial growth kinetics of “*M. lufu*” in the presence and absence of various drugs alone and in combination. A model for the development of combined chemotherapy against *M. leprae*? *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. março de 1982;50(1):20–30.
 58. Seydel JK, Wempe EG, Rosenfeld M. Bacterial growth kinetics of *Escherichia coli* and mycobacteria in the presence of brodimoprim and metioprim alone and in combination with sulfamerazine and dapsone (VI). *Chemotherapy*. 1983;29(4):249–61.
 59. Faget GH, Pogge RC. Present status of promin treatment in leprosy. *Int J Lepr*. dezembro de 1946;14:30–6.
 60. Noordeen SK. Multidrug therapy (MDT) and leprosy control. *Indian J Lepr*. dezembro de 1990;62(4):448–58.
 61. Cruz RC da S, Bühner-Sékula S, Penna MLF, Penna GO, Talhari S. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *An Bras Dermatol*. dezembro de 2017;92(6):761–73.

62. Haslett PAJ, Roche P, Butlin CR, Macdonald M, Shrestha N, Manandhar R, et al. Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation. *J Infect Dis.* 15 de dezembro de 2005;192(12):2045–53.
63. Fernández JM. Estudio comparativo de la reacción de Mitsuda con las reacciones tuberculínicas [Internet]. [citado 25 de novembro de 2018]. Disponível em: <http://www.biblio.unlp.edu.ar/catalogo/opac/cgi-bin/pgopac.cgi?VDOC=1.143272>
64. Calmette A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. *Proc R Soc Med.* setembro de 1931;24(11):1481–90.
65. Düppre NC, Camacho LAB, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JAC, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* julho de 2008;102(7):631–8.
66. de Carvalho FM, Rodrigues LS, Duppre NC, Alvim IMP, Ribeiro-Alves M, Pinheiro RO, et al. 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.* maio de 2017;11(5):e0005560.
67. Grzybowski A, Sak J, Pawlikowski J, Iwanowicz-Palus G. Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912)—The 100th anniversary of the death of the discoverer of *Mycobacterium leprae*. *Clin Dermatol.* setembro de 2013;31(5):653–5.
68. Bloom BR. [Learning from leprosy: a look at immunology and the Third World]. *Riv Infect.* dezembro de 1986;5(4):248–53.
69. Shepard CC, McRae DH. *Mycobacterium leprae*: viability at 0 degrees C, 31 degrees C, and during freezing. *Int J Lepr.* setembro de 1965;33(3):316–23.
70. Tortoli E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev.* outubro de 2014;27(4):727–52.
71. Gupta RS, Lo B, Son J. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera. *Front Microbiol.* 2018;9:67.
72. Fogel N. Tuberculosis: a disease without boundaries. *Tuberc Edinb Scotl.* setembro de 2015;95(5):527–31.
73. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* setembro de 1981;147(3):728–35.

74. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 25 de dezembro de 1982;257(24):15072–8.
75. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8):REVIEWS1023.
76. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 13 de outubro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Shepard+CC.+Multiplication+of+Mycobacterium+leprae+in+the+foot-pad+of+the+mouse.+Int+J+Lepr.+1962+Sep%3B30%3A291%E2%80%933306>.
77. Shepard CC, Chang YT. Effect of several anti-leprosy drugs on multiplication of human leprosy bacilli in footpads of mice. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N*. março de 1962;109:636–8.
78. Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF. Hairless mice, human leprosy and thymus-derived-lymphocytes. *Experientia*. 15 de julho de 1975;31(7):784–5.
79. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. março de 2001;69(1):1–12.
80. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol*. março de 2005;54(Pt 3):235–42.
81. Cole ST. The *Mycobacterium leprae* genome project. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. dezembro de 1998;66(4):589–91.
82. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 22 de fevereiro de 2001;409(6823):1007–11.
83. Black PA, Warren RM, Louw GE, Van Helden PD, Victor TC, Kana BD. Energy metabolism and drug efflux in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2491–503.
84. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. janeiro de 2011;6(1):57–71.
85. Benjak A, Avanzi C, Benito Y, Breyse F, Chartier C, Boschioli M-L, et al. Highly Reduced Genome of the New Species *Mycobacterium uberis*, the Causative Agent of Nodular Thelitis and Tuberculoid Scrotitis in Livestock and a Close Relative of the Leprosy Bacilli. *mSphere*. 03 de 2018;3(5).
86. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. dezembro de 2008;130(6):856–64.

87. Sotiriou MC, Stryjewska BM, Hill C. Two Cases of Leprosy in Siblings Caused by *Mycobacterium lepromatosis* and Review of the Literature. *Am J Trop Med Hyg.* 7 de setembro de 2016;95(3):522–7.
88. Armati P. *The Biology of Schwann Cells: Development, Differentiation and Immunomodulation.* Cambridge University Press; 2007. 185 p.
89. Cuzner ML, Davison AN, Gregson NA. The chemical composition of vertebrate myelin and microsomes. *J Neurochem.* junho de 1965;12(6):469–81.
90. Schmitt S, Castelvetti LC, Simons M. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim Biophys Acta.* agosto de 2015;1851(8):999–1005.
91. Brown AM, Evans RD, Black J, Ransom BR. Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. *Ann Neurol.* setembro de 2012;72(3):406–18.
92. Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. *Cell.* 21 de março de 1997;88(6):811–21.
93. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. 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.* 17 de agosto de 1999;96(17):9857–62.
94. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 27 de outubro de 2000;103(3):511–24.
95. de Melo Marques MA, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, et al. Bacterial and host-derived cationic proteins bind α 2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes Infect.* outubro de 2000;2(12):1407–17.
96. Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TL, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLoS Pathog.* julho de 2018;14(7):e1007151.
97. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci.* setembro de 2005;6(9):671–82.
98. Shetty VP, Mehta LN, Irani PF, Antia NH. Study of the evolution of nerve damage in leprosy. Part I--Lesions of the index branch of the radial cutaneous nerve in early leprosy. *Lepr India.* janeiro de 1980;52(1):5–18.
99. Shetty VP, Antia NH. Nerve damage in leprosy. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* dezembro de 1988;56(4):619–21.

100. Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog Neurobiol.* junho de 2010;91(2):102–7.
101. Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science.* 3 de maio de 2002;296(5569):927–31.
102. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming Adult Schwann Cells to Stem Cell-Like Cells by Leprosy Bacilli Promotes Dissemination of Infection. *Cell.* 17 de janeiro de 2013;152(0):51–67.
103. Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nat Med.* agosto de 2006;12(8):961–6.
104. Glial Cell Development: basic principles and clinical relevance [Internet]. Oxford University Press; 1997 [citado 28 de janeiro de 2019]. Disponível em: <http://www.oxfordscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9781872748542.001.0001/acprof-9781872748542>
105. Fawcett JW, Keynes RJ. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 1990;13:43–60.
106. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst JPNS.* março de 2002;7(1):13–27.
107. Tapinos N, Rambukkana A. 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 U S A.* 28 de junho de 2005;102(26):9188–93.
108. Kim HA, Pomeroy SL, Whoriskey W, Pawlitzky I, Benowitz LI, Sicinski P, et al. A developmentally regulated switch directs regenerative growth of Schwann cells through cyclin D1. *Neuron.* maio de 2000;26(2):405–16.
109. Rodrigues LS, Maeda S, Elisabete M, Moreira C, Tempone AJ, Lobato LS, et al. *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon. *Cell Microbiol.* 2010;12(September 2009):42–54.
110. Silva TP da, Silva ACC da, Baruque M da GA, Oliveira RB de, Machado MP, Sarno EN. Morphological and functional characterizations of Schwann cells stimulated with *Mycobacterium leprae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* junho de 2008;103(4):363–9.
111. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways -

Alves - 2004 - FEMS Microbiology Letters - Wiley Online Library [Internet]. 2018 [citado 3 de setembro de 2018]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09786.x>

112. Williams JW, Giannarelli C, Rahman A, Randolph GJ, Kovacic JC. Macrophage Biology, Classification, and Phenotype in Cardiovascular Disease: JACC Macrophage in CVD Series (Part 1). *J Am Coll Cardiol*. 30 de outubro de 2018;72(18):2166–80.
113. Astarie-Dequeker C, N'Diaye E-N, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria and Bypasses Bactericidal Responses in Human Macrophages. *Infect Immun*. 1999;67(2):469–77.
114. Prigozy TI, Sieling PA, Clemens D, Stewart PL, Behar SM, Porcelli SA, et al. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity*. 1997;6(2):187–97.
115. Schlesinger LS, Horwitz MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med*. 1991;174(November):1031–8.
116. Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng T-Y, Zailaa J, et al. A Macrophage Response to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. *Cell*. 24 de agosto de 2017;170(5):973-985.e10.
117. Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science*. 22 de março de 2013;339(6126):1448–53.
118. Donovan ML, Schultz TE, Duke TJ, Blumenthal A. Type I Interferons in the Pathogenesis of Tuberculosis: Molecular Drivers and Immunological Consequences. *Front Immunol*. 2017;8:1633.
119. Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity*. 23 de maio de 2013;38(5):870–80.
120. Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity*. 23 de maio de 2013;38(5):855–69.
121. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol*. 20 de 2016;17(10):1142–9.
122. Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*. 17 de maio de 2012;11(5):469–80.

123. Hartmann R, Olsen HS, Widder S, Jorgensen R, Justesen J. p59OASL, a 2'-5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'-5' oligoadenylate synthetase family. *Nucleic Acids Res.* 15 de setembro de 1998;26(18):4121–8.
124. de Toledo-Pinto TG, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ de A, et al. STING-Dependent 2'-5' Oligoadenylate Synthetase-Like Production Is Required for Intracellular *Mycobacterium leprae* Survival. *J Infect Dis.* 15 de 2016;214(2):311–20.
125. Kalisch PA. An overview of research on the history of leprosy. Part 1. From Celsus to Simpson, Circa. 1 A.D. Part 2. From Virchow to Møller-Christense, 1845-1973. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* junho de 1975;43(2):129–44.
126. Suster S, Cabello-Inchausti B, Robinson MJ. Nongranulomatous involvement of the bone marrow in lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* dezembro de 1989;92(6):797–801.
127. Mattos KA de, Sarno EN, Pessolani MCV, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* dezembro de 2012;107:156–66.
128. Knight M, Braverman J, Asfaha K, Gronert K, Stanley S. Lipid droplet formation in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages requires IFN- γ /HIF-1 α signaling and supports host defense. *PLoS Pathog.* 2018;14(1):e1006874.
129. Singh V, Jamwal S, Jain R, Verma P, Gokhale R, Rao KVS. *Mycobacterium tuberculosis*-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. *Cell Host Microbe.* 15 de novembro de 2012;12(5):669–81.
130. Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* março de 2010;87(3):371–84.
131. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol.* fevereiro de 2011;13(2):259–73.
132. Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1º de setembro de 2011;187(5):2548–58.
133. Almeida PE, Carneiro AB, Silva AR, Bozza PT. PPAR γ Expression and Function in Mycobacterial Infection: Roles in Lipid Metabolism, Immunity,

and Bacterial Killing. PPAR Res [Internet]. 2012 [citado 28 de novembro de 2018];2012. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407650/>

134. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther.* junho de 2006;110(3):371–85.
135. Szatmari I, Nagy L. Nuclear receptor signalling in dendritic cells connects lipids, the genome and immune function. *EMBO J.* 17 de setembro de 2008;27(18):2353–62.
136. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, et al. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem.* 18 de agosto de 1995;270(33):19269–76.
137. van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J Exp Med.* 1º de fevereiro de 1995;181(2):775–9.
138. Marques MAM, Berrêdo-Pinho M, Rosa TL, Pujari V, Lemes RMR, Lery LMS, et al. 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.* dezembro de 2015;197(23):3698–707.
139. Bloch H, Segal W. Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *J Bacteriol.* agosto de 1956;72(2):132–41.
140. Franzblau SG. Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. *J Clin Microbiol.* 1988;26(1):18–21.
141. Wheeler PR, Bulmer K, Ratledge C. Fatty acid oxidation and the β -oxidation complex in *Mycobacterium leprae* and two axenically cultivable mycobacteria that are pathogens. *J Gen Microbiol.* 1991;137:885–93.
142. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest.* agosto de 2008;118(8):2917–28.
143. Franzblau SG, Service USPH, Hansen WL. Axenic incorporation of [U - 14 C] palmitic acid into the phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;48:407–11.
144. Jain M, Petzold CJ, Schelle MW, Leavell MD, Mougous JD, Bertozzi CR, et al. Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 de março de 2007;104(12):5133–8.

145. Tanasova M, Fedie JR. Molecular Tools for Facilitative Carbohydrate Transporters (Gluts). *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 19 de 2017;18(18):1774–88.
146. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol.* dezembro de 2001;18(4):247–56.
147. Tanasova M, Fedie JR. Molecular Tools for Facilitative Carbohydrate Transporters (Gluts). *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 19 de 2017;18(18):1774–88.
148. Barron CC, Bilan PJ, Tsakiridis T, Tsiani E. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism.* fevereiro de 2016;65(2):124–39.
149. Zhao F-Q, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics.* abril de 2007;8(2):113–28.
150. Uldry M, Ibberson M, Hosokawa M, Thorens B. GLUT2 is a high affinity glucosamine transporter. *FEBS Lett.* 31 de julho de 2002;524(1–3):199–203.
151. Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O, Hirano H. Erythrocyte/HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem Biophys Res Commun.* 30 de novembro de 1990;173(1):67–73.
152. Zaid H, Antonescu CN, Randhawa VK, Klip A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochem J.* 15 de julho de 2008;413(2):201–15.
153. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 29 de junho de 2007;129(7):1261–74.
154. Bilan PJ, Ramlal T, Klip A. IGF-I mediated recruitment of glucose transporters from intracellular membranes to plasma membranes in L6 muscle cells. *Adv Exp Med Biol.* 1991;293:273–88.
155. Wong K-K, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* fevereiro de 2010;20(1):87–90.
156. Targeting HIF-1 for cancer therapy. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 17 de outubro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13130303>
157. Obach M, Navarro-Sabaté A, Caro J, Kong X, Duran J, Gómez M, et al. 6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia. *J Biol Chem.* 17 de dezembro de 2004;279(51):53562–70.

158. Hayashi M, Sakata M, Takeda T, Yamamoto T, Okamoto Y, Sawada K, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1alpha under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J Endocrinol.* outubro de 2004;183(1):145–54.
159. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* janeiro de 2008;7(1):11–20.
160. Zhao J, Benakanakere MR, Hosur KB, Galicia JC, Martin M, Kinane DF. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates TLR3 induced cytokines in human oral keratinocytes. *Mol Immunol.* 2010;48(0):294–304.
161. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* Artmed Editora; 1331 p.
162. Buchakjian MR, Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* outubro de 2010;11(10):715–27.
163. Lenzen S. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem.* 2 de maio de 2014;289(18):12189–94.
164. Barnett JA. A history of research on yeasts 6: the main respiratory pathway. *Yeast Chichester Engl.* setembro de 2003;20(12):1015–44.
165. Cori CF. Embden and the glycolytic pathway. *Trends Biochem Sci.* 1º de julho de 1983;8(7):257–9.
166. Pérez-Escuredo J, Van Hée VF, Sboarina M, Falces J, Payen VL, Pellerin L, et al. Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochim Biophys Acta.* outubro de 2016;1863(10):2481–97.
167. Pierre K, Pellerin L, Debernardi R, Riederer BM, Magistretti PJ. Cell-specific localization of monocarboxylate transporters, MCT1 and MCT2, in the adult mouse brain revealed by double immunohistochemical labeling and confocal microscopy. *Neuroscience.* 2000;100(3):617–27.
168. Domènech-Estévez E, Baloui H, Repond C, Rosafio K, Médard J-J, Tricaud N, et al. Distribution of monocarboxylate transporters in the peripheral nervous system suggests putative roles in lactate shuttling and myelination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 11 de março de 2015;35(10):4151–6.
169. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature.* 26 de julho de 2012;487(7408):443–8.
170. Taylor EB. Functional Properties of the Mitochondrial Carrier System. *Trends Cell Biol.* 2017;27(9):633–44.

171. Wolkow CA, Iser WB. Uncoupling protein homologs may provide a link between mitochondria, metabolism and lifespan. *Ageing Res Rev.* maio de 2006;5(2):196–208.
172. Mitchell P, Moyle J. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature.* 18 de dezembro de 1965;208(5016):1205–6.
173. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc.* agosto de 1966;41(3):445–502.
174. Teodoro JS, Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2018;1782:109–19.
175. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell.* outubro de 2005;8(4):311–21.
176. Chypre M, Zaidi N, Smans K. ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem Biophys Res Commun.* 25 de maio de 2012;422(1):1–4.
177. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger.* Artmed Editora; 1331 p.
178. Horecker BL. The pentose phosphate pathway. *J Biol Chem.* 13 de dezembro de 2002;277(50):47965–71.
179. Wamelink MMC, Struys EA, Jansen EEW, Levtchenko EN, Zijlstra FSM, Engelke U, et al. Sedoheptulokinase deficiency due to a 57-kb deletion in cystinosis patients causes urinary accumulation of sedoheptulose: elucidation of the CARKL gene. *Hum Mutat.* abril de 2008;29(4):532–6.
180. Clasquin MF, Melamud E, Singer A, Gooding JR, Xu X, Dong A, et al. Riboneogenesis in yeast. *Cell.* 10 de junho de 2011;145(6):969–80.
181. Kruger NJ, von Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr Opin Plant Biol.* junho de 2003;6(3):236–46.
182. Barcia-Vieitez R, Ramos-Martínez JI. The regulation of the oxidative phase of the pentose phosphate pathway: New answers to old problems. *IUBMB Life.* 1º de novembro de 2014;66(11):775–9.
183. Juhnke H, Krems B, Kötter P, Entian KD. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Mol Gen Genet MGG.* 25 de setembro de 1996;252(4):456–64.
184. Luzzatto L, Nannelli C, Notaro R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am.* abril de 2016;30(2):373–93.

185. Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, et al. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc.* agosto de 2015;90(3):927–63.
186. Frederiks WM, Vizan P, Bosch KS, Vreeling-Sindelárová H, Boren J, Cascante M. Elevated activity of the oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathway in (pre)neoplastic lesions in rat liver. *Int J Exp Pathol.* agosto de 2008;89(4):232–40.
187. Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* fevereiro de 1994;8(2):174–81.
188. Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, et al. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem.* 4 de junho de 1999;274(23):16040–6.
189. Stanton RC. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life.* maio de 2012;64(5):362–9.
190. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 30 de julho de 2010;39(2):171–83.
191. Folmes CDL, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab.* 3 de agosto de 2011;14(2):264–71.
192. Prigione A, Lichtner B, Kuhl H, Struys EA, Wamelink M, Lehrach H, et al. Human induced pluripotent stem cells harbor homoplasmic and heteroplasmic mitochondrial DNA mutations while maintaining human embryonic stem cell-like metabolic reprogramming. *Stem Cells Dayt Ohio.* setembro de 2011;29(9):1338–48.
193. Meadows AL, Kong B, Berdichevsky M, Roy S, Rosiva R, Blanch HW, et al. Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnol Prog.* abril de 2008;24(2):334–41.
194. Catchpole G, Platzer A, Weikert C, Kempkensteffen C, Johannsen M, Krause H, et al. Metabolic profiling reveals key metabolic features of renal cell carcinoma. *J Cell Mol Med.* janeiro de 2011;15(1):109–18.
195. Filosa S, Fico A, Paglialunga F, Balestrieri M, Crooke A, Verde P, et al. Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem J.* 15 de março de 2003;370(Pt 3):935–43.

196. Fico A, Paglialunga F, Cigliano L, Abrescia P, Verde P, Martini G, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* agosto de 2004;11(8):823–31.
197. Lange K, Proft ER. Inhibition of the 6-phosphogluconate dehydrogenase in the rat kidney by 6-aminonicotinamide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmakol.* 1970;267(2):177–80.
198. Manganelli G, Fico A, Masullo U, Pizzolongo F, Cimmino A, Filosa S. Modulation of the Pentose Phosphate Pathway Induces Endodermal Differentiation in Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 12 de janeiro de 2012 [citado 19 de janeiro de 2019];7(1). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3257253/>
199. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The Sedoheptulose Kinase CARKL Directs Macrophage Polarization through Control of Glucose Metabolism. *Cell Metab.* 6 de junho de 2012;15(6):813–26.
200. Taylor PL, Blakely KM, Leon GP de, Walker JR, McArthur F, Evdokimova E, et al. Structure and Function of Sedoheptulose-7-phosphate Isomerase, a Critical Enzyme for Lipopolysaccharide Biosynthesis and a Target for Antibiotic Adjuvants. *J Biol Chem.* 2 de janeiro de 2008;283(5):2835–45.
201. Valvano MA, Messner P, Kosma P. Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated glycerol-mannose-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides. *Microbiol Read Engl.* julho de 2002;148(Pt 7):1979–89.
202. Kneidinger B, Graninger M, Puchberger M, Kosma P, Messner P. Biosynthesis of nucleotide-activated D-glycerol-D-mannose-heptose. *J Biol Chem.* 15 de junho de 2001;276(24):20935–44.
203. Scherman M, Weston A, Duncan K, Whittington A, Upton R, Deng L, et al. Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall arabinosyl residues. *J Bacteriol.* dezembro de 1995;177(24):7125–30.
204. Klutts JS, Hatanaka K, Pan YT, Elbein AD. Biosynthesis of d-arabinose in *Mycobacterium smegmatis*: specific labeling from d-glucose. *Arch Biochem Biophys.* 15 de fevereiro de 2002;398(2):229–39.
205. Miyamoto Y, Mukai T, Matsuoka M, Kai M, Maeda Y, Makino M. Profiling of Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic Physiology of *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 1º de agosto de 2016 [citado 13 de outubro de 2018];10(8). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968842/>
206. Persico MG, Viglietto G, Martini G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, et al. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

- cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res.* 25 de março de 1986;14(6):2511–22.
207. Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes - Cohen - 1969 - *European Journal of Biochemistry* - Wiley Online Library [Internet]. [citado 21 de janeiro de 2019]. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1969.tb00488.x>
 208. Au SW, Gover S, Lam VM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure.* 1º de março de 2000;8(3):293–303.
 209. Chen EY, Zollo M, Mazzarella R, Ciccodicola A, Chen CN, Zuo L, et al. Long-range sequence analysis in Xq28: thirteen known and six candidate genes in 219.4 kb of high GC DNA between the RCP/GCP and G6PD loci. *Hum Mol Genet.* maio de 1996;5(5):659–68.
 210. Chen EY, Cheng A, Lee A, Kuang WJ, Hillier L, Green P, et al. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. *Genomics.* julho de 1991;10(3):792–800.
 211. Ademowo OG, Falusi AG. Molecular epidemiology and activity of erythrocyte G6PD variants in a homogeneous Nigerian population. *East Afr Med J.* janeiro de 2002;79(1):42–4.
 212. Beutler E, Vulliamy TJ. Hematologically Important Mutations: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis.* 1º de março de 2002;28(2):93–103.
 213. Longo L, Vanegas OC, Patel M, Rosti V, Li H, Waka J, et al. Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. *EMBO J.* 15 de agosto de 2002;21(16):4229.
 214. Chu CS, Bancone G, Nosten F, White NJ, Luzzatto L. Primaquine-induced haemolysis in females heterozygous for G6PD deficiency. *Malar J.* 2 de março de 2018;17(1):101.
 215. Primaquine. In: *Drugs and Lactation Database (LactMed)* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006 [citado 11 de janeiro de 2019]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501706/>
 216. Jollow DJ, Bradshaw TP, McMillan DC. Dapsone-induced hemolytic anemia. *Drug Metab Rev.* 1995;27(1–2):107–24.
 217. Dapsone. In: *Drugs and Lactation Database (LactMed)* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2006 [citado 21 de janeiro de 2019]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501589/>

218. Monteiro WM, Val FF, Siqueira AM, Franca GP, Sampaio VS, Melo GC, et al. G6PD deficiency in Latin America: systematic review on prevalence and variants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 19 de agosto de 2014;109(5):553–68.
219. Gómez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. Structural Defects Underlying Protein Dysfunction in Human Glucose-6-phosphate Dehydrogenase A⁻ Deficiency. *J Biol Chem*. 31 de março de 2000;275(13):9256–62.
220. Babalola MO, Imaga NA, Samuel TA, Diriwari IP, Kolade O, Ezeamalu I, et al. Genetic Polymorphisms of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Lagos, Nigeria. *Hemoglobin*. 2 de janeiro de 2018;42(1):47–50.
221. Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrons JL, Prchal JT. Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase A⁻. *Blood*. 15 de novembro de 1989;74(7):2550–5.
222. Cellular and Molecular Immunology - 9th Edition [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3>
223. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Network+integration+of+parallel+metabolic+and+transcriptional+data+reveals+metabolic+modules+that+regulate+macrophage+polarization>
224. TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKε supports the anabolic demands of dendritic cell activation [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358322/>
225. The Monocarboxylate Transporter 4 Is Required for Glycolytic Reprogramming and Inflammatory Response in Macrophages [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4281748/>
226. Involvement of the Warburg effect in non-tumor diseases processes. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28488732>
227. On the Origin of Cancer Cells | Science [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/content/123/3191/309.long>
228. Rosa JC, Lira FS, Festuccia W, Wessner B, Bishop NC. Immunometabolism: Molecular Mechanisms, Diseases, and Therapies 2018. *Mediators Inflamm*. 30 de janeiro de 2019;2019:1–2.

229. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396078>
230. The Cellular and Molecular Basis of Translational Immunometabolism. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26377896>
231. O'Neill LAJ, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J Exp Med*. 11 de janeiro de 2016;213(1):15–23.
232. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679807?log\\$=activity](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30679807?log$=activity)
233. O'Neill LAJ. A broken krebs cycle in macrophages. *Immunity*. 17 de março de 2015;42(3):393–4.
234. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=.+Immune-responsive+gene+1+protein+links+metabolism+to+immunity+by+catalyzin+g+itaconic+acid+production.+Proc.+Natl.+Acad.+S>
235. Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. *Cell Biochem Biophys*. abril de 2014;68(3):475–8.
236. Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 7 de setembro de 2000;275(3):715–9.
237. Succinate: a metabolic signal in inflammation. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361092>
238. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Repurposing mitochondria from ATP production to ROS generation drives a pro-inflammatory phenotype in macrophages that depends on succinate oxidation by complex II. *Cell*. 6 de outubro de 2016;167(2):457-470.e13.
239. Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, et al. Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell*. 6 de outubro de 2016;167(2):457-470.e13.
240. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. março de 2012;122(3):787–95.

241. Impact of hepatitis B virus infection on hepatic metabolic signaling pathway. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27688657>
242. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964123>
243. Olive AJ, Sasseti CM. Metabolic crosstalk between host and pathogen: sensing, adapting and competing. *Nat Rev Microbiol.* abril de 2016;14(4):221–34.
244. Gouzy A, Larrouy-Maumus G, Bottai D, Levillain F, Dumas A, Wallach JB, et al. Mycobacterium tuberculosis exploits asparagine to assimilate nitrogen and resist acid stress during infection. *PLoS Pathog.* fevereiro de 2014;10(2):e1003928.
245. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 15 de outubro de 2018]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870173>
246. Burrack KS, Morrison TE. The role of myeloid cell activation and arginine metabolism in the pathogenesis of virus-induced diseases. *Front Immunol.* 2014;5:428.
247. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 05 de 2018;115(23):5839–48.
248. Workman AD, Carey RM, Kohanski MA, Kennedy DW, Palmer JN, Adappa ND, et al. Relative susceptibility of airway organisms to antimicrobial effects of nitric oxide. *Int Forum Allergy Rhinol.* agosto de 2017;7(8):770–6.
249. Abu-Lubad M, Meyer TF, Al-Zeer MA. Chlamydia trachomatis inhibits inducible NO synthase in human mesenchymal stem cells by stimulating polyamine synthesis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de setembro de 2014;193(6):2941–51.
250. El-Bacha T, Menezes MMT, Azevedo e Silva MC, Sola-Penna M, Da Poian AT. Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. *Mol Cell Biochem.* novembro de 2004;266(1–2):191–8.
251. Garry RF, Bostick DA, Ulug ET. Sindbis virus infection increases hexose transport in quiescent cells. *Virology.* dezembro de 1986;155(2):378–91.
252. Kavanagh Williamson M, Coombes N, Juszczak F, Athanasopoulos M, Khan MB, Eykyn TR, et al. Upregulation of Glucose Uptake and Hexokinase Activity of Primary Human CD4+ T Cells in Response to Infection with HIV-1. *Viruses.* 07 de 2018;10(3).

253. Hegedus A, Kavanagh Williamson M, Huthoff H. HIV-1 pathogenicity and virion production are dependent on the metabolic phenotype of activated CD4+ T cells. *Retrovirology* [Internet]. 25 de novembro de 2014 [citado 16 de dezembro de 2018];11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4252996/>
254. Hepatitis B virus stimulates G6PD expression through HBx-mediated Nrf2 activation. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Liu+B%2C+Fang+M%2C+He+Z%2C+Cui+D%2C+Jia+S%2C+Lin+X%2C+Xu+X%2C+Zhou+T%2C+Liu+W.+Hepatitis+B+virus+stimulates+G6PD+expression+through+HBxmediated+Nrf2+activation>
255. Metabolic responses of primary and transformed cells to intracellular *Listeria monocytogenes*. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Metabolic+responses+of+primary+and+transformed+cells+to+intracellular+Listeria+monocytogenes>
256. Stavru F, Bouillaud F, Sartori A, Ricquier D, Cossart P. *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1º de março de 2011;108(9):3612–7.
257. *Brucella abortus* Induces a Warburg Shift in Host Metabolism That Is Linked to Enhanced Intracellular Survival of the Pathogen. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Brucella+abortus+induces+a+Warburg+shift+in+host+metabolism+that+is+linked+to+enhanced+intracellular+survival+of+the+pathogen>
258. Mehrotra P, Jamwal SV, Saquib N, Sinha N, Siddiqui Z, Manivel V, et al. Pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* Is Expressed by Regulating Metabolic Thresholds of the Host Macrophage. *PLoS Pathog* [Internet]. 24 de julho de 2014 [citado 16 de dezembro de 2018];10(7). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4110042/>
259. Lachmandas E, Beigier-Bompadre M, Cheng S-C, Kumar V, van Laarhoven A, Wang X, et al. Rewiring cellular metabolism via the AKT/mTOR pathway contributes to host defence against *Mycobacterium tuberculosis* in human and murine cells. *Eur J Immunol*. 2016;46(11):2574–86.
260. Cumming BM, Addicott KW, Adamson JH, Steyn AJ. *Mycobacterium tuberculosis* induces decelerated bioenergetic metabolism in human macrophages. *eLife*. 16 de 2018;7.
261. Alveolar Macrophages Provide an Early *Mycobacterium tuberculosis* Niche and Initiate Dissemination. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Alveolar+macrophages+prov>

ide+an+early+Mycobacterium+tuberculosis+niche+and+initiate+dissemination.

262. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo segregates with host macrophage metabolism and ontogeny. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Growth+of+Mycobacterium+tuberculosis+in%2%A0vivo+segregates+with+host+macrophage+metabolism+and+ontogeny>
263. Linking the transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis* during an extended intracellular infection. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 25 de março de 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Linking+the+transcriptional+profiles+and+the+physiological+states+of+Mycobacterium+tuberculosis+during+an+extended+intracellular+infection>
264. Guerreiro LTA, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One*. 2013;8(6):e64748.
265. Development of a quantitative PCR (TaqMan) assay for relative mitochondrial DNA copy number and the common mitochondrial DNA deletion in the rat. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 3 de fevereiro de 2019]. Disponível em: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Development+of+a+Quantitative+PCR+\(TaqMan\)+Assay+for+Relative+Mitochondrial+DNA+Copy+Number+and+the+Common+Mitochondrial+DNA+Deletion+in+the+Rat.+Environmental+and+Molecular+Mutagenesis](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Development+of+a+Quantitative+PCR+(TaqMan)+Assay+for+Relative+Mitochondrial+DNA+Copy+Number+and+the+Common+Mitochondrial+DNA+Deletion+in+the+Rat.+Environmental+and+Molecular+Mutagenesis)
266. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stepensky VA, Yegin O, Alpsoy E, et al. Cutting edge: A common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol*. 2007;178(12):7520–4.
267. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*. maio de 2011;6(5):533–49.
268. Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004;427(6975):636–40.
269. Koch RE, Josefson CC, Hill GE. Mitochondrial function, ornamentation, and immunocompetence. *Biol Rev Camb Philos Soc*. agosto de 2017;92(3):1459–74.
270. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 15 de outubro de 2003;552(Pt 2):335–44.

271. Douki T, Cadet J. Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free Radic Res.* maio de 1996;24(5):369–80.
272. Stocks J, Dormandy TL. The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol.* janeiro de 1971;20(1):95–111.
273. Mailloux RJ, Harper M-E. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med.* 15 de setembro de 2011;51(6):1106–15.
274. Jezek P, Orosz DE, Modriansky M, Garlid KD. Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem.* 21 de outubro de 1994;269(42):26184–90.
275. Ricquier D. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie.* março de 2017;134:3–8.
276. Pooya S, Liu X, Kumar VBS, Anderson J, Imai F, Zhang W, et al. The tumour suppressor LKB1 regulates myelination through mitochondrial metabolism. *Nat Commun.* 26 de setembro de 2014;5:4993.
277. Harris J, Deen N, Zamani S, Hasnat MA. Mitophagy and the release of inflammatory cytokines. *Mitochondrion.* 2018;41:2–8.
278. Riley JS, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, et al. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J.* 3 de setembro de 2018;37(17).
279. Spencer JS, Marques MAM, Lima MCBS, Junqueira-Kipnis AP, Gregory BC, Truman RW, et al. Antigenic Specificity of the Mycobacterium leprae Homologue of ESAT-6. *Infect Immun.* fevereiro de 2002;70(2):1010–3.
280. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiol Read Engl.* novembro de 1998;144 (Pt 11):3195–203.
281. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun.* janeiro de 1996;64(1):16–22.
282. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 29 de junho de 2007;129(7):1287–98.
283. Solenski NJ, diPierro CG, Trimmer PA, Kwan A-L, Helm GA, Helms GA. Ultrastructural changes of neuronal mitochondria after transient and permanent cerebral ischemia. *Stroke.* março de 2002;33(3):816–24.

284. Halestrap AP. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 23 de março de 1989;973(3):355–82.
285. Zoratti M, Szabò I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta*. 7 de janeiro de 2005;1706(1–2):40–52.
286. Ashpole NM, Sanders JE, Hodges EL, Yan H, Sonntag WE. Growth hormone, insulin-like growth factor-1 and the aging brain. *Exp Gerontol*. agosto de 2015;68:76–81.
287. De Ita JR, Castilla-Cortázar I, Aguirre GA, Sánchez-Yago C, Santos-Ruiz MO, Guerra-Menéndez L, et al. Altered liver expression of genes involved in lipid and glucose metabolism in mice with partial IGF-1 deficiency: an experimental approach to metabolic syndrome. *J Transl Med*. 14 de outubro de 2015;13:326.
288. Boutouja F, Stiehm CM, Platta HW. mTOR: A Cellular Regulator Interface in Health and Disease. *Cells*. 2 de janeiro de 2019;8(1).
289. Van de Velde S, Hogan MF, Montminy M. mTOR links incretin signaling to HIF induction in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 de outubro de 2011;108(41):16876–82.
290. Fan H, Yu X, Zou Z, Zheng W, Deng X, Guo L, et al. Metformin suppresses the esophageal carcinogenesis in rats treated with NMBzA through inhibiting AMPK/mTOR signaling pathway. *Carcinogenesis*. 16 de novembro de 2018;
291. Wang Q, Wang H, Jia Y, Ding H, Zhang L, Pan H. Luteolin reduces migration of human glioblastoma cell lines via inhibition of the p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Oncol Lett*. setembro de 2017;14(3):3545–51.
292. Park S, Chapuis N, Tamburini J, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Willems L, et al. Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. maio de 2010;95(5):819–28.
293. Singh V, Kaur C, Chaudhary VK, Rao KVS, Chatterjee S. M. tuberculosis Secretory Protein ESAT-6 Induces Metabolic Flux Perturbations to Drive Foamy Macrophage Differentiation. *Sci Rep [Internet]*. outubro de 2015 [citado 30 de setembro de 2018];5(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep12906>
294. Godal T. Leprosy immunology--some aspects of the role of the immune system in the pathogenesis of disease. *Lepr Rev*. dezembro de 1984;55(4):407–14.
295. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kushner P, Granelli-Piperno A, et al. Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with

- antigen and interleukin 2. *J Exp Med*. 1º de dezembro de 1983;158(6):2165–70.
296. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. novembro de 1999;50(5):541–9.
297. Teles RMB, Moraes MO, Geraldo NTR, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res*. novembro de 2002;294(8):355–62.
298. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol*. outubro de 2013;94(4):657–70.
299. Mattos KA, Oliveira VCG, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol*. junho de 2014;16(6):797–815.
300. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem Soc Trans*. novembro de 2002;30(Pt 6):1091–5.
301. Cerni S, Shafer D, To K, Venketaraman V. Investigating the Role of Everolimus in mTOR Inhibition and Autophagy Promotion as a Potential Host-Directed Therapeutic Target in Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Clin Med*. 11 de fevereiro de 2019;8(2).
302. Guindo A, Fairhurst RM, Doumbo OK, Wellems TE, Diallo DA. X-Linked G6PD Deficiency Protects Hemizygous Males but Not Heterozygous Females against Severe Malaria. *PLoS Med* [Internet]. março de 2007 [citado 27 de novembro de 2018];4(3). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1820604/>
303. Bottini E, Gloria-Bottini F, Maggioni G. On the relation between malaria and G-6-PD deficiency. *J Med Genet*. outubro de 1978;15(5):363–5.
304. Dombrowski JG, Souza RM, Curry J, Hinton L, Silva NRM, Grignard L, et al. G6PD deficiency alleles in a malaria-endemic region in the Western Brazilian Amazon. *Malar J* [Internet]. 15 de junho de 2017 [citado 23 de julho de 2018];16. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5471696/>
305. Surgenor DM. *The Red Blood Cell*. Academic Press; 2013. 783 p.
306. Friedman MJ. Oxidant damage mediates variant red cell resistance to malaria. *Nature*. 19 de julho de 1979;280(5719):245–7.

307. Andersen CBF, Torvund-Jensen M, Nielsen MJ, de Oliveira CLP, Hersleth H-P, Andersen NH, et al. Structure of the haptoglobin-haemoglobin complex. *Nature*. 20 de setembro de 2012;489(7416):456–9.
308. Kosman DJ. Redox cycling in iron uptake, efflux, and trafficking. *J Biol Chem*. 27 de agosto de 2010;285(35):26729–35.
309. Mendonça VRR, Luz NF, Santos NJG, Borges VM, Gonçalves MS, Andrade BB, et al. Association between the haptoglobin and heme oxygenase 1 genetic profiles and soluble CD163 in susceptibility to and severity of human malaria. *Infect Immun*. abril de 2012;80(4):1445–54.
310. Thomsen JH, Etzerodt A, Svendsen P, Moestrup SK. The haptoglobin-CD163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:523652.
311. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. novembro de 2012;42(11):2925–36.
312. Wang J, Moolji J, Dufort A, Staffa A, Domenech P, Reed MB, et al. Iron Acquisition in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Bacteriol*. 28 de dezembro de 2015;198(5):857–66.
313. Griffiths AJF, Wessler SR, Carroll SB, Doebley J. Introduction to Genetic Analysis. Eleventh edition. New York, NY: W. H. Freeman; 2015. 896 p.

Anexos

1. RESULTADOS COMPLEMENTARES CITADOS NA DISCUSSÃO

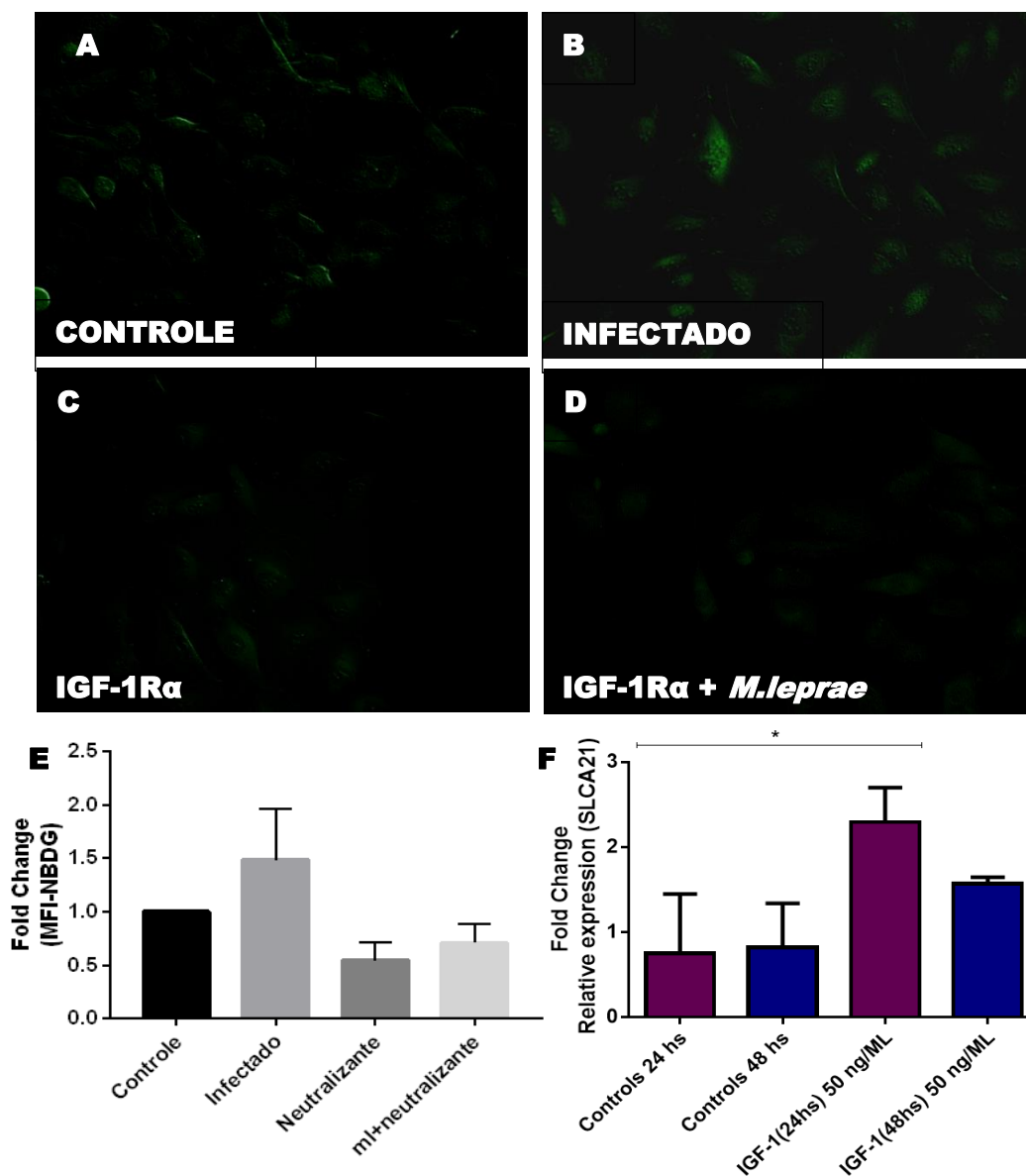


Figura 3.1. A adição do neutralizante do receptor de IGF-1 (IGF-1R α) diminui a captação de glicose em células ST8814 infectadas. Imagens de fluorescência de células marcadas com 2-NBDG após 48 horas de infecção. Células controle (A), células infectadas com o bacilo em uma MOI de 50:1 (B), Células submetidas ao neutralizante (IGF-1R α) por 48 horas (C). Células submetidas ao neutralizante 30 minutos antes da infecção por 48 horas (D) média e desvio padrão da quantificação da intensidade de fluorescência de 2-NBDG de 2 experimentos independentes (E), Células de Schwann não infectadas submetidas ao IGF-1 recombinante por 24 e 48 horas- Média e desvio padrão de 3 experimentos independentes (F) A significância estatística foi calculada por Friedman test (* $p < 0.05$).

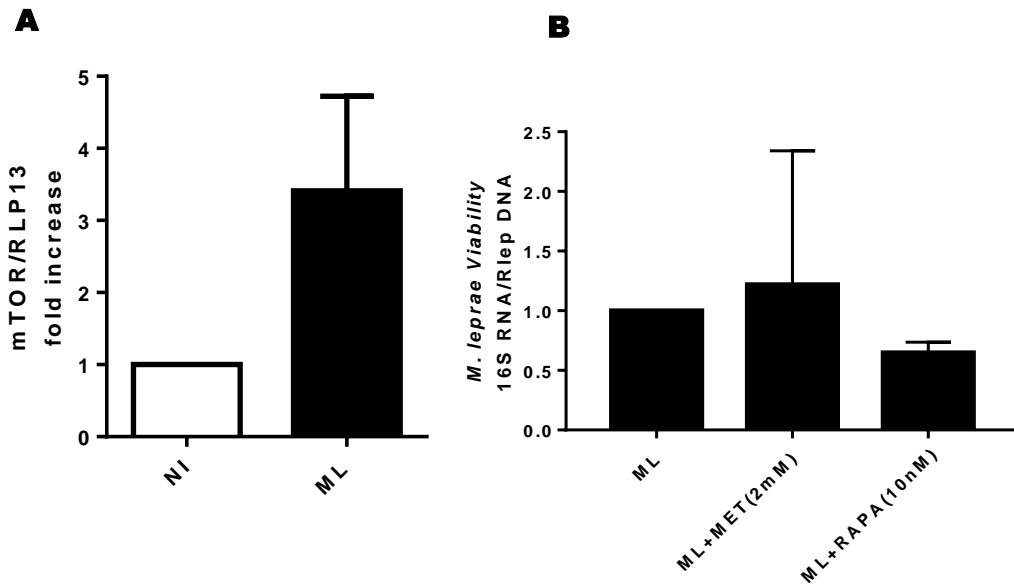


Figura 3.2 *M. leprae* induz a expressão de mTOR e adição de seu inibidor específico (rapamicina) diminui a viabilidade do bacilo em 48 horas de infecção. Expressão de mTOR avaliada por PCR em tempo real (A), viabilidade intracelular do *M. leprae* detectada pela razão RNA: 16S e DNA: Rlep. Os resultados mostram a análise de 2 experimentos independentes.

3. METODOLOGIA DOS RESULTADOS COMPLEMENTARES CITADOS NA DISCUSSÃO

Viabilidade Intracelular do *M. leprae* em células estimuladas com rapamicina e metformina

As células de Schwann da linhagem ST8814 foram distribuídas em placas de 12 pocos (8×10^5 por poço). Após 24 horas do plaqueamento, células foram submetidas ao *M. leprae* viável (MOI 50:1). A rapamicina (10nM) e metformina (2mM) foram adicionadas após 24 horas de infecção. A rapamicina foi ressuspendida em DMSO (Dimetilsulfóxido), que foi utilizado com veículo para nossas análises (dados não mostrados). Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi utilizado o sistema de PCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S do bacilo, com algumas modificações, como descrito por (54). A partir das células infectadas com o bacilo viável foram extraídos o DNA e o RNA, onde este último foi reversamente transcrito em cDNA. Os níveis de RNAr 16S foram normalizados pela detecção de DNA Rlep. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com 500 ng de DNA e cDNA em volume final de 20 μ L contendo TaqMan PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 0,1 μ M da sonda e 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo. As reações foram incubadas a 50° C por 2 min, 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 min no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus®.

Interferência do IGF-1R α na captação de glicose

A captação de glicose foi monitorada através de um análogo fluorescente 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-*glucose* (2-NBDG-*BioTECH*) como descrito no artigo apresentado no capítulo II. As células foram distribuídas em placas de 24 poços (2×10^4 em cada poço) com lamínula de vidro e embebidas em meio RPMI com 10% de SFB. O neutralizante do IGF-1 (IGF-1R α - R&D Systems) foi adicionado 30 minutos antes da infecção (MOI 50:1) que durou aproximadamente 48 horas. Após a marcação com 500 nM do análogo fluorescente de glicose (2-NBDG) por 30 minutos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, seguindo instruções do fabricante. As lamínulas de vidro foram

lavadas duas vezes com PBS 1X por 2 minutos e colocadas em lâminas de vidro onde foram analisadas rapidamente. Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se o microscópio invertido de fluorescência Zeiss AxioObserver com sistema de iluminação Colibri com objetiva Plan-neofluar 40X com 1.4 de abertura numérica (Zeiss). O sinal verde do NBDG foi fotografado em câmera monocromática HMR AxioCAN (Zeiss) através do software Axiovision versão 3.2 (Zeiss). O sistema de iluminação utilizou led de 470nm e filtro Zeiss 61.