

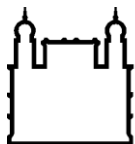
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**PAPEL DA AUTOFAGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA NO CONTROLE  
DA CARGA BACILAR EM PACIENTES MULTIBACILARES E NA  
PATOGENESE DA REAÇÃO TIPO 1 NA HANSENÍASE**

**TAMIRIS LAMEIRA BITTENCOURT**

Rio de Janeiro  
Agosto de 2022



Ministério da Saúde

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

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***TAMIRIS LAMEIRA BITTENCOURT***

Papel da autofagia da célula hospedeira no controle da carga bacilar em pacientes multibacilares e na patogênese da reação tipo 1 na hanseníase

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

**Orientador:** Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

**RIO DE JANEIRO**  
Agosto de 2022

Bittencourt, Tamiris Lameira.

Papel da autofagia da célula hospedeira no controle da carga bacilar em pacientes multibacilares e na patogênese da reação tipo 1 na hanseníase / Tamiris Lameira Bittencourt. - Rio de Janeiro, 2022.

xviii, 132f f.; il.

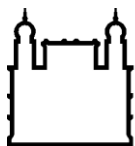
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

Orientadora: Roberta Olmo Pinheiro.

Bibliografia: f. 100-123

1. hanseníase. 2. reação reversa. 3. Interferon gama . 4. autofagia. 5. verapamil. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: TAMIRIS LAMEIRA BITTENCOURT**

PAPEL DA AUTOFAGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA NO CONTROLE DA CARGA  
BACILAR EM PACIENTES MULTIBACILARES E NA PATOGÊNESE DA REAÇÃO  
TIPO 1 NA HANSENÍASE

**ORIENTADOR: Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro**

**Aprovada em: 12/08/2022**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadock Menna-Barreto (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - RJ)

Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - RJ)

Prof. Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras (Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz - BA)

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues (Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ)

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz - RJ)

Rio de Janeiro, 12 de agosto de 2022



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de **Tamiris Lameira Bittencourt**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro. Ao décimo segundo dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às quatorze horas, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **"Papel da autofagia da célula hospedeira no controle da carga bacilar em pacientes multibacilares e na patogênese da reação tipo 1 na hanseníase"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Patologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Patricia Sampaio Tavares Veras – FIOCRUZ/BA, Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Vidal Pessolani – IOC/FIOCRUZ, e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Luciana Silva Rodrigues- UERJ/RJ e Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 12 de agosto de 2022.

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (Presidente da Banca):

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser meu refúgio e fortaleza;

Ao meu marido Mateus, por aturar meu estresse, por me incentivar, por me apoiar em todos os momentos, pela parceria, eu te amo;

Aos meus pais Marcelo e Cristina, obrigada pelo suporte, pelas orações e por não me deixarem desistir;

Ao meu irmão Lucas, por sempre estar ao meu lado e acreditar mais em mim do que eu mesma;

À minha avó Sebastiana e minha tia Rosilene, pelo carinho e por terem ajudado na minha formação, amo vocês;

Agradeço a minha orientadora Dra. Roberta Olmo Pinheiro pelas discussões científicas, pelas instruções profissionais, obrigada pela confiança e por sempre me motivar. A Beta é luz, mansidão, uma pessoa muito especial;

Ao Dr. Bruno Jorge, obrigada por ter contribuído diretamente para o meu amadurecimento profissional, pela colaboração e pelos ensinamentos na área de autofagia, muito obrigada;

Agradeço a toda equipe do pavilhão de hanseníase (galera da portaria, técnicos, tecnólogos, pesquisadores, colaboradores da limpeza e da secretaria, ao LAMICEL e ao LAHAN (sala 19)), vocês fazem parte dessa história;

As minhas amigas de laboratório, e de vida (rs) Mariana Martins, Jéssica Paixão, Ana Carolina e Mayara Mendes, sem vocês eu não teria chegado até a escrita dessa tese. Existe um trecho da música do compositor Emicida que resume nossa parceria: “E tudo, tudo, tudo, tudo que nós tem é nós”, vocês são demais;

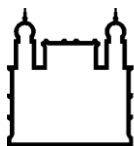
Agradeço a Ariane, Eliane, Rhana, Tatiana, Andressa, Pedro, Julia, Mylena, Katherine, Cibelle, Sandra, Isabella, Jéssica Brandão, Thaís, Beatriz, cada um, de maneira única e especial, tornaram essa trajetória muito mais leve, gratidão;

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Biologia Parasitária por serem excelentes referências, a Rita (sempre acessível), e à banca examinadora pelo tempo dedicado à avaliação deste trabalho;

Aos pacientes do Ambulatório Souza Araújo pelo consentimento em colaborar com este projeto;

Ao apoio financeiro do CNPq e do IOC/Fiocruz, muito obrigada.

“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’. Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PAPEL DA AUTOFAGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA NO CONTROLE DA CARGA BACILAR EM PACIENTES MULTIBACILARES E NA PATOGÊNESE DA REAÇÃO TIPO 1 NA HANSENÍASE

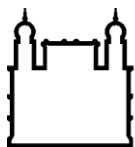
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Tamiris Lameira Bittencourt**

As reações hansênicas são episódios inflamatórios agudos que podem contribuir para o incremento do dano neural, contribuindo para a ocorrência de deformidades e incapacidades permanentes. O entendimento das vias moleculares relacionadas ao estabelecimento dos episódios reacionais é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que possam efetivamente controlar a reação. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina chave para o estabelecimento da reação tipo 1 (T1R) e está associado à indução de autofagia, um mecanismo de homeostase celular associado com o controle da carga bacilar em macrófagos infectados com *Mycobacterium leprae*. No presente trabalho, avaliamos a modulação da via de autofagia em células estimuladas por *M. leprae* na presença ou ausência de IFN- $\gamma$ . Observamos que o tratamento com IFN- $\gamma$  promoveu ativação da autofagia e aumentou a expressão de genes relacionados à formação de fagossomos e vias lisossomais. IFN- $\gamma$  aumentou a secreção de interleucina 15 (IL-15) em células THP-1 estimuladas por *M. leprae* em um processo associado à ativação da autofagia. Também observamos maior expressão do gene *IL15* em pacientes multibacilares (MB) que posteriormente desenvolveram T1R durante o acompanhamento, quando comparados aos pacientes MB que não desenvolveram a reação. Foram observados 13 genes comuns compartilhados entre células de lesão de pele de pacientes T1R e macrófagos THP-1 tratados com *M. leprae* e IFN- $\gamma$ . Entre esses genes, a expressão de *TPR* (“translocated promoter region”) aumentou significativamente em células T1R quando comparadas às células de pacientes MB. A identificação da autofagia como fator importante durante o estabelecimento das formas resistentes e suscetíveis abre portas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de controle da doença através da modulação do fluxo autofágico. Estratégias direcionadas à célula hospedeira, têm sido descritas com relativo sucesso e, a utilização de um fármaco capaz de modular o fluxo autofágico na célula hospedeira, pode ser promissor. Desse modo, avaliamos o papel do verapamil, um bloqueador de canal de cálcio, na indução de autofagia na célula hospedeira e controle da carga bacilar. Vimos que o fármaco induziu a formação de autofagossomos nos macrófagos primários e da linhagem THP-1, bem como, contribuiu para a redução da viabilidade do bacilo em macrófagos THP-1 infectados. Em conjunto, nossos resultados indicam que o IFN- $\gamma$  é uma citocina chave na imunopatogênese do T1R e está diretamente associado ao controle da carga bacilar em pacientes com hanseníase, possivelmente através da modulação da via autofágica na célula hospedeira, o que contribui para o controle da carga bacilar e que, fármacos com ação pró-autofágica podem ser avaliados como adjuvantes ao esquema poliquimioterápico.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## OSWALDO CRUZ INSTITUTE

### ROLE OF HOST CELL AUTOPHAGY IN THE CONTROL OF BACILLARY LOAD IN MULTIBACILLARY PATIENTS AND IN THE PATHOGENESIS OF THE TYPE 1 REACTION IN LEPROSY

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN PARASITIC BIOLOGY

**Tamiris Lameira Bittencourt**

Leprosy reactions are acute inflammatory episodes that may contribute to the improvement of neural damage, contributing to the occurrence of deformities and permanent disabilities. The understanding of the molecular pathways related to the establishment of reactional episodes is pivotal for the development of strategies that can effectively control the reaction. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is a key cytokine related with the outcome of the type 1 reaction (T1R) and is associated with the induction of autophagy, a mechanism of cellular homeostasis involved in the control of bacillary load in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. In the present work, we evaluated the modulation of the autophagy pathway in cells stimulated by *M. leprae* in the presence or absence of IFN- $\gamma$ . We observed that treatment with IFN- $\gamma$  promoted activation of autophagy and increased expression of genes related to phagosome formation and lysosomal pathways. IFN- $\gamma$  increased the secretion of interleukin 15 (IL-15) in THP-1 cells stimulated by *M. leprae* in a process associated with the activation of autophagy. We also observed higher expression of the *IL15* gene in multibacillary (MB) patients who later developed T1R during follow-up, when compared to MB patients who did not develop the reaction. Thirteen common genes shared between skin lesion cells from T1R patients and THP-1 macrophages treated with *M. leprae* and IFN- $\gamma$  were observed. Among these genes, TPR ("translocated promoter region") was significantly increased in T1R cells when compared to cells from MB patients. The identification of autophagy as an important factor during the establishment of resistant and susceptible forms may contribute for the development of new therapeutic strategies to control the disease through the modulation of the autophagic flow. Strategies targeting the host cell have been described with relative success, and the use of a drug capable of modulating the autophagic flux in the host cell may be promising. Thus, we evaluated the role of verapamil, a calcium channel blocker, in inducing autophagy in the host cell and controlling bacillary load. We saw that the drug induced the formation of autophagosomes in primary and THP-1 lineage macrophages, as well as contributed to the reduction of bacillus viability in THP-1 infected macrophages. Together, our results indicate that IFN- $\gamma$  is a key cytokine in the immunopathogenesis of T1R and is directly associated with the control of bacillary load in patients with leprosy, possibly through modulation of the autophagic pathway in the host cell, which contributes to the control of the bacillary load in leprosy patients and that drugs with pro-autophagic action can be evaluated as adjuvants to the multidrug therapy.

## ÍNDICE

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMO</b>  | <b>VII</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>    |
| <b>1.1 A Hanseníase</b> .....  | <b>1</b>    |
| 1.1.1 Epidemiologia.....   | 1           |
| 1.1.2 Aspectos clínicos e classificação.....   | 3           |
| 1.1.3 Agente etiológico.....   | 7           |
| 1.1.4 Interação patógeno – hospedeiro.....   | 10          |
| 1.1.5 Diagnóstico e tratamento.....  | 14          |
| 1.1.6 Alvos Terapêuticos.....  | 17          |
| 1.1.7 Terapias direcionadas ao hospedeiro.....                                       | 18          |
| <b>1.2 Autofagia</b> .....   | <b>19</b>   |
| 1.2.1 Mecanismo de execução da autofagia.....  | 19          |
| 1.2.2 Autofagia seletiva e não seletiva.....   | 27          |
| 1.2.3 Autofagia e infecção por microrganismos intracelulares.....                    | 28          |
| 1.2.4 Fármacos moduladores da via autofágica e sua ação em doenças infecciosas ..... | 31          |
| 1.2.5 Doenças micobacterianas .....  | 32          |
| <b>1.3 Verapamil</b> .....   | <b>40</b>   |
| <b>1.4 Verapamil e indução de autofagia na célula hospedeira</b> .....               | <b>43</b>   |
| <b>1.5 Justificativa</b> .....   | <b>44</b>   |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | <b>45</b>   |
| <b>2.1 Objetivo Geral</b> .....  | <b>45</b>   |
| <b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....   | <b>45</b>   |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>46</b>   |
| <b>3.1 Cultivo de micobactérias</b> .....  | <b>46</b>   |
| 3.1.1 Obtenção de <i>M. abscessus</i> .....  | 46          |
| 3.1.2 Obtenção de <i>M. leprae</i> .....   | 46          |
| 3.1.3 Marcação de <i>M. leprae</i> com o kit PKH.....                                | 47          |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.2 Cultura de células</b> .....  | <b>47</b> |
| 3.2.1 Amostras clínicas de pacientes com hanseníase  | 47        |
| 3.2.2 Separações de células mononucleares do sangue periférico<br>.....                                  | 48        |
| 3.2.3 Obtenção de monócitos e geração de macrófagos M2   | 49        |
| 3.2.4 Cultura celular de monócitos THP-1 e diferenciação para macrófagos<br>.....                        | 49        |
| <b>3.3 Indução e inibição de autofagia</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>3.4 Purificação de ácidos nucléicos</b> .....   | <b>50</b> |
| 3.4.1 Extração de RNA.....   | 50        |
| 3.4.2 Quantificação e análise da integridade do RNA.....   | 51        |
| 3.4.3 Tratamento do RNA com DNase.....   | 52        |
| 3.4.4 Extração do DNA.....   | 52        |
| <b>3.5 RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica</b> .....                                   | <b>53</b> |
| 3.5.1 Síntese de cDNA.....   | 53        |
| 3.5.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).....  | 53        |
| 3.5.3 Análise da via de autofagia.....   | 54        |
| 3.5.4 Expressão gênica de biópsia de pele de hanseníase a partir de dados<br>públicos de microarray..... | 54        |
| 3.5.5 Determinação da viabilidade de <i>M. leprae</i> e <i>M. abscessus</i> .....                        | 55        |
| 3.5.6 Análise dos dados de qPCR .....  | 56        |
| <b>3.6 Imunofluorescência</b> .....  | <b>58</b> |
| 3.6.1 Transdução viral com baculovírus .....   | 58        |
| 3.6.2 Ensaio de detecção para GFP-LC3B.....  | 58        |
| <b>3.7 Viabilidade celular</b> .....   | <b>59</b> |
| 3.7.1 Ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT.....  | 59        |
| 3.7.2 Marcação celular com Anexina V e Iodeto de Propídeo.....   | 59        |
| <b>3.8 Análise dos níveis de LC3B por Western blotting</b> .....   | <b>60</b> |
| <b>3.9 Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>3.10 Ensaio para detecção de citocinas</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>3.11 Análises estatísticas</b> .....  | <b>62</b> |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | <b>63</b> |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 4.1  | IFN- $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em macrófagos humanos estimulados com <i>M. Leprae</i> .....                | 63  |
| 4.2  | O tratamento com IFN- $\gamma$ induz o fluxo autofágico em macrófagos THP-1 estimulados com <i>M. leprae</i> .....           | 67  |
| 4.3  | IFN- $\gamma$ regula positivamente a expressão de genes de autofagia em células THP-1 estimuladas com <i>M. leprae</i> ..... | 68  |
| 4.4  | IFN- $\gamma$ aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1 estimulados com <i>M. leprae</i> .....                         | 70  |
| 4.5  | A citocina inflamatória IL-15 está aumentada em lesões de pele de pacientes MB que progrediram para T1R .....                | 72  |
| 4.6  | A modulação da via de autofagia em lesões de T1R foi mediada por IFN- $\gamma$ .....   | 74  |
| 4.7  | Verapamil não altera a viabilidade de macrófagos de indivíduos sadios.....   | 78  |
| 4.8  | Verapamil regula positivamente a indução de LC3-II em macrófagos de indivíduos sadios e da linhagem THP-1 .....              | 80  |
| 4.9  | O Verapamil parece induzir a formação de autofagossomos em macrófagos humanos estimulados com <i>M. leprae</i> .....         | 83  |
| 4.10 | Avaliação da capacidade microbicida do Verapamil em macrófagos M2 .....  | 85  |
| 4.11 | O Verapamil parece inibir o crescimento intracelular de <i>M. leprae</i> e <i>M. abscessus</i> em células THP-1.....         | 86  |
| 5    | <b>DISCUSSÃO</b>   | 91  |
| 6    | <b>CONCLUSÃO</b>   | 99  |
| 7    | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 100 |
| 8    | <b>APÊNDICES</b>   | 124 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica dos novos casos da hanseníase reportadas à OMS no ano de 2020. ....  | 1  |
| <b>Figura 2:</b> Taxa de detecção de novos casos de hanseníase em função da unidade de federação e capital de residência no ano de 2020.. ....                            | 3  |
| <b>Figura 3:</b> Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase. ....  | 5  |
| <b>Figura 4:</b> Modelo esquemático simplificado do envelope celular de <i>M. leprae</i> .....  | 8  |
| <b>Figura 5:</b> Cultivo de <i>M. leprae</i> na pata de camundongo atímico. ....  | 10 |
| <b>Figura 6:</b> Modelo de divergência dos programas antimicrobiano e fagocítico na hanseníase.....   | 13 |
| <b>Figura 7:</b> Três vias principais de degradação autofágica. ....  | 21 |
| <b>Figura 8:</b> Principais eventos moleculares da autofagia. ....  | 25 |
| <b>Figura 9:</b> Direcionamento de patógenos microbianos para destruição lisossomal. ...  | 26 |
| <b>Figura 10:</b> Estrutura dos domínios do receptor p62.. ....   | 28 |
| <b>Figura 11:</b> Fórmula estrutural do cloridrato de verapamil. ....   | 41 |
| <b>Figura 12:</b> O IFN- $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em monócitos estimulados com <i>M. leprae</i> .....  | 65 |
| <b>Figura 13:</b> O IFN- $\gamma$ regula positivamente a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 estimulados com <i>M. leprae</i> .....                                     | 67 |
| <b>Figura 14:</b> A wortmanina bloqueia o fluxo autofágico induzido por IFN- $\gamma$ em macrófagos THP-1 estimulados com <i>M. leprae</i> .....                          | 68 |
| <b>Figura 15:</b> Perfis de expressão gênica autofágica de células THP-1 estimuladas com <i>M. leprae</i> e IFN- $\gamma$ .....   | 70 |
| <b>Figura 16:</b> Na presença de <i>M. leprae</i> , o IFN- $\gamma$ aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1. ....   | 72 |
| <b>Figura 17:</b> Perfil de expressão de mRNA de citocinas em lesões cutâneas de pacientes PB, MB e T1R. ....   | 74 |
| <b>Figura 18:</b> Lesões de pele de T1R e macrófagos THP-1 estimulados com <i>M. leprae</i> + IFN- $\gamma$ compartilham uma assinatura gênica de autofagia em comum..... | 76 |
| <b>Figura 19:</b> Rede de interação proteica de autofagia entre lesões cutâneas de T1R e macrófagos THP-1 estimulados com <i>M. leprae</i> e IFN- $\gamma$ .....          | 77 |
| <b>Figura 20:</b> Citotoxicidade do verapamil em macrófagos de indivíduos saudáveis. ....   | 79 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 21:</b> Análise da expressão de LC3 em macrófagos de indivíduos saudáveis e da linhagem THP-1 após o tratamento com Verapamil, utilizando microscopia HCS (high content screening; CellImage HCA System)..... | 83  |
| <b>Figura 22:</b> O verapamil regula positivamente a indução de autofagossomos em macrófagos de indivíduos saudáveis estimulados com o <i>M. leprae</i> .....   | 85  |
| <b>Figura 23:</b> Verapamil favorece a viabilidade do bacilo em macrófagos de indivíduos saudáveis.....   | 86  |
| <b>Figura 24:</b> Verapamil parece reduzir a viabilidade do bacilo em macrófagos THP-1..  | 87  |
| <b>Figura 25:</b> Verapamil induz a conversão de LC3-I para LC3-II em macrófagos THP-1. ....  | 889 |
| <b>Figura 26:</b> Perfis de expressão de genes associados à autofagia em células THP-1 estimuladas com <i>M. leprae</i> e/ou verapamil. ....  | 90  |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Esquemas de tratamento da hanseníase paucibacilar e multibacilar. ....  | 16 |
| <b>Tabela 2:</b> Estratégias terapêuticas de reposicionamento de fármacos visando a autofagia de células hospedeiras contra doenças micobacterianas..... | 38 |
| <b>Tabela 3:</b> Propriedades físico-químicas do verapamil .....   | 42 |
| <b>Tabela 4:</b> Características dos pacientes com hanseníase incluídos no estudo.....   | 48 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|  |  |
|--|--|
| 3-MA - 3-metiladenina  | BTK - tirosina quinase de Bruton   |
| ADC - Albumina Dextrose Catalase   | CaMKK $\beta$ - proteína quinase quinase $\beta$<br>dependente de cálcio/calmodulina                                   |
| ADP - difosfato de adenosina   | CD - Grupamento de diferenciação   |
| AIDS - do inglês “Acquired Immune<br>Deficiency Syndrome”  | cDNA - DNA complementar  |
| Akt - Cepa Ak de camundongos,<br>associada a um retrovírus<br>“transformante”. Também pode ser<br>chamada de Proteína cinase B | CFU - Unidades formadoras de<br>colônias   |
| AMBRA1 - Molécula ativadora na<br>autofagia regulada por beclina-1   | CLIR - LIR específico para interação<br>com LC3C   |
| AMC - autofagia mediada por<br>chaperonas  | CMV - citomegalovírus  |
| AMP - Monofosfato de adenosina   | CR - Receptores de complemento   |
| AMPK - Proteína cinase ativada por<br>AMP  | CT - do inglês “Cycle threshold”   |
| ATG - Genes relacionados com a<br>autofagia  | CYP27b1- Citocromo P450, família 27,<br>subfamília B, polipeptídeo 1   |
| ATP – trifosfato de adenosina  | DAPI - 4,6 diamidino-2-fenilindol  |
| AV - condução atrioventricular   | DC-SIGN/CD209 - Molécula de<br>adesão intercelular 3 específica de<br>células dendríticas-não ligante de<br>integrinas |
| BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente  | DEFB4 - do inglês “Defensin beta 4A”   |
| BB - Forma “borderline borderline”   | DHGNA - doença hepática gordurosa<br>não alcoólica   |
| BCCs - bloqueadores dos canais de<br>cálcio  | DMSO - Dimetilsulfóxido  |
| BCG - <i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo de<br>Calmette-Guérin  | DNA - ácido desoxirribonucléico  |
| Bcl-2 - Proteína recombinante linfoma<br>de células B 2  | DO – densidade óptica  |
| BECN1- Beclina-1   | EDTA - Ácido<br>etilenodiaminotetraacético   |
| BL - Forma “borderline”lepromatosa   | ELISA - Ensaio Imunoenzimático   |
| BSA - Albumina sérica bovina   | ENH - Eritema nodoso hansênico ou<br>reação tipo 2   |
| BT - Forma “borderline” tuberculóide   | ESX-1 - Sistema de secreção do tipo<br>VII ESAT-6  |



FC – Fibrose cística  
 Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz  
 FIP200 - Proteína de interação com ULK  
 FKBP12 - Proteína ligadora de FK506 ou Tacrolimus  
 g - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional  
 GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
 GM-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos  
 GTPase - Guanosina 5' trifosfatase induzida por IFN  
 HCV – vírus da hepatite C  
 HIV - Vírus da imunodeficiência humana  
 HMGCR - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase  
 HPRT1 - do inglês “Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1”  
 HSV-1 - do inglês “Herpes simplex virus 1”  
 IB - Índice baciloscópico  
 IBL - índice baciloscópico logarítmico da lesão  
 IBMP - Instituto de Biologia Molecular do Paraná  
 IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase  
 IFN - Interferon  
 Ig - Imunoglobulina  
 IL - Interleucina  
 IRGM - GTPase M relacionada à imunidade  
 LAM - Lipoarabinomanana  
 LAMP2 - Proteína de membrana-2 associada ao lisossomo  
 LAP - Fagocitose associada à LC3  
 LKB1 - quinase hepática B1  
 LC - Células de Langerhans  
 LC3 / Atg8 - proteína 1 associada aos microtúbulos, cadeia leve 3  
 LDL - Lipoproteínas de baixa densidade  
 LIR - região de interação com LC3  
 LL – Forma lepromatosa lepromatosa  
 LLC - leucemia linfocítica crônica  
 LM - lipomanana  
 LPS - Lipopolissacarídeo  
 LRG-47 - GTPase de 47 kDa induzida por IFN-γ  
 M1 - Macrófagos inflamatórios  
 M2 - Macrófagos antiinflamatórios  
 MAC - complexo *M. avium*  
 MB - Multibacilares  
 M-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos  
 MDP - muramil dipeptídeo  
*M. leprae* – *Mycobacterium leprae*  
 MLMA - fração de membrana  
 MLSA - fração citosólica  
 mLST8 - mTORC subunidade LST8  
 MNTs - micobactérias não tuberculosas  
 MOI - Multiplicidade de infecção  
 mTOR - proteína mecanística alvo da rapamicina  
 mTORC - Complexo mTOR

N.E. - Não estimulado  
 NDP52 / CALCOCO - Proteína de antígeno nuclear de 52 kDa / “Calcium binding and coiled-coil domain”  
 NK - Células matadoras naturais  
 NOD - Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo  
 OMS – Organização Mundial da Saúde  
 oxLDL - LDL oxidadas p24 - Proteína de 24 kDa presente no capsídeo de HIV  
 PABA - ácido para-aminobenzóico  
 PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida  
 PARK2 - região reguladora de parkina  
 PB - Paucibacilares  
 PB1 - Domínio 1 de ligação à proteína  
 PBMC - Células mononucleares de sangue periférico  
 PBS - Salina tampão fosfato  
 PCR - Reação em cadeia da polimerase  
 PE - Fosfatidiletanolamina  
 PGK1 - “Phosphoglycerate kinase 1”  
 PGL-1 - Glicolípido fenólico-1  
 PI - Fosfatidilinositol  
 PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase  
 PI3P - Fosfatidilinositol-3-fosfato  
 PIMs - Fosfatidilinositol manosídeos  
 PMA - Forbol 12-Miristato 13-Acetato  
 PPIA - “Peptidilprolil isomerase A”  
 PRRs - receptores de reconhecimento de padrões moleculares  
 PQT - Poliquimioterapia  
 qPCR - PCR em tempo real  
 Rapa – rapamicina  
 Raptor - Proteína regulatória associada à mTOR  
 RE - Retículo endoplasmático  
 RLEP - Specific Repetitive Element  
 RNA - Ácido ribonucleico  
 RNAm - RNA mensageiro  
 RPL13A - do inglês “Ribosomal protein L13a”  
 RPMI - Meio do Instituto Memorial Roswell Park  
 RR - Reação reversa ou reação tipo 1  
 RT-qPCR- Reação da transcriptase reversa, seguida de qPCR  
 SDS - Dodecil sulfato de sódio  
 SFB - Soro fetal bovino  
 SLR - Receptores do tipo sequestosoma SQSTM1/p62  
 SMURF1 - do inglês “SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1”  
 SNARE - do inglês “SNAP Soluble NSF Attachment Protein REceptor”  
 SQSTM1/p62 - Sequestosoma 1  
 SR - Receptores “scavenger”  
 STX17 - Sintaxina 17  
 T1R – Reação tipo 1 ou reação reversa  
 TAX1BP1 - do inglês “Tax1 binding protein 1”  
 TBS - Tampão tris salino  
 Th - Célula T auxiliar  
 THP-1 - Linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana

TIM4 - do inglês "T-cell  
immunoglobulin mucin protein 4"  
TLR - Receptores do tipo Toll (de  
*Drosophila melanogaster*)  
TNF - Fator de necrose tumoral  
TT - Forma tuberculóide  
UA - Unidades arbitrárias  
UBA - do inglês "Ubiquitin-associated  
protein domain"  
UBD - Domínio de ligação à ubiquitina  
UBQLN - "Ubiquilina"

UF - Unidade de Federação  
ULK - Família similar a Unc-51  
UVRAG / VPS38 - Gene associado à  
resistência à irradiação UV  
VAMP8 - do inglês "Vesicle associated  
membrane protein 8"  
VDR - Receptor de vitamina D  
Vera – Verapamil  
WB - do inglês "Western blotting"  
Wtm - Wortmanina

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Hanseníase

### 1.1.1 Epidemiologia

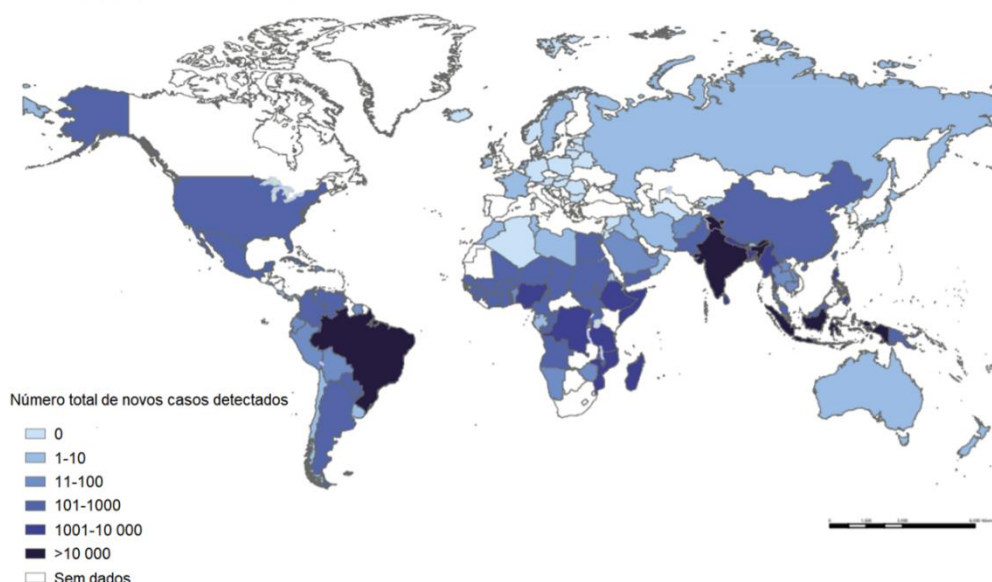
A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada por *Mycobacterium leprae* ou *M. lepromatosis*, que acometem principalmente a pele e os nervos periféricos (Deps & Collin, 2021). Há evidências de que a hanseníase pode ser transmitida por meio do contato prolongado e frequente, de pessoa a pessoa, através da dispersão de partículas infectantes pelas vias aéreas superiores de pacientes não tratados e com alta carga bacilar, sendo o nariz e a boca a porta de entrada de *M. leprae* no organismo, embora não seja descartada a possibilidade de infecção via lesões de pele (Bratschi et al., 2015, Mohanty et al., 2016). Em média, o período de incubação da doença é de cinco anos, mas os sintomas podem aparecer dentro de um ano e, em outros casos, pode levar até vinte anos ou mais (Scollard, 2017). Esta doença pode causar incapacidade física permanente, devido ao acometimento dos nervos periféricos, por isso é considerada um grave problema para a saúde pública. Dentre os fatores que contribuem para a incapacidade física, está o abandono de tratamento, o nível de esclarecimento sobre a doença, o diagnóstico tardio, estigma e preconceito que penalizam os portadores de hanseníase, dificultando a execução das medidas de controle (Lana, 1992).

Nas últimas três décadas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adotou estratégias globais para o controle da hanseníase que envolveu o diagnóstico precoce e o pronto atendimento com a poliquimioterapia. A nova estratégia global para os anos de 2021 a 2030 tem como principal objetivo reduzir a prevalência da hanseníase através do combate à doença e suas complicações, bem como, tem por finalidade reduzir o estigma e a discriminação estimulando a equidade e justiça social, enfatizando a inclusão de pessoas afetadas pela hanseníase (WHO, 2021).

Em 2020, foram relatados à OMS 121.358 novos casos de hanseníase no mundo e a nova taxa de detecção de casos foi de 16,4 casos por 1 milhão de habitantes (WHO, 2021). A proporção de novos casos em muitos países foi significativamente menor do que em 2019 (média de 31,1%), o que pode refletir o impacto da pandemia da COVID-19. A Índia registrou 43,1% menos casos do que

em 2019. No entanto, 5 países – República Democrática do Congo, Madagascar, Kiribati, Somália e Sudão – relataram aumentos em novos casos de detecção. Esta mudança pode estar relacionada à menor detecção e notificação durante a pandemia da COVID-19. Apenas 127 países (de 221) forneceram dados em 2020, em comparação com 160 em 2019 (WHO, 2021).

Dentre os novos casos mundiais registrados, 19.195 ocorreram na região das Américas e 17.979 foram notificados no Brasil. Diante dos dados estatísticos, o Brasil foi considerado como um país de alta carga para a doença, ocupando o segundo lugar na relação de países com maior número de casos mundiais, ficando atrás apenas da Índia (WHO, 2021). Em 2020, dentre os 127 países e territórios que forneceram dados à OMS, apenas três deles (Brasil, Índia e Indonésia) informaram o número maior que 10.000 novos casos cada (**Figura 1**) (WHO, 2021).

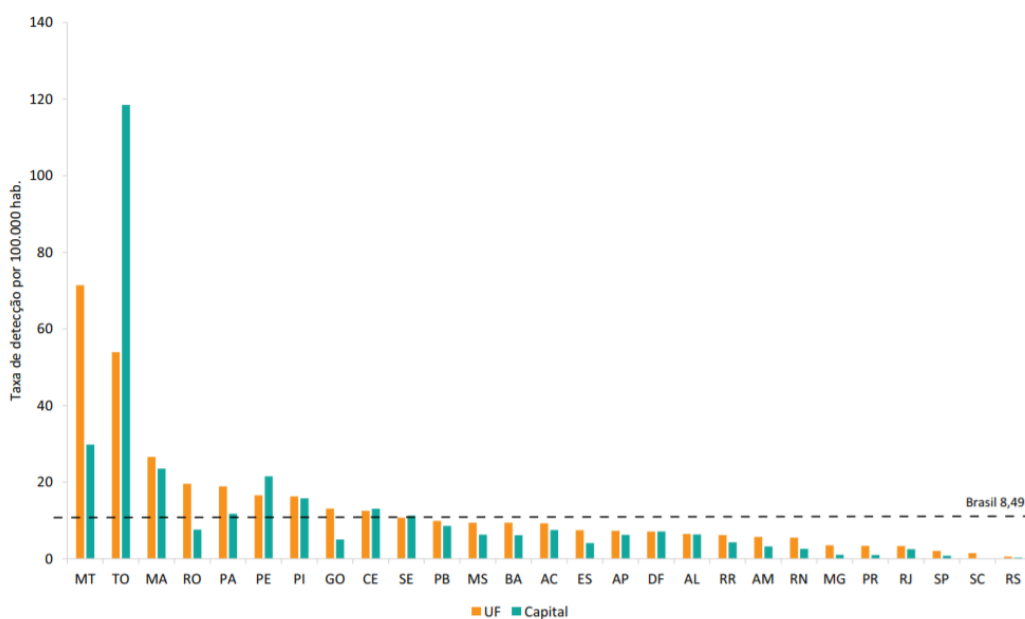


**Figura 1: Distribuição geográfica dos novos casos da hanseníase reportados à OMS no ano de 2020.** As taxas foram calculadas por milhão da população com base em estimativas (média) fornecidas pelo Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais das Nações Unidas. Fonte: Adaptado de WHO/LEP 2021, acesso em 07 de fevereiro de 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444>

A hanseníase, apesar de ainda considerada como um problema em saúde pública tem conseguido alcançar um grande avanço na redução de casos e cura de muitos pacientes através da poliquimioterapia (PQT).

No Brasil, entre os anos de 2011 e 2020, foram diagnosticados 284.723 novos casos de hanseníase. Nesse período, a taxa de detecção geral de novos casos, apresentou uma redução de 51,9%, passando de 17,7 em 2011 para 8,49 casos por 100.000 habitantes em 2020. Todas as regiões apresentaram redução na taxa de

detecção geral de novos casos de hanseníase entre 2011 e 2020 (Ministério da Saúde, 2022). Desse modo, o parâmetro de endemicidade do país mudou de alto para médio. Em 2020, o Mato Grosso foi a Unidade de Federação (UF) que apresentou a maior taxa de detecção geral, 71,4 novos casos por 100.000 habitantes; Cuiabá, sua capital, registrou a taxa de 29,8 casos. A segunda posição entre as UF foi ocupada por Tocantins, com 54,0 casos novos, Palmas, sua capital, registrou uma taxa de 118,5 casos por 100.000 habitantes, a maior entre as capitais do país. As UF de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, assim como suas capitais, apresentaram baixa endemicidade (**Figura 2**) (Ministério da Saúde, 2022). O ano de 2020 apresentou maior redução da taxa de detecção geral, o que pode estar relacionado à sobrecarga dos serviços de saúde e pelo medo dos pacientes de procurarem atendimento durante a pandemia da COVID-19.



**Figura 2: Taxa de detecção de novos casos de hanseníase em função da unidade de federação e capital de residência no ano de 2020.** Número de novos casos por 100 mil habitantes. Fonte: Brasil, 2021 (Sinan/SVS-MS).

### 1.1.2 Aspectos clínicos e classificação

A hanseníase se manifesta por meio de lesões ou regiões da pele que apresentam alteração de sensibilidade e comprometimento dos nervos periféricos (Foss, 1997), os quais são importantes para o diagnóstico clínico da doença. Os distúrbios sensitivos nas lesões podem ser causados tanto pela ação do bacilo nos nervos como pela reação do sistema imune ao bacilo. A neurite pode levar à perda

de força muscular, com posterior paralisia, o que pode originar incapacidades e deformidades, como articulações anquilosadas (sem movimento) e em garras, associados ou não a quadros de logoftalmo (desabamento da pálpebra inferior) (Ridley, 1955). A classificação da hanseníase é baseada nos aspectos imunológicos, bacteriológicos e histopatológicos, que define um largo espectro de formas clínicas, identificando o polo lepromatoso (LL) e tuberculoide (TT), assim como as formas intermediárias chamadas de *borderline* (Ridley e Jopling, 1966). Pacientes que não se enquadram em nenhum desses grupos mencionados são definidos como portadores de hanseníase indeterminada (Goulart et al., 2002), que geralmente se manifesta como uma lesão hipocrômica, que pode evoluir para cura espontânea ou para outras formas clínicas da doença (Yawalkar, 2002). Algumas vezes, a hanseníase pode se manifestar apenas por lesões em nervos periféricos, sem lesão cutânea, forma essa conhecida como neural pura (Yawalkar, 2002).

No polo lepromatoso da doença, os pacientes são caracterizados pela ausência ou reduzida imunidade celular específica contra *M. leprae*, associado à elevada produção de citocinas com funções predominantemente antiinflamatórias como a interleucina 10 (IL-10), levando a uma proliferação bacteriana descontrolada com várias lesões e com infiltração extensa na pele e nervos, caracterizada pela presença de macrófagos carregados de bacilos (Misch et al., 2010). Já os pacientes do polo tuberculoide são caracterizados por apresentarem uma resposta imune celular efetiva a *M. leprae*, e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-15, IFN- $\gamma$ , IL-2, dentre outras. O perfil de resposta imunológica observado no polo tuberculóide é fundamental para limitar a doença a poucas e bem definidas lesões cutâneas ou nervos lesionados (Britton & Lockwood, 2004).

Nas formas clínicas intermediárias [*borderline* lepromatosa (BL), *borderline borderline* (BB) e *borderline* tuberculoide (BT)], a resposta imune celular é maior de acordo com a proximidade ao polo tuberculoide. Segundo Goulart e colaboradores (2002), os pacientes BT apresentam lesões com poucos bacilos, os BB são difíceis de definir, com carga bacilar moderada, e os do polo BL possuem granulomas compostos de macrófagos indiferenciados altamente parasitados. De acordo com a classificação de 1982 da OMS (WHO, 1982) as formas TT e BT são consideradas paucibacilares e as BB, BL e LL são classificadas como multibacilares por apresentarem uma alta carga parasitária. Apesar de pacientes com uma única lesão cutânea serem classificados como paucibacilares, esse grupo é definido oficialmente

pela presença de  $\leq 5$  lesões. Já o grupo multibacilar é caracterizado pela presença de  $\geq 6$  (Figura 3) (WHO 1982).



**Figura 3: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase.** O polo tuberculóide apresenta uma boa resposta imune celular a *M. leprae*, formando granulomas epitelióides e secretando citocinas pró-inflamatórias. O polo lepromatoso apresenta uma resposta imune humoral e secreção de citocinas antiinflamatórias. Os pacientes *borderline* apresentam características intermediárias, se aproximando mais de um polo ou outro de acordo com o tipo de resposta imunológica a *M. leprae*. Existem ainda os episódios reacionais, que são episódios inflamatórios agudos responsáveis por grande destruição de ramos nervosos e consequente incapacidade, sendo classificados em: reação tipo 1 (T1R), que ocorre principalmente nas formas *borderline* e, o Eritema Nodoso Hansênico (ENH), que ocorre principalmente nas formas multibacilares BL e LL. Pacientes que não se enquadram em nenhum desses grupos mencionados são definidos como portadores de hanseníase indeterminada. Fonte: adaptado de Lockwood & Saunderson, 2012.

Dados da literatura sugerem que o perfil genético do hospedeiro é determinante para a resposta ao bacilo. Aproximadamente, 95% da população é naturalmente resistente à infecção por *M. leprae* (Lázaro et al., 2010). Ainda nesse contexto, foi observado que alguns polimorfismos gênicos podem estar diretamente associados à susceptibilidade à hanseníase. Por exemplo, já foi relatado que polimorfismos no gene *PARK2* (Mira et al., 2004), que codifica a parkina, uma E3-ubiquitina ligase, estão relacionados com a susceptibilidade à doença. Outro exemplo está relacionado a um estudo genômico feito em larga escala utilizando amostras brasileiras, onde foi observada a relação da região 6p21.32 do gene codificante para o sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA) com a susceptibilidade à hanseníase (Miller et al., 2004).



A doença tem evolução crônica, podendo ser interrompida por episódios de inflamação aguda associados com mudanças na resposta imunológica, denominados estados reacionais (Ministério da Saúde, 2002). Esses episódios reacionais podem se manifestar em todas as formas clínicas da doença. Os quadros reacionais podem ocorrer espontaneamente, antes, durante ou até mesmo após o tratamento, quando o paciente é considerado curado bacteriologicamente (Sarno & Sampaio, 1996). Em casos específicos, a hanseníase pode apresentar reações inflamatórias exacerbadas durante o tratamento, que comprometem a continuidade da PQT por serem altamente debilitantes, exigindo o uso de medicamentos complementares para o combate às reações, como os corticoides. As reações são classificadas como reação reversa ou reação tipo 1 (T1R), que ocorrem em pacientes paucibacilares e interpolares (*borderlines*) (Ridley & Waters 1969, Hastings & Job 1978, Kar & Job 2005, Andrade et al., 2015a); e a reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) que ocorre nos pacientes multibacilares BL e LL (Nery et al., 1998, Kamath et al., 2014). O ENH apresenta-se com exacerbação das lesões iniciais, surgimento de novas lesões cutâneas e neurites. Esses episódios reacionais afetam principalmente pele e nervos, e são consideradas as principais causas de dano neural em pacientes com hanseníase (Junqueira et al., 2008).

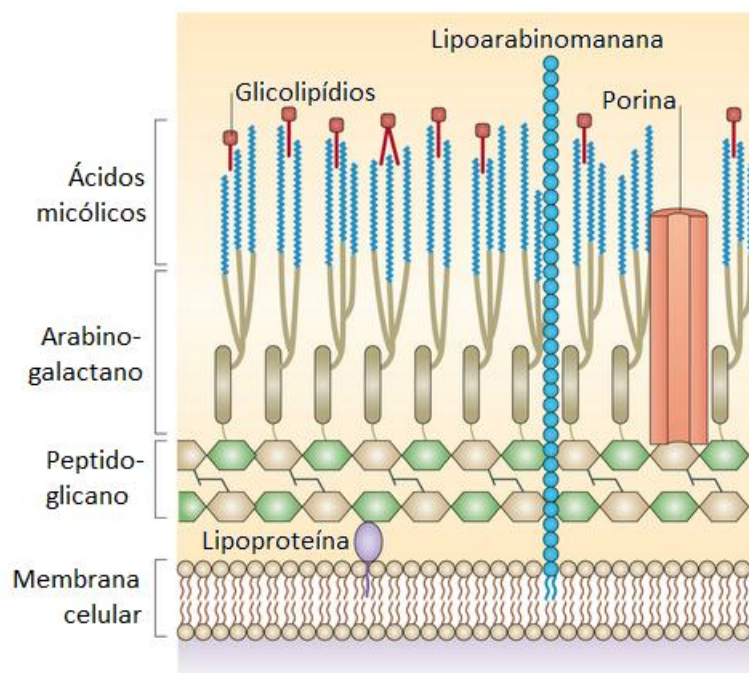
O quadro clínico da T1R caracteriza-se por sinais de inflamação aguda, tais como dor, eritema, infiltração e edema de lesões pré-existentes, às vezes acompanhadas de novas lesões (Trabulsi et al., 2005). A ocorrência de reação tipo 1 após o término da poliquimioterapia pode ser explicada pela persistência de antígenos de bacilos mortos e pelo desequilíbrio na regulação da resposta imune inflamatória decorrente da redução da carga bacilar. Lesões de troncos nervosos são frequentes durante a T1R, justificando o uso precoce de corticoides em altas doses para impedir o dano irreversível dos nervos periféricos (Sampaio et al., 2000). O risco de se desenvolver o ENH é diretamente proporcional ao índice baciloscópico (IB) e a forma clínica do paciente, desse modo, pacientes LL têm maior risco (Manandhar et al., 1999). As lesões cutâneas podem apresentar-se como eritematosas, pápulas ou nódulos que podem ser superficiais ou profundos. Clinicamente, o ENH é caracterizado por sintomas sistêmicos, como febre alta com nódulos avermelhados, mal-estar, edema da face, mãos e pés (Pfaltzgraff et al., 1989). Também apresentam outros sinais como neurites que são muito mais brandas do que o observado na reação tipo 1.

### 1.1.3 Agente etiológico

*M. leprae* é um bacilo que mede aproximadamente de 1,5 a 8,0 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de diâmetro. Também conhecido como bacilo de Hansen, foi descoberto em 1873 pelo médico Gerhard Armauer Hansen na Noruega (Hansen, 1955). *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória que apresenta tropismo por macrófagos, células de Schwann e o endotélio. Devido ao seu alto teor de lipídeos, não se cora pelo método tradicional (coloração de Gram). É um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Rees, 1985). Este bacilo tem tempo de geração de 12 a 14 dias, tendo sido fracassadas todas as tentativas de cultivá-lo *in vitro*, dificultando o acompanhamento clínico devido à sua progressão lenta (Britton et al., 2004). Os tecidos primeiramente infectados por *M. leprae* são sítios superficiais da pele e nervos, devido à sua preferência por baixas temperaturas (de 30°C a 33°C). Desde que Hansen conseguiu isolar o bacilo, ele tentou por várias vezes estabelecer infecções em coelhos e, com o passar dos anos, também testou outros modelos animais, como primatas não humanos, ratos, porcos, não tendo sucesso em nenhum dos modelos avaliados (Johnstone, 1987).

Assim como em outras bactérias, o envoltório celular micobacteriano é constituído de duas estruturas distintas: a membrana plasmática e a parede celular. A membrana plasmática é muito semelhante à das demais bactérias, sendo formada por uma clássica bicamada fosfolípídica com proteínas intercaladas. O folheto externo é, contudo, rico em fosfatidilinositol manosídios (PIMs), lipoarabinomanana (LAM) e lipomanana (LM). O esqueleto da parede celular é formado por um complexo resultante da ligação covalente de três macromoléculas: o peptideoglicano, um polissacarídeo ramificado (arabinogalactano) e os ácidos micólicos (**Figura 4**) (Scollard et al, 2006).

Apresenta, mais externamente, o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), dominante em sua parede celular. Por ser um componente exclusivo de *M. leprae*, a sorologia baseada na detecção de anticorpos contra PGL-1 passou a ser vista como um parâmetro potencialmente aplicável no diagnóstico da doença (Young et al., 1989). Os testes sorológicos são usualmente utilizados em estudos de epidemiologia, mas pouco utilizados na clínica devido à baixa sensibilidade do método (Jardim et al., 2005, Scollard et al., 2006).



**Figura 4: Modelo esquemático simplificado do envelope celular de *M. leprae*.** A membrana plasmática de *M. leprae* é envolvida por uma parede celular composta de peptidoglicano ligada covalentemente a arabinogalactano. Nesse arranjo podem ser encontrados componentes como glicolipídios e lipoarabinomanana (LAM). Ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose, formando o *core* da parede celular da micobactéria. Na porção mais externa do envelope celular é encontrado o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), um dos principais componentes dessa camada. Adaptado de Brown et al., 2015.

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

Inicialmente, o cultivo do bacilo para fins acadêmicos foi realizado em camundongos CFW (Shepard, 1960) e, posteriormente, em tatu de nove bandas (*Dasyurus novencinctus*) (Coelho et al., 1988). Shepard, em 1960, demonstrou ser possível estabelecer a infecção inoculando *M. leprae* no coxim plantar de camundongos, tendo sido observadas infiltrados granulomatosos proporcionais ao número de bacilos inoculados. A inoculação de  $5 \times 10^3$  a  $10^4$  de bacilos em um volume de 0,03 mL no coxim plantar traseiro de um camundongo normal alcança, após 120-240 dias, aproximadamente  $10^6$  de bacilos/pata. Após a purificação, os bacilos podem ser usados vivos por até uma semana ou letalmente irradiados

(Kirchheimer & Storrs 1972). O estabelecimento deste modelo foi um passo importante na realização de pesquisas em hanseníase. Shepard, em 1962, aproveitou seu modelo para determinar o impacto de certos fármacos na viabilidade de *M. leprae* (Shepard & Chang, 1962). Apesar de ter sido fundamental, este modelo é muito limitado para obtenção de grandes quantidades de bacilo para estudos *in vitro*, necessitando modelos adicionais. Tatus de nove bandas podem desenvolver uma forma disseminada da doença semelhante ao polo lepromatoso, atingindo órgãos como, o fígado e o baço com a presença de grandes quantidades do bacilo para estudos *in vitro*, sendo uma vantagem em relação ao modelo antigo. Entretanto, seu uso como modelo animal ainda é muito limitado uma vez que o tatu é um animal atípico como modelo de infecção. Além disso, é mais complexo manter colônias e obter reagentes laboratoriais específicos para tatus.

Atualmente, os camundongos atímicos (nude) são utilizados para a multiplicação dos bacilos. Esses camundongos são deficientes em linfócitos T, sendo o modelo mais utilizado para obtenção de bacilos em inoculações *in vitro*. Lancaster e colaboradores (1983) demonstraram que a infecção do camundongo “nude” por *M. leprae* dissemina e alcança proporções sistêmicas, além de reportar que o crescimento bacteriano é exponencial e em escala comparável ao obtido em tatu (Lancaster *et al.*, 1983). Com a necessidade de se obter maiores quantidades de *M. leprae* para fins acadêmicos, a infecção de animais “nude” demonstrou-se satisfatória. Ao inocular  $5 \times 10^7$  bacilos no coxim plantar foi possível obter  $1-5 \times 10^9$  bacilos viáveis, após 6 meses (**Figura 5**) (Scollard *et al.*, 2006). Esta significativa proliferação de bacilos ocorre devido à suscetibilidade desses animais à infecção por *M. leprae* em decorrência da ausência de linfócitos T (Truman & Krahenbuhl, 2001; Lahiri *et al.*, 2005).



**Figura 5: Cultivo de *M. leprae* na pata de camundongo atímico.** Lesão no coxim plantar na pata de camundongo congenitamente atímico (nude) com inoculação de  $5 \times 10^7$  bacilos. Após 6 meses de infecção por *M. leprae*, é possível obter  $1-5 \times 10^9$  bacilos viáveis. Fonte: Scollard *et al.*, 2006.

#### 1.1.4 Interação patógeno – hospedeiro

A entrada de *M. leprae* no interior dos macrófagos ocorre por projeções citoplasmáticas e a fagocitose do bacilo é mediada pelos receptores de complemento CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) (Schlesinger *et al.*, 1991). Outro mecanismo envolvido na internalização da micobactéria na célula é a interação de LAM, que compõe a parede celular micobacteriana, com a molécula DC-SIGN (CD209). Esse receptor tem sido associado com a indução de resposta adaptativa do tipo Th2, sendo encontrado em células dendríticas e macrófagos (Soilleux *et al.*, 2002). Além disso, foi observado um predomínio da expressão de CD209 em lesões de pacientes do polo lepromatoso (LL) quando comparado com os pacientes do polo tuberculóide (TT) (Soilleux *et al.*, 2006, Montoya & Modlin 2010). Receptores “scavenger”, como o CD163 também tem sido descrito como um co-receptor para a entrada de *M. leprae* na célula hospedeira, visto que o bloqueio deste receptor resultou na redução da fagocitose de micobactérias em monócitos humanos. Além disso, a fagocitose de *M. leprae* foi mais efetiva em células HEK293 (linhagem de células embrionárias de rim humanas) transfectadas com CD163 comparado a células não transfectadas (Moura *et al.*, 2012). Nas células de Schwann, a entrada do bacilo é mediada pela proteína de ligação à laminina 21 (LBP21) e pelo PGL-1 presente na parede celular micobacteriana, e ambos se ligam à laminina 2, presente na membrana das células (Shimoji *et al.*, 1999; Rambukkana, 2001).

Nas etapas iniciais da infecção, *M. leprae* é capaz de interagir com as células apresentadoras de antígenos, por exemplo, células dendríticas e macrófagos. Esta interação com a célula hospedeira envolve receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs), como receptores do tipo Toll (TLR) e NOD2 (Cardoso et al., 2011). O receptor NOD2, que foi implicado em estudos pân-genômicos à hanseníase em Chineses (Zhang et al., 2010), e posteriormente, confirmados em pacientes vietnamitas e brasileiros (De Sales-Marques et al., 2014), encontra-se no citoplasma e é responsável pela detecção intracelular do muramil dipeptídeo (MDP), presente na parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas (Giardin et al., 2003). O reconhecimento de MDP por NOD2 é capaz de ativar o fator transcricional NF-κB, através da molécula adaptadora RIP2 (que foi associada geneticamente à suscetibilidade à hanseníase), e iniciar a produção de mediadores pró-inflamatórios. Cooney e colaboradores (2009) mostraram que a ativação de NOD2 induz autofagia em células dendríticas e é responsável por mediar o processamento e apresentação de antígenos (Cooney et al., 2009).

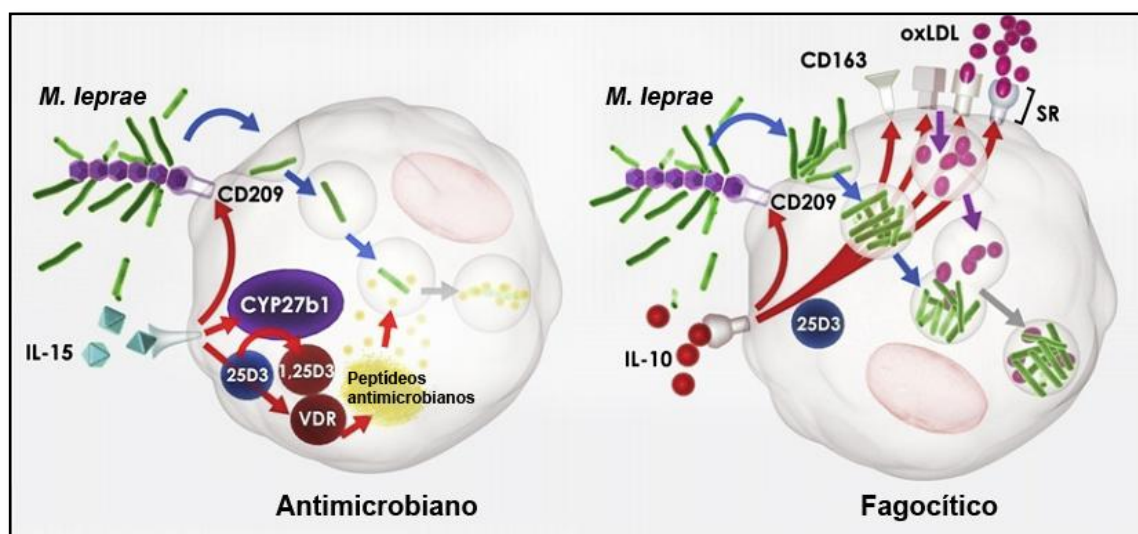
Já está bem descrito que lipoproteínas micobacterianas são capazes de ativar respostas imunológicas do hospedeiro via TLR2 (Aliprantis et al., 1999). Esse reconhecimento também é realizado pelo TLR1; ambos ativam a via de sinalização de NF-κB, por conseguinte, induzem a síntese de citocinas que ativam a imunidade adaptativa (Thoma-Uszynski et al., 2001). Foi demonstrado que a expressão de TLR2 e TLR1 é elevada em biópsias de pacientes do polo TT quando comparado com o polo LL (Krutzik et al., 2003). Além dos macrófagos, as células de Schwann também podem expressar TLR2. Foi demonstrado que a ativação desse receptor, nesse tipo celular, contribui para o dano neurológico na hanseníase (Oliveira et al., 2003). Um trabalho recente do nosso grupo mostrou que *M. leprae* morto e suas frações são capazes de modular diferencialmente a atividade e funcionalidade da enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO-1) em células dendríticas derivadas de monócitos humanos por uma via que envolve TLR2. Tal enzima é induzida por diversos estímulos pró-inflamatórios, sendo um dos principais estímulos a citocina Th1, IFN-γ. Essa enzima é uma enzima chave no metabolismo do triptofano. Diferentes antígenos micobacterianos, especificamente antígenos presentes na fração de membrana do bacilo, são capazes de induzir a expressão de IDO-1 em microambientes de inflamação, onde IDO-1 é induzida por TNF e IL-6, estando associada com o dano neural através da modulação da via das quinureninas, como ocorre durante os episódios reacionais (Oliveira et al., 2021). Por outro lado,

antígenos solúveis de *M. leprae* também conseguem induzirIDO-1 via TLR2, no entanto, modulam a produção de IL-10, ativando vias de supressão que favorecem a sobrevivência do bacilo, pela inibição de respostas efetoras resultado do aumento da frequência de células T reguladoras (Sales et al., 2011; Moura et al., 2012; Oliveira et al., 2021). Hirai e colaboradores (2016) demonstraram maior expressão das moléculas CD1a, CD207, CD123 e fator XIIIa, característica de células dendríticas em lesões de pacientes do polo paucibacilar da doença (TT), tanto na derme quanto na epiderme (Hirai et al., 2016). Por fim, variações em genes responsáveis pela adesão e entrada da micobactéria na célula, como TLRs, são cruciais na determinação da resistência natural do hospedeiro pela modulação das taxas de entrada do bacilo na célula hospedeira (Cardoso et al., 2011).

A ativação de TLR2/1 induz alguns mecanismos microbicidas em monócitos humanos, dentre eles, destacam-se: regulação positiva do receptor de vitamina D (VDR); a indução da enzima CYP27b1, a qual é responsável por converter a forma 25-hidroxivitamina D para sua forma biologicamente ativa (1,25-hidroxivitamina); indução de catelecidina, um importante peptídeo antimicrobiano (Liu et al., 2006, 2007; Martineau et al., 2007). A regulação positiva de VDR e de CYP27b1 ocorrem de maneira dependente da citocina IL-15 (Krutzik et al., 2005). De modo concomitante, a ativação de VDR, associada à produção de IL-1 $\beta$ , é capaz de induzir DEFB4, outro peptídeo necessário para a atividade microbicida da célula hospedeira (Liu et al., 2009).

Montoya e colaboradores (2009) relataram que os macrófagos inflamatórios com atividade microbicida, caracterizados como M1, apresentavam-se com maior frequência em formas paucibacilares da hanseníase e em lesões de pacientes com T1R, quando comparados a macrófagos com perfil fagocítico caracterizados como M2 predominantes no polo lepromatoso (**Figura 6**), mostrando o importante papel da diferenciação fenotípica no controle da doença (Montoya et al., 2009). Ou seja, essa dicotomização da ação dos macrófagos está ligada à determinação das formas clínicas da doença. Mediadores antiinflamatórios como IL-10, IL-4 e IL-13 são capazes de induzir a polarização para M2, além de inibir a ativação de M1, suprimindo a resposta Th1. Adicionalmente, M2 secretam níveis consideráveis de MIP-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1 e RANTES, o que indica um papel ativo dessas células em recrutar e interagir com outros tipos celulares e participar na regulação da imunidade celular. Somente macrófagos polarizados para o perfil M1 são capazes de secretar altos níveis de mediadores pró-inflamatórios (com perfil Th1) como IL-18, IL-6, TNF,

IL-12, IL-23 e IL-1 $\beta$ . Sabe-se que os macrófagos teciduais humanos são células com alta plasticidade e, essa classificação de macrófagos em M1 e M2 é extremamente limitada e está longe de refletir a grande diversidade de macrófagos existentes nas lesões de pele dos pacientes com hanseníase, no entanto, didaticamente ela funciona no sentido de entendermos M1 como sendo representativo de fenótipos associados à inflamação e atividade microbicida e M2 como sendo representativo de fenótipos associados à fagocitose e sobrevivência do bacilo (De Matos Barbosa et al., 2017; Da Silva Prata et al., 2019).



**Figura 6: Modelo de divergência dos programas antimicrobiano e fagocítico na hanseníase.** Programa antimicrobiano: o estímulo com IL-15 induz a via da vitamina D, onde CYP27b1 converte a forma intracelular da vitamina D, a 25D3, para a forma ativa 1,25D3, que interage com o receptor de vitamina D (VDR), produzindo peptídeos microbicidas como a catelecidina. Programa fagocítico: após estímulo com IL-10 ocorre o aumento da expressão de receptores *scavenger* (SR), como o CD163, possibilitando a fagocitose de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (oxLDL) e de *M. leprae*, que contribui para a sobrevivência de micobactérias. Fonte: adaptado de Montoya et al., 2009.

Alguns trabalhos evidenciaram que a regulação do metabolismo lipídico possui um papel importante na resposta do hospedeiro a patógenos intracelulares. Corpúsculos lipídicos induzidos por *M. leprae* podem ser reguladores críticos na subversão da resposta imune a hanseníase (Mattos et al., 2010). A via de biossíntese de colesterol é modulada positivamente na forma lepromatosa da hanseníase, uma vez que foi reportado o aumento da expressão de enzimas importantes dessa via, como a 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR) em biópsias de pacientes LL (Mattos et al., 2014). Além disso, o bacilo ainda aumenta a captação de colesterol exógeno, aumentando a expressão do receptor de LDL (lipoproteína de baixa densidade), principal responsável pela captação de LDL na



sua forma nativa, assim como de receptores “scavengers”, responsáveis pela captação de LDL modificado, contribuindo ainda mais com o acúmulo do mesmo na célula infectada (Mattos et al., 2014). Os estudos ainda apontam que o acúmulo de colesterol observado na célula infectada é crucial para a sobrevivência de *M. leprae*, uma vez que o tratamento da célula com estatinas, que são fármacos classicamente descritos como inibidores da biossíntese de colesterol, reduz a viabilidade de *M. leprae* em monócitos infectados *in vitro* (Mattos et al., 2014) e em camundongos BALB/c infectados segundo o modelo de Shepard (Lobato et al., 2014).

### 1.1.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da hanseníase é feito primariamente a partir da observação dos sinais clínicos e sintomas (exame clínico), aliado à verificação dos aspectos histológicos da lesão e detecção dos bacilos em lâminas derivadas de esfregaços cutâneos e/ou biópsias retiradas das lesões (exame baciloscópico), usualmente da pele (Scollard et al., 2006). Para observação ao microscópio, as lâminas são coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen e os bacilos são contados por campo para obtenção do índice baciloscópico (IB) (Reibel et al., 2015), que é correlacionado em uma escala logarítmica (Ridley & Hilson, 1967). Ainda nesse contexto, existe um esforço para se implementar o diagnóstico sorológico através da realização de imunoensaio capaz de detectar anticorpos contra o antígeno PGL-I, no qual os níveis de produção do IgM indicam exposição a *M. leprae*, supostamente correlacionando com a baciloscopia. No teste cutâneo da lepromina, o antígeno de *M. leprae* é injetado via intradérmica e avalia-se a resposta imunológica e formação do edema após 4 semanas. Contudo, o teste da lepromina não se enquadra num teste de diagnóstico ou de exposição ao bacilo, atuando mais como um avaliador da capacidade de resposta granulomatosa do indivíduo e, apesar de não ser uma resposta específica a *M. leprae*, a ausência de resposta indicaria uma possibilidade de desenvolver uma forma lepromatosa (Scollard et al., 2006).

O desafio de identificar os bacilos em lesões paucibacilares, em contactantes domiciliares de pacientes com hanseníase ou em infecções subclínicas, começou a ser superado com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A alta sensibilidade dessa técnica permite sua utilização a partir de uma variedade de amostras clínicas extraídas de pele, nervos, sangue periférico e em vários tipos diferentes de amostras, como urina, raspados orais ou nasais e lesões

oculares (Brasil, 2021a). Estudos foram capazes de detectar a presença de genes específicos de *M. leprae* em biópsias de pacientes utilizando PCR, incluindo pacientes do polo tuberculóide, mostrando que essa técnica pode ser uma ferramenta para contribuir no diagnóstico de casos atípicos (Barbieri et al., 2014). A escolha do alvo genético certo favorece uma importante melhoria na sensibilidade, por meio da identificação de sequências genéticas repetitivas, como a “Specific Repetitive Element” (RLEP) (Truman et al., 2008). O uso da ferramenta de PCR também está sendo empregado para acompanhar o tratamento da doença. Martinez e colaboradores avaliaram a eficiência do tratamento com rifampicina *in vitro* sobre a viabilidade de *M. leprae*, fazendo uma relação entre RNA e DNA da micobactéria, utilizando o codificante do rRNA 16S, o gene *sodA* e a região repetitiva RLEP (Martinez et al., 2009; Martinez et al., 2011).

A detecção do material genético de *M. leprae* em casos de difícil diagnóstico, como em pacientes com baciloscopia negativa ou histopatologia inconclusiva por meio da PCR, surgiu como a possibilidade de um método promissor no alcance do diagnóstico correto com a possibilidade de identificar a doença precocemente. Um novo teste de diagnóstico desenvolvido por pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em parceria com o Instituto Carlos Chagas (Fiocruz Paraná) e o Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP), pode contribuir para o enfrentamento da hanseníase. Baseado na metodologia de PCR, o Kit NAT Hanseníase obteve registro Nº 80780040007 na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), sendo o primeiro teste molecular comercial para a doença desenvolvido no Brasil. O kit se destina à detecção qualitativa do material genético de *M. leprae* (DNA total) extraído de amostras de biópsia de pele ou nervo obtidas em serviços de diagnóstico de rotina ou vigilância epidemiológica, com o objetivo de auxiliar e/ou confirmar o diagnóstico clínico de hanseníase. O teste é qualitativo (atesta presença ou ausência do alvo na amostra), não sendo validado para quantificação (Brasil, 2021a).

A hanseníase possui tratamento estabelecido, um regime combinado dos antibióticos rifampicina, dapsona e clofazimina administrado em 6 doses para os pacientes paucibacilares (PB) e em 12 doses para os pacientes multibacilares (MB)(WHO, 2020) (**Tabela 1**). Os pacientes com forma indeterminada por dificuldade de diagnóstico são tratados segundo o regime administrado para pacientes multibacilares. A poliquimioterapia (PQT) foi introduzida pela OMS em 1982 (WHO, 2016), após a evidência de resistência ao tratamento unicamente com Dapsona

(Pettit & Rees, 1964), que revelou a necessidade de padronização do tratamento em combinação com outros fármacos, surgindo então a PQT. Pacientes com T1R são tratados com esteróides (prednisona a 1,0 mg/kg), enquanto pacientes ENH são tratados preferencialmente com talidomida (300 mg/dia) ou pentoxifilina (400 mg de 8 em 8 horas), associada ou não a esteroides.

**Tabela 1: Esquemas de tratamento da hanseníase paucibacilar e multibacilar.**

| Grupo de idade                   | Medicamento | Dosagem e frequência                                 | Duração  |         |
|----------------------------------|-------------|--|----------|---------|
|                                  |             |  | MB       | PB      |
| Adulto                           | Rifampicina | 600 mg uma vez por mês                               | 12 doses | 6 doses |
|                                  | Clofazimina | 300 mg uma vez por mês e 50 mg por dia               |          |         |
|                                  | Dapsona     | 100 mg por dia                                       |          |         |
| Crianças (10-14 anos)            | Rifampicina | 450 mg uma vez por mês                               | 12 doses | 6 doses |
|                                  | Clofazimina | 150 mg uma vez por mês e 50 mg em dias alternados    |          |         |
|                                  | Dapsona     | 50 mg por dia  |          |         |
| Crianças com < 10 anos ou < 40kg | Rifampicina | 10 mg/kg uma vez por mês                             | 12 doses | 6 doses |
|                                  | Clofazimina | 100 mg uma vez por mês e 50 mg duas vezes por semana |          |         |
|                                  | Dapsona     | 2 mg/kg por dia                                      |          |         |

Fonte: WHO, 2020.

Ainda não existem vacinas preventivas específicas para *M. leprae*, mas estudos apontam que a vacina Bacillus Calmette-Guérin (BCG) confere proteção a *M. leprae*. Estudos no Brasil mostram que o uso da BCG pode ser bastante relevante para proteção dos casos de contatos próximos de pacientes hansenícos (Düppre et al., 2008). Além disso, engloba uma das duas medidas adotadas pelo Ministério da Saúde para controle da infecção: 1ª) tratamento de pacientes; 2ª) vacinação dos contatos com BCG, que favorece o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e específica contra antígenos micobacterianos, sendo eficiente para proteção à doença (de Carvalho et al., 2017).

### 1.1.6 Alvos terapêuticos

A PQT é composta pela associação dos medicamentos: dapsona, clofazimina e rifampicina. A dapsona foi estabelecida como o principal fármaco anti-hansênico e estratégico para o controle da doença na década de 1950. A dapsona auxiliou no controle da hanseníase, mas o tratamento durava muitos anos, gerando um alto índice de abandono do tratamento e, em longo prazo, o aparecimento de resistência (WHO, 2004). Em 1960, foram descritos os primeiros casos de resistência de *M. leprae* a dapsona que ainda era o único fármaco descrito como sendo efetivo contra a hanseníase. Somente a partir de 1982, a clofazimina e rifampicina começaram a ser utilizadas no tratamento (Goulart et al., 2002).

A dapsona apresenta um efeito imunomodulador, desejável nas neurites hansênicas (Dewey et al., 2002). *M. leprae* requer o PABA (ácido para-aminobenzóico) para a síntese de ácido fólico usado em seu organismo. O PABA e a dapsona competem entre si, acarretando a redução ou bloqueio na produção de ácido fólico pelo bacilo, de modo que é fracamente bactericida (Goulart et al., 2002).

A clofazimina possui atividade antimicobacteriana e antiinflamatória; apresenta eficácia correspondente à da dapsona. Seu mecanismo de ação contra as micobactérias não está totalmente elucidado. Sua ação provavelmente está relacionada ao efeito antimicobacteriano ligando-se preferencialmente ao ácido desoxirribonucleico (DNA) da bactéria, inibindo a replicação e o crescimento, por isso, pode estar associada à melhora do quadro clínico do paciente (Serra, 2018). Também está associada ao aumento da atividade fagocítica de células polimorfonucleares e macrófagos e ao aumento do metabolismo oxidativo nas células hospedeiras. Os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores da clofazimina, além dos efeitos antimicobacterianos, parecem contribuir para a eficácia no tratamento e prevenção das reações de ENH (Brasil, 2020).

A rifampicina tem ação bactericida contra *M. leprae*, inibindo a síntese proteica bacteriana pela combinação com a RNA polimerase, ou seja, seu efeito primário sobre a transcrição gênica tem consequência na tradução (Goulart et al., 2002; Diniz et al, 2010). É o único medicamento bactericida incluído no regime de PQT.

O tratamento alternativo para hanseníase, assim como a PQT (tratamento padrão), é composto pela associação de três fármacos, sendo estas a rifampicina, ofloxacina e minociclina. A ofloxacina possui amplo espectro antibacteriano. O alvo

desse antimicrobiano é a DNA girase e a topoisomerase IV das bactérias (Brasil, 2018; Brasil, 2020; Brasil, 2021b). É contraindicada na gravidez devido ao risco de doença articular. A minociclina apresenta ação bacteriostática, inibindo a síntese de proteínas bacterianas por ligação com a subunidade ribossomal 30S e possivelmente a subunidade ribossômica 50S de bactérias suscetíveis; a síntese da parede celular não é afetada (Brasil, 2021c). É contraindicada na gravidez e crianças abaixo dos oito anos, por causar anormalidades ósseas fetais e do esmalte dentário. A combinação da rifampicina com a ofloxacina e a minociclina foi utilizada para prevenir os bacilos mutantes e resistentes à rifampicina (Diniz et al, 2010).

### **1.1.7 Terapias direcionadas ao hospedeiro**

Apesar da eficácia do tratamento contra *M. leprae* à base de rifampicina, dapsona e clofazimina, limitações em termos de duração do tratamento, resistência aos medicamentos, associadas ao uso de um esquema terapêutico complexo (Bona et al., 2015), fizeram com que os pesquisadores utilizassem outra estratégia no tratamento de diferentes doenças bacterianas. Uma estratégia promissora no tratamento de doenças infecciosas é o uso de terapia dirigida ao hospedeiro. Funciona como uma terapia adjuvante, que visa potencializar os principais componentes dos mecanismos efetores antimicobacterianos do hospedeiro (Hawn et al., 2013; Zumla et al., 2016; Machelart et al., 2017; Yang, 2017). Vários estudos sobre interações patógeno-hospedeiro, imunidade, e intervenções dirigidas ao hospedeiro mostraram que a ação antimicobacteriana dos medicamentos do esquema padronizado anti-tuberculose (anti-TB) está associada à indução de autofagia (Kim et al., 2012). Assim, diversos medicamentos utilizados na área clínica para tratamento de doenças infecciosas podem ter sua ação por meio do processo autofágico.

Uma via de autofagia funcional induzida por IFN- $\gamma$  e Beclina 1 em macrófagos de lesões de pele foi associada à forma tuberculóide (paucibacilar) da doença, enquanto um bloqueio da autofagia mediado por Bcl2 (gene regulador da apoptose), foi relacionado ao polo lepromatoso (multibacilar) (Silva et al., 2017a). Enquanto os macrófagos patrulham a derme, a epiderme humana é enriquecida por células de Langerhans (LC). As LCs restringiram a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1 através da captura de partículas virais pela langerina e subsequente internalização nos grânulos de Birbeck e direcionamento do HIV-1 para destruição

na via autolisossômica TRIM5 (proteína 5 contendo motivo tripartido, do inglês “tripartite motif-containing protein 5”) (Ribeiro et al., 2016), que por sua vez é induzida por IFN- $\gamma$  (Kimura et al., 2015). Em LC infectados por *M. leprae*, a atividade antimicrobiana induzida pelo tratamento com IFN- $\gamma$  é alcançada através da autofagia, que melhora a degradação de fagolisossomos contendo *M. leprae* e auxilia na capacidade da LC em apresentar antígenos para células T de maneira restrita a CD1a (Dang et al., 2019).

Assim, a terapia com IFN- $\gamma$  ou um medicamento direcionado à autofagia nas células da pele pode ser favorável ao manejo clínico da hanseníase e outras micobacterioses relacionadas à pele, como a úlcera de Buruli (Franco-Paredes et al., 2019). De fato, o “clearance” de bacilos álcool-ácido resistentes na pele de pacientes com hanseníase multibacilar é acelerada quando a poliquimioterapia é usada juntamente com um tratamento intradérmico com IFN- $\gamma$  humano recombinante (Sampaio et al., 1996). No entanto, a depuração de bacilos durante o tratamento de pacientes multibacilares com IFN- $\gamma$  foi acompanhada da ocorrência de ENH, de modo que outras substâncias precisam ser testadas.

## 1.2 Autofagia

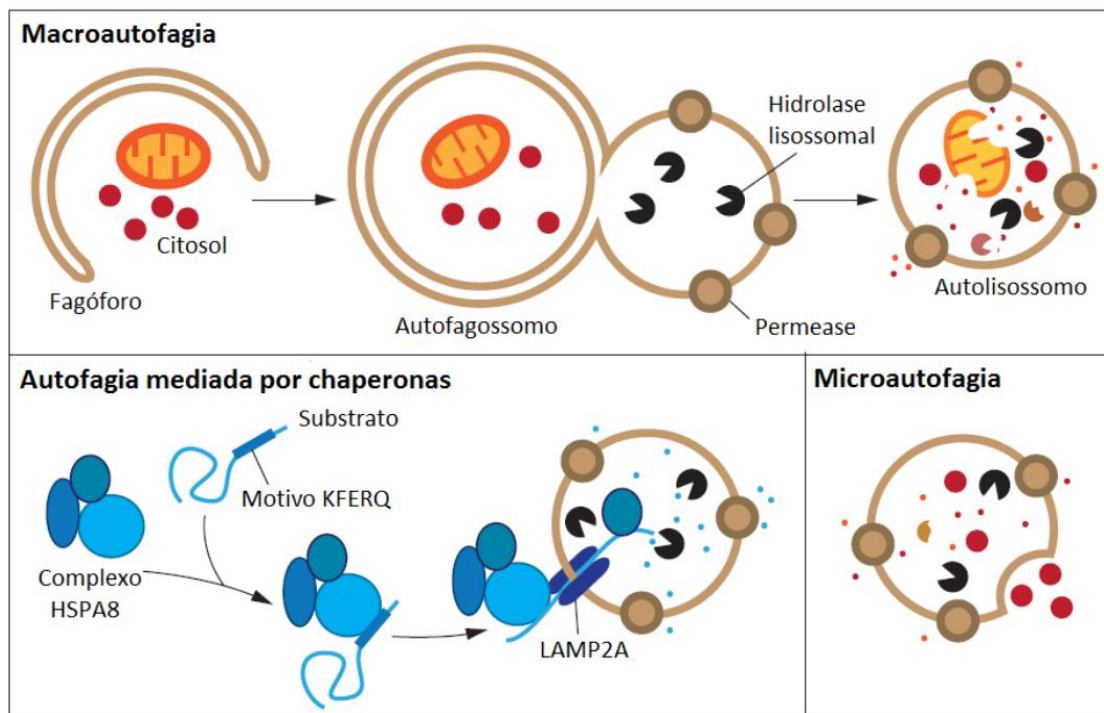
### 1.2.1 Mecanismo de execução da autofagia

Em 1967, Christian de Duve descreveu um processo fisiológico conservado evolutivamente, intitulado como autofagia (do grego *auto* para si mesmo, próprio e *phagein*, significando comer), o termo se refere a uma série de processos intracelulares que levam à remoção de proteínas citosólicas ou organelas celulares pelos lisossomos (Deter & Duve, 1967; Mizushima, 2009; Z. Yang & Klionsky, 2010).

A autofagia é uma via catabólica essencial que promove a degradação de componentes celulares no compartimento lisossomal, incluindo macromoléculas e organelas que já não se encontram funcionais. Na literatura, são descritas três vias principais de degradação: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas (AMC) e a macroautofagia (Murrow & Debnath 2013) (**Figura 7**). O processo de microautofagia consiste na absorção de componentes citoplasmáticos pelo lisossomo através da invaginação ou protusão da membrana lisossomal (Van Limbergen et al., 2009). O catabolismo mediado pela microautofagia pode ser seletivo ou não seletivo. Na forma seletiva, ocorre a degradação de organelas

específicas, por exemplo, micromitofagia (refere-se às mitocôndrias), micropexofagia (peroxissomos) ou micronucleofagia (núcleo). Enquanto na forma não seletiva, ocorre a degradação de porções aleatórias do citoplasma e de organelas, de modo inespecífico (Mijaljica et al., 2011). Na AMC, ocorre a degradação seletiva de proteínas com uma sequência sinal específica Lys-Phe-Glu-Arg-Gln (lisina, fenilalanina, ácido glutâmico, arginina e glutamina; motivo KFERQ), foi a primeira sequência descrita, que é reconhecida pela proteína de choque térmico Hsc70 (Dice et al., 1990; Jiang & Mizushima, 2013). Por esta via são degradados vários substratos, incluindo proteínas ligadoras de cálcio e lipídeos, enzimas glicolíticas, fatores de transcrição e seus inibidores, subunidades do proteassoma e proteínas envolvidas no tráfego de vesículas (Arias & Cuervo, 2011). A Hsc70 transporta o substrato a ser degradado até a membrana do lisossomo onde se liga ao receptor de membrana 2A associado ao lisossomo (LAMP2A) (Cuervo & Wong, 2013).

A macroautofagia (usualmente referida como autofagia) é caracterizada pela formação de uma estrutura de membrana dupla conhecida como autofagossomo, que posteriormente se funde com o lisossomo, originando o autolisossomo, sendo o seu conteúdo degradado por enzimas lisossomais (Van Limbergen et al. 2009).



**Figura 7: Três vias principais de degradação autofágica.** Macroautofagia: inicialmente, ocorre a formação do fagóforo (membrana de isolamento). Em seguida, ocorre a captura de porções celulares e forma-se o autofagossomo. Posteriormente, ocorre a fusão desta vesícula de membrana dupla com o lisossomo (autofagolisossomo), local onde os componentes celulares serão degradados. Autofagia mediada por chaperonas: ocorre o transporte de proteínas individuais diretamente para a membrana do lisossomo. Microautofagia: ocorre a captação direta do conteúdo citoplasmático através da membrana do lisossomo. Adaptado de Parzych & Klionsky, 2014.

O processo autofágico é complexo envolvendo diferentes etapas controladas por proteínas Atgs (“autophagy-related genes”) que foram primeiramente descritos em leveduras (Dwivedi & Ahn 2009). Todas as etapas são dinâmicas, envolvendo a integração com diversas vias de sinalização. A maioria dos dados de autofagia foram obtidos em estudos de estresse induzido pela privação de nutrientes (incluindo os aminoácidos), o que promove modificações transcricionais e pós traducionais nas proteínas Atgs.

Em mamíferos, uma das vias que regula negativamente a autofagia é controlada pela proteína mecanística alvo da rapamicina (mTOR), serina/treonina quinase importante no controle do crescimento celular e um dos principais reguladores de autofagia. Apresenta-se formando dois complexos proteicos: mTORC1 (composto pelas proteínas mTOR, PRAS40 - Substrato de Akt rico em prolina de 40 KDa, MLST8 - Proteína associada a mTOR, homólogo de LST8; DEPTOR - Proteína de interação com mTOR contendo domínio DEP e RAPTOR - proteína associada à regulação de mTOR) e mTORC2 (composto pelas proteínas Rictor, mSIN1 - quinase associada a ativação por mitógeno 1, PRR5 – proteína rica



em prolina 5, mLST8 e mTOR). Sob condições de redução nutricional, ou ainda sob o tratamento com rapamicina ou Torina 1, o mecanismo de ativação de mTOR é reprimido, ocorre a rápida defosforilação do complexo serina/treonina proteína quinase (Ulk1) e, conseqüentemente, a indução da autofagia, resultando na formação da membrana de isolamento (fagóforo) (Mizushima & Komatsu, 2011, Lane, 2017). Em condições de abundância nutricional, mTORC1 associa-se ao complexo Ulk1/2 e promove a fosforilação e inibição de Ulk1/2 e Atg13 (Nazio et al., 2013), impedindo a ativação da via. Ulk1 é o ortólogo de Atg1 em leveduras e faz parte do complexo Ulk1-Atg13-Atg101-Fip200. A Ulk interage com diferentes proteínas como Hsp90 ou Atg101 e CDC37, também atua na fosforilação do complexo beclina 1 (BECN1) e da Atg14 (Park et al., 2016).

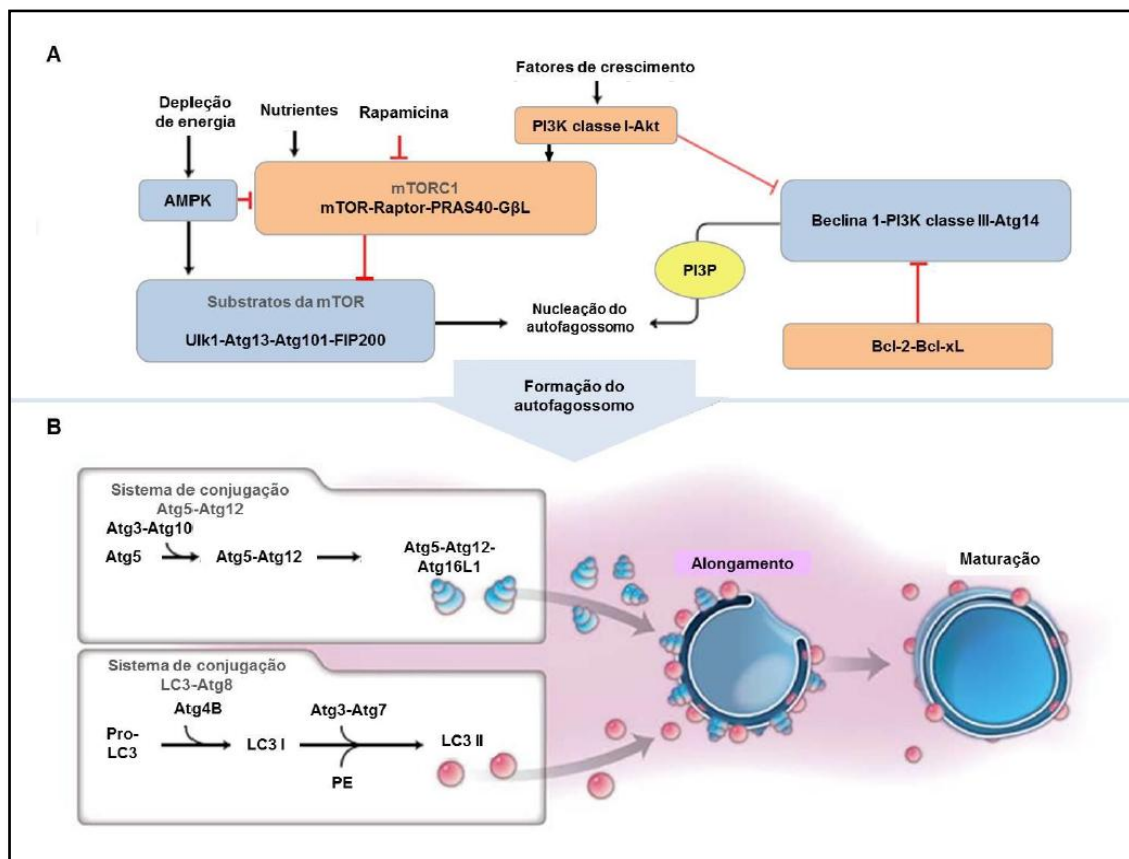
O estado energético de uma célula também atua na modulação da autofagia em função dos níveis de ATP, ADP e AMP. Uma vez que o ATP não é ativamente sintetizado, a carga energética diminui de modo simultâneo ao acúmulo de AMP e ADP. Esta condição energética estimula a autofagia através da ativação de AMPK [quinase ativada por AMP (monofosfato de adenosina)], outra proteína sensora da redução dos níveis de energia celular, como em situações de hipóxia, jejum, e de privação de nutrientes (em especial glicose) (Hardie et al., 2012). A ativação do heterodímero AMPK é controlada principalmente por duas quinases “upstream”: LKB1 (quinase hepática B1) e CaMKK $\beta$  (proteína quinase quinase  $\beta$  dependente de cálcio/calmodulina). A ativação de AMPK pode induzir diretamente o processo autofágico, independente de mTOR, por meio da fosforilação e ativação de ULK1 (Kim et al., 2011), bem como, componentes do complexo BECN1/VPS34, aumentando a atividade da PI3K classe III (Yu et al., 2015). A autofagia também pode ocorrer através da inibição indireta de mTORC1 via ativação do complexo TSC1/2 (esclerose tuberosa 1/2), um regulador negativo de mTORC1 (Russell et al., 2013).

Didaticamente, podemos descrever o processo autofágico em quatro etapas: formação do fagóforo (nucleação), expansão, fusão e a degradação/reciclagem. O fagóforo pode ser originário da membrana plasmática e/ou das membranas de organelas, como o retículo endoplasmático (RE), Golgi e mitocôndria (Militello & Colombo, 2011). Quando a autofagia é induzida, inicia-se a montagem de complexos funcionais e ativação de proteínas Atgs, ocorrendo projeções de membrana da organela de origem chamadas de omegassoma, onde se inicia a montagem do fagóforo com o recrutamento das proteínas do complexo Ulk1/Ulk2,

Atg13, Atg101 e Fip200 (complexo ULK) (Hurley & Young, 2017). O complexo ULK é ativado e se transloca para um determinado domínio do RE (Shibutani & Yoshimori, 2014, Knorr et al. 2015, Shpilka et al. 2015). Uma vez no RE, o complexo ULK recruta o complexo PI3K de classe III (Beclina 1 [BECN1 ou Atg6], Atg14, p150 [VPS15], VPS34, AMBRA1, UVRAG [VPS38] e Rubicon), sendo o recrutamento de BECN1 imprescindível para a ativação deste complexo.

Já foi demonstrado que a etapa de nucleação requer a proteína VPS34, uma fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) de classe III que forma um complexo com BECN1 (Juenemann & Reits, 2012) (**Figura 8A**). A proteína BECN1 tem um papel fundamental na iniciação da autofagia, ela interage com a proteína Bcl-2 (proteína anti-apoptótica). Bcl-2 bloqueia a interação de BECN1 com o complexo PI3K, inibindo a formação do autofagossomo, suprimindo a autofagia (Romanov et al., 2012). Em um segundo momento, é necessária a expansão da membrana que envolverá o material a ser degradado. Esse processo ocorre através da participação de dois sistemas de conjugação independentes. No primeiro sistema, a Atg12 é ativada por Atg7 (enzima E1-símile) e, em seguida, é conjugada à Atg5 em um passo que requer Atg10 e por sua vez, esse conjugado interage com Atg16L1, formando o complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 presente na parte externa da membrana de isolamento (**Figura 8B**). Atg12 é uma proteína ubiquitina-like que pode conjugarse covalentemente com Atg3 e Atg5, regulando os processos de apoptose e autofagia (Rubinstein et al., 2011). No segundo sistema, a protease Atg4 cliva a extremidade C-terminal da forma pró-LC3 dando origem a forma citosólica denominada LC3-I (proteína 1 associada aos microtúbulos de cadeia leve 3). Em etapas subsequentes, a enzima Atg7 ativa LC3-I, que é então conjugado ao lipídio fosfatidiletanolamina (PE) pela enzima Atg3 com auxílio do complexo Atg12-Atg5-Atg16L1, formando sua forma lipidada LC3-PE (ou LC3-II), que se transloca do citoplasma principalmente para as pontas das partes interna e externa da membrana de isolamento (Tanida et al., 2004; Hanada et al., 2007, Zhou et al., 2015). Quando o alongamento é concluído, os componentes do complexo trimérico Atg12-Atg5-Atg16L1 se dissociam do autofagossomo e retornam para o citoplasma (Zhou et al., 2015). A proteína LC3/MAP1LC3 é distribuída de forma ubíqua em tecidos de mamíferos e células cultivadas. Existem três isoformas da proteína LC3 (LC3A, LC3B e LC3C) que são modificadas por processos pós-traducionais durante a ativação autofágica (Chen, 2011).

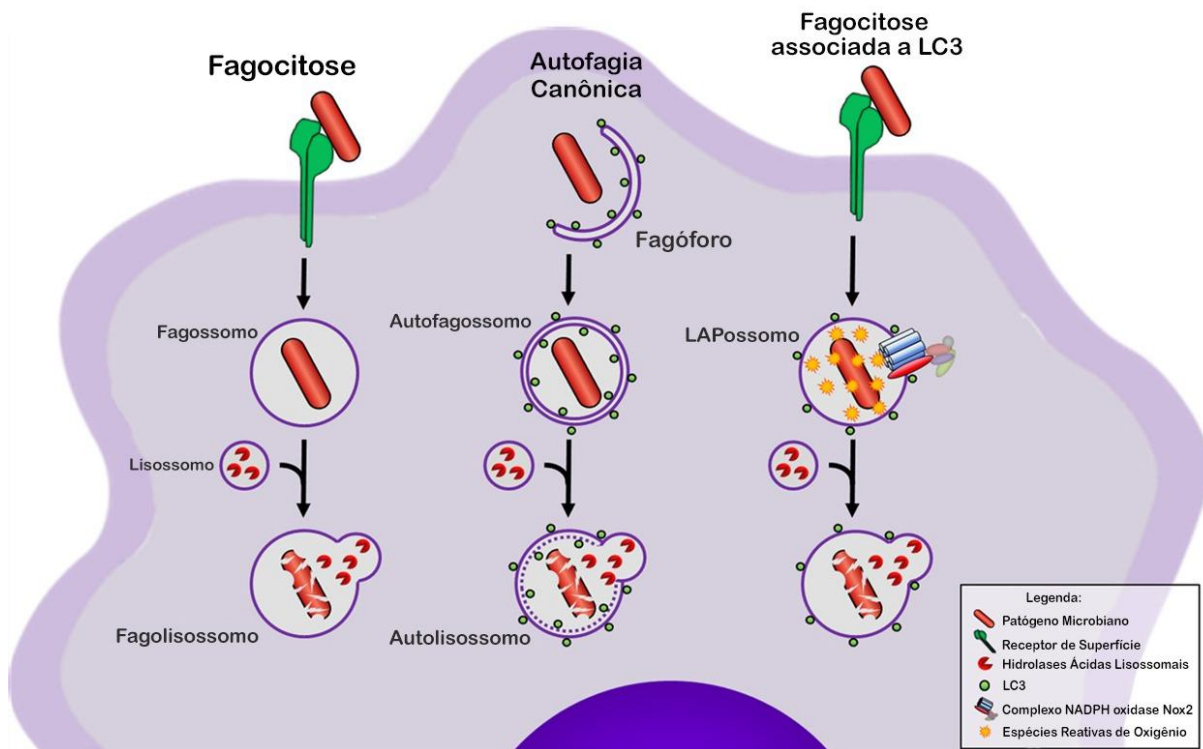
Ao final do processo de expansão da membrana de isolamento, ocorre a captura de alvos citoplasmáticos (agregados protéicos, organelas danificadas ou patógenos) que ficam retidos no interior dos autofagossomos. Subsequentemente ocorre a fusão autofagossomo-lisossomo, dando origem a uma nova organela conhecida como autofagolisossomo (Mizushima & Komatsu, 2011). Atualmente, o que se sabe sobre a maquinaria envolvida nas etapas de transporte e fusão está baseado no entendimento geral do tráfego intracelular de vesículas, particularmente no conhecimento de proteínas como: SNARES, Rab com função GTPase e complexos de fixação de membrana (Nakamura & Yoshimori, 2017). Algumas SNARES já foram descritas no processo de fusão do autofagossomo (SNARES STX17 e a SNAP 29) com o lisossomo (SNARES VAMP7 e VAMP8) (Hikita et al., 2018). A fusão entre essas organelas também é mediada pela Rab7 e pela proteína lisossomal transmembrana LAMP-2. No interior do autofagolisossomo, as enzimas lisossomais degradam o conteúdo autofagossomal, concluindo o processo de reciclagem. Esse processo de degradação é decorrente da atividade de várias proteases, dentre as quais, as mais conhecidas são as catepsinas (catepsinas D, B e L) (Settembre et al., 2013). Mesmo após a fusão autofagolisossomal, LC3-II permanece associado à membrana por algum tempo, sendo a sua conjugação com a fosfatidiletanolamina clivada pela Atg4, o que promove a sua dissociação da membrana do autofagolisossomo (**Figura 8B**) (Satoo et al., 2009). As macromoléculas resultantes são liberadas de volta ao citoplasma através de permeases, originalmente presentes na membrana dos lisossomos, permitindo a reutilização dos produtos gerados (Lim & Zoncu, 2016).



**Figura 8: Principais eventos moleculares da autofagia.** (A) Devido à depleção de energia, ocorre a ativação do complexo Ulk1-Atg13-Atg101-Fip200, essencial para a fase de nucleação do autofagossomo. A estimulação do complexo beclina1-PI3KIII também é crucial para o início da autofagia, pois gera PI3P e promove a nucleação da membrana do autofagossomo. As proteínas Bcl-2 e Bcl-xL são inibidoras da autofagia, pois sequestram BECN1. O complexo mTORC1 inibe a Ulk1 quando existe disponibilidade de nutrientes e impede a autofagia. Em resposta a níveis aumentados de AMP, a cinase AMPK controla negativamente a mTOR e fosforila Ulk1. PI3K classe I-Akt regula a autofagia negativamente ao ativar mTOR em resposta a fatores de crescimento e Akt regula negativamente a autofagia através da fosforilação de beclina-1. (B) Dois sistemas de conjugação *ubiquitina-like* são necessários para o alongamento do autofagossomo. O primeiro sistema leva a formação do complexo Atg5-Atg12-Atg16L1 e o segundo envolve a conversão de LC3-I em LC3-II. Adaptado de Choi et al., 2013.

No contexto de papéis não autofágicos das proteínas Atg, pode-se incluir o processo ligado à fagocitose, combinando muitos componentes da sua maquinaria molecular com a autofagia canônica. Conhecido como fagocitose associada à LC3 (LAP) (**Figura 9**), este processo é independente de Ulk1, sendo dependente de outras moléculas da via de autofagia como Atg5, Atg7, Atg12, Atg10 e BECN1, envolvendo também o recrutamento da proteína autofágica LC3 para os fagossomos (do inglês “LAPossomes”). Como a formação do LAPossomo requer muitos, mas não todos, componentes da maquinaria molecular necessária para a formação de autofagossomos, a LAP é considerada uma forma não canônica de autofagia (Herb et al., 2020). A principal diferença é o mecanismo de ativação. A autofagia canônica é induzida pelas quinases mTORC1 e/ou AMPK através de um complexo de pré-

iniciação composto por Ulk1-Fip200-Atg13-Atg101. A indução de LAP é independente desse complexo de pré-iniciação (Hurley & Young et al., 2017). A LAP é ativada após a fagocitose de partículas que se ligam a receptores de superfície como TLR1/2, TLR2/6, TLR4, dectina-1 e dectina-2, receptores que reconhecem células mortas como TIM4 e receptores de IgG como FcγR, ou endossomais como TLR9, levando a uma rápida maturação dos fagossomos em autofagolisossomos e à degradação de bactérias e “debris” celulares, sendo considerada uma via microbiana (Klionsky et al., 2014, J. Martinez et al., 2015, Herb et al., 2020).



**Figura 9: Direcionamento de patógenos microbianos para destruição lisossomal.** A imagem mostra a maturação do fagossomo em três processos que são iniciados por vias distintas: fagocitose, autofagia canônica e fagocitose associada a LC3, seguido da entrega da bactéria para o lisossomo, que contém hidrolases responsáveis pela degradação e morte de patógenos fagocitados. Durante a fagocitose, partículas extracelulares são reconhecidas por receptores de superfície específicos e englobadas em estruturas chamadas fagossomos. Durante a autofagia canônica, o fagóforo envolve componentes citosólicos dando origem a uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo. Por uma via autofágica não canônica conhecida como fagocitose associada a LC3 (LAP), o LC3 é recrutado para fagossomos intitulado como LAPossomo. Adaptado de Herb et al., 2020.

Em condições em que autofagia está exacerbada, como situações de estresse químico (drogas) ou nutricional (escassez de aminoácidos, açúcares, fatores de crescimento e oxigênio), a degradação de componentes celulares fornece a reciclagem de precursores metabólicos essenciais para a sobrevivência da célula até que a homeostase seja restabelecida (Kroemer et al., 2010; Ravikumar et al., 2010). No entanto, em situações em que a homeostase não pode ser restabelecida, devido ao estresse contínuo, altos níveis de autofagia tendem a favorecer a morte

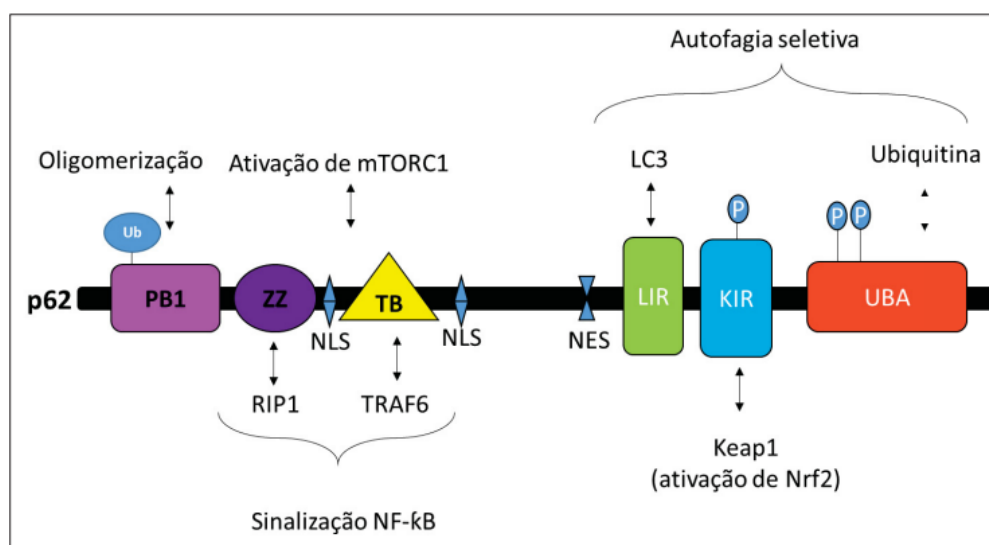
celular pela degradação excessiva de moléculas essenciais e de organelas, caracterizando a morte celular autofágica (Shen & Codogno, 2011).

### 1.2.2 Autofagia seletiva e não seletiva

Existem algumas formas descritas de autofagia, podendo ser seletivas (alvo específica) ou não seletivas. O que difere essas duas formas de autofagia é o tipo de carga e o local onde essa carga é sequestrada. A formação do fagóforo, tanto na via seletiva quanto na não seletiva, é dependente de proteínas Atg. Além disso, a seletividade da via autofágica tem sido descrita em relação aos componentes degradados (Akers et al., 2012). Termos específicos são atribuídos para a degradação de diferentes alvos, como reticulofagia em referência à degradação do retículo endoplasmático, pexofagia para degradação de peroxissomos, mitofagia para mitocôndrias, ribofagia para ribossomos, mielinofagia para mielina e xenofagia em referência à degradação de patógenos (Ravikumar et al., 2010).

A autofagia seletiva é mediada por um grupo de receptores da imunidade inata que funcionam como adaptadores para a eliminação dos alvos pela via, onde eles também agem como substratos e são degradados no mesmo processo, servindo como marcadores de degradação autolisossomal (Klionsky et al., 2016). Esses receptores são denominados receptores do tipo sequestrassoma 1 (SQSTM1/p62) (SLR) (Deretic et al., 2013). Essa família inclui ainda os receptores NBR1, NDP52 (também conhecido como CALCOCO2), Optineurina, TAX1BP1 e galectina. Outro exemplo é o receptor Nix/BNIP3L, essencial para remoção de mitocôndrias danificadas (Johansen & Lamark, 2011). Esses receptores possuem um motivo designado por região de interação com LC3 (LIR), que medeia a sua ligação às proteínas LC3, promovendo o endereçamento da carga para o autofagossomo (Gatica et al., 2018). O p62 possui domínio N-terminal (PB1) que o torna capaz de se auto-oligomerizar e um domínio C-terminal (UBA) capaz de interagir com proteínas ubiquitinadas (Johansen & Lamark, 2011) (**Figura 10**). Os receptores NBR1, NDP52, Optineurina e TAX1BP1 reconhecem os alvos marcados com ubiquitina via domínio de ligação à ubiquitina (UBD), que pode variar de acordo com o tipo de ubiquitina reconhecida por cada receptor (por exemplo, o domínio UBA em p62 e NBR1, possui afinidade por monoubiquitina e cadeias de poliubiquitina-K63). Após o reconhecimento pelo proteassoma, ocorre a degradação

seletiva de substratos ubiquitinados, como agregados proteicos ou bactérias intracelulares (Shaid et al., 2013, Kimura et al., 2016).



**Figura 10: Estrutura dos domínios do receptor p62.** A proteína p62 possui domínios múltiplos, tais como: domínio Phox1 e B1 (PB1), uma região *zinc finger* (ZZ), dois sinais de localização nuclear (NLSs), um domínio de ligação a TRAF6 (TB), um sinal de exportação nuclear (NES), uma região que reconhece especificamente o LC3 (LIR), uma região que interage com Keap1 (KIR) e que está envolvida na regulação da ativação do fator de transcrição Nrf2 e um domínio associado ao reconhecimento de alvos ubiquitinados (UBA). Fonte: adaptado de Lin et al., 2013.

### 1.2.3 Autofagia e infecção por microrganismos intracelulares

A autofagia é um processo catabólico intracelular que pode contribuir para a remoção de patógenos invasores por meio de uma via de degradação lisossomal. No entanto, alguns patógenos como *M. tuberculosis* inibem a maturação do autofagossomo com o objetivo de favorecer a replicação bacteriana (Campoy & Colombo 2009; Cemma & Brumell 2012). No caso de *M. marinum*, o mesmo reside em um compartimento contendo LC3 que é desprovido de enzimas lisossomais. Porém, o tratamento com rapamicina leva à indução de autofagia, favorecendo a maturação do compartimento que contém o patógeno (Lerena & Colombo 2011).

A xenofagia é descrita em diferentes modelos como vírus, incluindo o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e o vírus chikungunya (Joubert et al., 2012), parasitos como *Toxoplasma gondii* (Subauste, 2019) e diversas bactérias importantes do ponto de vista médico, incluindo a *Shigella flexneri*, *Salmonella entérica* (Thurston et al., 2009), *Listeria monocytogenes* (Py et al., 2007), *Francisella tularensis* e *Streptococcus pyogenes* do grupo A (Nozawa, 2018). Este processo apresenta

papel chave na defesa imune inata, importante mecanismo de defesa contra doenças infecciosas (Virgin & Levine, 2009; Levine et al., 2011).

Há diversos trabalhos associando autofagia e infecção por micobactérias, sendo a maioria dos estudos realizados com *M. tuberculosis*. Um trabalho sobre a parkina, uma ubiquitina E3 ligase, demonstrou que a mesma não só participa da eliminação de mitocôndrias danificadas via autofagia (Geisler et al., 2010), mas também promove a resistência do hospedeiro à listeriose e tuberculose (TB) por intermédio da autofagia dependente de ubiquitina (Manzanillo et al., 2013). Estudos genéticos evidenciaram que polimorfismos encontrados na região reguladora de parkina (*PARK2*) estão associados com o aumento da susceptibilidade do hospedeiro à hanseníase (Mira et al., 2004). Também foi observado que a UBQLN1, um membro da família de proteínas que contém um domínio semelhante à ubiquitina é responsável por restringir a replicação bacteriana de *M. tuberculosis* uma vez que recruta ubiquitina, p62 e LC3 para vacúolos contendo o patógeno (Sakowski et al., 2015). Franco e colaboradores (2017) mostraram que outra ubiquitina ligase, conhecida como Smurf1, também participa da autofagia seletiva de bactérias intracelulares, incluindo *L. monocytogenes* e *M. tuberculosis*. Adicionalmente, camundongos “knockout” para a Smurf tiveram a carga bacteriana aumentada, bem como o aumento da inflamação pulmonar e mortalidade acelerada durante a infecção crônica (Franco et al., 2017). Neste mesmo trabalho foi mostrado que a Smurf1 se associa com bactérias nos pulmões de pacientes com tuberculose pulmonar. Poucos trabalhos têm como foco a maquinaria de autofagia em células da pele, tais como: células de Langerhans, células dendríticas, mastócitos, queratinócitos, fibroblastos da pele, melanócitos, neutrófilos, células B e células NK. O conhecimento atual sobre a autofagia em células da pele durante doenças micobacterianas/infecciosas é baseado principalmente em estudos com macrófagos dérmicos e linhagens celulares.

O extravasamento do conteúdo citoplasmático mediado pelo sistema ESX-1 de *M. tuberculosis* é capaz de induzir autofagia seletiva dependente de ubiquitinação, um mecanismo da resposta imune inata eficiente em conter o crescimento de patógenos intracelulares (Watson et al., 2012; Manzanillo et al., 2013). O sistema de secreção ESX-1 também está envolvido no direcionamento de *M. marinum* para o compartimento que contém LC3; no entanto, esse processo não é dependente de ubiquitinação. Kim e colaboradores (2017) demonstraram que *M. abscessus* (UC22 – variante “rough”) induz autofagia e inibe o fluxo autofágico em



macrófagos murinos. Também foi observado que os componentes lipídicos do isolado clínico UC22, que é altamente virulento, desempenham um papel importante na formação do autofagossomo. Esses dados sugerem que *M. abscessus* virulento pode sobreviver dentro de autofagossomos, impedindo a fusão autofagossomo-lisossomo (Kim et al., 2017). *Coxiella burnetii* e *Legionella pneumophila* também desenvolveram estratégias para subverter o processo autofágico (Shi et al., 2012). Um estudo sobre o papel da D-lactoferrina na autofagia, demonstrou que esse peptídeo antimicrobiano, foi capaz de inibir o crescimento intracelular de *M. avium* em macrófagos derivados de medula óssea, ao passo que, também aumentou o conteúdo lisossomal e o número de vesículas autofágicas nos macrófagos infectados (Silva et al., 2017b). Um estudo comparando a indução de autofagia por diferentes espécies de micobactérias descobriu que micobactérias não patogênicas, como *M. smegmatis*, induzem uma resposta autofágica mais robusta do que *M. tuberculosis* (cepa H37Rv) (Bah et al., 2016). O grupo observou a redução na co-localização de LC3 com *M. smegmatis*  $\Delta$ pmmB (mutante deficiente em lipoglicana), bem como, a diminuição na expressão de LC3-II quando o receptor TLR2 foi bloqueado, sugerindo a participação de TLR2 na ativação da autofagia durante infecção com *M. smegmatis* (Bah et al., 2016).

O IFN- $\gamma$  induz autofagia em macrófagos, com isso, ocorre o recrutamento de LC3-II para o fagossomo micobacteriano via molécula efetora IRGM/LRG-47 (Singh et al., 2006). A IRGM controla a autofagia regulando a montagem do complexo de iniciação, através da interação com BECN1 e Ulk1, e depois em conjunto com Atg16L1 e o receptor NOD2, forma um complexo molecular que promove a defesa antimicrobiana (Chauhan et al., 2015). IFN- $\gamma$  através da UBQLN1, também pode induzir a xenofagia de *M. tuberculosis* (Sakowski et al., 2015). Além disso, foi descrito que *M. tuberculosis* induz a supressão da autofagia, o que resulta em acúmulo de lipídeos (Neyrolles et al., 2006, Singh et al., 2009, Kumar & Rao 2011). Em macrófagos espumosos, os fagossomos que contém as micobactérias migram em direção aos corpúsculos lipídicos, o que pode resultar no encapsulamento do bacilo em partículas lipídicas (de Chastellier et al., 2009). A autofagia parece desempenhar um importante papel na reciclagem dos principais componentes dos corpúsculos lipídicos como triglicerídeos e ésteres de colesterol. É possível que o englobamento do bacilo em um ambiente rico em lipídeos contribua para a proteção do patógeno contra o estresse hipóxico, bem como, o proteja de respostas microbicidas que envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Além disso, o ambiente abundante em lipídeos permite a manutenção do reservatório nutricional que propicia a persistência do bacilo na célula hospedeira (de Chastellier, 2009).

Nosso grupo observou que pacientes LL apresentam alta carga bacilar devido ao bloqueio da via autofágica, utilizado por *M. leprae* como um mecanismo de subversão da resposta do hospedeiro. Entretanto, células de pacientes TT ou reacionais, que apresentam aumento da citocina IFN- $\gamma$ , apresentam maior capacidade de indução de autofagia, justificando a redução da carga bacilar nesses casos (Silva et al., 2017a).

Outras funções da via de autofagia e das proteínas que participam desse processo podem ser incluídas nos mecanismos de resposta imune inata e adaptativa, bem como, nos mecanismos efetores durante infecções. Dentre eles, podemos destacar a remoção de corpos apoptóticos, regulação da produção de IFNs do tipo I, citoproteção contra fatores ou toxinas microbianas, regulação da produção de citocinas inflamatórias e recrutamento de moléculas efetoras imunes para membranas intracelulares (Pua et al., 2007; Levine et al., 2011; Mizushima & Komatsu 2011).

#### **1.2.4 Fármacos moduladores da via autofágica e sua ação em doenças infecciosas**

Uma perspectiva promissora no controle de doenças infecciosas é o reposicionamento de fármacos, sendo utilizado de forma isolada ou complementar aos tratamentos existentes. No caso de patógenos que modulam a via autofágica, alguns desafios ainda precisam ser enfrentados, como o entendimento dos mecanismos utilizados para subverter a indução da autofagia na célula hospedeira e que possam ser alvos para a escolha de fármacos que possam contribuir para a ativação da via autofágica. É importante entender o impacto de uma terapia direcionada à célula hospedeira nos casos em que há coinfeção, bem como a avaliação da modulação da via autofágica por diferentes isolados clínicos, incluindo cepas resistentes, e, por fim, se o uso de um medicamento em combinação com os esquemas terapêuticos já utilizados terá efeito benéfico sobre a infecção.

O benefício terapêutico em utilizar agentes farmacológicos que modulam a autofagia tem pontos importantes a ser considerados, uma vez que existe uma variedade de patógenos que utilizam a maquinaria autofágica a seu favor. É

necessário considerar se o fármaco irá atuar apenas em um componente específico da via ou em todas as vias autofágicas. É fundamental entender se o patógeno explora essa via como um todo (sistemicamente) ou apenas parte dos componentes para aumentar sua replicação e/ou sobrevivência intracelular. Por exemplo, *Brucella abortus intracelular* (*B. abortus*) sobrevive promovendo a formação de vacúolos que requerem a atividade das proteínas de iniciação de autofagia (PIK3C3, ULK1, Atg14L e Beclin 1), mas não as proteínas de alongamento da via de autofagia Atg16L1, Atg4B, Atg5, Atg7 e LC3-II (Starr et al., 2012). Nessa condição, o uso de inibidores da maturação do autofagossomo ou inibidores dos sistemas de conjugação de proteínas da autofagia não teria efeito protetor contra a sobrevivência dessa bactéria. Ainda neste contexto, é importante considerar aqueles pacientes que são acometidos por infecções (por exemplo, tuberculose) que podem ser eliminadas se a autofagia for regulada positivamente, mas que estão coinfectados com patógenos que utilizam a via autofágica a seu favor, como infecções concomitantes com o vírus da hepatite B e HIV (Li et al., 2011). Em outras condições, o paciente coinfectado é favorecido pela ativação autofágica, como é o caso dos pacientes com fibrose cística (FC) que são tratados com cisteamina. O estímulo autofágico mediado pela cisteamina em macrófagos de pacientes com fibrose cística (com a mutação CFTRdel506) favorece o “clearance” de *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria que frequentemente infecta os pulmões de pacientes com FC (Ferrari et al., 2017). Portanto, é primordial entender as diferenças entre cada estímulo, patógeno e o tipo de célula em estudo para que o uso dessa via como alvo para o desenvolvimento de drogas antimicobacterianas possa avançar.

### **1.2.5 Doenças micobacterianas**

A ativação da autofagia por diversos fármacos pode representar uma estratégia promissora de tratamento contra doenças micobacterianas. Os estudos iniciais sobre fármacos indutores da via autofágica foram baseados na única droga que era capaz de induzir cronicamente a via, conhecido como rapamicina. Sua atividade antimicobacteriana foi observada através da redução da sobrevivência de *M. kansasii*, *M. avium*, Bacillus Calmette-Guérin (BCG) e cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Greenstein et al., 2008; Zullo et al., 2014). No entanto, os efeitos adversos da rapamicina (que não foram associados à indução de autofagia) tornaram esse medicamento pouco favorável para uso. Vários fármacos são

capazes de induzir autofagia e tratar doenças micobacterianas, alguns exemplos estão listados na **Tabela 2**.

Dentre os diversos fármacos descritos na literatura com propriedades pró-autofágicas, o ácido valpróico (Schiebler et al., 2015), carbamazepina (Schiebler et al., 2015), metformina (Singhal et al., 2014), verapamil (Abate et al., 2016), loperamida (Juárez et al., 2016) e ambroxol (Choi et al., 2018), já possuem aprovação para uso clínico em diferentes patologias. A estratégia em utilizar medicamentos com um perfil de segurança conhecido para novas indicações relacionadas à autofagia é atraente por não precisarem passar pela avaliação toxicológica completa (Sundaramurthy et al., 2013, Stanley et al., 2014, Kim et al., 2019).

Com relação à propriedade pró-autofágica do ambroxol, o fármaco se mostrou capaz de potencializar a atividade antimicrobiana da rifampicina no modelo murino em ensaios pra TB (Choi et al., 2018). Ainda no contexto de fármacos capazes de estimular a morte autofágica de *M. tuberculosis*, o anticonvulsivante carbamazepina induziu autofagia em camundongos infectados com a cepa de *M. tuberculosis* multirresistente, resultando na diminuição da carga bacteriana e melhora da patologia pulmonar (Schiebler et al., 2015). Foi observado que a carbamazepina induz autofagia antimicrobiana em uma via independente de mTOR, que resulta na diminuição dos níveis de mioinositol (bloqueando a captação de mioinositol). Além disso, a carbamazepina também ativa AMPK (Cárdenas-Rodríguez et al., 2010). Nesse mesmo estudo, o grupo descreveu a indução de autofagia pelo fármaco ácido valpróico, outro anticonvulsivante (Schiebler et al., 2015), que favoreceu o aumento da colocalização de LC3 com *M. tuberculosis*, efeito semelhante ao observado após tratamento com o fármaco antidiarreico loperamida (Juárez et al., 2016). Ao contrário da carbamazepina, que ativa a AMPK, a indução de autofagia pela baicalina em macrófagos infectados por *M. tuberculosis* ocorreu por meio da inibição da via PI3K/Akt/mTOR. Além disso, a baicalina apresentou efeito supressor na ativação do inflamassoma NLRP3 via PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B (fator nuclear- $\kappa$ B), bem como reduziu os níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  (Zhang et al., 2017).

Estudos iniciais que avaliaram o efeito do verapamil e seus análogos em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* mostraram que o análogo estrutural KSV21 tinha um efeito aditivo na atividade antimicobacteriana inibitória de isoniazida e rifampicina (Abate et al., 2016). O fármaco antidiabético metformina reduziu o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* de maneira dependente de AMPK. Além

disso, a metformina foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais e facilitar a fusão fagossoma-lisossoma (Singhal et al., 2014). No entanto, um estudo mais recente não conseguiu mostrar a melhora na atividade bactericida de fármacos antituberculose pela metformina no modelo murino (Dutta et al., 2017). Esses dados nos fazem refletir sobre a importância de considerar se o medicamento anti-TB pode ou não alterar a farmacocinética do medicamento de reposicionamento. O uso de rifampicina neste estudo mais recente (Dutta et al., 2017) pode ter alterado a farmacocinética da metformina. Além disso, também é prudente atentar para as diferenças no desenho experimental realizado para avaliar a eficácia da terapia, que pode ser combinada (Dutta et al., 2017) ou utilizada isoladamente (monoterapia) (Singhal et al., 2014).

Atualmente existem vários estudos associando autofagia e infecção por bactérias, incluindo estudos que mostram as diferentes estratégias desenvolvidas por bactérias para inibir as respostas autofágicas do hospedeiro (Yoshikawa et al., 2009; O’Keeffe et al., 2015), além de estudos que mostram que a ativação da autofagia por privação de nutrientes (“starvation”) ou por tratamento com rapamicina restringe o crescimento bacteriano e é capaz de melhorar a resistência celular à infecção (Gutierrez et al., 2004, Kim et al., 2012, Lapaquette et al., 2012, Miao et al., 2015). O P-aminosalicilato, um dos fármacos mais antigos usados contra a tuberculose, inibe a assimilação do ferro (Periyasamy et al., 2020). A depleção de ferro está fortemente associada ao aumento da expressão e acúmulo de REDD1 (proteína regulada no desenvolvimento e na resposta ao dano no DNA 1), que inibe a ativação de mTOR, diminui a fosforilação de Akt e TSC2 (Fretham et al., 2013; Watson et al., 2016). A depleção de ferro também aumenta a ativação de HIF-1 $\alpha$  (fator induzível por hipóxia) e AMPK, e induz autofagia (Wu et al., 2010; Fretham et al., 2013). Além disso, os antibióticos isoniazida e pirazinamida, dois fármacos de primeira linha usados no tratamento da TB, exercem sua atividade antimicobacteriana por meio da autofagia (Kim et al., 2012). Recentemente, foi relatado o impacto da linezolidina e da bedaquilina no comportamento intramacrofágico do *M. tuberculosis*. Foi observado que o efeito anti-*M. tuberculosis* desses novos fármacos ocorreu por meio da ativação de autofagia e aumento da formação de autolisossomos em macrófagos infectados (Genestet et al., 2018). A bedaquilina induz estresse metabólico em *M. tuberculosis*, que resulta no acúmulo de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo), seguido pela geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) (Bhat et al., 2016). Embora não tenha sido provado

diretamente, ROS pode desencadear a ativação autofágica e ser responsável pela morte de *M. tuberculosis* induzida por antibióticos (Piccaro et al., 2014, Bhat et al., 2016). O resveratrol também foi estudado quanto ao seu efeito antioxidante e seu papel na indução de autofagia. Em relação ao efeito antioxidante, o resveratrol pode tanto aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como pode agir como um *scavenger* de radicais livres (deLa Lastra & Villegas et al., 2007, Kursvietiene et al., 2016). Foi demonstrado que o resveratrol possui atividade inibitória sobre mTOR (Park et al., 2016). Outro estudo demonstrou as propriedades antibacterianas de flavonóides e do resveratrol, mostrando principalmente atividade contra bactérias Gram-positivas (Sun et al., 2012). Acredita-se que o desenvolvimento de fármacos que modulam a autofagia na célula hospedeira possa ser uma estratégia útil para ampliar a janela terapêutica contra infecções bacterianas.

O tratamento das micobacterioses não-tuberculosas é pouco recompensador. Atualmente, o regime terapêutico proposto para a infecção por micobactérias não tuberculosas (MNTs) é baseado no uso de macrolídeos (claritromicina ou azitromicina), etambutol e rifamicinas (Griffith, 2018). A azitromicina é um antibiótico potente e frequentemente usado na profilaxia e nos regimes de tratamento de infecções por micobactérias (Griffith et al., 2007). No entanto, um estudo relatou que o uso de azitromicina a longo prazo por adultos com FC aumentou o risco de infecção por *M. abscessus*. Isso foi observado porque a dosagem terapêutica de azitromicina prejudicou a degradação autofágica (Renna et al., 2011). Tais dados enfatizam a importância da autofagia na resposta do hospedeiro à infecção por MNTs.

O desafio de tratar doenças pulmonares causadas por *M. abscessus* está relacionado à resistência aos antibióticos, incluindo todos os fármacos de primeira linha do tratamento anti-TB (Luthra et al., 2018, Wu et al., 2018). Até a rifampicina, que apresenta atividade bactericida contra *M. tuberculosis* e *M. leprae*, possui baixa potência contra *M. abscessus*. Embora faça parte dos regimes de tratamento estabelecidos para infecções por *M. kansasii* e complexo *M. avium* (MAC), a rifampicina não é recomendada contra *M. abscessus* (Chopra et al., 2011, Pang et al., 2015). Recentemente, a rifabutina, através de sua atividade bactericida, mostrou-se eficaz contra cepas de isolados clínicos das três subespécies do complexo *M. abscessus* (subsp. *Abscessus*, subsp. *Massiliense* e subsp. *Bolletii*) (Aziz et al., 2017). Recentemente, a atividade *in vitro* de omadaciclina e tigeciclina contra isolados clínicos de *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum* foi avaliada (Shoen et

al., 2019). Omadaciclina, um novo análogo da tetraciclina, aprovado para o tratamento de infecções bacterianas agudas de pele e da estrutura da pele (ABSSSI) (O'Riordan et al., 2019) mostrou atividade contra os três isolados clínicos (Shoen et al., 2019). Há relatos de que esses microrganismos foram identificados em infecções pós-operatórias causadas por micobactérias, incluindo os três patógenos oportunistas: *M. fortuitum* (Celdrán et al., 2007), *M. abscessus* (Murillo et al., 2000) e *M. chelonae* (Brickman et al., 2005). Infecções pós-operatórias foram relatadas após procedimentos ortopédicos, laparoscópicos, oftálmicos e operações estéticas (principalmente lipoaspiração, abdominoplastia, rinoplastia) (Mauriello et al., 2003; Gravante et al., 2008).

*M. chelonae* pode causar infecção cutânea localizada após inoculação acidental do ambiente (em ateliês de pedicure, aquecedores de água e estúdios de tatuagem) (Goldman et al., 2010; Falkinham, 2011). Em pacientes imunocomprometidos, a infecção causada por essa micobactéria pode se manifestar como uma doença cutânea disseminada. Um relato de caso mostrou infecção de pele e tecidos moles por *M. chelonae* em um paciente com leucemia linfocítica crônica (LLC) que estava usando ibrutinibe, um fármaco de administração por via oral, que atua inibindo a tirosina quinase de Bruton (BTK) para o tratamento de células B malignas (Khan et al., 2017; Tran et al., 2017). Após 6 meses de terapia com ibrutinibe, o homem de 85 anos desenvolveu lesões cutâneas nos braços e pernas (Dousa et al., 2018). Fiorcari e colegas (2016) mostraram que o ibrutinibe promove um fenótipo M2 ao modificar a função de macrófagos/monócitos no LLC. Avaliados em conjunto, esses resultados mostram que a resposta microbicida pode ser prejudicada em pacientes tratados. Por outro lado, um estudo mais atual relatou o impacto do fármaco no comportamento intra-macrofágico do *M. tuberculosis*, sendo demonstrada a ativação de autofagia que facilitaria a fusão fagossomolisossoma em macrófagos infectados (Hu et al., 2020).

A nitazoxanida também foi estudada quanto ao seu papel na indução da autofagia. O uso de nitazoxanida em camundongos C57BL/6 infectados com *M. leprae* apresentou ação bactericida semelhante à da rifampicina, antibiótico utilizado no esquema terapêutico contra hanseníase (Bailey et al., 2017). Com base neste estudo, a nitazoxanida pode ser uma opção eficaz para o tratamento da hanseníase. Já foi visto que o calcipotriol, um análogo da vitamina D, tem a capacidade de induzir autofagia em queratinócitos (componente da epiderme) (Wang & Levine, 2011). A via autofágica converge com a via da vitamina D3-catelidina, que é observada

preferencialmente na forma paucibacilar da hanseníase (Krutzik et al., 2008, Montoya et al., 2009). A vitamina D3 induz autofagia via catelicidina em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, sendo a catelicidina necessária para a atividade antimicrobiana mediada por IFN- $\gamma$  (Yuk et al., 2009, Fabri et al., 2011). Além disso, 1,25 (OH) 2D3-induzido LL-37 (peptídeo antimicrobiano C-terminal) aumenta a colocalização de fagossomas micobacterianos e autofagossomos (Vickers, 2017). A vitamina D3 tem sido usada com sucesso no tratamento de pacientes com TB (Martineau et al. 2007). A vitamina D3 pode ser um dos componentes do tratamento da hanseníase e de outras doenças infecciosas crônicas nas quais a resposta imune celular é desregulada (Selvaraj, 2011; Liu et al, 2012). A vitamina D evita danos aos tecidos por meio da regulação negativa de perforina, granzima B e granulicina em linfócitos T citotóxicos (Harishankar et al., 2018).

A relevância da autofagia como alvo no reposicionamento de fármacos não se restringe apenas ao controle da infecção pelo *M. leprae*, mas também no seu potencial para regular a inflamação exacerbada associada aos episódios reacionais da hanseníase, pois a autofagia modera a inflamação sequestrando inflamassomas ativos para destruição (Shi et al., 2012). A regulação negativa da autofagia observada em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase multibacilar também prediz o início da reação tipo 1. Esse comprometimento da via autofágica correlaciona-se com a ativação do inflamassoma de NLRP3 (NALP3; domínios NACHT, LRR e PYD contendo proteína 3) e produção de IL-1 $\beta$ , que impulsionam o estado inflamatório encontrado em pacientes multibacilares quando submetidos à reação tipo 1 (Barbosa et al., 2018). Por outro lado, devido ao deslocamento Th2 $\rightarrow$ Th1 e ao aumento da produção de IFN- $\gamma$ , os níveis de autofagia são restaurados em pacientes lepromatosos quando o episódio de reação tipo 1 é estabelecido, o que, por sua vez, ajuda a reduzir a carga bacilar nas células da pele (Silva et al., 2017a). Portanto, as células da pele de lesão hanseníase podem ganhar um duplo benefício com o uso da autofagia como plataforma para o desenvolvimento de medicamentos. Isso torna um agente antimicobacteriano que tem a autofagia como alvo farmacológico, um candidato promissor para auxiliar na terapia direcionada ao hospedeiro.



**Tabela 2:** Estratégias terapêuticas de reposicionamento de fármacos visando a autofagia de células hospedeiras contra doenças micobacterianas

| <b>Fármacos</b>  | <b>Micobactérias</b>                          | <b>Modelo</b>  | <b>Mecanismo de ação</b>   | <b>Referências</b>                            |
|------------------|---|--|--|---|
| Ácido valpróico* | <i>M. tuberculosis</i>                        | Macrófagos humanos primários   | Aumenta a colocalização de LC3 com <i>M. tuberculosis</i>  | Schiebler et al., 2015; Juárez et al., 2016   |
| Carbamazepina*   | <i>M. tuberculosis</i>                        | Macrófagos humanos primários<br>Infecção de camundongos C57BL/6 com a cepa MDR | Reduz os níveis de mioinositol, ativa a AMPK e induz a autofagia de maneira independente de mTOR | Cardenas et al., 2010; Schiebler et al., 2015 |
| Metformina*      | <i>M. tuberculosis</i>                        | Monócitos diferenciados em macrófagos (linhagem celular THP-1)                 | Aumenta a expressão de AMPK, induzindo a fosforilação de ULK1                                    | Singhal, 2014                                 |
| Verapamil        | <i>M. tuberculosis</i><br><i>M. bovis</i> BCG | BMDM de camundongos ATG5(flox/flox) e (controle); Monócitos humanos            | Inibe canais de Ca <sup>2+</sup> ,<br>↓ Ca <sup>2+</sup> citosólico                              | Abate et al., 2016                            |
| Loperamida       | <i>M. tuberculosis</i>                        | Macrófagos humanos primários   | Diminui a produção de TNF e aumenta a colocalização de LC3 com <i>M. tuberculosis</i>            | Juárez et al., 2016                           |
| Ambroxol         | <i>M. tuberculosis</i>                        | BMDM e macrófagos humanos primários  | Aumento da produção de autofagossomos  | Choi et al., 2018                             |
| Baicalina        | <i>M. tuberculosis</i>                        | Macrófagos RAW264.7  | Induz autofagia inibindo a via PI3K/Akt/mTOR   | Zhang et al., 2017                            |
| Ferro            | --  | Modelo DN TfR-1 e DMT-1 CKO  | A depleção de ferro aumenta a ativação de HIF-1 $\alpha$ (fator induzível por hipóxia) e AMPK.   | Wu et al., 2010; Fretham et al., 2013         |

|               |   |   |                                      |  |
|---------------|---|---|--------------------------------------|--|
| Isoniazida    | <i>M. tuberculosis</i>  | BMDMs primários, monócitos primários humanos e MDMs   | Facilita a fusão fagossoma-lisossoma | Kim et al., 2012                       |
| Pirazinamida  | <i>M. tuberculosis</i>  | BMDMs primários, monócitos primários humanos e MDMs   | Ativa AMPK e induz autofagia         | Kim et al., 2012                       |
| Linezolida*   | <i>M. tuberculosis</i>  | Linhagem celular U-937 (monócitos humanos)  | Aumenta a formação de autofagossomos | Genestet et al., 2018                  |
| Bedaquilina*  | <i>M. tuberculosis</i>  | Linhagem celular U-937 (monócitos humanos)  | Aumenta a formação de autofagossomos | Genestet et al., 2018                  |
| Resveratrol   | <i>M. tuberculosis</i>  | Os valores de MIC foram determinados para <i>M. tuberculosis</i> usando o método padrão de diluição de microcaldo | Inibidor de mTOR                     | Sun et al., 2012; Heeyoon et al., 2016 |
| Azitromicina* | <i>M. abscessus</i>   | Macrófagos humanos primários e camundongos C57BL/6  | Bloqueia a acidificação lisossomal   | Renna et al., 2011                     |
| Rifabutina*   | <i>M. abscessus</i>   | MICs em ensaios de dose-resposta foram determinados pelo método de microdiluição em caldo                         | Indefinido                           | Aziz et al., 2017                      |
| Omadaciclina  | <i>Mycobacterium abscessus</i><br><i>Mycobacterium chelonae</i><br><i>Mycobacterium fortuitum</i> | Ensaio de diluição de microtitulação de caldo   | --                                   | Shoen et al., 2019                     |
| Tigeciclina   | <i>Mycobacterium abscessus</i><br><i>Mycobacterium chelonae</i>                                   | Ensaio de diluição de microtitulação de caldo   | --                                   | Shoen et al., 2019                     |

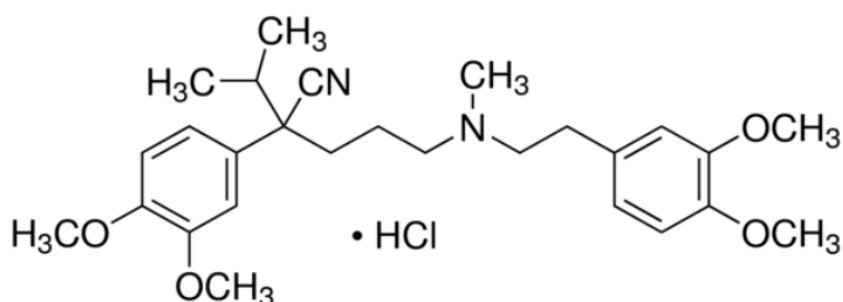
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> |   |  |   |  |
|--------------------------------|---|--|---|--|
| Ibrutinibe                     | <i>M. tuberculosis</i>                                    | Monócitos diferenciados em macrófagos (linhagem celular THP-1) e camundongos C57BL/6 | Facilita a fusão fagossoma-lisossoma  | Hu et al., 2020                            |
| Nitazoxanida                   | <i>M. leprae</i>  | Camundongo C57BL/6   | Inibição de mTOR por TSC2   | Bailey et al. 2017                         |
| Vitamina D3                    | <i>M. tuberculosis</i>                                    | Macrófagos humanos   | Estimula o VDR para induzir a expressão da catelicidina; regulação positiva da expressão de Atg5 e Beclin-1 | Jo, 2010; Palucci & Delogu, 2018           |
| Vitamina D3                    | <i>M. leprae</i>  | Monócitos periféricos  | Estimula o VDR para induzir a expressão de catelicidina   | Krutzik et al., 2008, Montoya et al., 2009 |
| Rapamicina                     | <i>M. avium</i> subespécies <i>paratuberculosis</i> (MAP) | Inibição do crescimento de MAP <i>in vitro</i> ("BACTEC radiometric 7H12 broth")     | Inibidor de mTOR  | Greenstein et al., 2008                    |
| Rapamicina                     | <i>M. smegmatis</i>                                       | Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (BMDM) e macrófagos RAW264.7     | Inibidor de mTOR  | Zullo et al., 2014                         |

\* Fármacos reposicionados

### 1.3 Verapamil

O cloridrato de verapamil ( $\alpha$ -[3-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil]metilamino]propil]- 3,4-dimetoxi- $\alpha$ -(1-metiletil)-benzenoacetonitrila)) (**Figura 11**) é classificado como um agente antiarrítmico da classe IV das fenilalquilaminas, responsável por bloquear os canais de íons  $Ca^{2+}$  (Page et al., 2004). Este fármaco foi o primeiro bloqueador de

canal de cálcio a ser utilizado na clínica (Bergson et al., 2011), sendo o medicamento mais utilizado no tratamento de algumas doenças cardiovasculares como hipertensão, angina e, na prevenção secundária de infarto agudo do miocárdio (Page et al., 2004). O verapamil bloqueia a entrada de cálcio extracelular no músculo vascular e cardíaco, e seus efeitos incluem a diminuição da resistência vascular periférica e promoção de vasodilatação (Midtbø et al, 1986; Kelly, 1986, Zhao et al, 2009).



**Figura 11: Fórmula estrutural do cloridrato de verapamil.** Verapamil hydrochloride V4629 - datasheet da Sigma-Aldrich - [Internet], acesso em 07 de junho de 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/v4629>

Apesar de ser classificado como bloqueador de canal de cálcio tipo L, o verapamil também já foi descrito como inibidor de canais de cálcio dos tipos P, N, Q e T (Freeze et al., 2006; Bergson et al, 2011). O estudo de Schneider e colaboradores (2005) mostrou a capacidade do verapamil em inibir alguns canais de potássio (Schneider et al, 2005). Além de sua capacidade de modular canais de íons, o composto também é capaz de reverter o fenótipo de resistência a quimioterápicos (Tsuruo et al., 1981), foi observado que o fármaco aumenta a sensibilidade das células a quimioterápicos e bloqueia o transporte de substratos mediado pela proteína ABCB1 por competir por seu sítio de ligação (Salmon et al., 1991). Além de inibir a atividade da ABCB1, o verapamil também é capaz de promover a diminuição da expressão dessa molécula em células leucêmicas com o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (MDR) e em células de linhagem de adenocarcinoma humano (Muller et al, 1994; Muller et al, 1995; Liu et al., 2007). Apesar de ser um fármaco muito utilizado na clínica, alguns dos seus efeitos ainda estão em investigação, por exemplo, sua capacidade de diminuir a viabilidade de células que apresentam o fenótipo MDR (Pluchino et al, 2012).

O mecanismo de ação do verapamil baseia-se na redução da magnitude de corrente de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através do canal lento e diminui a taxa de recuperação do canal. Suas propriedades físico-químicas são apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3:** Propriedades físico-químicas do verapamil

|                   |   |
|-------------------|---|
| Fórmula molecular | $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$ |
| Massa molar       | 491,06 $\text{g mol}^{-1}$  |
| Ponto de fusão    | 142 °C  |
| Solubilidade      | Solúvel em água   |
| pKa               | 8,92  |
| Descrição         | Sólido cristalino   |

Fonte: Verapamil hydrochloride V4629 -datasheet da Sigma-Aldrich - [Internet], acesso em 07 de junho de 2022. <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/v4629>

O processo de contração em toda célula muscular é desencadeado pela elevação da concentração de cálcio intracelular, o cálcio desencadeia o mecanismo de deslocamento dos filamentos de actina e miosina, ao liberar os sítios ativos de actina, permite que as extremidades de miosina se fixem e iniciem o deslocamento (Alberts, 2002). Em níveis terapêuticos, o cloridrato de verapamil inibe o transporte transmembrana do íon cálcio através dos “canais lentos” ou “canais de cálcio”, diminuindo o cálcio intracelular disponível para iniciar o processo de contração muscular e modificando os fenômenos elétricos ao nível da membrana celular (Bergson et al, 2011). Clinicamente, a ação bloqueadora dos canais lentos exercida pelo cloridrato de verapamil é específica para dois tipos de músculos, o músculo liso vascular e as fibras musculares do sistema cardíaco de condução. Este fármaco bloqueia os canais de cálcio do músculo liso arterial, produzindo diminuição da resistência periférica e uma dilatação arterial.

Em geral, o cloridrato de verapamil é bem tolerado. Seus efeitos secundários são relativamente raros. Sua concentração que resulta em bons efeitos terapêuticos varia de 0,10 a 0,40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no plasma, níveis acima deste valor podem gerar alguns efeitos colaterais como arritmia, bloqueio atrioventricular, náuseas, constipação e hipotensão. Uma concentração acima de 2,28  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tem grande risco de levar o indivíduo ao óbito (Mégarbane et al., 2011).

Os relatos que existem sobre as reações adversas estão associados ao 1) sistema nervoso central, 2) gastrintestinal e 3) cardiovascular. Dentre esses, destacam-se: 1) tonteira, cefaléia, fadiga, nervosismo e parestesias (sensação de formigamento); 2) constipação e náusea; 3) hipotensão, edema periférico, bradicardia, insuficiência cardíaca congestiva. Em casos muito raros, foi observado o aumento descontrolado das mamas (ginecomastia) em pacientes idosos sob tratamento prolongado, o qual é revertido após a suspensão do medicamento (Sandoz do Brasil Indústria Farmacêutica Ltda, n.d.).

#### **1.4 Verapamil e indução de autofagia na célula hospedeira**

Um trabalho recente mostrou como os bloqueadores dos canais de cálcio (BCCs) retardam o envelhecimento e prolongam a vida útil de *Caenorhabditis elegans* por inibir a atividade de calcineurina e promover a autofagia (Liu et al., 2020). Nesse estudo, o tratamento com verapamil beneficiou alguns parâmetros fisiológicos relacionados à longevidade de *C. elegans*, observados pela melhora da locomoção, integridade vulvar associada à idade e resistência ao estresse osmótico. O verapamil aumentou os níveis proteicos de LC3-II, bem como, aumentou a expressão gênica de ATG7, ATG18 e SQSTM1. O grupo mostrou ainda que a indução de autofagia pelo fármaco ocorre via “downstream” à calcineurina, uma vez que ao deletar o gene *tax-6* (gene da calcineurina) não ocorre a indução do processo autofágico. A calcineurina atua como um elo importante entre a sinalização de cálcio e a longevidade em *C. elegans* (Dwivedi et al., 2009). Também foram observados efeitos antiproliferativos dos seus estereoisômeros (R-verapamil, VR inativo; S-verapamil) em células do músculo liso vascular de rato (CMLV), produzidos pelo aumento do dano mitocondrial e autofagia exacerbada (Salabei et al., 2012). Em células normais da próstata, o verapamil diminui os níveis de glicose, levando à depleção de adenosina 5'-trifosfato (ATP). Em contraste, nas células COLO 205, aumentou a glicólise e manteve o ATP. É importante ressaltar que a resposta autofágica nessas células está relacionada à atividade da lactato desidrogenase A (LDHA, EC 1.1.1.27), pois a inibição de LDHA reduz a autofagia e, conseqüentemente, diminui a viabilidade celular. Em resumo, o uso de verapamil junto com inibidores de autofagia tornam-se um alvo em potencial para o tratamento de neoplasias (Kania et al., 2017).

## 1.5 Justificativa

A introdução da PQT foi um marco importante no controle da hanseníase, contribuindo para a redução dos casos da doença. No entanto, há um percentual elevado de pacientes multibacilares que terminam o tratamento com a PQT sem apresentarem redução da baciloscopia. Isso repercute na frequência de recidivas e episódios reacionais pós-tratamento. A identificação da autofagia como fator importante durante o estabelecimento das formas resistentes e suscetíveis abre portas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas de controle da doença através da modulação da via. Estudo anterior de nosso grupo demonstrou que há um bloqueio na autofagia dependente de beclina-1 em macrófagos presentes nas lesões de pele de pacientes LL quando comparados aos pacientes BT e que *M. leprae* é capaz de inibir o fluxo autofágico em macrófagos *in vitro*, o que pode ser revertido após o tratamento com IFN- $\gamma$  ou rapamicina. Em pacientes LL que desenvolveram episódios de reação tipo 1, uma condição clínica inflamatória aguda associada ao aumento dos níveis de IFN- $\gamma$ , a ativação da autofagia foi restaurada. A compreensão dos mecanismos relacionados à T1R é limitada, principalmente porque estudos avaliaram a resposta imune durante o episódio inflamatório agudo (Corstjens et al., 2016; Silva et al., 2017a), enquanto vários mediadores inflamatórios estão aumentados. Há uma necessidade urgente de identificação de mecanismos moleculares, imunológicos e genéticos que possam auxiliar na administração de tratamentos adequados para prevenir as complicações da T1R. Estudos iniciais que avaliaram o efeito do verapamil e de seus análogos em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* mostraram uma associação entre a indução de autofagia e inibição da replicação intracelular da micobactéria, e um dos análogos estruturais apresentou efeito aditivo na atividade antimicrobiana inibitória da isoniazida e rifampicina (Abate et al., 2016). Dentre os diversos fármacos descritos na literatura com propriedades pró-autofágicas, nós selecionamos o verapamil que já possui aprovação para uso clínico em outras patologias. Portanto, o presente estudo justifica-se pela necessidade de entendermos o papel da autofagia da célula hospedeira na patogênese da T1R em pacientes multibacilares, bem como investigar a capacidade do fármaco verapamil em induzir a morte de *M. leprae* em macrófagos humanos, através da ativação da autofagia.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento da autofagia na imunopatogênese da reação tipo 1 em pacientes multibacilares, bem como, investigar o efeito de verapamil sobre a indução de autofagia em macrófagos humanos e, sobre a viabilidade de *M. leprae*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a correlação entre a expressão gênica da via autofágica em células de lesão de pele de pacientes com T1R e, em células THP-1 diferenciadas com PMA, estimuladas com IFN- $\gamma$  e *M. leprae*;
- ✓ Investigar o efeito do fármaco verapamil sobre a viabilidade de *M. leprae* em macrófagos derivados de monócitos (de indivíduos sadios e da linhagem THP-1);
- ✓ Identificar os mecanismos de indução de autofagia pelo verapamil em macrófagos da linhagem THP-1 infectados com *M. leprae*;
- ✓ Investigar a capacidade de verapamil em inibir a viabilidade de *M. abscessus* em macrófagos THP-1.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo de micobactérias

##### 3.1.1 Obtenção de *M. abscessus*

*M. abscessus massiliense* (CCUG 48898) foi doado pelo Dr. Rafael Silva Duarte, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sendo cultivado em meio Middlebrook 7H10 (Beckton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) suplementado com 0,05% de Tween 80 e 10% de ADC (0,2 % de glicose, 0,5 % de albumina de soro bovino [BSA], 0,085 % de cloreto de sódio) sob agitação constante de 81 a 108 x g em tubo cônico de 50mL em posição inclinado para garantir aeração da cultura, mantido em estufa a 37°C. O tempo de cultivo foi de aproximadamente sete a onze dias. Nesse período, a cultura foi centrifugada a 225 x g por 5 min para evitar grumos micobacterianos e o sobrenadante foi utilizado para aferir a densidade óptica (DO<sub>600</sub>). Ao atingir aproximadamente 0,8 (DO<sub>600</sub> 0,8 = 2x10<sup>8</sup> bactérias/mL), correspondente à fase exponencial do crescimento micobacteriano, o cultivo foi interrompido e aliquoteado em 20% glicerol e estocado em freezer -70°C para posterior uso em ensaios de infecção.

Para a utilização nos ensaios de infecção, as alíquotas congeladas de *M. abscessus* em 20% glicerol foram centrifugadas a 6300 x g por 10 min e ressuspensas em meio RPMI-1640 sem adição de antibióticos.

##### 3.1.2 Obtenção de *M. leprae*

Nos ensaios de interação entre patógeno e célula hospedeira foram utilizadas suspensões de *M. leprae* vivo, cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil). A cepa Thai-53 de *M. leprae* foi proveniente da infecção do coxim plantar de camundongos atímicos BALB/c (*Nu/Nu*). Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, as patas foram colhidas e enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular (FIOCRUZ, RJ) para purificação. Essa etapa foi realizada pelo tecnologista do laboratório segundo o protocolo descrito por Trombone e colaboradores (2014). Após a purificação, as micobactérias foram coradas pela técnica de Ziehl-Neelsen (Neelsen, 1883; Ziehl, 1883) e contadas por microscopia; em paralelo foi feita a aferição da viabilidade

através do kit Live/Dead<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific) segundo informações do fabricante.

### 3.1.3 Marcação de *M. leprae* com o kit PKH

Para obtenção de *M. leprae* fluorescente foram utilizados os kits para marcação de membranas celulares PKH67 “green”, um fluorocromo verde com pico de excitação em 490 nm e emissão em 502 nm, e o PKH26 “red”, um fluorocromo vermelho com pico de excitação em 551 nm e emissão em 567 nm, de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich). Para isso, aproximadamente  $10^7$  bacilos foram centrifugados a  $6300 \times g$  por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspense em 100  $\mu$ L da solução diluente A. Posteriormente, foi adicionado 1  $\mu$ L do corante PKH67 ou PKH26 e homogeneizado. A mistura foi incubada por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, a marcação foi bloqueada adicionando igual volume de soro fetal bovino (SFB), incubando por 1 min, para a neutralização. A suspensão de bacilos foi então diluída em igual volume de meio RPMI-1640 completo e centrifugada por 10 min a  $6300 \times g$ . Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram lavadas por três vezes com meio RPMI-1640 para a retirada do excesso de fluorocromo. Ao final, as bactérias foram ressuspendidas no volume inicial com meio RPMI-1640.

Após a marcação, as suspensões de *M. leprae* foram homogeneizadas 10 vezes em seringa de insulina ultrafina de 100 U com agulha 31G (Becton Dickinson, NJ, EUA) para desfazer as globias. As culturas celulares foram infectadas com *M. leprae* ou *M. abscessus* de forma a se obter multiplicidade de infecção (MOI) igual a 10 ou 20 organismos/célula e incubadas por 3, 12, 24 e 48 horas a 33°C.

## 3.2 Cultura de células

### 3.2.1 Amostras clínicas de pacientes com hanseníase

As capas leucoplaquetárias (“buffy-coats”) foram obtidas de doadores sadios através de termo de cooperação técnico-científica com o serviço de hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os pacientes com hanseníase envolvidos no estudo foram

recrutados no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ) e classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling, 1966. Quarenta e um voluntários foram incluídos no estudo (n = 41), incluindo 14 pacientes paucibacilares (PB), 15 pacientes multibacilares (MB) e 12 pacientes com T1R. Conforme observado na **Tabela 4**, dos 15 pacientes MB incluídos no estudo, 7 foram diagnosticados com T1R durante o acompanhamento clínico. As biópsias de pele dos pacientes PB e MB foram realizadas no momento do diagnóstico da hanseníase e, portanto, antes da PQT. Biópsias de T1R foram obtidas durante episódios de T1R em pacientes originalmente diagnosticados com formas clínicas BL ou LL subpolar. Os dados clínicos e demográficos de todos os pacientes recrutados neste estudo são apresentados na **Tabela 4**. A participação de cada voluntário no estudo foi condicionada à assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo CEP/FIOCRUZ (Parecer 1.538.467, data de aprovação: 10 de maio de 2016). Como critérios de exclusão para o estudo tiveram: pacientes menores de 18 anos cuja triagem sorológica foi positiva para hepatite B (HbsAg e Anti-HBc), hepatite C (HCV), AIDS, doença de Chagas (Anti-*Trypanosoma cruzi*), sífilis (VDRL - não treponemal), HTLV-I e HTLV-II, malária e citomegalovírus (CMV). Também excluímos pacientes com doenças autoimunes, gestantes e pacientes com anemia.

**Tabela 4:** Características dos pacientes com hanseníase incluídos no estudo.

|  | PB          | MB não progrediram | MB progrediram   | T1R              |
|--|-------------|--------------------|------------------|------------------|
| Masculino/feminino, n                                  | 6/8         | 7/1                | 5/2              | 9/3              |
| Idade média (intervalo)                                | 54,5 (8-92) | 53,37 (34-65)      | 45,14 (32-69)    | 49,16 (17-66)    |
| IB médio (intervalo)                                   | 0 (0-0)     | 2,15 (1,50-5,50)   | 2,98 (0,50-4,67) | 2,66 (0,75-5,85) |
| IBL médio (intervalo)                                  | 0 (0-0)     | 4,38 (2,85-5,95)   | 4,6 (2,7-5,95)   | 2,06 (0-3,8)     |
| <b>Forma clínica da hanseníase (Ridley-Jopling), n</b> |             |                    |                  |                  |
| BT   | 14          | -                  | -                | -                |
| BL   | -           | 4                  | 4                | 9                |
| LL   | -           | 4                  | 3                | 3                |

T1R, reação tipo 1; IB, índice bacilos cópico; IBL, índice bacilos cópico logarítmico da lesão; BT, “borderline” tuberculóide; BL, “borderline” lepromatoso; LL, lepromatoso lepromatoso; n, número amostral.

### 3.2.2 Separações de células mononucleares do sangue periférico

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de “Buffy coat”. Primeiramente foi feita a diluição 1:1 em tampão fosfato salina (PBS) para

separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia). Após centrifugação a 900 x g por 30 min à temperatura ambiente, as PBMC foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco Invitrogen Corporation, EUA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina (Gibco Invitrogen Corporation, EUA) a 100µg/mL (meio completo 10%). Uma alíquota desta suspensão celular foi diluída em azul de Tripán 0,4% (1:1) (Bio WHITTAKER, EUA) e em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis.

### **3.2.3 Obtenção de monócitos e geração de macrófagos M2**

Para a obtenção de monócitos, as PBMC foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (Corning, EUA) contendo meio completo com 2% de SFB e mantidas por 2 h em estufa para a aderência dos monócitos. Após esse período foi feita a retirada das células em suspensão no meio de cultura e foram realizadas 3 lavagens com PBS fresco para remover as células não aderentes. Os monócitos recuperados foram cultivados na presença de meio completo com 10% SFB contendo 50 ng/mL de M-CSF (PeproTech, NJ, USA) durante 6 dias para obtenção de macrófagos M2.

### **3.2.4 Cultura celular de monócitos THP-1 e diferenciação para macrófagos**

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

Para os ensaios de infecção, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer e a viabilidade aferida pelo método de exclusão por coloração pelo azul Tripán (Sigma-Aldrich, EUA). Posteriormente, foram estimuladas com 200 nM de Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) para diferenciação em macrófagos THP-1. Após 24h de estímulo, as células foram

lavadas com o meio para a retirada de PMA, e então adicionado meio fresco. Os antibióticos do meio completo foram substituídos por ampicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) durante a infecção por *M. leprae*.

### 3.3 Indução e inibição de autofagia

A indução de autofagia em macrófagos diferenciados a partir de monócitos THP-1 foi realizada por meio do tratamento com IFN $\gamma$  humano recombinante (10 ng/mL; BD PharMingen, EUA) ou através da adição de rapamicina (200 ng/mL; Sigma-Aldrich, R0395) ao meio completo e incubação por 18 h a 37°C (Pinheiro et al., 2009, Fabri et al., 2011). Quando indicado, foi realizada a inibição da autofagia utilizando os inibidores farmacológicos Wtm (Wortmanina) (100 nM; Enzo Life Sciences) ou 3-MA (3-metiladenina) (10 µM; Sigma-Aldrich, M9281), 1 h antes da indução de autofagia, sendo esta avaliada por *Western blotting* (WB), microscopias de fluorescência, e eletrônica de transmissão.

## 3.4 Purificação de ácidos nucleicos

### 3.4.1 Extração de RNA

Para lesões de pele, punções de 4 mm foram excisados cirurgicamente e transferidos para 1 mL de solução de “RNA later” (ThermoFisher Scientific). O RNA total foi isolado usando um homogeneizador Polytron, modelo PT3100 (Kinematica AG, Lucerna, Suíça) em 2 mL de TRIzol (Life Technologies). Monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos após estímulo com PMA e macrófagos M2 ( $5 \times 10^5$  células) foram cultivados em placas de 24 poços. Após o período de infecção, o sobrenadante das culturas foi coletado e o RNA total das células foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies, EUA), segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após raspagem com a ponteira, o conteúdo lisado foi transferido para tubos de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e incubada a -70°C por no mínimo 24h. As fases

intermediárias e orgânicas foram armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA para a realização do ensaio da viabilidade bacteriana. Após o período de incubação, foi adicionado 2 µL de GlycoBlue® (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do sedimento, e então centrifugados a 14000 x g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 10 min e, em seguida, ressuspensos em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC, Life Technologies, EUA).

### 3.4.2 Quantificação e análise da integridade do RNA

O RNA total purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA) e sua integridade avaliada por gel desnaturante de agarose 1,2% (Life Technologies, EUA) em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich, EUA). A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância ( $A$ ) em dois comprimentos de onda:  $A_{260/280}$  indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto  $A_{260/230}$  indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  apresentaram valores >1,8. Foi feito um gel de agarose 1,2% para determinação da integridade do RNA. O gel 1,2% de agarose foi preparado com agarose ultrapura (Invitrogen) dissolvida em MOPs (ácido 3- (N-morfolino) propano sulfônico) 1x em água livre de RNase tratada com DEPC com auxílio de aquecimento ao microondas. Foram utilizados 400 ng de RNA, a estes foram acrescentados 7 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol e xileno cianol 0,3%, formamida 70% e MOPS 2x); 1 µL de SYBR e água livre de RNase qsp 15 µL. As amostras foram aquecidas a 65 °C no banho seco por 15 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada no gel imerso no tampão MOPS 1x, a 120 V por 1 hora e o gel foi visualizado com a iluminação ultravioleta (U.V.), no transiluminador (MiniBis pro – DNR Biolmaging System). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S), sem rastros.

### 3.4.3 Tratamento do RNA com DNase

Após a quantificação e confirmada a integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit TURBO DNA-free™ (Life technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30 µL. Inicialmente, em tubos de 0,6 mL foi adicionado 3 µg de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10X e 1 µL da enzima Turbo DNase, seguido por incubação a 37°C durante 30 min. Após o período de incubação, foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação enzimática. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 min, agitando os tubos manualmente 2-3 vezes durante esse período para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 2 min, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado como descrito no item anterior (3.4.2).

### 3.4.4 Extração do DNA

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

### 3.5 RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica

#### 3.5.1 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total de  $5 \times 10^5$  monócitos diferenciados em macrófagos THP-1 e macrófagos M2 mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript VILO™ (Invitrogen, EUA) em uma reação com volume final de 20  $\mu$ L. Inicialmente, 500 ng de RNA foram incubados com 4  $\mu$ L do mix de reação 5x VILO™, 2  $\mu$ L do mix da enzima 10x SuperScript™ e água livre de RNase. Esta mistura foi incubada a 25°C durante 10 min para a linearização da molécula de RNA, 42°C por 1 h para transcrição, seguida de incubação a 85°C por 5 min para inativação da enzima. Em seguida, as amostras foram diluídas até a concentração de 5  $\mu$ g/mL para posterior utilização na reação de PCR e armazenadas a -20 °C.

#### 3.5.2 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Para a avaliação da expressão de genes relacionados à autofagia (29 genes) por qPCR, foi utilizado um kit de PCR “array” da via autofágica (Real Time Primers, HATPL-I), composto por 88 alvos e 8 genes de referência (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PGK1*, *PPIA* e *RPL13A*). A lista completa de genes alvos está disponibilizada em <http://realtimeprimers.com/huauprli.html>. A qPCR “array” foi realizada a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, para ativação da DNA polimerase, 50 ciclos a 95°C por 10 segundos, para a desnaturação da fita, e a 58°C por 45 s, para o anelamento do primer e extensão da fita de cDNA, utilizando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, MA, EUA) em um termociclador StepOnePlus qPCR System (Applied Biosystems, MA, EUA), com o auxílio do software StepOne versão 2.3. A curva de “melting” foi feita de modo contínuo a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. Os dados de expressão gênica foram analisados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e normalizados usando o gene de referência hipoxantina fosfo ribosiltransferase 1 (HPRT1) (Real Time Primers). O gene HPRT1 foi o melhor controle endógeno devido ao menor valor de variação de pontuação (determinado pelo ExpressionSuite V1.1).

Para a análise de expressão gênica de IL-15 e IL-10, o RT-qPCR quantitativo foi realizado em um volume de reação total de 10  $\mu$ L contendo 1x cada um dos ensaios de expressão gênica TaqMan (20x) (*IL10* humana (Hs00174086\_m1) e *IL15* humana (Hs01003716\_m1) (ThermoFisher Scientific), 1x TaqMan Fast Advanced



Master Mix (2x)(ThermoFisher Scientific) e 10 ng de cDNA. As reações de RT-qPCR foram realizadas em um termociclador StepOnePlus Real-Time PCR Systems (ThermoFisher Scientific), e a expressão relativa dos genes alvo foi normalizada pelo *GAPDH* humano (Hs99999905\_m1; Thermo Fisher Scientific). A análise dos dados de RT-qPCR foi realizada com o método N0 implementado no LinRegPCR v. 2020.0, que considera as eficiências médias de RT-qPCR estimadas pelo método da janela de linearidade (Ruijter et al., 2009; Ramakers et al., 2013) Resumidamente, os valores de N0 foram calculados em LinRegPCR usando parâmetros padrão. Em seguida, os valores de N0 do gene de interesse (GOI) foram normalizados tomando sua razão para o N0 do gene de referência *GAPDH* (N0GOI/N0REF).

### 3.5.3 Análise da via autofágica

Os perfis de expressão gênica de macrófagos THP-1 foram derivados do “array” de autofagia por RT-qPCR. Os genes que foram expressos diferencialmente nos dois grupos foram identificados por “fold change”  $\geq 1.5$  “fold thresholds” (Schenk et al., 2012, Barbosa et al., 2018). “Heat maps” foram gerados usando a função “Enhanced Heat Map” (heatmap.2) do pacote “gplots” para o programa “R” e apresentados em forma de uma escala de “scores-z”. Os genes associados à autofagia exibidos no heatmap foram funcionalmente subcategorizados em nove subgrupos de acordo com uma lista publicada anteriormente de símbolos de genes humanos envolvidos nas vias de autofagia e nas vias lisossômicas (Feng et al., 2013). O diagrama de Venn foi gerado usando VENNY 2.1 (Oliveros, 2007). As assinaturas de genes de autofagia de lesões de hanseníase foram obtidas da referência (Silva et al, 2017a) e estão disponíveis no **apêndice A**. O banco de dados “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins” (STRING versão 11.0) (<http://string-db.org/>) foi usado para análise de interação de proteínas (acesso em 5 de junho de 2021) (Szklarczyk et al., 2019). Os mapas de rede de interações proteína-proteína foram obtidos através da visualização de evidências em STRING.

### 3.5.4 Expressão gênica de biópsia de pele de hanseníase a partir de dados públicos de *microarray*

Os dados de microarranjo referentes à expressão gênica de amostras de lesões de pele de pacientes com hanseníase foram obtidos de banco de dados públicos gerados por Belone e colaboradores (GSE74481) (Belone et al., 2015) através do “Gene Expression Omnibus” (GEO). Os dados brutos foram importados para o ambiente R v. 3.4.1 com a ajuda dos pacotes Biobase v. 2.36.2 e limma v. 3.32.6. Os valores de intensidade não processados foram corrigidos e normalizados usando “Robust Multi-array Average” (RMA) e normalização quantílica, respectivamente. Sondas/genes duplicados foram removidos mantendo-se aquele com a maior média em todas as amostras. Valores log2 normalizados foram usados para visualização de dados usando ggplot2 v. 3.0.0. A lista de genes a serem rastreados no teste de hipótese nula foi a seguinte: *TPR*, *GFI1B*, *GNAI3*, *GPSM1*, *GPSM2*, *LETM2*, *BECN2*, *RASD1*, *RPTOR*, *FRS3*, *UVRAG*, *SEC24A* e *SEC23B*. *BECN2* foi excluído devido a problemas de anotação de microarranjo. O teste de hipótese nula foi realizado usando ANOVA para variância não constante ajustando modelos lineares usando mínimos quadrados generalizados (nlme::gls, v. 3.1-148). As comparações pareadas entre os grupos MB (LL + BL), PB (TT + BT) e T1R foram testadas usando o procedimento de “Tukey” conforme implementado pelo ‘pacote emmeans v. 1.4.4’. Hipóteses nulas foram rejeitadas se os valores de p de Tukey fossem menores ou iguais a 0,1.

### **3.5.5 Determinação da viabilidade de *M. leprae* e *M. abscessus***

Para estimar a viabilidade intracelular de *M. leprae* foi realizado qPCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S do bacilo, com algumas modificações, como descrito por Martinez e colaboradores, (2009). A partir das células infectadas com o bacilo foi extraído o DNA e o RNA, onde este último foi reversamente transcrito em cDNA com a utilização da enzima transcriptase reversa Superscript VILO™ (Invitrogen, EUA), conforme descrito anteriormente para os genes humanos (no item 3.5.1). Os níveis de RNAr 16S foram normalizados pela detecção de DNA 16S. Os oligonucleotídeos utilizados foram os descritos em Martinez e colaboradores (2009). As reações de qPCR foram realizadas com 500 ng de DNA e cDNA em volume final de 20 µL contendo TaqMan PCR Master Mix 1x (Applied Biosystem), 0,1 µM da sonda e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo. As reações foram incubadas a 50° C por 2 min, 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 s e 60° C por 1 min no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus®.

Para o ensaio de viabilidade intracelular de *M. abscessus*,  $2 \times 10^5$  macrófagos THP-1 infectados, foram lisados com Triton X-100 0,1% para recuperação das bactérias viáveis e em seguida diluições seriadas foram submetidas a meio de cultura sólido 7H10 suplementado com ADC 10% em placa de Petri. O crescimento bacteriano foi estimado através da contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). O antibiótico claritromicina (Sigma-Aldrich) (32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi utilizado como controle positivo. Foi realizado o cálculo da CFU/mL de acordo com a seguinte equação:

[Média da duplicata] x [Diluição selecionada com o expoente positivo] x [Correção para mL]

onde a diluição  $10^{-9}$  será incluída como  $10^9$ , e a correção para mL será  $10^2$  correspondendo ao valor necessário para multiplicar os 10  $\mu\text{L}$  tornando-o 1 mL, uma vez que a CFU obtida será por mililitro.

### 3.5.6 Análise dos dados de qPCR

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ). Inicialmente foi calculado o  $\Delta C_T$ , subtraindo-se os valores de  $C_T$  (do inglês “threshold cycle”, limiar do ciclo) do gene alvo dos valores de  $C_T$  do gene normalizador (HPRT1). Uma vez determinado o  $\Delta C_T$  das amostras, foi escolhido como amostra normalizadora o cDNA referente à condição experimental de células não estimuladas. Para calcular o  $\Delta\Delta C_T$  foi utilizada a seguinte fórmula: [ $\Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (amostra normalizadora)]. Por fim, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

Para estimar a viabilidade intracelular de *M. leprae* foi utilizado também o método descrito acima. Entretanto, para o cálculo do  $\Delta C_T$ , subtraiu-se os valores de  $C_T$  referentes ao cDNA de 16S dos valores de DNA genômico 16S. A condição experimental de monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos, infectados com *M. leprae* sem tratamento foi selecionada como amostra normalizadora. Após se obter o  $\Delta\Delta C_T$ , os valores de expressão relativa de 16S foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

### 3.6 Imunofluorescência

Para verificar a redistribuição do marcador de autofagia LC3 nas culturas celulares, foram utilizados macrófagos M2 ( $5 \times 10^5$  células por poço), em placas de

24 poços (Corning, EUA), onde as células foram diferenciadas sobre lamínulas de vidro estéreis de 15 mm. Ao final dos ensaios de infecção, o meio de cultura foi removido, as células lavadas duas vezes com PBS 1x (LGC biotecnologia, Brasil) e fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS acrescido de Triton X-100 0,01% (ou saponina 0,05%, Sigma-Aldrich) e bloqueadas com uma solução de SFB 10%, SNC 10% e BSA 1% por 1 h à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com o anticorpo primário contra LC3B (diluição 1:200; policlonal, código NB100-2220, Novus Biologicals) ou Atg3 (1:300; Santa Cruz Biotecnologia sc-393660 A-3). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de PBS/Triton X-100 0,01% e foi então realizada a incubação com o anticorpo secundário por 2 h à temperatura ambiente: anticorpo contra coelho feito em cabra Alexa Fluor 568 (1:500; código A21124, Molecular Probes), contra camundongo Alexa Fluor 633 (1:500; código A21126, Molecular Probes) ou contra camundongo Alexa Fluor 488 (1:500; código A21141, Molecular Probes). Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de PBS/Triton X-100 0,01% e foi realizada incubação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol – Molecular Probes, Life Technologies) por 5 min em temperatura ambiente e protegidas da luz. Para marcar os lisossomos, o corante acidotrópico LysoTracker Yellow HCK-123 (500 nM; Molecular Probes) foi adicionado às culturas 30 min antes da fixação. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS por 1 min e as lâminas foram montadas em meio *anti-fade* Prolong Diamond (Thermo Fisher Scientific) e seladas com esmalte nas bordas. Controles negativos também foram realizados, consistindo na utilização de isotipos correspondentes, ou omissão do anticorpo primário.

As células foram fotografadas utilizando o microscópio AxioObserver.Z1 equipado com os sistemas Colibri.2 e ApoTome.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e as objetivas de óleo EC Plan-Neofluar de 40x/1,30, 63x/1,40 e 100x/1,30. As imagens foram capturadas com a câmera digital AxioCam HRm e auxílio do programa AxioVision Rel. 4.8.2.0 (Carl Zeiss). O número de marcações puntiformes para LC3B por campo foi determinado utilizando uma adaptação do macro GFP-LC3 (Dagda et al. 2008) e o “plugin” “Analyze Particles” no software de análise de imagens ImageJ versão 1.50 g (Wayne Rasband, National Institutes of Health) (Rovetta et al., 2014, de Toledo-Pinto et al., 2016). Este número foi normalizado pelo número de núcleos corados com DAPI por campo. ImageJ foi

usado para análise de colocalização. Resumidamente, os canais vermelho, verde e azul foram extraídos de imagens RGB e convertidos em imagens binárias (escala de cinza) por limiarização automática. Em seguida, a pixelização de fundo foi removida da análise e, em seguida, os canais mesclados foram analisados usando as funções integradas de colocalização de software e análise de partículas (de Toledo-Pinto et al., 2016). Para as análises, cada experimento envolveu a contagem de pelo menos 100 células por amostra, em ao menos 10 campos randômicos.

### 3.6.1 Transdução viral com baculovírus

Foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células THP-1 e macrófagos humanos na placa preta de 96 poços (Corning – ref: 3603). Para realizar a transdução viral com baculovírus, realizamos o seguinte cálculo para obtenção do volume do componente A (LC3B-FP) e do componente B (LC3B-G120A):

$$\text{mL de LC3B-FP ou LC3B(G120A) -FP} = \frac{(\text{número de células}) (\text{MOI})}{(1 \times 10^8)}$$

onde o número de células é o número total estimado no momento da marcação celular, MOI (multiplicidade de infecção) é o número de partículas virais por célula (utilizamos a MOI 30:1), e  $1 \times 10^8$  é o número de partículas virais por mL do reagente. Após o preparo dos reagentes, adicionamos os componentes A e B diretamente às células em meio DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 10% de SFB, e incubadas “overnight” ( $\geq 16$  h) em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> (Shel Lab, OR, USA) para expressão de GFP-LC3B.

### 3.6.2 Ensaio de detecção para GFP-LC3B

Para realização desse ensaio, utilizamos  $1 \times 10^4$  macrófagos primários e da linhagem THP-1 expressando GFP-LC3B obtidos através de transdução viral com Baculovirus (Life technologies), tratados com diferentes concentrações de verapamil (12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ). Para marcação de núcleos foi utilizado Hoeschst 33342 (azul), visto que, observamos células vivas. A aquisição das imagens foi realizada através de bioimageamento por microscopia automatizada (HCA: análise de alto conteúdo), utilizando o equipamento da “Molecular Devices ImageXpress micro XLS”. Tanto as

imagens quanto as análises foram feitas automaticamente por microscopia HCS (high content screening; ImageXpress micro XLS HCA System), utilizando o software Metaxpress 6.0. Foi realizado um protocolo de análise selecionando os comprimentos de onda desejados para a análise, assim como a placa utilizada, nesse caso uma placa preta de 96 poços (Corning – ref: 3603).

### **3.7 Viabilidade celular**

#### **3.7.1 Ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT**

Para realização deste ensaio colorimétrico, macrófagos M2 ( $1 \times 10^4$  células por poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, e tratados com diferentes concentrações de verapamil (12,5, 25 e 50 $\mu$ M) (Sigma-Aldrich, V4629-1G) ou com 0,05% de DMSO (Sigma-Aldrich), veículo utilizado para diluir o composto. Após 24, 48 e 72 h de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, adicionou-se 10  $\mu$ L de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio) (5mg/mL) (Sigma-Aldrich, M2128) e as células foram mantidas durante 3 h a 37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, os cristais de “formazan”, resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos utilizando SDS 10% e a absorbância medida através do leitor de ELISA (SPECTRA MAX190, Molecular Devices, LLC, USA), a um comprimento de onda de 590 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem relativa à absorbância determinada nas células controle.

#### **3.7.2 Marcação celular com anexina V e Iodeto de propídeo**

A porcentagem de células viáveis, em apoptose e/ou em necrose foi determinada através do kit de detecção de apoptose Anexina V FITC (BD Pharmingen™, Califórnia, USA). Para essa finalidade, foram plaqueadas  $5 \times 10^5$  macrófagos M2 tratados com diferentes concentrações de verapamil (12,5, 25 e 50  $\mu$ M) por 24 e 48h. Após o tempo de estímulo, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria apropriados e lavadas duas vezes com PBS gelado. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 $\mu$ L de tampão de ligação e incubadas com 1,5 $\mu$ L de anexina V-FITC por 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 200 $\mu$ L de tampão de ligação e 1,5 $\mu$ L de iodeto de propídeo (PI). Em seguida, as amostras foram

adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur) em um intervalo de até 30 min conforme instruções do fabricante. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos na região de morfologia normal desse tipo celular. A análise foi realizada no software BD FlowJo e, para a determinação da viabilidade celular relativa foram utilizados como referência a porcentagem de células viáveis (duplo-negativas) em meio livre do fármaco verapamil (célula não estimulada).

### **3.8 Análise dos níveis de LC3B por *Western blotting***

Para realização deste experimento,  $1 \times 10^6$  monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos foram cultivados em placas de 12 poços (Corning, EUA), e tratados com diferentes concentrações de verapamil (1,6, 3,2, 6,25, 12,5, 25 e 50  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, V4629), rapamicina (200 ng/mL; Sigma-Aldrich, R0395), 3-MA (10  $\mu$ M; Sigma-Aldrich, M9281) e rifampicina (10  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich, R3501) por 18 h (*overnight*). Após as dosagens pelo método de Bradford, 20  $\mu$ g das proteínas extraídas a partir do tampão RIPA na presença de inibidores de protease e fosfatase (1:100, Sigma-Aldrich) foram diluídas em tampão de amostra 4 vezes concentrado (0,05 M Tris-HCL em pH 6,8; 10% Glicerol; 2% SDS; 0,5 mL de 5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol) e desnaturadas a 100°C por 5 min. As amostras e o padrão de peso molecular (Unstained SDS-PAGE Standards, broad range, catálogo 161-0317) foram aplicados em gel de poliacrilamida composto por um gel de empilhamento a 5% e um gel de separação a 12%. Após corrida eletroforética a 130 V por 90 min em tampão contendo Tris a 25 mM e glicina a 250 mM, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana dePVDF (Immun-Blot® PVDF Membrane, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). A transferência foi feita em tampão de transferência (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM e metanol a 10%), a 100 V por 60 min a temperatura ambiente (Bio-Rad).

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução Ponceau por 1 a 2 min para a confirmação da transferência e identificação do padrão de peso molecular e, posteriormente, descoradas por lavagens com solução de TBS/T (10 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; Tween-20 0,05%). Em seguida, a membrana foi bloqueada com solução de leite em pó desnatado a 5% em TBS/T (solução de bloqueio) por 1 h à temperatura ambiente e incubada por 1 h com anticorpo primário policlonal contra LC3B (código NB100-2220, Novus Biologicals) na diluição de 1  $\mu$ g/mL em solução de bloqueio, a temperatura ambiente. LC3B-II é observado em 17

kDa enquanto LC3B-I é observado em 19kDa. Para o controle endógeno a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal contra GAPDH (37 kDa; Santa Cruz 1:1000 - catálogo SC-47724) por 1h, à temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada por três vezes com TBS/T durante 5 min e logo em seguida, foi incubada por 1 h com anticorpo secundário contra coelho conjugada à peroxidase (código P0448, DakoCytomation) diluído 1:2000 e contra camundongo HRP (DAKO - cat. P0447) diluído 1:1000, em TBS/T com BSA 3%. As membranas foram lavadas três vezes com TBS/T por 5 min e reveladas adicionando-se substrato quimioluminescente (ECL Substrates for High-Sensitivity Western Blot Detection, Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA).

Os gráficos de análise densitométrica apresentados foram realizados utilizando o software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram gerados a partir do cálculo da razão entre valores de densitometria do perfil de bandas de expressão de LC3-II e GAPDH e expressos em unidades arbitrárias.

### **3.9 Microscopia eletrônica de transmissão**

Monócitos humanos foram cultivados em frascos de cultura de células de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, EUA) e fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 24h a 4 °C e pós-fixados em 2% tetróxido de ósmio em tampão cacodilato 0,1 M por 1h a 4 °C. Em seguida, as células aderidas foram raspadas, transferidas para um tubo de 1,5 mL e desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Por fim, a acetona foi removida e substituída por resina epóxi (kit Polybed-812). Em seguida, a amostra foi transferida para um molde de inclusão e o bloco polimerizado a 60°C por 72 h. Cortes ultrafinos (70 - 80 nm) foram obtidos no ultramicrotomo Reichert OMU3 (Leica, Wetzlar, Alemanha), coletados em grades de cobre, contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 2% e visualizados no microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (Jeol, Tóquio, Japão) operando com a tensão do feixe a 80 kV, da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth (IOC/FIOCRUZ). Todos os reagentes foram adquiridos da "Electron Microscopy Sciences" (PA, EUA), exceto quando indicado. As imagens foram capturadas digitalmente com auxílio de uma câmera CCD SC1000 ORIUS (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EUA) usando o software Gatan Digital Micrograph 2.31.734.0 (Gatan Inc.).



### 3.10 Ensaio para detecção de citocinas

Os sobrenadantes dos experimentos de infecção com *M. leprae* tratados com IFN- $\gamma$  foram coletados e estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da utilização. Para dosagem de IL-15 e IL-10 foi utilizado o kit de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As absorbâncias foram medidas usando o leitor de microplacas SpectraMax 190 e analisadas usando o software SoftMax Pro v5.3 (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, EUA). Os níveis de fluorescência foram determinados usando um sistema de leitor de multiplex Bio-Plex baseado em Luminex (Bio-Rad Laboratories).

### 3.11 Análises estatísticas

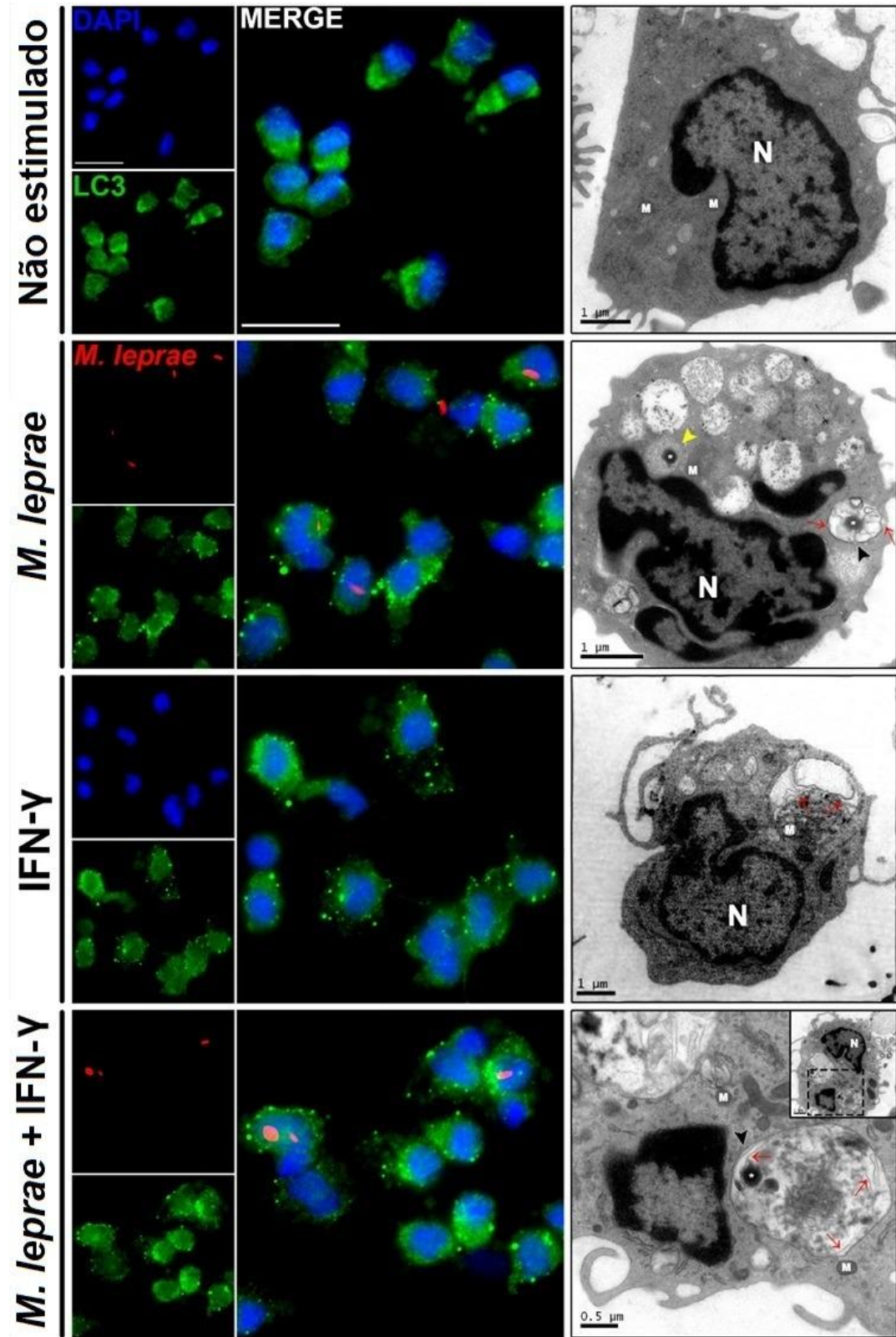
A análise estatística e a representação gráfica foram realizadas com o software GraphPad Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As estatísticas relatadas são de séries inteiras de experimentos e descritas como média  $\pm$  erro padrão, ou “whiskers” indicando o mínimo ao máximo com todos os pontos mostrados. Para comparação entre três ou mais grupos com dados pareados ou repetidos, utilizou-se one-way ou two-way ANOVA, com correção de Geisser-Greenhouse, além do teste de comparações múltiplas de Tukey, com variâncias individuais computadas para cada comparação; para dados sem correspondência ou pareamento, usamos os testes Brown-Forsythe e Welch ANOVA com o teste de comparações múltiplas de Dunnett T3. Para análise de dois grupos, foi usado o teste t de Student's two-tailed pareado ou o teste t não pareado, two-tailed, com correção de Welch's. O valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Para o segundo bloco de resultados a significância estatística foi calculada pelos testes Kruskal-wallis com pós-teste Dunn e Mann-Whitney. Os valores de  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$  foi considerado estatisticamente significativo.

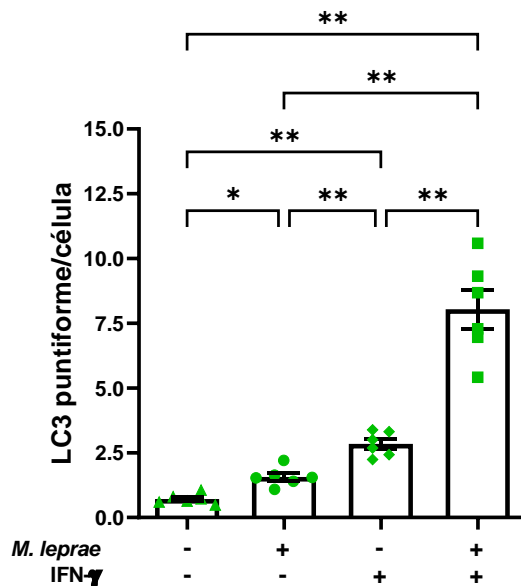
## 4 RESULTADOS

### 4.1 IFN- $\gamma$ induz a formação de autofagossomos em macrófagos humanos estimulados com *M. leprae*

Sabe-se que o IFN- $\gamma$  prepara os macrófagos para a ativação inflamatória e induz o mecanismo autofágico em macrófagos isolados de lesões de pele de pacientes com hanseníase (Silva et al., 2017a). Para avaliar se esta citocina ativa autofagia em nosso modelo celular, com a finalidade de estudarmos o episódio reacional T1R, a expressão de LC3-II lipídada (ou LC3-PE) foi avaliada por imunofluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em monócitos humanos primários previamente estimulados com *M. leprae* (10:1 bactéria/célula) por 30 min e tratados com IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) por 18 h. Em comparação ao controle (não estimulado) e aos estímulos sozinhos, o tratamento com IFN- $\gamma$  aumentou a expressão de LC3 puntiforme nos monócitos estimulados com *M. leprae* (**Figura 12A-B**). A análise por MET revelou a presença de fagossomos (cabeça de setas amarelas) ou autofagossomos (cabeça de setas pretas) contendo bactérias em monócitos estimulados com *M. leprae* (asterisco), mas não em células não estimuladas. O estímulo com IFN- $\gamma$  promoveu a formação de vacúolos de dupla membrana (setas vermelhas). Em células estimuladas com *M. leprae* e IFN- $\gamma$ , foram observados autofagossomos que abrigam o *M. leprae* (**Figura 12A**).

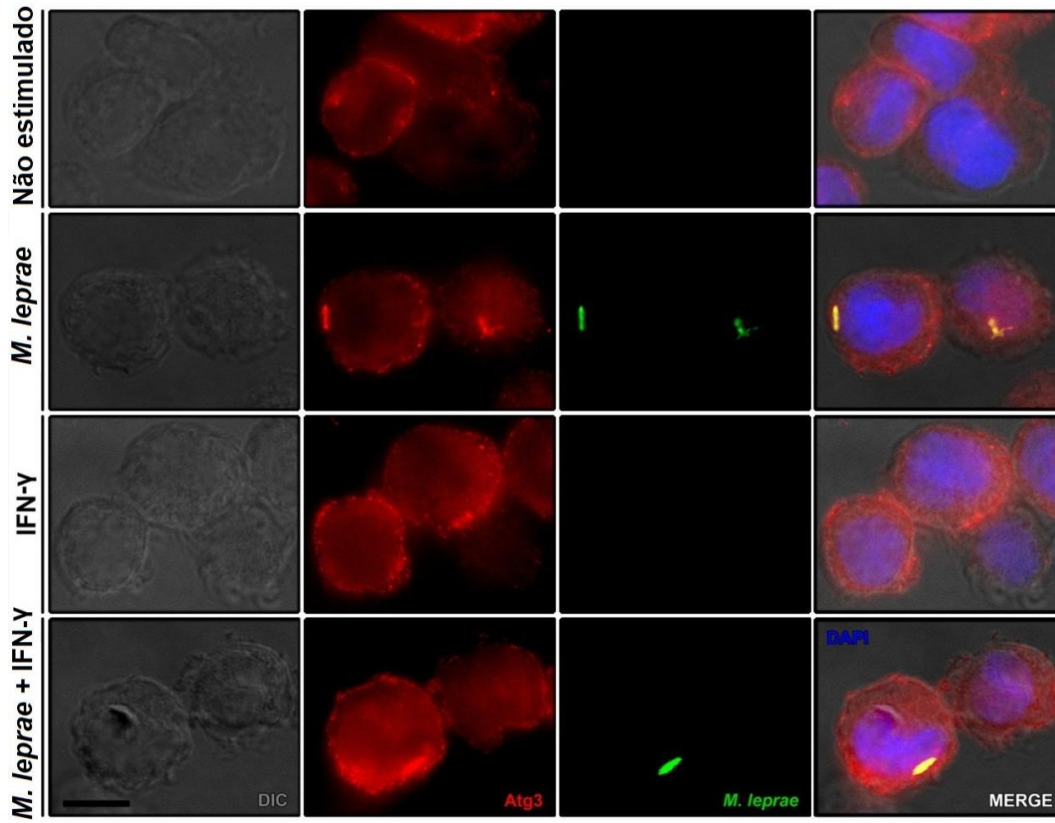
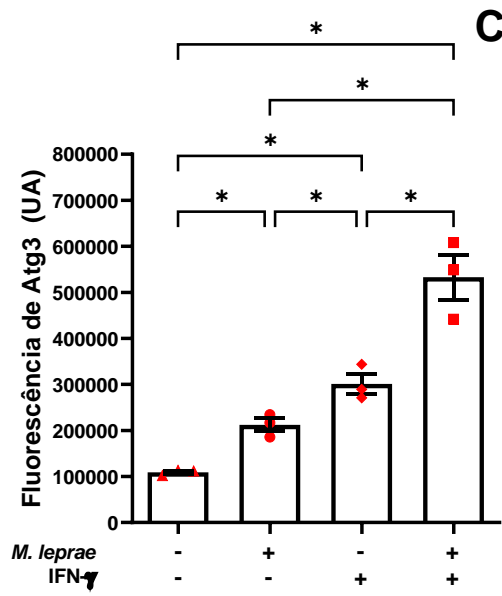
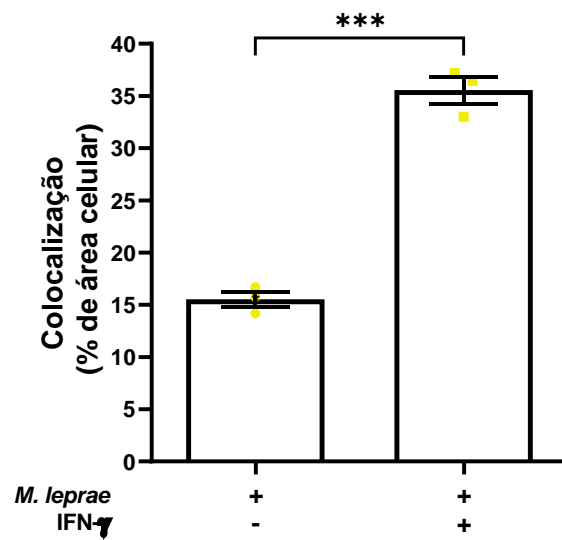
A



**B**

**Figura 12: O IFN- $\gamma$  induz a formação de autofagossomos em monócitos estimulados com *M. leprae*.** (A) Monócitos humanos foram estimulados com *M. leprae* (MOI 10:1) por 30 minutos, depois foram tratados com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$  por 18 h e processados para análise por imunofluorescência ou microscopia eletrônica de transmissão. LC3 (verde), *M. leprae* corado com PKH26 (vermelho) e o núcleo corado com DAPI (azul). As setas vermelhas indicam locais visíveis de membrana dupla (autofagossomos); as pontas de setas pretas indicam autofagossomos contendo *M. leprae*; pontas de seta amarelas indicam fagossomos contendo *M. leprae*; asteriscos indicam *M. leprae*; M indica mitocôndrias; N indica núcleo. As imagens são representativas de seis experimentos de imunofluorescência e três experimentos de MET. Barra de escala: 20  $\mu$ m. (B) A quantificação de LC3 puntiforme por célula nas mesmas condições mencionadas acima. Os dados mostrados representam a média  $\pm$  S.E.M (erro padrão) de seis experimentos biológicos independentes e a significância estatística foi calculada por one-way ANOVA com correção de Geisser–Greenhouse e teste de comparações múltiplas de Tukey (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

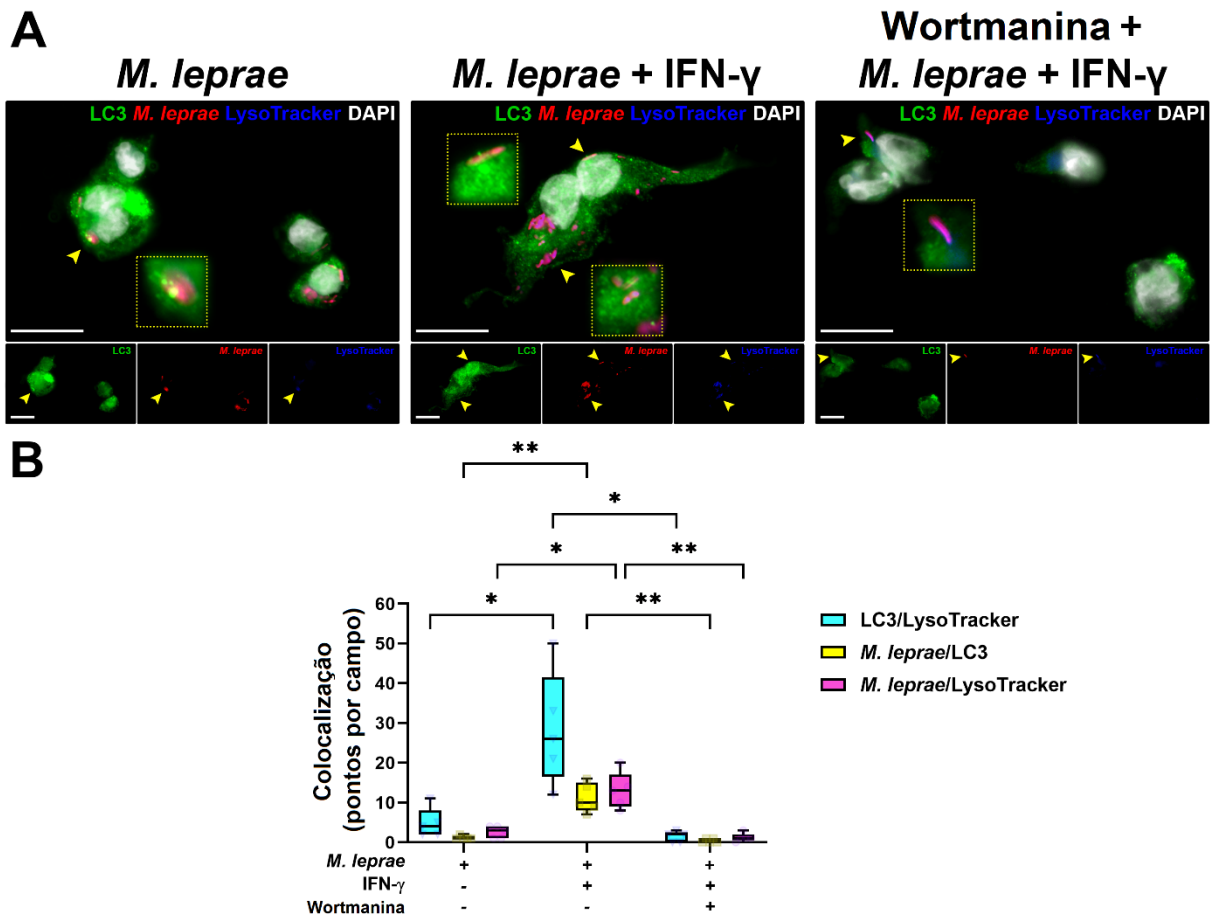
Em seguida, avaliamos a expressão de Atg3, uma enzima responsável pela conjugação de LC3-I a PE, formando LC3-II (Münz 2009). Em comparação com as células não estimuladas ou *M. leprae* sozinho, o estímulo com IFN- $\gamma$  aumentou a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 (**Figura 13A**). Notamos que em macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ , a expressão de Atg3 se concentrou na membrana plasmática, local onde ocorre a entrada de bactérias e a formação de autofagossomos (Travassos et al., 2010). Além disso, na presença de IFN- $\gamma$ , houve um aumento na colocalização de Atg3 e *M. leprae* (**Figura 13B-C**).

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

**Figura 13: O IFN- $\gamma$  regula positivamente a expressão de Atg3 em macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae*.** (A) Monócitos humanos THP-1 foram diferenciados em macrófagos por 24 horas na presença de 200 nM de PMA, o meio foi trocado e então, foram estimulados com *M. leprae*-PKH26 (verde) por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$  por 18 h. A expressão de Atg3 foi avaliada por microscopia de imunofluorescência com anticorpo anti-Atg3 (vermelho), e o núcleo corado com DAPI (azul). As imagens são representativas de três experimentos. Barra de escala: 10  $\mu$ m. Contraste de interferência diferencial (DIC). (B) Quantificação de fluorescência de Atg3 nas mesmas condições mencionadas acima. (C) Quantificação da porcentagem de *M. leprae* co-localizados com Atg3. Os dados mostrados representam a média  $\pm$  S.E.M (erro padrão) de três experimentos biológicos independentes e a significância estatística foi calculada por one-way ANOVA com correção de Geisser–Greenhouse e teste de comparações múltiplas de Tukey (D) ou test t pareado Two-tailed (E) (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### **4.2 O tratamento com IFN- $\gamma$ induz o fluxo autofágico em macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae***

A última etapa da via autofágica é a maturação dos autofagossomos em compartimentos degradativos chamados autolisossomos. Uma vez que existe a regulação positiva de autofagossomos na presença combinada de IFN- $\gamma$  e *M. leprae*, fomos avaliar os efeitos do IFN- $\gamma$  na maturação desses autofagossomos. A análise do fluxo autofágico revelou estruturas com a marcação puntiforme de LC3-II colocalizadas com lisossomos marcados com LysoTracker em macrófagos THP-1 estimulados apenas com *M. leprae* (**Figura 14A**). De modo mais significativo, a indução de autofagia por IFN- $\gamma$  foi capaz de promover a colocalização acentuada de autofagossomos (LC3-II) com lisossomos positivos para LysoTracker em macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae* (**Figura 14A**). O pré-tratamento com o inibidor PI3K (wortmanina) foi capaz de inibir a expressão de LC3-II induzida por IFN- $\gamma$  + *M. leprae* em macrófagos THP-1 (**Figura 14A**). Ao quantificar cada compartimento da via autofágica através da análise de colocalização, observamos que as células THP-1 tratadas com IFN- $\gamma$  e *M. leprae* foram marcadas de forma mais proeminente para autolisossomos e tiveram mais micobactérias marcadas para autofagossomos e lisossomos em comparação com *M. leprae* sozinho ou na presença de wortmanina (**Figura 14B**).



**Figura 14: A wortmanina bloqueia o fluxo autofágico induzido por IFN- $\gamma$  em macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae*.** (A) Macrófagos THP-1 foram pré-tratados com 100 nM de wortmanina por 1 h, estimulados com *M. leprae* PKH26 (vermelho) por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$  por 18 h. A expressão de LC3 foi avaliada por imunofluorescência usando o anticorpo anti-LC3 (verde), com o núcleo corado com DAPI (branco). LysoTracker (azul) foi adicionado às culturas 30 minutos antes da fixação. As pontas de seta indicam perfis de colocalização em pelo menos dois canais, que são mostrados nas inserções (on the insets). Barra de escala: 20  $\mu$ m. (B) Análise de colocalização. As imagens são representativas de cinco experimentos. Os dados em “whiskers” são do mínimo ao máximo com todos os pontos mostrados; e a significância estatística foi calculada por one-way ANOVA com correção de Geisser–Greenhouse e teste de comparações múltiplas de Tukey (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

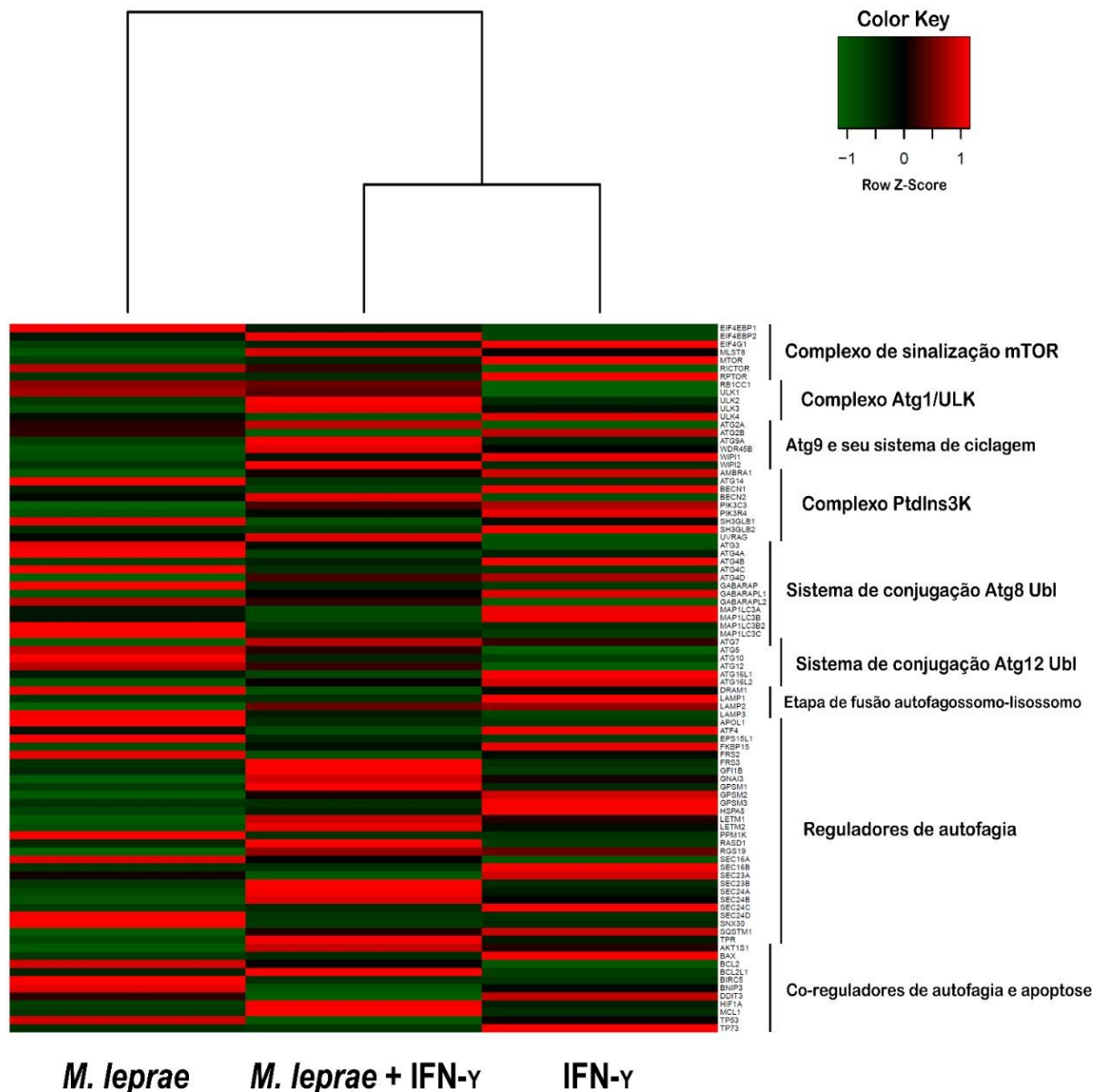
### 4.3 IFN- $\gamma$ regula positivamente a expressão de genes de autofagia em células THP-1 estimuladas com *M. leprae*

Os resultados descritos acima indicam que a resposta autofágica foi maior nas células estimuladas com *M. leprae* e tratadas com IFN- $\gamma$ . Para identificar os componentes da maquinaria autofágica envolvidos na resposta celular à infecção micobacteriana, avaliamos a regulação transcricional dos genes ATG, o que pode fornecer dados correlativos relacionados à indução da autofagia. Para esta finalidade, mRNAs isolados de macrófagos THP-1 tratados com *M. leprae* + IFN- $\gamma$ , assim como, os macrófagos tratados individualmente com cada estímulo, foram

analisados por RT-qPCR para obter os perfis de expressão gênica (88 genes) utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia.

Conforme mostrado na **Figura 15**, o IFN- $\gamma$  induziu uma regulação positiva de genes relacionados ao processo de autofagia em culturas estimuladas com *M. leprae* (**apêndice A**). Os genes envolvidos na formação de autofagossomos (*ULK2* - um membro do complexo Atg1/ULK (Feng et al. 2013); *ATG16L2* – participa do sistema de conjugação ATG12; *ATG10* e *ATG7* que também participam desse sistema e que estão envolvidos na expansão da vesícula), regulação de autofagia (*FKBP15*, *GPSM1*, *GPSM2*, *SEC23B* e *SQSTM1*) e vias lisossomais (*LAMP2* - componente lisossomal necessário para a etapa de fusão autofagossomo-lisossomo (Feng et al. 2013)) foram regulados positivamente por IFN- $\gamma$  em macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae* (**Figura 15**).





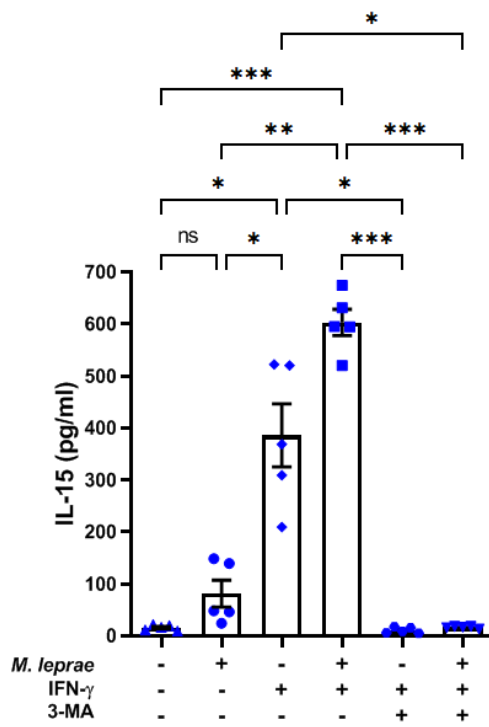
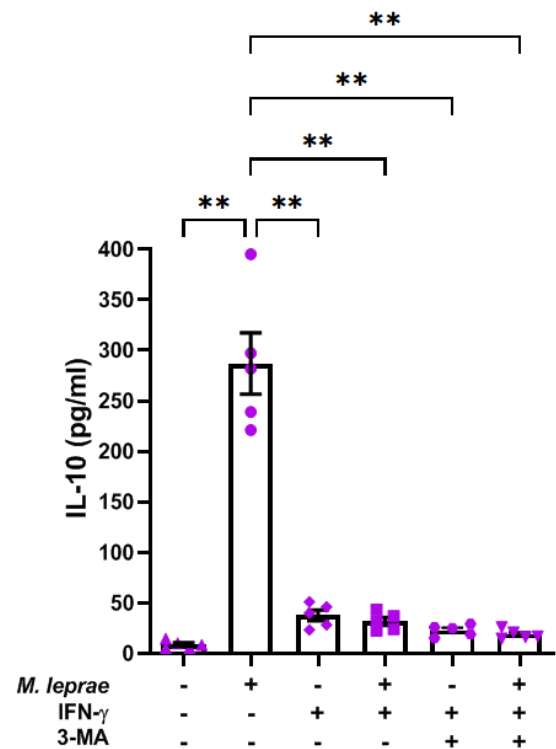
**Figura 15: Perfis de expressão gênica autofágica de células THP-1 estimuladas com *M. leprae* e IFN- $\gamma$ .** mRNAs de macrófagos THP-1 tratados com *M. leprae* + IFN- $\gamma$ , assim como, os macrófagos tratados individualmente com cada estímulo, foram analisados por RT-qPCR usando um kit de PCR “array” da via de autofagia. O “Heat map” mostra a análise de expressão de genes relacionados à autofagia agregados em diferentes categorias. Cada linha é representativa de um gene. Os dados são representativos de três experimentos independentes.

#### 4.4 IFN- $\gamma$ aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae*

Um estudo recente, avaliou a expressão gênica (103 genes-alvo) no sangue de pacientes com hanseníase recém-diagnosticados, incluindo os pacientes que desenvolveram reação do tipo 1 (T1R), a fim de utilizá-los como biomarcadores no diagnóstico precoce das reações inflamatórias da hanseníase. A análise longitudinal

demonstrou que vários genes induzidos por IFN-gamma estão significativamente aumentados no início da reação, incluindo IL-15. Devido ao aumento dos níveis de IL-15 em pacientes que desenvolvem T1R (Tió-Coma et al., 2019), procuramos avaliar através da técnica ELISA se os níveis de citocinas IL-15 e IL-10 estão alterados em macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$  na presença ou ausência de *M. leprae*.

O tratamento de macrófagos com IFN- $\gamma$  foi capaz de aumentar significativamente a secreção de IL-15, mas não IL-10, em relação às culturas não estimuladas (**Figura 16A,B**). Na presença de *M. leprae* + IFN- $\gamma$ , houve aumento da secreção de IL-15 e diminuição da secreção de IL-10, em comparação a *M. leprae* sozinho (**Figura 16A,B**). O aumento de IL-15 em culturas estimuladas com IFN- $\gamma$  ou *M. leprae* + IFN- $\gamma$  foi totalmente inibido na presença de 3-MA (**Figura 16A**). Em contraste, o bloqueio da autofagia não restaurou os níveis de IL-10 (**Figura 16B**). Esses resultados sugerem que a indução de IL-15 por IFN- $\gamma$  pode estar associada com autofagia.

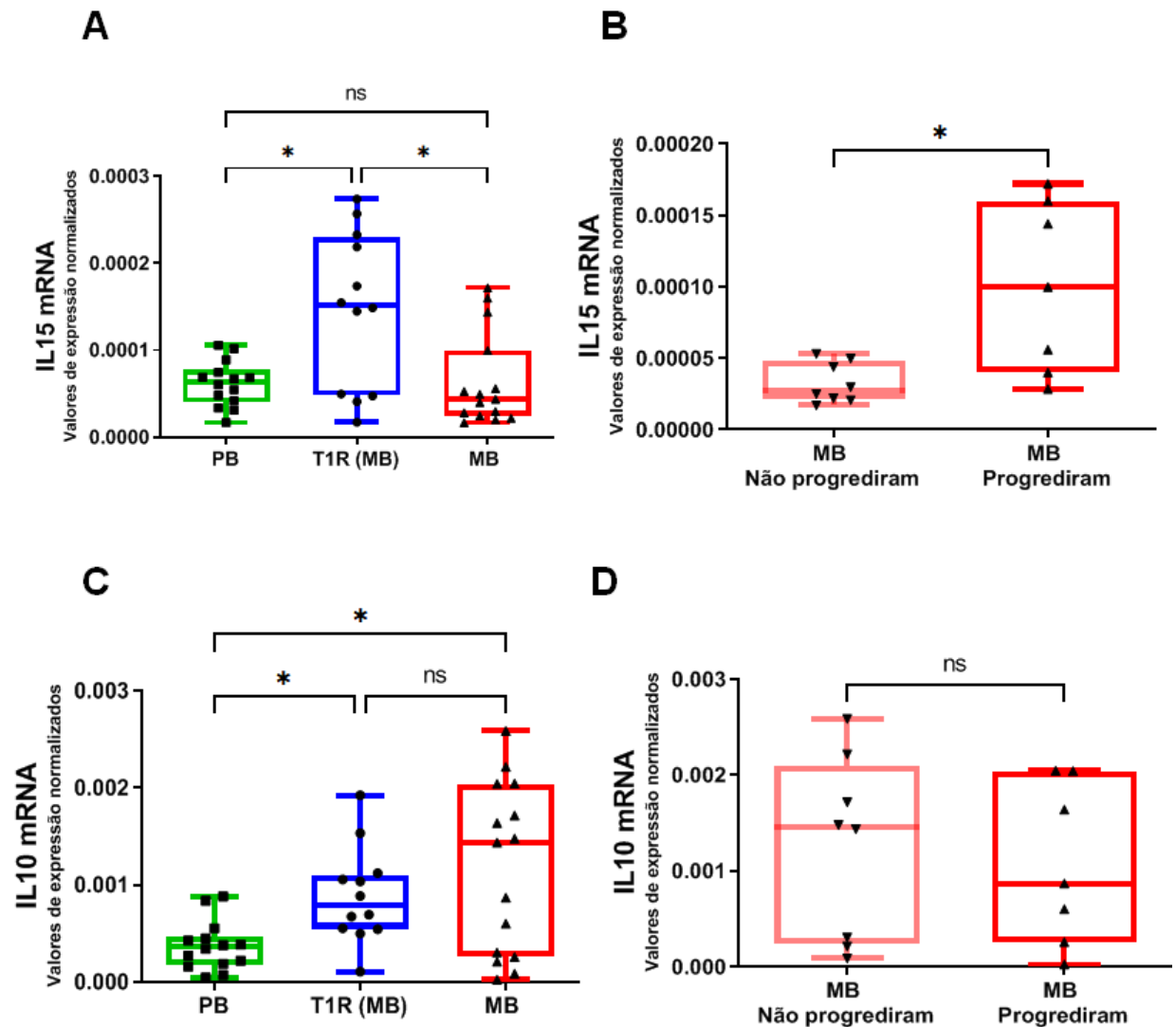
**A****B**

**Figura 16: Na presença de *M. leprae*, o IFN- $\gamma$  aumenta a secreção de IL-15 em macrófagos THP-1.** Macrófagos THP-1 foram pré-tratados ou não com 10 mM de 3-MA por 1 h, estimulados com *M. leprae* por 30 minutos (MOI 10:1) e tratados com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$  por 18 h. A produção de citocinas foi avaliada por ELISA. (A) IL-15, (B) IL-10. Os gráficos são representativos de cinco experimentos. Os dados são a média  $\pm$  S.E.M; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  pelas medidas repetidas unidirecionais ANOVA com correção de Geisser-Greenhouse e teste de comparações múltiplas de Tukey. ns: não significativo. Os dados mostrados representam a média  $\pm$  S.E.M (erro padrão) de cinco experimentos biológicos independentes e a significância estatística foi calculada por one-way ANOVA com correção de Geisser–Greenhouse e teste de comparações múltiplas de Tukey (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.5 A expressão da citocina inflamatória IL-15 está aumentada em lesões de pele de pacientes MB que progrediram para T1R

Demonstrou-se que o processo autofágico é regulado positivamente por uma ampla quantidade de citocinas pró-inflamatórias, ao passo que, as citocinas antiinflamatórias regulam negativamente a autofagia (Ge et al. 2018). A citocina pró-inflamatória IL-15 induz uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3, observada nos pacientes PB, enquanto a antiinflamatória IL-10 induz a via fagocítica nos macrófagos, observada nos pacientes MB (Montoya et al. 2009). Por sua vez, o IFN $\gamma$  induz IL-15 por uma via dependente de Stat1, levando à conversão da vitamina D3 e ativação de uma via antimicrobiana mediada pela autofagia (Fabri et al. 2011).

Como a IL-15 foi modulada por IFN- $\gamma$  em células THP-1 estimuladas com *M. leprae*, avaliamos a expressão de IL-10 e IL-15 em células de lesão de pele de pacientes MB que desenvolveram ou não T1R durante o acompanhamento clínico. A expressão aumentada de IL-15 foi observada em lesões T1R em comparação com os grupos PB e MB (**Figura 17A**). Além disso, monitoramos os pacientes MB por 2 anos visando observar a ocorrência ou não do episódio reacional. A análise de expressão gênica mostrou a regulação diferencial de IL-15 em amostras de pacientes que desenvolveram T1R (MB que progrediram) em comparação com aqueles que não evoluíram para T1R (MB não progrediram) durante o tempo de 2 anos (**Figura 17B**). Por outro lado, as lesões T1R exibiram expressão aumentada de IL-10 (**Figura 17C**), enquanto não foram encontradas diferenças na expressão de IL-10 em amostras de pacientes multibacilares que progrediram ou não para T1R (**Figura 17D**).



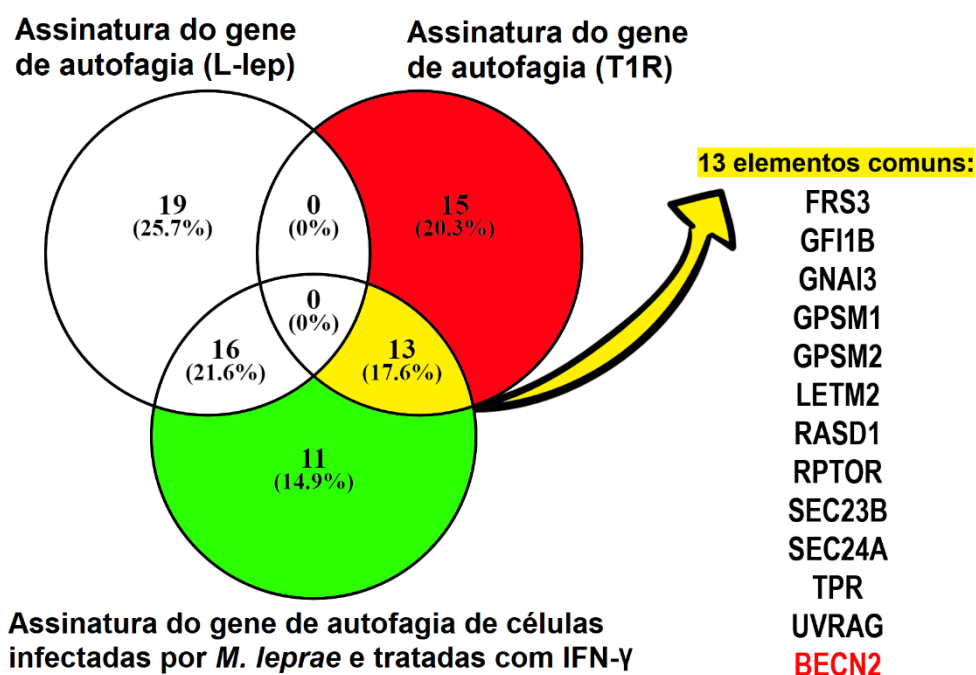
**Figura 17: Perfil de expressão de mRNA de citocinas em lesões cutâneas de pacientes PB, MB e T1R.** Expressão gênica da molécula inflamatória IL-15 (A) e a molécula antiinflamatória IL-10 (C) foram avaliadas por PCR em tempo real em lesões cutâneas de pacientes paucibacilares (PB), multibacilares (MB) e reacionais (T1R). (B, D) Pacientes MB foram monitorados por 2 anos após o início da PQT e foram estratificados com base no resultado ou não de T1R durante o follow-up. (B) Níveis de mRNA de IL-15 (D) Níveis de mRNA de IL-10. Os dados são representativos de pacientes PB (n = 14), MB sem progressão (n = 8), progressão para MB (n = 7) e T1R (n = 12). Os dados em “whiskers” são do mínimo ao máximo com todos os pontos mostrados; e a significância estatística foi calculada pelos testes Brown–Forsythe e Welch ANOVA com teste de comparações múltiplas de Dunnett’s T3 (A, C) ou teste t não pareado two-tailed com correção Welch’s (\* p<0,05) (B,D). Ns: não significativo.

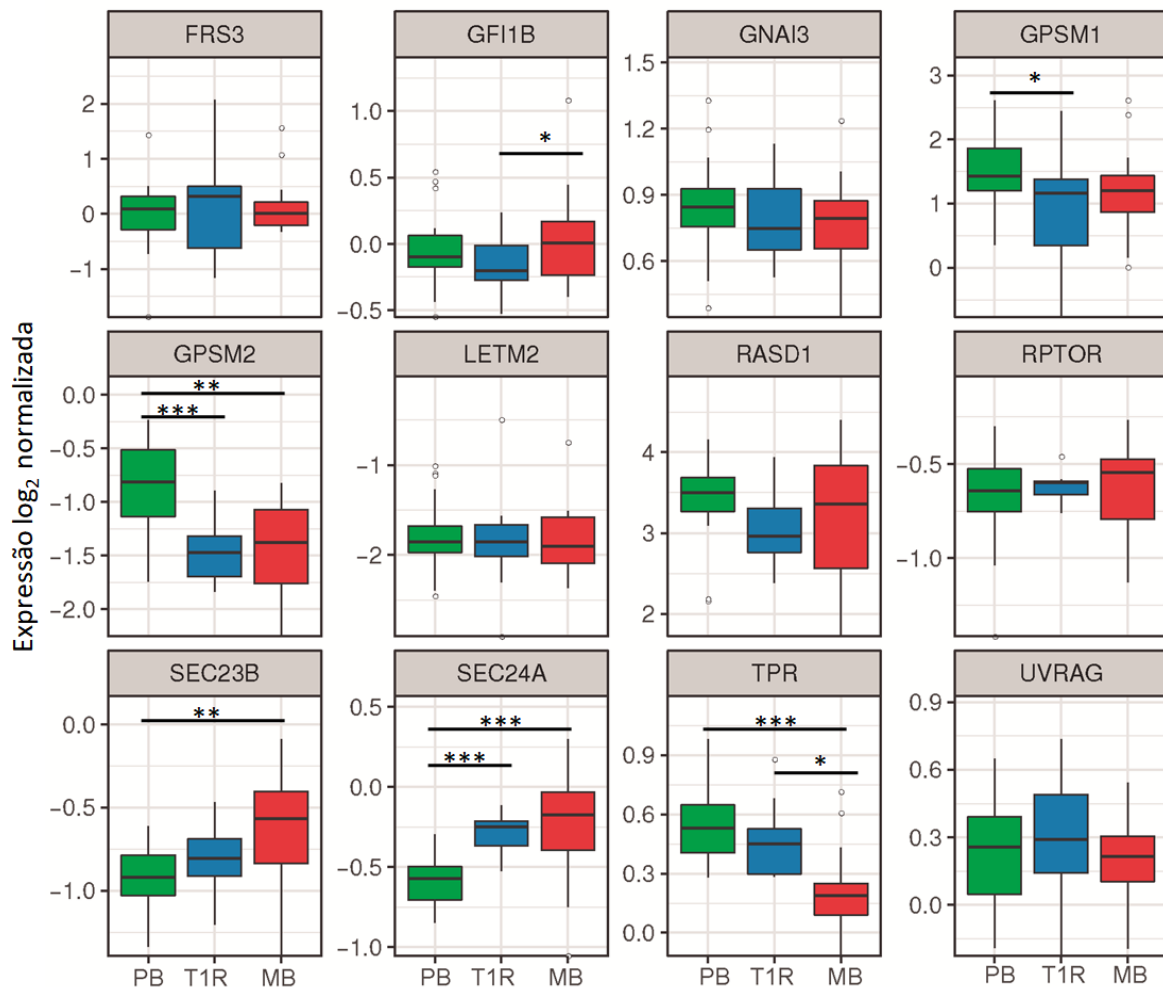
#### 4.6 A modulação da via de autofagia em lesões de T1R foi mediada por IFN- $\gamma$

Para estabelecer um paralelo entre as culturas de células estimuladas por *M. leprae* incubadas com IFN- $\gamma$  e células de lesão de pele T1R, realizamos uma análise de interseção (como ilustrado pelo diagrama de Venn) entre uma assinatura de expressão gênica de autofagia derivada de macrófagos THP-1 tratados com IFN- $\gamma$  e

*M. leprae* (**Figura 15**), e nossas assinaturas de autofagia publicadas anteriormente (Silva et al., 2017a) obtidas de lesões de pele de pacientes MB e T1R (**apêndices A e B**). Observou-se a presença de 13 genes comuns (17,6%) entre as lesões cutâneas de T1R e as células estimuladas pelo *M. leprae* + IFN- $\gamma$  (*FRS3*, *GFI1B*, *GNAI3*, *GPSM1*, *GPSM2*, *LETM2*, *RASD1*, *RPTOR*, *SEC23B*, *SEC24A*, *TPR*, *UVRAG* e *BECN2*) (**Figura 18A**). A reanálise de expressão gênica de biópsia de pele de hanseníase a partir dos dados de “microarray” (Szklarczyk et al., 2019) mostrou que a expressão de *TPR* foi significativamente aumentada em T1R *versus* MB ( $\log_2FC$  0,20, 95% IC Tukey [0,01-0,40]) e em PB *versus* MB ( $\log_2FC$  0,34, [0,16–0,51]). No entanto, *SEC24A* foi regulado positivamente apenas em T1R comparado com PB ( $\log_2FC$  0,33, [0,14-0,52]). Os genes *GPSM1* e *GPSM2* foram regulados negativamente em T1R comparados com lesões de pele PB ( $\log_2FC$  -0,67 [-1,29 a -0,04];  $\log_2FC$  -0,60 [-0,95 a -0,25], respectivamente). Os genes *SEC24A* e *SEC23B* foram regulados positivamente em pacientes MB em comparação com lesões de pacientes PB ( $\log_2FC$  0,34 [0,15–0,54] e  $\log_2FC$  0,31 [0,1–0,52], respectivamente). *GFI1B* teve uma maior expressão média em pacientes MB em comparação com T1R ( $\log_2FC$  0,27, [0,02-0,56]) (**Figura 18B**).

**A**



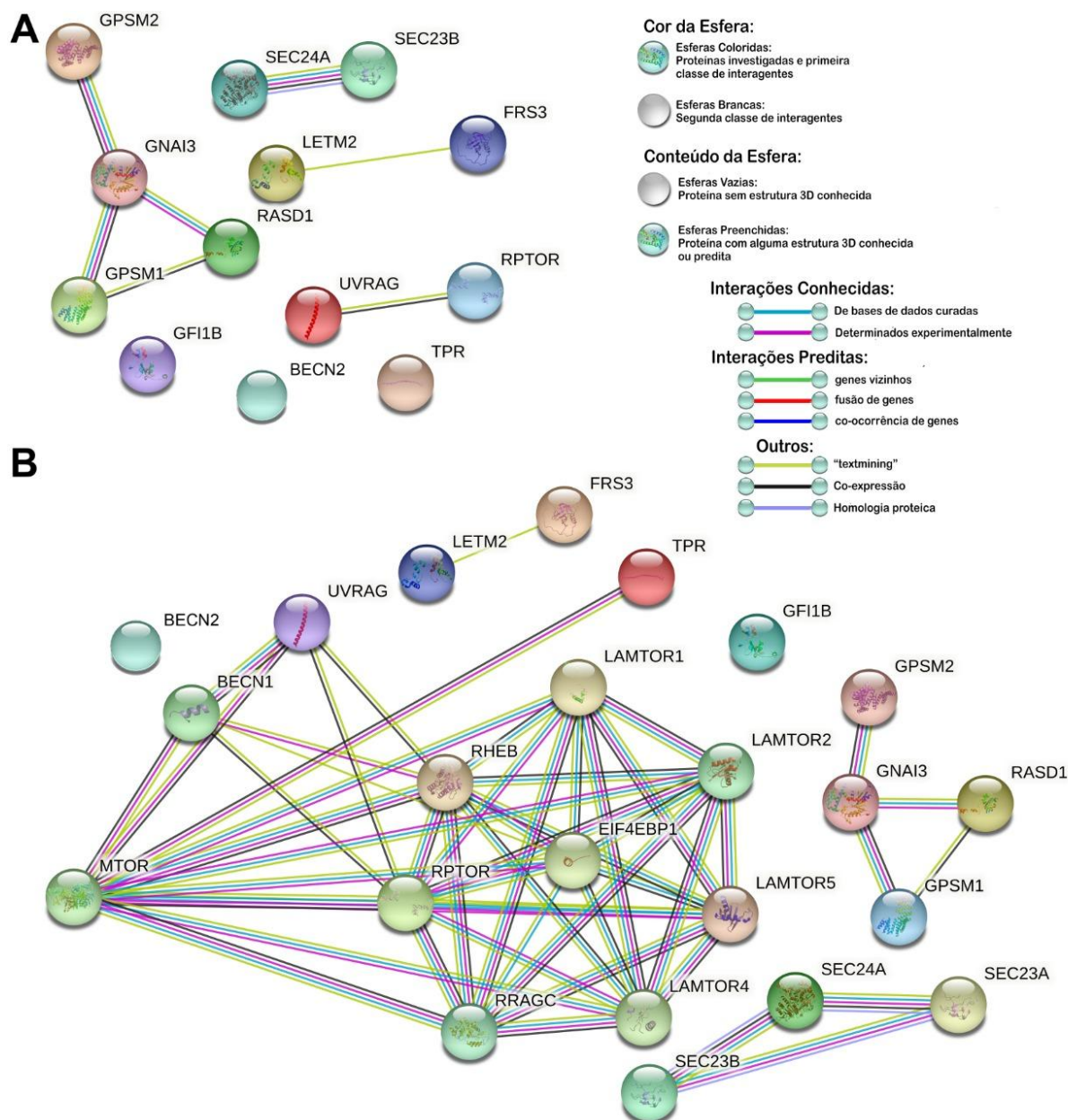
**B**

**Figura 18: Lesões de pele de T1R e macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae* + IFN- $\gamma$  compartilham uma assinatura gênica de autofagia em comum.** (A) Diagrama de Venn sobrepõe as assinaturas de expressão gênica de autofagia de lesões cutâneas da hanseníase e macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae* e tratados com IFN- $\gamma$ . (B) Box plots de Tukey mostram valores de expressão do gene  $\log_2$  normalizados a partir de dados de microarray (Belone et al., 2015) para os 13 genes encontrados em (A). BECN2 foi excluído devido a problemas de anotação de microarray. As médias foram comparadas usando um modelo linear de efeitos mistos, seguido pelo procedimento de comparação múltipla de Tukey. Os asteriscos representam os valores de p de Tukey como \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Os intervalos de confiança de Tukey são descritos nos resultados.

Para entender melhor a relação entre os genes sobrepostos em células THP-1 e lesões T1R, submetemos ainda os 13 alvos comuns à análise de interação proteína-proteína usando o banco de dados STRING. Mapas de rede (“network maps”) de 13 elementos comuns revelaram três nodes distintos de interação protéica: GNAI3, GPSM1, GPSM2 e RASD1; RPTOR e UVRAG; e SEC23B e SEC24A; além disso, algumas associações proteína-proteína dentro desses nodes foram reveladas (**Figura 19A**). Ao conectar os 13 elementos comuns ao “core”



deproteínas da maquinaria autofágica, determinamos que TPR interage diretamente com o regulador central de autofagia mTOR, que por sua vez se conecta a RPTOR e UVRAG (**Figura 19B**).



**Figura 19: Rede de interação proteica de autofagia entre lesões cutâneas de T1R e macrófagos THP-1 estimulados com *M. leprae* e IFN- $\gamma$ .** As 13 proteínas de autofagia codificadas pelos genes regulados positivamente em pacientes T1R e células THP-1 tratadas foram visualizadas por STRING. (A) Nesta imagem, as linhas coloridas entre as proteínas indicam os vários tipos de interações. Os nodes de rede ("network nodes") representam proteínas. As bordas representam associações proteína-proteína. (B) Mais proteínas foram adicionadas à rede de evidências mostrada em (A) para mostrar a interação dos 13 alvos compartilhados com as proteínas centrais da maquinaria de autofagia.

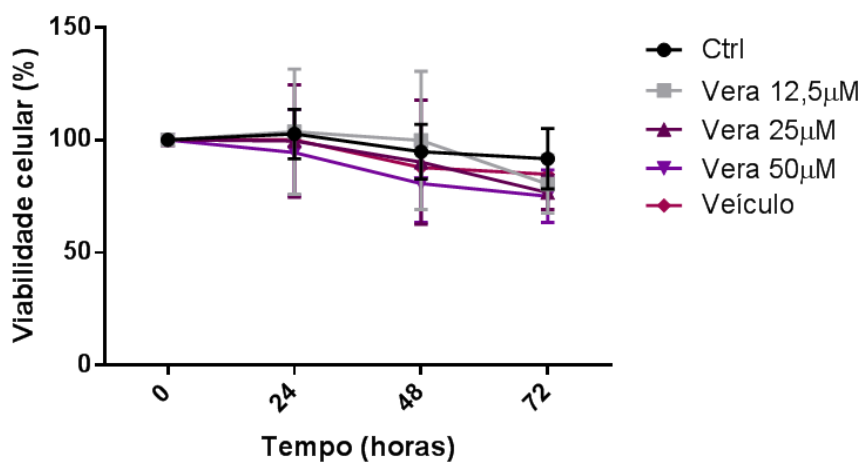


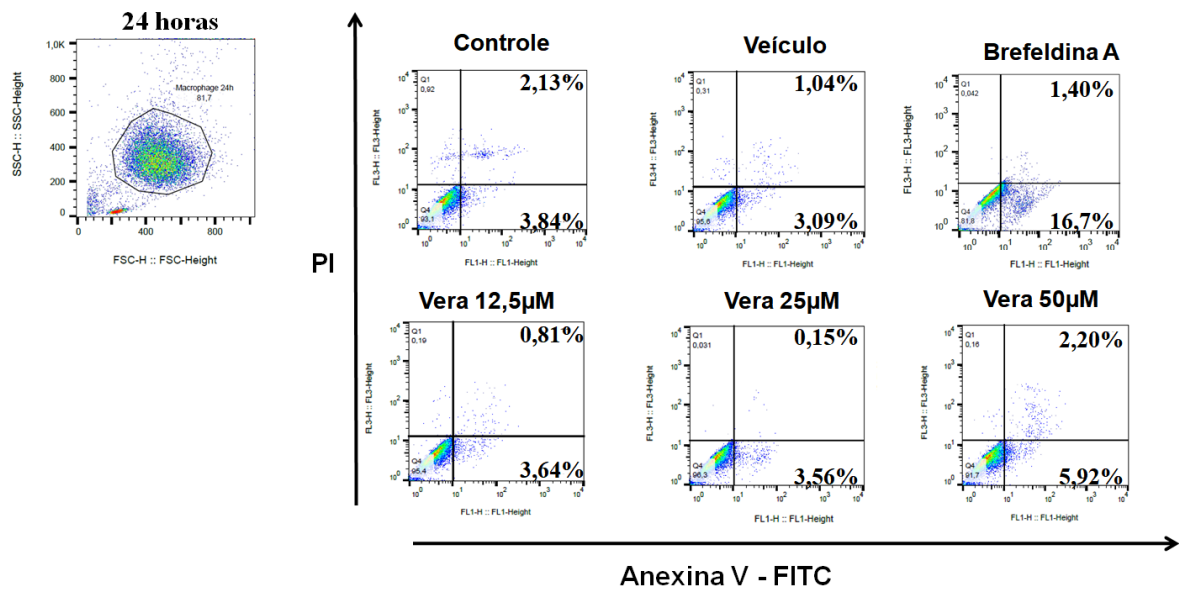
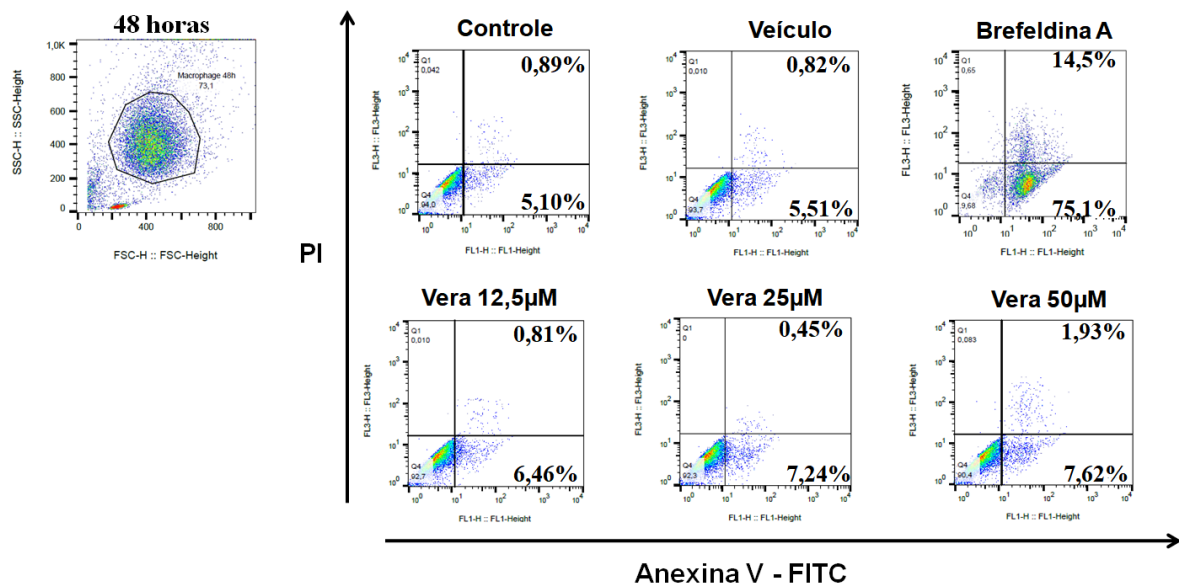
#### 4.7 Verapamil não altera a viabilidade de macrófagos de indivíduos saudáveis

Já que demonstramos que o IFN- $\gamma$  aumenta a secreção de IL-15 em células THP-1 estimuladas com *M. leprae* em um processo relacionado à ativação da autofagia, e é sabido que o processo autofágico é um fator importante durante o estabelecimento das formas resistentes e suscetíveis da hanseníase, buscamos avaliar novas estratégias terapêuticas de controle da doença através da modulação da autofagia. Decidimos avaliar o efeito do verapamil, que já possui aprovação para uso clínico em outras patologias, na indução de autofagia e inibição da replicação da micobactéria.

O verapamil tem a capacidade de inibir a captação de cálcio, tanto *in vitro* como *in vivo* (Yedinak, 1993). Fomos então avaliar os níveis de citotoxicidade do verapamil em macrófagos humanos. Como observado na **Figura 20A**, a viabilidade celular não foi alterada na presença desse fármaco, independente da concentração utilizada, quer pela avaliação do metabolismo celular por MTT ou pela avaliação do processo de apoptose e necrose, pelo kit de anexina V-PI (**Figura 20B-C**).

**A**



**B****C**

**Figura 20: Citotoxicidade do verapamil em macrófagos de indivíduos saudáveis.** (A) Curva de viabilidade celular dos macrófagos M2 após tratamento com concentrações crescentes de Verapamil (Vera 12,5, 25, 50µM) por 24, 48, 72h, medidas pelo ensaio MTT. Os dados expressos como % foram calculados usando a densidade óptica (DO) da seguinte forma:  $100 - (100 \times [\text{DO com o fármaco} / \text{DO sem o fármaco}])$ . Os resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada pelo teste Kruskal-wallis com pós-teste de Dunn. (B-C) A apoptose de macrófagos M2 tratados com verapamil foi avaliada pela marcação com AnexinaV-FITC (eixo x) e PI (eixo y) após 24 e 48h de cultura. Brefeldina A (10 µg/mL) foi utilizada como controle positivo para apoptose (Lee et al., 2013). A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSaria e a análise realizada no software FlowJo. Para cada amostra, foram analisados no mínimo 10.000 eventos. O dotplot é representativo de três experimentos independentes.

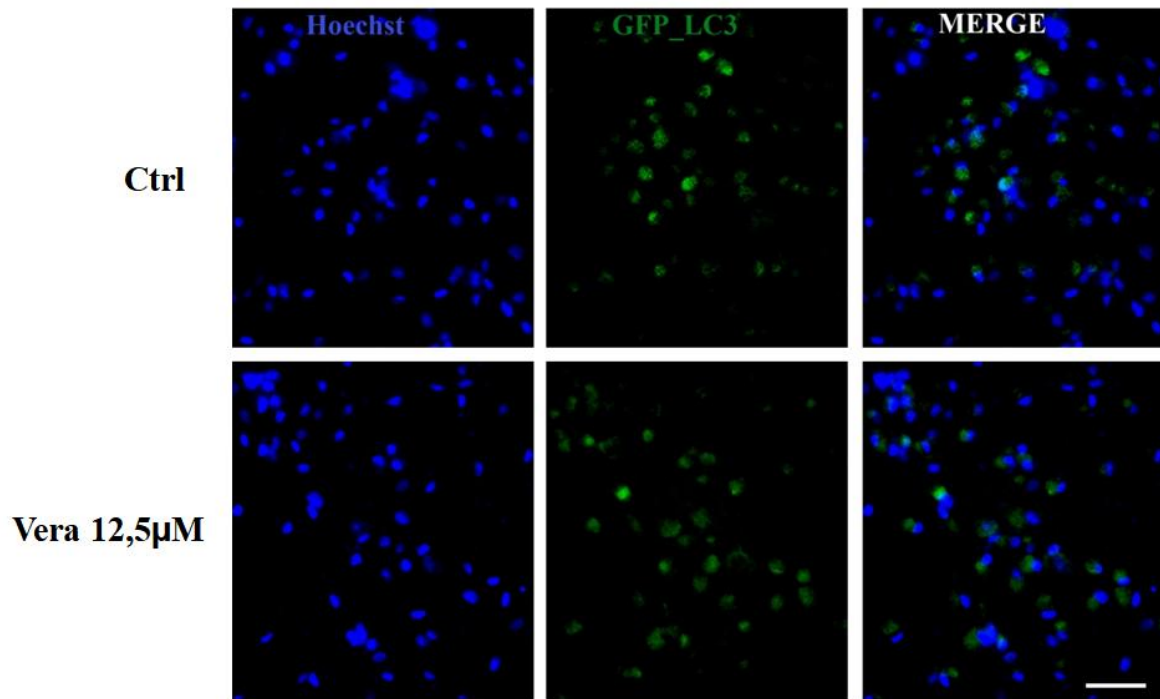
#### 4.8 Verapamil regula positivamente a indução de LC3-II em macrófagos de indivíduos saudáveis e da linhagem THP-1

A autofagia é um processo celular que auxilia a acidificação do fagossomo micobacteriano, levando à inibição do crescimento micobacteriano intracelular (Bradford et al., 2013, Yu et al., 2013). Visto que dados recentes na literatura têm mostrado que o verapamil é capaz de induzir o fluxo autofágico em células tumorais e células normais imortalizadas (Kania et al., 2017), buscamos avaliar a sua capacidade na indução do mecanismo autofágico em macrófagos de indivíduos saudáveis e da linhagem THP-1.

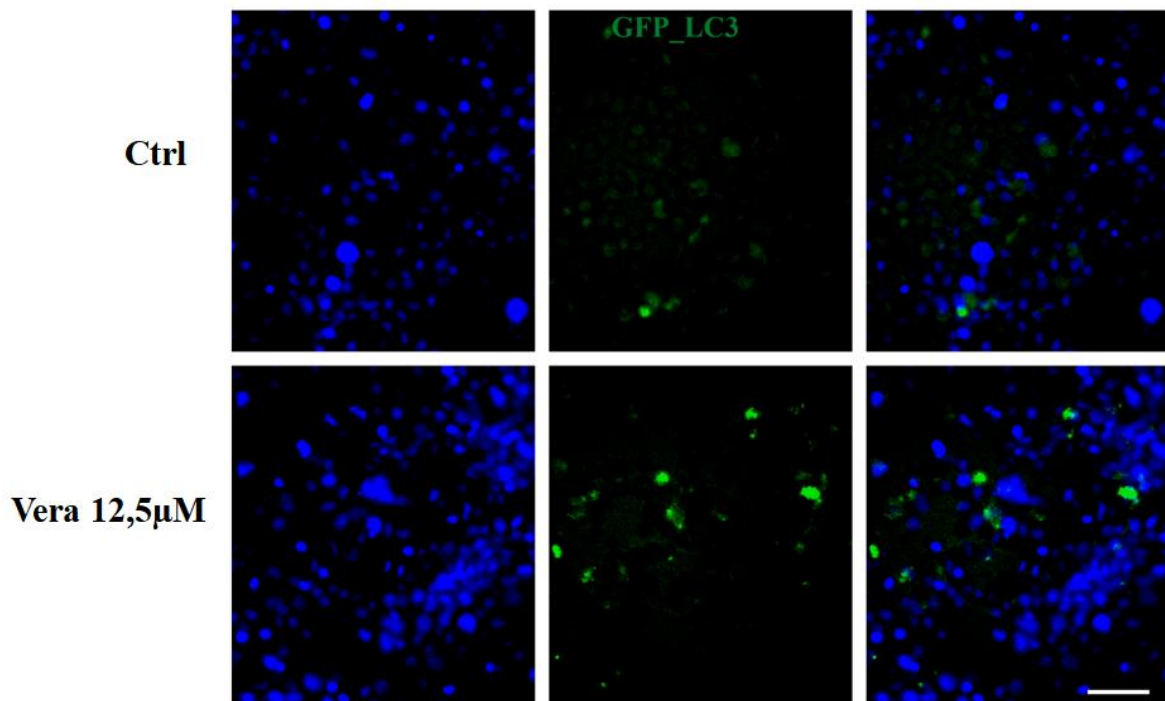
Para tal, utilizamos macrófagos primários e da linhagem THP-1 expressando GFP-LC3B obtidos através de transdução viral com Baculovirus (Life technologies). Para marcação de núcleos foi utilizado Hoechst 33342, visto que, observamos células vivas. Nossa análise revelou um número maior de células expressando LC3 puntiforme em macrófagos de indivíduos saudáveis e da linhagem THP-1 tratados com verapamil quando comparados às células tratadas com o veículo no tempo de 12h (Macrófagos M2: Vera 12,5  $\mu$ M =  $0,2943 \pm 0,06928$  versus veículo =  $0,0567 \pm 0,01750$ ) (**Figura 21A**). Além disso, o tratamento dos macrófagos com rapamicina (200 ng/mL), um potente indutor autofágico, foi capaz de aumentar significativamente a expressão de LC3-II (Rapa =  $0,3748 \pm 0,08746$ ) comparado ao veículo. A quantificação dos macrófagos expressando LC3-II é mostrada na **Figura 21B-G**. Desse modo, demonstramos que o verapamil é capaz de aumentar a formação de autofagossomos.

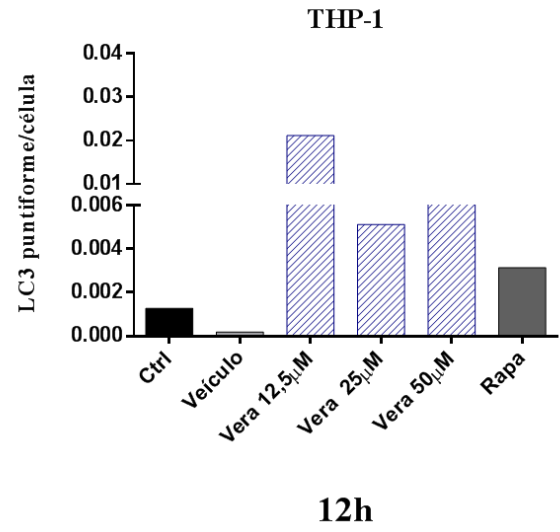
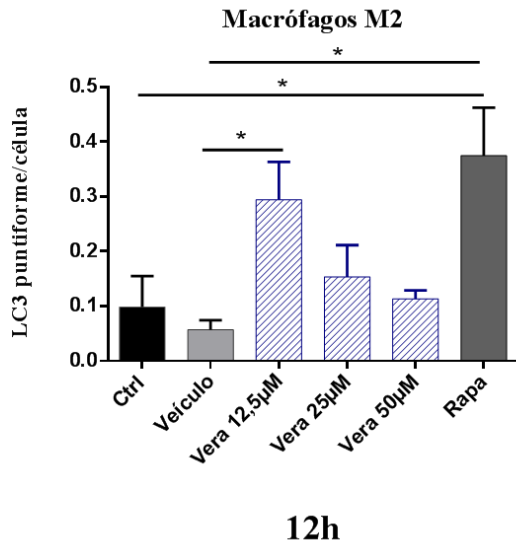
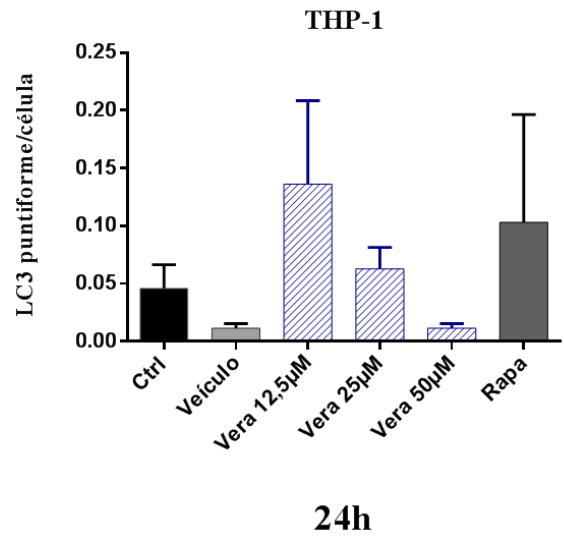
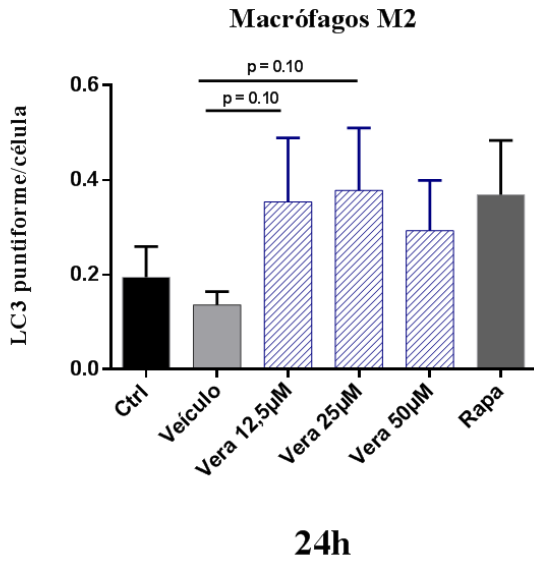
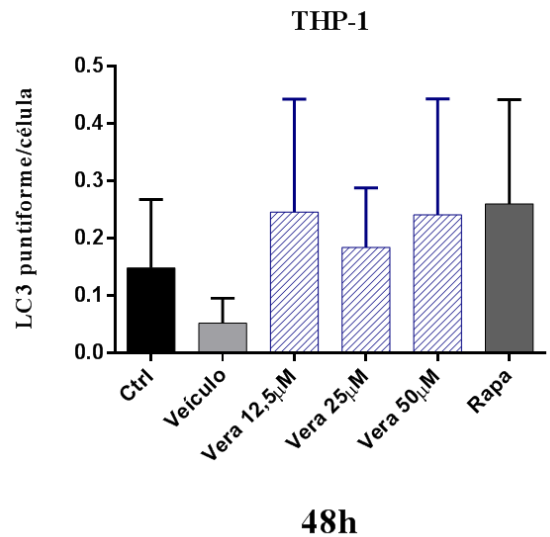
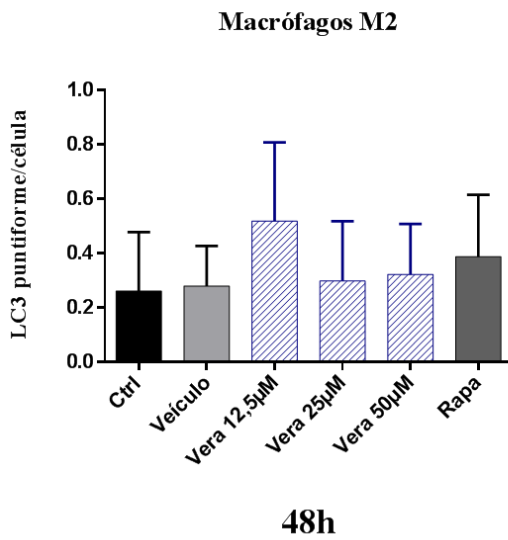
**A**

**Macrófagos M2**



**THP-1**



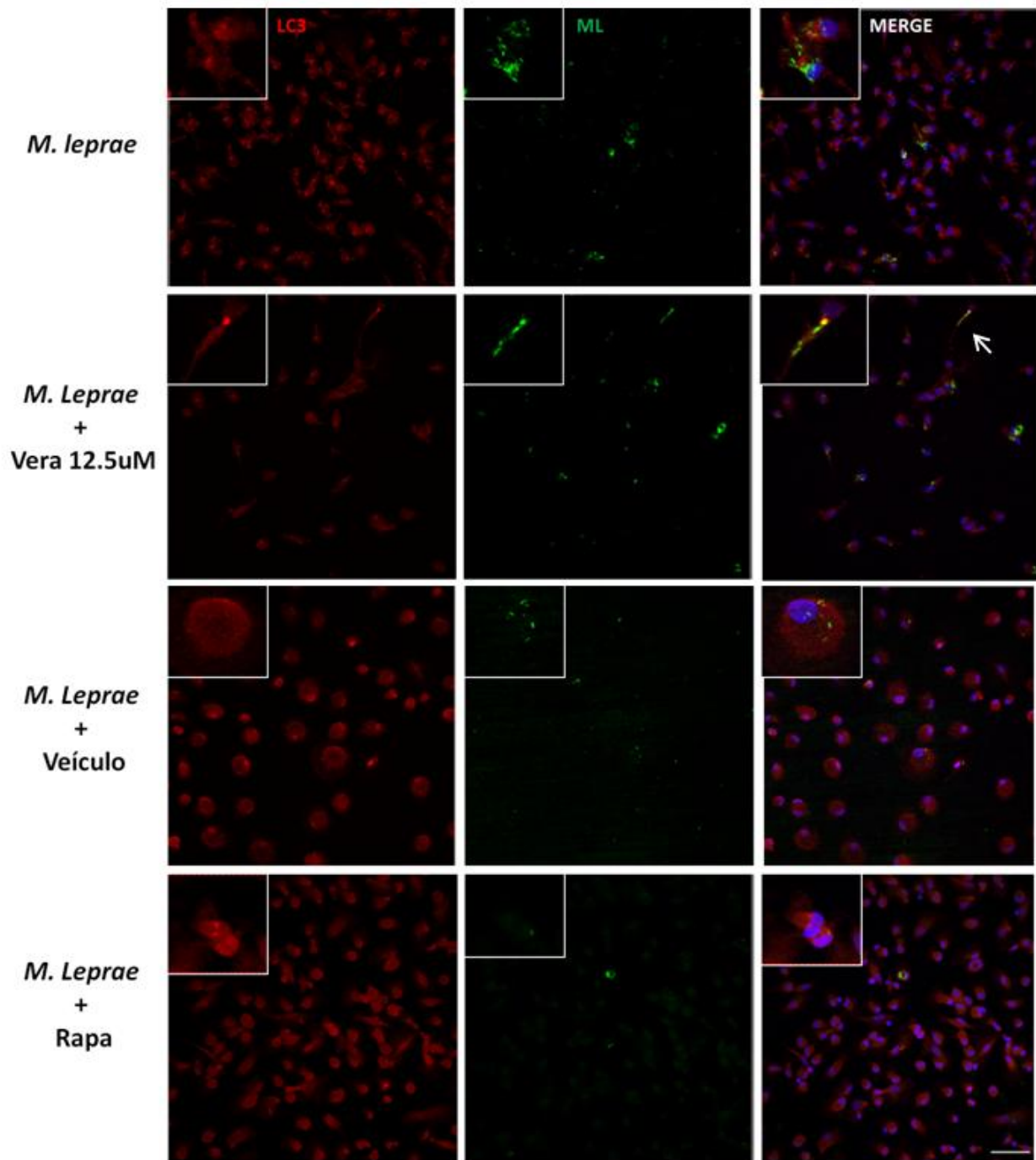
**B****C****D**

**Figura 21: Análise da expressão de LC3 em macrófagos de indivíduos sadios e da linhagem THP-1 após o tratamento com Verapamil, utilizando microscopia HCS (high content screening; CellImaging HCA System)** (A) Ensaio de detecção para GFP-LC3B (verde) em macrófagos de indivíduos sadios e macrófagos THP-1 tratados com diferentes concentrações de verapamil (12,5, 25 e 50 $\mu$ M), realizado através de bioimageamento por microscopia automatizada (HCA: análise de alto conteúdo), utilizando o equipamento da “Molecular Devices ImageXpress micro XLS”. A marcação nuclear foi realizada com Hoeschst 33342 (azul), visto que, observamos células vivas. Barra de escala: 50  $\mu$ m. (B) Análise quantitativa dos resultados obtidos pelo bioimageamento por microscopia automatizada. Tanto as imagens quanto as análises foram feitas automaticamente por microscopia HCS (high content screening; ImageXpress micro XLS HCA System), utilizando o software Metaxpress 6.0. Foi realizado um protocolo de análise selecionando os comprimentos de onda desejados para a análise, assim como a placa utilizada, nesse caso uma placa preta de 96 poços (Corning – ref: 3603). Cada experimento foi realizado em quadruplicata nos tempos de 12 (B), 24 (C) e 48h (D). Foram feitas 9 fotos em cada poço utilizando a objetiva de 20x e analisadas automaticamente pelo software. Os resultados são representativos de 4 experimentos independentes no tempo de 12h e 48h e 3 experimentos no tempo de 24h em macrófagos M2. Em relação a linhagem THP-1, os resultados são representativos de 1 experimento no tempo de 12h, 4 e 3 experimentos nos tempos de 24 e 48h, respectivamente. E a significância estatística foi calculada pelo teste Mann-Whitney. \* $P < 0,05$ .

#### **4.9 O verapamil induz a formação de autofagossomos em macrófagos humanos estimulados com *M. leprae***

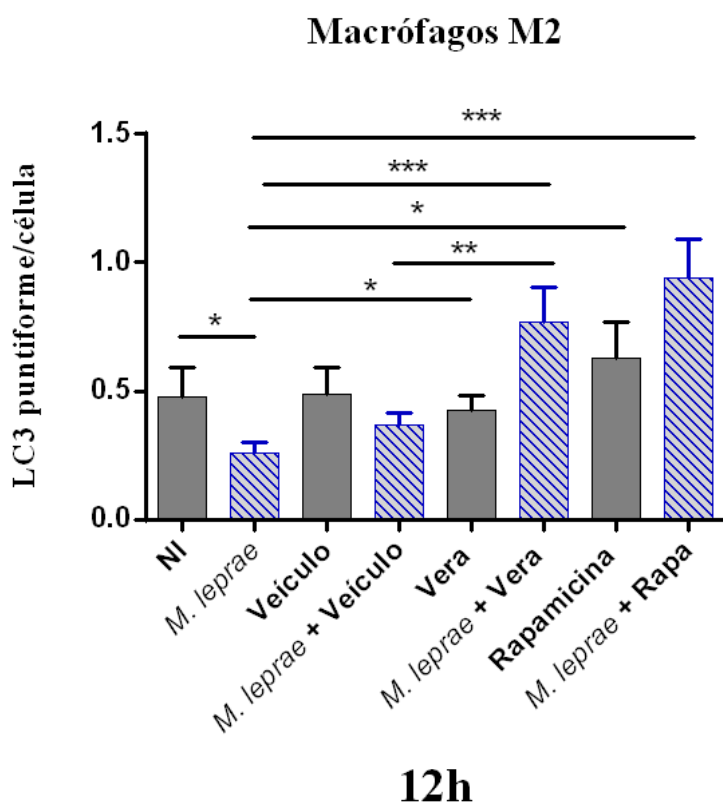
Em seguida, fomos investigar se *M. leprae* vivo poderia reduzir ou bloquear a ativação autofágica desencadeada pelo tratamento com verapamil em macrófagos de indivíduos sadios. Podemos observar que *M. leprae* vivo reduz a autofagia comparado ao NI (não infectado) (*M. leprae* = 0,2581  $\pm$  0,0425 versus NI 0,4760  $\pm$  0,1138). O tratamento com Vera 12,5  $\mu$ M não aumentou a expressão de LC3 comparado ao veículo (Vera 12,5  $\mu$ M = 0,4230  $\pm$  0,0578 versus veículo = 0,4889  $\pm$  0,1006). No entanto, os macrófagos infectados com o *M. leprae* e tratados apresentaram um aumento significativo na expressão de LC3 comparado aos macrófagos infectados com *M. leprae* na presença do veículo (*M. leprae* + Vera 12.5  $\mu$ M = 0,7683  $\pm$  0,1379 versus *M. leprae* + veículo = 0,3653  $\pm$  0,05176). Além disso, o tratamento em células previamente estimuladas com *M. leprae* foi capaz de aumentar significativamente a expressão puntiforme de LC3 em relação aos macrófagos humanos infectados apenas com *M. leprae* (*M. leprae* + Vera 12.5  $\mu$ M = 0,7683  $\pm$  0,1379 versus *M. leprae* = 0,2581  $\pm$  0,0425) (**Figura 22A-B**).

**A**





## B



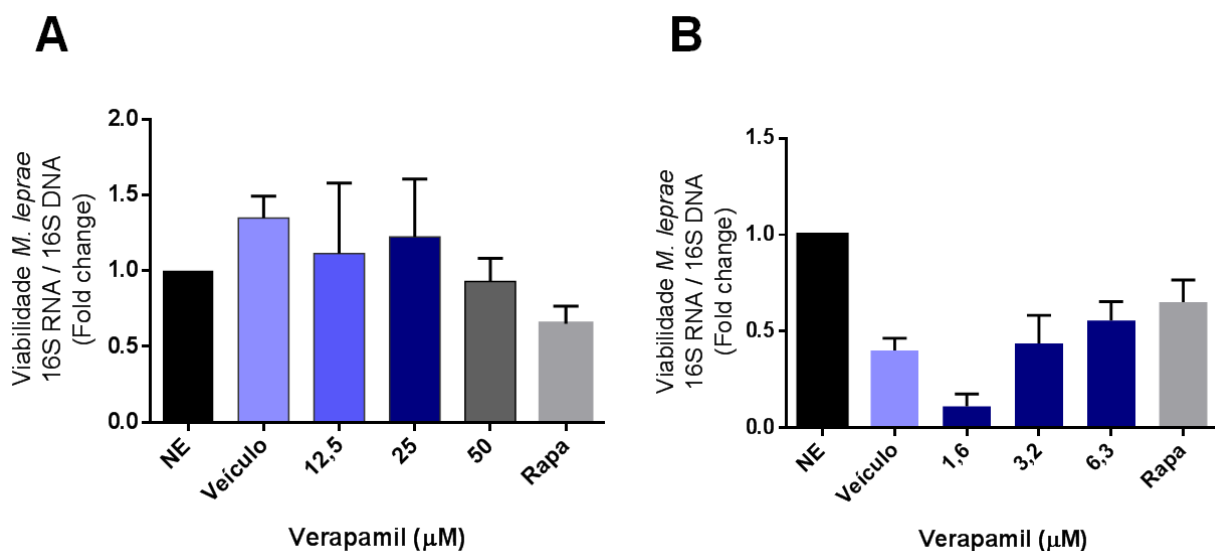
**Figura 22: O verapamil regula positivamente a indução de autofagossomos em macrófagos de indivíduos saudáveis estimulados com o *M. leprae*.** Os macrófagos foram infectados com *M. leprae* na MOI 20:1 por 18h (“overnight”) seguido do tratamento com 12,5  $\mu$ M de verapamil por 12 h e processados para análise da expressão do marcador LC3. (A) Detecção de LC3 (verde) durante a infecção por *M. leprae* (corado com PKH26; vermelho) em macrófagos de indivíduos saudáveis, foi avaliada por microscopia de imunofluorescência, sendo o núcleo corado com DAPI (em azul). DMSO foi utilizado como veículo (0,05% de DMSO). Barra de escala: 50  $\mu$ m. Setas indicam co-localização. As imagens são representativas de 3 experimentos. (B) Para as análises, cada experimento envolveu a contagem de pelo menos 100 células por amostra, em ao menos 10 campos randômicos. NI: Não infectado. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos independentes e a significância estatística foi calculada pelos testes Kruskal-wallis com pós-teste Dunn e Mann-Whitney (demonstrado no gráfico). \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

### 4.10 Avaliação da capacidade microbicida do verapamil em macrófagos M2

Em seguida, fomos avaliar a sobrevivência do bacilo em condições de indução de autofagia durante o tratamento com verapamil (12,5, 25 e 50 $\mu$ M), utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 20:1 (bactérias/células). Para isso, macrófagos foram infectados com *M. leprae* por 30 min, seguido do tratamento, onde a viabilidade intracelular do bacilo foi determinada pela razão entre os níveis de 16S cDNA pela detecção de 16S DNA (Martinez et al., 2009). Utilizando a MOI de 20:1 foi possível observar que nos três experimentos iniciais o tratamento parece ter beneficiado a viabilidade do bacilo após 48 h de infecção (**Figura 23A**). No entanto, ao repetir o ensaio com doses menores de verapamil, observamos uma redução na



viabilidade do bacilo nas doses de 1.6, 3.2 e 6.25  $\mu\text{M}$  (**Figura 23B**), de modo que não podemos ainda ter uma conclusão definitiva. Novos experimentos serão realizados, inclusive incluindo inibidores de autofagia como 3-MA e Wtm, para que possamos não apenas avaliar a capacidade microbicida, bem como determinar se um possível controle da carga bacilar pelo verapamil é realmente dependente da autofagia da célula hospedeira.

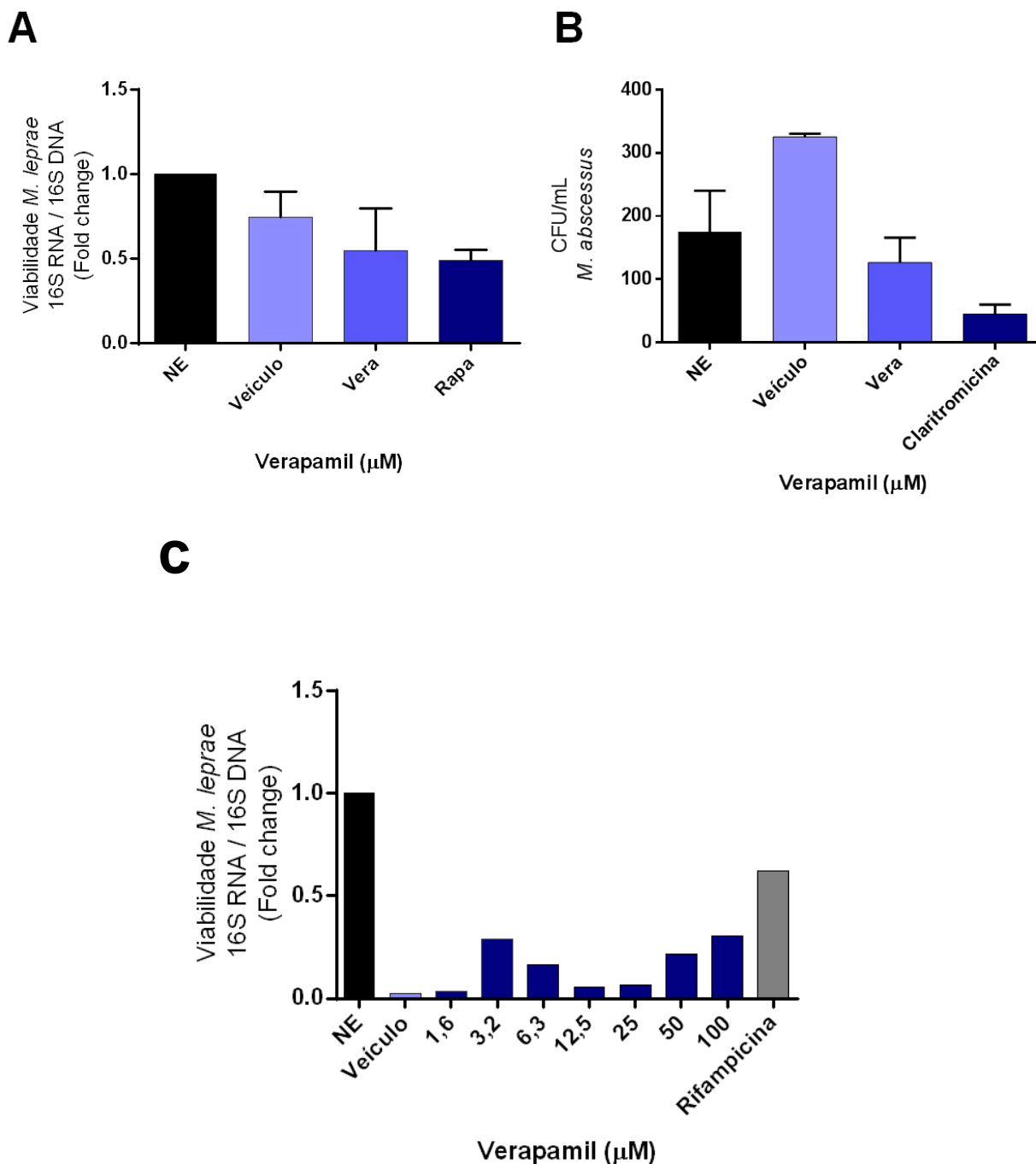


**Figura 23: Verapamil favorece a viabilidade do bacilo em macrófagos de indivíduos saudáveis.** Estimativa da viabilidade intracelular do *M. leprae* obtida pela razão da expressão de 16S RNA normalizada pela detecção 16S DNA nas células infectadas com *M. leprae* na presença ou ausência de Verapamil e rapamicina (200ng/mL) por 48h. Os dados mostrados representam a média ( $\pm$  SEM) de (A) 3 experimentos (nas doses 12,5, 25 e 50 $\mu\text{M}$ ) e (B) 2 experimentos (nas doses 1.6, 3.2 e 6.3 $\mu\text{M}$ ).

#### 4.11 O verapamil parece inibir o crescimento intracelular de *M. leprae* e *M. abscessus* em células THP-1

Recentemente, foi demonstrado que além de potencializar o efeito da bedaquilina contra *M. tuberculosis*, o verapamil também apresenta esse efeito contra *M. abscessus* em macrófagos THP-1 (Viljoen et al., 2019). Deste modo, o passo seguinte foi avaliar a sobrevivência intracelular do *M. leprae* e *M. abscessus* na linhagem THP-1 tratada. Para diferenciação *in vitro* do monócito THP-1 em macrófagos, as células foram suspensas em meio completo com SFB a 10% e PMA (Forbol 12-Miristato 13-Acetato) durante 24 h a 37 °C. Em seguida, macrófagos THP-1 foram infectados com *M. leprae* por 30 min, seguido do tratamento com verapamil. Nossos resultados mostram que na presença desse fármaco houve uma redução no número de bactérias intracelulares nas doses de 12,5  $\mu\text{M}$ , quando comparado à célula não tratada, indicando que a autofagia parece atuar como um

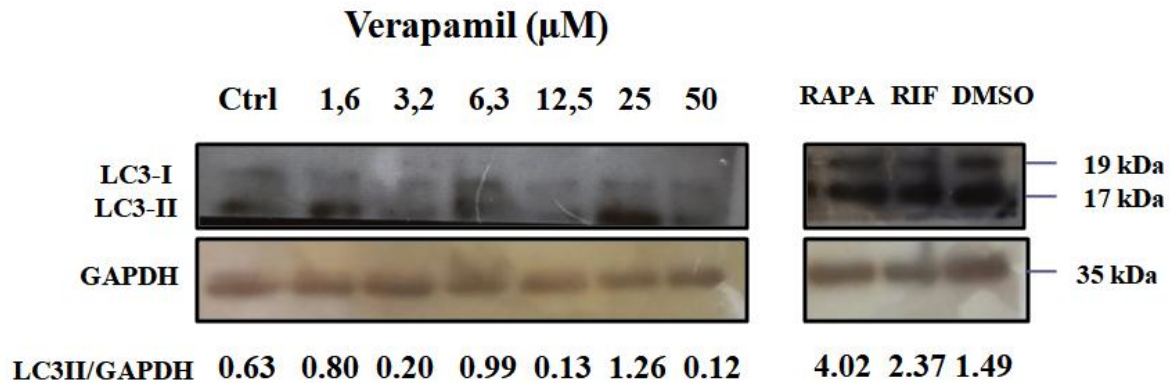
importante mecanismo no controle da viabilidade intracelular de *M. leprae* (**Figura 24A**) e *M. abscessus* (**Figura 24B**). Utilizando doses menores, observamos uma redução na viabilidade do *M. leprae* na dose de 1,6  $\mu\text{M}$ , bem como, nas doses de 12,5 e 25 $\mu\text{M}$  (**Figura 24C**).



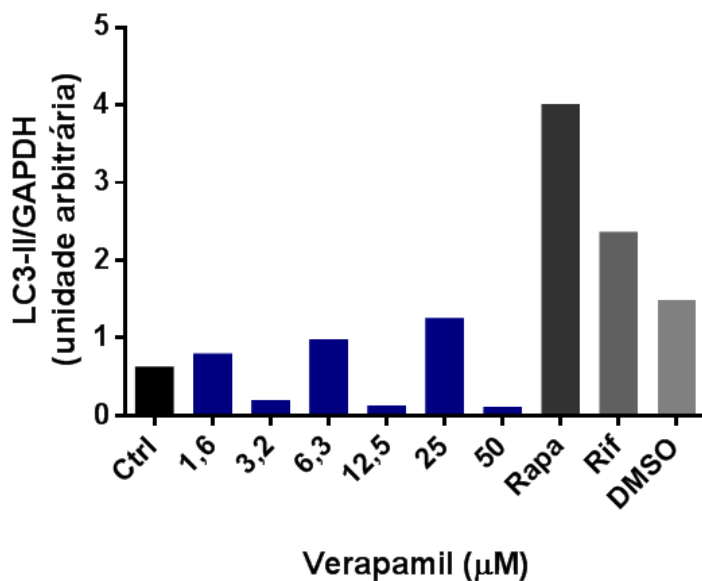
**Figura 24: Verapamil parece reduzir a viabilidade do bacilo em macrófagos THP-1.** (A) Estimativa da viabilidade intracelular do *M. leprae* obtida pela razão da expressão de 16S RNA normalizada pela detecção 16S DNA nas células infectadas com *M. leprae* na presença ou ausência de 12,5 $\mu\text{M}$  de Verapamil por 48h. Os resultados mostrados são representativos de 3 experimentos em simplicata. (B) Os macrófagos THP-1 foram infectados com *M. abscessus* por 4 h, e posteriormente, foram estimulados com diferentes concentrações de Verapamil por 24 h. O lisado de células foi preparado e plaqueado (100  $\mu\text{l}$  de cada grupo) em placas contendo meio ágar 7H10 para contagem das UFCs (unidades formadoras de colônias). A claritromicina foi utilizada como controle positivo. Os dados são representativos de 1 experimento biológico em duplicata (Vera 12,5 $\mu\text{M}$ ). (C) 1 experimento em simplicata (Vera nas doses 1,6, 3,2, 6,3, 12,5, 25, 50 e 100 $\mu\text{M}$ ).

Os dados acima mostram que as doses 1,6, 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  de verapamil foram capazes de reduzir a viabilidade de *M. leprae* em macrófagos THP-1. Desse modo, decidimos avaliar a conversão de LC3-I para LC3-II (PE) utilizando as mesmas concentrações. Para tal, macrófagos foram estimulados com diferentes doses de verapamil (1,6 - 50  $\mu\text{M}$ ), e após 18h foi realizado o *Western blotting*. Nessas condições, observamos que a proporção de LC3 presente na forma lipidada (LC3-II) foi maior em macrófagos THP-1 tratados com 1,6, 6,3 e 25  $\mu\text{M}$ . Na presença de rapamicina (200 ng/mL) e rifampicina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) o tratamento das células apresentou um efeito acentuado sobre a expressão de LC3-II (**Figura 25**).

**A**



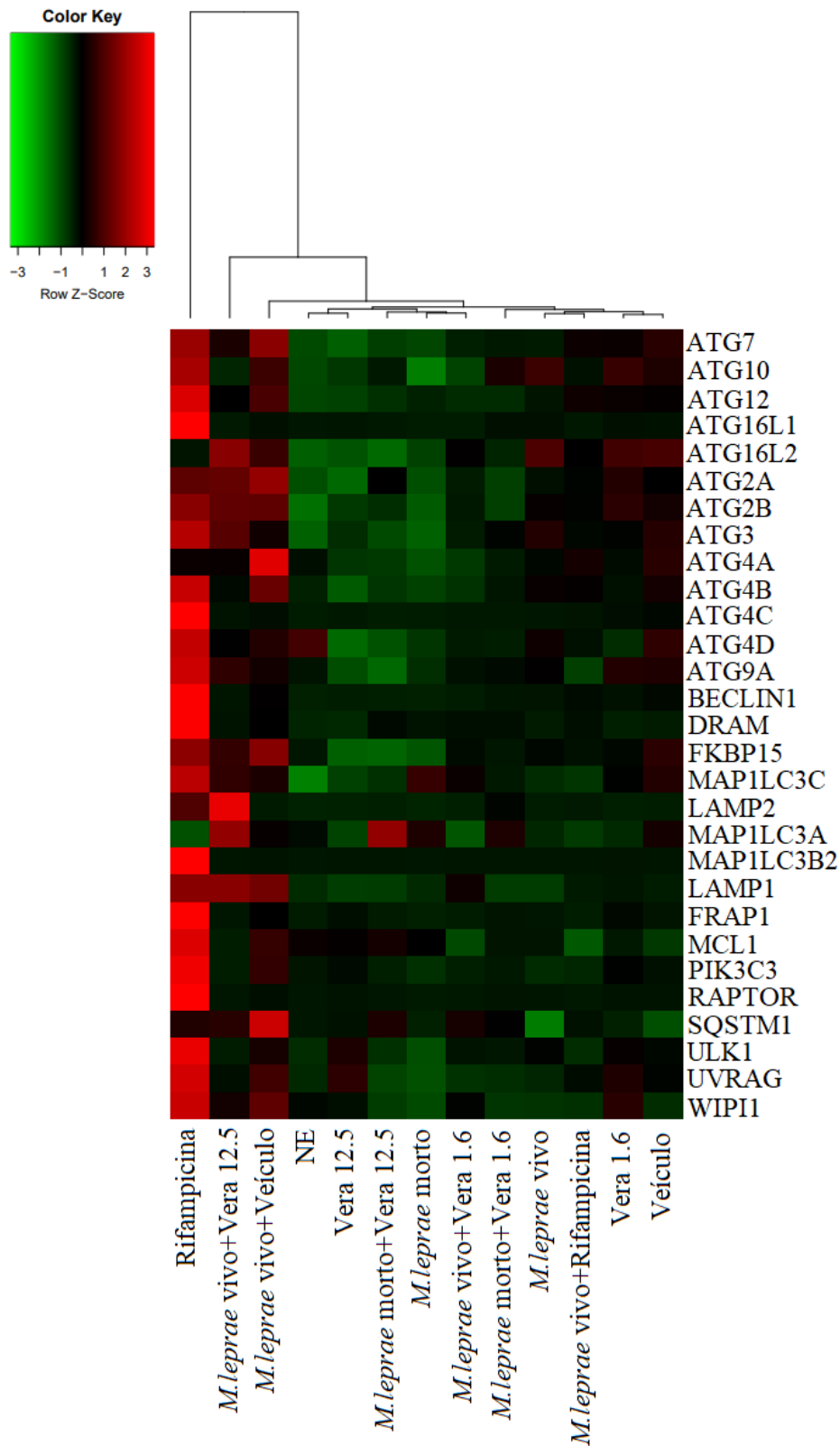
**B**



**Figura 25: Verapamil parece induzir a conversão de LC3-I para LC3-II em macrófagos THP-1.** (A) Macrófagos THP-1 foram diferenciados por 24 horas na presença de 200 nM de PMA, 10 ug/mL de rifampicina (Rif), 200 ng/mL de rapamicina (Rapa) e 1,6, 3,2, 6,3, 12,5, 25, 50  $\mu$ M de verapamil por 18 horas (overnight). A expressão de LC3 foi avaliada por *Western blotting* utilizando o anticorpo anti-LC3B. O anticorpo GAPDH foi usado para verificar o carregamento da quantidade de proteína. (B) A análise densitométrica foi realizada e os valores da razão LC3-II/GAPDH são mostrados. Os dados representam um único experimento em triplicata. Ctrl: controle (sem verapamil).

Dados anteriores de nosso grupo demonstraram que enquanto *M. leprae* morto induz autofagia em monócitos humanos primários e de linhagem, a micobactéria viável reduz a ativação da autofagia, sugerindo que *M. leprae* pode inibir a indução da autofagia como um mecanismo de escape da resposta imunológica (de Toledo-Pinto et al., 2016, Silva et al., 2017a). Por conta disso, nos perguntamos se o verapamil é capaz de reverter o bloqueio do fluxo autofágico induzido por *M. leprae* vivo. Para tal, avaliamos a regulação transcricional dos genes ATG, o que pode fornecer dados correlativos relacionados à indução da autofagia. Para esta finalidade, mRNAs isolados de macrófagos THP-1 tratados com *M. leprae* vivo (MOI 20:1) ou morto (20 $\mu$ g/mL), na presença ou ausência de 1,6 e 12,5  $\mu$ M de verapamil (**Figura 26**), foram analisados por RT-qPCR para obter os perfis de expressão gênica (29 genes) utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia.

Verapamil na dose de 12,5  $\mu$ M induziu uma regulação positiva de genes relacionados ao processo de autofagia em culturas infectadas com *M. leprae*. Os genes envolvidos na formação de autofagossomos *ATG16L2*; bem como, os genes envolvidos no sistema de ciclagem de ATG9 (*ATG9A*, *ATG2Ae* *ATG2B*); sistema de conjugação ATG8 (*MAP1LC3A* e *ATG3*) e vias lisossomais (*LAMP1* e *LAMP2*) foram regulados positivamente pelo fármaco em macrófagos THP-1 infectados com *M. leprae* (**Figura 26**).



**Figura 26: Perfis de expressão de genes associados à autofagia em células THP-1 estimuladas com *M. leprae* e/ou verapamil.** mRNAs de macrófagos THP-1 tratados com *M. leprae* vivo (20:1) ou morto (20 µg/mL), na presença ou ausência de verapamil (1,6µM e 12,5µM), assim como, os macrófagos tratados individualmente com 10 µg/mL de rifampicina, foram analisados por RT-qPCR usando um kit de PCR “array” da via de autofagia. O “Heat map” mostra a análise de expressão de genes relacionados à autofagia agrupados em diferentes categorias. Cada linha é representativa de um gene. O dado é representativo de 1 experimento em simplicata. Veículo (0,05% de DMSO).

## 5 DISCUSSÃO

T1R é uma condição patológica humana relacionada à hipersensibilidade tardia contra antígenos de *M. leprae* (Barbosa et al., 2018). O conhecimento dos mecanismos relacionados ao aparecimento de T1R é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle que sejam eficazes. É de fundamental importância o rápido diagnóstico e manejo da reação, pois constituem a maior causa de lesão no nervo periférico (observa-se a piora dos sinais neurológicos de perda de sensibilidade) e aumento das deformidades (perda de função muscular) relacionadas à patologia da hanseníase (Kamath et al., 2014, Croft et al., 2000). Em nosso estudo, verificamos que 13 genes relacionados à patogênese da T1R também são modulados em células estimuladas por *M. leprae* na presença de IFN- $\gamma$ , e que a IL-15 está envolvida na patogênese da T1R.

Estudos anteriores identificaram biomarcadores específicos para T1R (Walker et al., 2008, Geluk et al., 2012, Khadge et al., 2015) e há um consenso sobre o papel do IFN- $\gamma$  na patogênese desse episódio inflamatório (Geluk, et al., 2014, Teles, et al., 2019). A falta de um modelo experimental de hanseníase que reproduza não apenas as diferentes formas clínicas da doença, mas também seus episódios reacionais são fatores limitantes para o entendimento das etapas iniciais da patogênese de T1R. Outra limitação, relacionada à parte clínica, é que os sintomas de T1R não apresentam um início gradual, em vez disso, surgem de modo repentino e estão associados ao aumento das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-6, e quimiocinas como IP-10/CXCL-10 e MCP-1 (Teles et al., 2013, Chaitanya et al., 2013). Esse contexto inflamatório de T1R está associado à morte do bacilo, e a disseminação de antígenos, que são fatores importantes na progressão do episódio reacional. Baseado no papel do IFN- $\gamma$  durante a T1R, decidimos avaliar como esta citocina modula a função dos macrófagos infectados com *M. leprae*. Estudos anteriores de nosso grupo mostraram que o IFN- $\gamma$  induz a autofagia da célula hospedeira e está associado à atividade micobactericida do macrófago (Silva et al., 2017a). Além disso, descobrimos que o bloqueio da via de autofagia está associado ao desenvolvimento de T1R em pacientes multibacilares (a “downregulation” da autofagia no grupo T1R foi associado ao aumento da expressão de *NLRP3*, caspase-1 (p10) e da produção de IL-1 $\beta$ ) (Barbosa et al., 2018). O presente trabalho buscou avaliar se existe uma correlação entre a indução de autofagia em células

THP-1 diferenciadas em macrófagos estimuladas com IFN- $\gamma$  e *M. leprae* irradiado, e células de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram T1R durante o acompanhamento clínico.

A análise da indução de autofagia revelou que o IFN- $\gamma$  aumentou a formação de autofagossomos em células previamente estimuladas com *M. leprae*. IFN- $\gamma$  aumentou tanto a expressão de Atg3 quanto o fluxo autofágico em células estimuladas por *M. leprae*, que foi revertido pela Wtm (inibidor de PI3K, que inibe autofagia). O tratamento com IFN- $\gamma$  regulou positivamente a expressão de genes associados às vias de sinalização que regulam o metabolismo lipídico/obesidade (*RPTOR*) (Lee et al., 2016); tráfego de vesículas (*SEC23B*) (Graef et al., 2013); expansão de vesículas (*ATG7*, *ATG10* e *ATG16L2*); e adesão de lisossomos (*LAMP2*) (Graef et al., 2013) em células estimuladas por *M. leprae*. Também foi observada maior expressão de genes que fazem parte da maquinaria autofágica central, como o *ULK2*, um dos membros do complexo ATG1/ULK, que regula a montagem do autofagossomo (Feng et al., 2013). Também foi observado o aumento de *SQSTM1*, que funciona como uma proteína adaptadora ligando proteínas ubiquitinadas a LC3 (Kirkin et al., 2009), e *FKBP15*, que inibe mTOR quando forma um complexo com a rapamicina (Reichen et al., 2012).

Trabalhos anteriores mostraram que citocinas pró-inflamatórias podem induzir a formação de autofagossomos (Ge et al., 2018). Pacientes MB têm uma resposta imune predominantemente Th2, e citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 estão associadas à regulação negativa de autofagia, contribuindo para a carga bacilar aumentada nas células de pacientes MB (Silva et al., 2017a, Teles et al., 2013). Montoya e colaboradores (2009) demonstraram uma dicotomia na atividade de IL-15 e IL-10 em macrófagos de pacientes hansênicos. Embora a IL-15 seja induzida por IFN- $\gamma$  e induza uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3 em pacientes PB, a IL-10 induz a via fagocítica que é observada em macrófagos de pacientes MB (Montoya et al., 2009). Nós observamos que o IFN- $\gamma$  aumentou os níveis de IL-15 em células estimuladas por *M. leprae* e que a expressão de IL-15, mas não de IL-10, estava aumentada em células de pele de pacientes MB que desenvolveram T1R no momento do diagnóstico da forma não reacional. Nosso conjunto de dados sugere que antes dos sinais clínicos da reação, ocorrem alterações inflamatórias no microambiente cutâneo parcialmente moduladas pela IL-15. A pele humana é um órgão de endereçamento das células T, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, e a sinalização local por IL-15 é necessária para a formação de células

de memória de longa duração (Tokura et al., 2020). A T1R é caracterizada por um aumento de células T, o que sugere a ativação intravascular no início dos episódios reacionais (Dos Santos et al., 2016). Dados da literatura mostraram que a IL-15 está envolvida na proliferação e sobrevivência de células T de memória circulantes, e que a IL-15 induz fortemente a expressão de perforina e granzima B em células CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> CD49a<sup>+</sup> (Cheuk et al., 2017). Em pacientes co-infectados hanseníase-HIV, a T1R é caracterizada por um aumento da expressão de células T CD8<sup>+</sup> de memória efetora, que está associada ao aumento da gravidade de T1R nesses pacientes co-infectados (Oliveira et al., 2013). Apesar do papel relevante de células T CD8<sup>+</sup> na patogênese de T1R, decidimos focar na participação dos mecanismos imunes inatos relacionados ao aparecimento de T1R em pacientes MB. No entanto, não podemos ignorar o fato de que o recrutamento de células T da pele mediado por IL-15 pode contribuir para a produção local de IFN- $\gamma$ , contribuindo assim para um “feedback” positivo que resultará na produção de IL-15 por células da pele como queratinócitos e macrófagos.

Na literatura é descrito que no início da T1R ocorre alteração da organização e morfologia da lesão de pacientes MB, levando ao aparecimento de novas populações celulares, como células epitelióides, granulomas e uma diversidade fenotípica de macrófagos e células dendríticas (Andrade et al., 2015b). IFN- $\gamma$  estimula a produção de IL-15 por uma via dependente de Stat1, levando à conversão de vitamina D3 e ativação de uma via antimicrobiana mediada por autofagia, promovendo a fusão autolisossomal e o “clearance” de *M. tuberculosis* (Fabri et al., 2011, Yuk, et al., 2009). Nossos dados mostram que o bloqueio farmacológico da via de autofagia, mediado por 3-MA, levou à redução dos níveis de IL-15, mas não aumentou a produção de IL-10. A IL-15, assim como outras citocinas pró-inflamatórias, pode exercer ação parácrina e autócrina nas células, estimulando a autofagia, que por sua vez promoveria a produção de citocinas, fornecendo feedback positivo. Wang e colaboradores (2015) demonstraram que a IL-15 produzida pelas células dendríticas em resposta ao estresse se liga ao receptor de IL-15 nas células T CD4<sup>+</sup> e induz a expressão de CD40L, a proliferação de células T e produção de IFN- $\gamma$ . A expressão de CD40L em células T CD4<sup>+</sup> então reativam as moléculas de CD40 na célula dendrítica, induzindo sua maturação e expressão de IL-15, mantendo um feedback positivo (Wang et al., 2015). Já foi descrito que lesões cutâneas reacionais apresentam maior infiltração de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, além de maior reatividade imune celular contra antígenos do *M. leprae*



(Cooper et al., 1989). Desse modo, os macrófagos de lesões de pele de pacientes MB que evoluem para T1R são ativados e iniciam uma resposta imune contra os componentes do *M. leprae*, o que interrompe a imunossupressão induzida pela bactéria observada em células de pacientes MB no início de T1R.

A análise de interseção das listas de genes diferencialmente expressos revelou a presença de 13 genes comuns (17,6%) entre lesões de pele de T1R e células estimuladas por *M. leprae* + IFN- $\gamma$ . Entre esses genes, encontramos dois componentes centrais de vesículas de COPII (complexo de proteína de revestimento II), *SEC23* e *SEC24*; ambos estão envolvidos no tráfego de membrana entre RE e Golgi em leveduras e células animais (Richter et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que o complexo *SEC23/SEC24* é recrutado para a membrana do RE por SAR1, uma proteína G, que também participa do complexo de revestimento proteico (Zanetti et al., 2011, Amodio et al., 2013). Como um componente central das vesículas COPII, *SEC23* não está apenas envolvido no processo de transporte e secreção de proteínas nas células, mas também participa da autofagia e promove a sobrevivência de células cancerígenas. As funções de COPII na via autofágica foram conservadas durante a evolução (Ishihara et al., 2001, Reggiori et al., 2004, Lemus et al., 2016). Tan e colegas (2013) mostraram que o complexo TRAPP III (proteína transportadora de partículas) pode ser recrutado para o local de montagem do fagóforo durante a macroautofagia, uma vez que TRAPP III se liga à subunidade de revestimento *SEC23* do complexo COPII no local de montagem, fornecendo os componentes de membrana usadas na formação de autofagossomos (Tan et al., 2013). Ainda nesse contexto, foi descrito um mecanismo baseado na ação de ULK-FBXW5-*SEC23B*. Foi demonstrado que o *FBXW5* (“F-box and WD repeat domain containing 5”) pode inibir a biogênese do autofagossomo mediado por COPII ao marcar *SEC23B* para ser degradado na presença de nutrientes, enquanto ULK1 fosforila *SEC23B* em S186 e impede a interação de *SEC23B* e *FBXW5* inibindo a degradação de *SEC23B* durante o “starvation” celular, o que resulta na autofagia celular (Jing et al., 2019).

O gene *TPR* (um regulador nuclear da ativação de autofagia) também foi modulado, o que corrobora com estudos anteriores do nosso grupo onde foi observado que os genes *BECN1*, *GPSM3*, *ATG14*, *APOL1* e *TPR* são regulados positivamente nas células de pacientes PB comparado com as células de pacientes MB. Curiosamente, esses cinco genes também são regulados positivamente em lesões T1R. No entanto, o gene *TPR* mostrou o maior “fold-change” ao comparar

amostras de pacientes MB com e sem episódios de T1R (Silva et al., 2017a). O *TPR* desempenha um papel na autofagia através do controle da exportação de mRNA de Hsp70 e HSF1, tráfego de p53 e regulação direta da transcrição de fatores de autofagia (Funasaka et al., 2012, Dewi et al., 2020). Embora preliminares, nossos dados sugerem que o gene *TPR* poderia ter um papel regulador na indução de autofagia tanto na hanseníase PB quanto durante os episódios de T1R em pacientes MB. O gene *GPSM2* também está presente na lista de 13 genes comuns entre lesões de pele de T1R e células estimuladas por *M. leprae* + IFN- $\gamma$ . O *GPSM2* atua principalmente na regulação do ciclo celular e na estabilidade da divisão celular (Mochizuki et al., 1996).

Em síntese, nesse primeiro bloco de dados, observamos que a modulação de autofagia está associada à patogênese de T1R em pacientes MB e que os estímulos de IFN- $\gamma$  em células THP-1 estimuladas por *M. leprae* podem regular positivamente alguns genes que são expressos na pele de pacientes T1R. Nossos dados sugerem que a identificação de alvos que modulam as vias autofágicas durante a T1R pode levar à descoberta de novas estratégias terapêuticas baseadas no hospedeiro para controlar efetivamente a hanseníase e a T1R. Por conta disso, decidimos avaliar o efeito do verapamil (que já possui aprovação para uso clínico em outras patologias) na indução de autofagia e inibição da replicação da micobactéria.

Dando seguimento, avaliamos os níveis de citotoxicidade do verapamil em macrófagos humanos. Observamos que as concentrações utilizadas no presente estudo (até 50  $\mu$ M) não foram capazes de alterar a viabilidade celular. Como os estudos iniciais que avaliaram o efeito do fármaco e de seus análogos em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* mostraram uma associação entre a indução de autofagia e inibição da replicação intracelular da micobactéria (Abate et al., 2016), fomos avaliar se o verapamil era capaz de induzir a formação de autofagossomos em macrófagos M2 (diferenciados com M-CSF) e da linhagem THP-1. Na presença de *M. leprae*, a droga na dose de 12,5  $\mu$ M aumentou os níveis de LC3-II comparado ao bacilo sozinho. Além disso, observamos que o *M. leprae* vivo reduziu os níveis proteicos de LC3-II comparado ao não infectado. Este achado corrobora com dados do nosso grupo em que a micobactéria viável reduz a ativação da autofagia, sugerindo que *M. leprae* pode inibir a indução da autofagia como um mecanismo de escape da resposta imunológica (de Toledo-Pinto et al., 2016, Silva et al., 2017a).

Adicionalmente, apesar do número amostral reduzido, vimos que nas maiores doses utilizadas (12,5  $\mu$ M a 50  $\mu$ M), o verapamil parece favorecer a permanência do bacilo nas culturas de macrófagos M2 (macrófagos espumosos), efeito contrário ao observado nos macrófagos THP-1. Também vimos o aumento de LC3 na forma lipidada (LC3-II) (WB: 1,6, 6,3 e 25  $\mu$ M) em macrófagos THP-1. Entretanto, nas menores doses (até 6,3  $\mu$ M) observamos redução na viabilidade do *M. leprae* nos macrófagos M2. Foi descrito que *M. tuberculosis* induz a supressão da autofagia, o que resulta em acúmulo de lipídeos (Neyrolles et al., 2006, Singh et al., 2009). Estudos demonstraram que em macrófagos espumosos, os fagossomos contendo as micobactérias migram na direção de corpúsculos lipídicos e que isso resulta no engolfamento do bacilo em partículas lipídicas (de Chastellier et al., 2009). É possível que o encapsulamento do bacilo em um meio ambiente rico em lipídeos contribua para a manutenção do reservatório nutricional que permite a persistência do bacilo na célula hospedeira. A autofagia parece desempenhar um importante papel na mediação da reciclagem de triglicerídeos e ésteres de colesterol, os principais componentes dos corpúsculos lipídicos. Outros estudos mostraram que o verapamil (25mg/kg) induz autofagia (WB: Atg7, LC3, Beclina, p62), reduz o peso de ratos com fígado gorduroso (reduz o acúmulo de gotículas lipídicas), melhora a função hepática (hepatócitos) e promove a regeneração dos hepatócitos através da via de sinalização independente de mTOR (Lai et al., 2021). A fim de investigar como a lipotoxicidade e a obesidade afetam a autofagia, Park e colaboradores (2014) estabeleceram um sistema *in vitro* onde células de hepatocarcinoma humano (HepG2) exibem acúmulo de SQSTM1 e proteínas ubiquitinadas em corpos de inclusão insolúveis após tratamento com ácidos graxos saturados. Usando este sistema e um modelo de obesidade em camundongo, foi visto que o uso de verapamil restaura o fluxo autofágico e suprime as inclusões protéicas, não apenas nas células HepG2, mas também no fígado do camundongo, reduzindo o acúmulo de gotículas lipídicas hepáticas, resistência à insulina e esteatose hepática (Park et al., 2014). Desse modo, nos perguntamos se *M. leprae* consegue subverter a atividade autofágica do macrófago M2 mediada por verapamil, pela modulação de corpúsculos lipídicos. Esta hipótese é válida e serão necessários experimentos adicionais para determinar se o mecanismo pelo qual o bacilo consegue subverter o efeito pró-autofágico do fármaco ocorre pela modulação de corpúsculos lipídicos. Pensamos em marcar os corpúsculos lipídicos em macrófagos M2 e da linhagem THP-1 após a infecção de *M. leprae* vivo tratados com diferentes concentrações.

Além disso, com o objetivo de avaliar se a sua atividade micobactericida em macrófagos THP-1 é dependente de autofagia, utilizaremos os inibidores autofágicos 3-MA e Wtm na presença do *M. leprae* tratado.

Além de potencializar o efeito da bedaquilina contra *M. tuberculosis*, o verapamil também apresenta esse efeito contra *M. abscessus* em macrófagos THP-1 (Viljoen et al., 2019). Em resumo, o fármaco melhora a eficácia da atividade de bedaquilina contra isolados clínicos e cepas resistentes de *M. abscessus*, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A clofazimina e bedaquilina já estão sendo avaliadas quanto ao seu reposicionamento em ensaios clínicos contra infecções pulmonares causadas por *M. abscessus* (Viljoen et al., 2019) e isolados clínicos de *M. tuberculosis* (Xu et al., 2017). Baseado nessas informações, fomos avaliar o efeito do verapamil em outras micobactérias a fim de investigar se ele possui efeito seletivo, para isso utilizamos o *M. abscessus* (cepa CCUG) e células THP-1. Nossos resultados mostram uma redução no número de bactérias intracelulares nas doses de 12,5 µM, quando comparado à célula não tratada, indicando que a autofagia parece atuar como um importante mecanismo no controle da viabilidade intracelular de *M. abscessus*.

Uma perspectiva promissora no controle de doenças infecciosas é o reposicionamento de fármacos, sendo utilizado de forma isolada ou complementar aos tratamentos existentes. Canezin e colaboradores (2018) mostraram que o uso de rifampicina combinado ao verapamil em macrófagos THP-1 causou “downregulation” de 54,5% (6/11) genes da bomba de efluxo em *M. tuberculosis* (cepa H37Rv) (Canezin et al., 2018). Como o verapamil é um inibidor da glicoproteína P, essa atividade anti-TB (tuberculose) geralmente está relacionada à inibição de bombas de efluxo que são constitutivas ou induzidas pela aquisição de resistência ao fármaco (Coelho et al., 2014, Srikrishna et al., 2015). Em camundongos, a adição deste fármaco ao regime medicamentoso de primeira linha acelerou a esterilização dos pulmões infectados (Gupta et al., 2013). Esses achados comprovam que o verapamil pode potencializar os medicamentos anti-TB na clínica (Srikrishna et al., 2015). Ainda nesse contexto, já é descrito um colapso no potencial de membrana de *M. tuberculosis* causado pelo tratamento, fornecendo uma possível explicação para a sinergia relatada com fármacos anti-TB que requerem fosforilação oxidativa (Chen et al., 2018).

O presente estudo demonstrou que o verapamil foi capaz de reduzir a viabilidade do *M. leprae* e *M. abscessus* em macrófagos THP-1, mas não em

macrófagos M2 (nas maiores doses utilizadas). Em conjunto, esses dados contribuem para uma maior compreensão dos mecanismos de controle micobacteriano, com implicações promissoras no desenvolvimento de alternativas de tratamento na prevenção da hanseníase e da T1R. No entanto, ainda iremos realizar novos ensaios para identificar o efeito pró autofágico do verapamil em células de lesão de pele de pacientes com hanseníase. Do mesmo modo, pretendemos identificar a interação desse fármaco, com rifampicina e clofazimina.

## 6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados no presente estudo nos permitem concluir que IFN- $\gamma$  é uma citocina chave na modulação da autofagia nas células de pele dos pacientes com reação tipo 1 e, devido a inexistência de modelos experimentais, pode-se utilizar um modelo *in vitro* através do estímulo com IFN- $\gamma$  em células THP-1 diferenciadas, visando mimetizar a modulação da via autofágica em células de lesão de pele de pacientes reacionais. Em conjunto, demonstramos que a indução de IL-15 por IFN- $\gamma$  está associada ao desenvolvimento de T1R em pacientes multibacilares. Uma vez que a autofagia é inibida pela micobactéria para garantir sua sobrevivência na célula hospedeira, demonstramos que o verapamil é capaz de induzir autofagia em macrófagos humanos primários e de linhagem celular diferenciados *in vitro*, não afetando a viabilidade das células hospedeiras e que uma redução na viabilidade do bacilo foi observada em culturas de macrófagos THP-1 diferenciados com PMA, infectados com *M. leprae*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G. et al. New Verapamil Analogs Inhibit Intracellular Mycobacteria without Affecting the Functions of Mycobacterium-Specific T Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 3, p. 1216–1225, 1 mar. 2016.

AFSAL, K.; SELVARAJ, P.; HARISHANKAR, M. 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 downregulates cytotoxic effector response in pulmonary tuberculosis. *International immunopharmacology*, v. 62, p. 251–260, 1 set. 2018.

ALARCÓN DE LA LASTRA, C.; VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society transactions*, v. 35, n. 5, p. 1156–1160, nov. 2007.

ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4<sup>a</sup> ed. New York: Garland Science, 2002.

ALERS, S. et al. The incredible ULKs. *Cell communication and signaling: CCS*, v. 10, n. 1, 2012.

ALIPRANTIS, A. O. et al. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science*, v. 285, n. 5428, p. 736–739, 30 jul. 1999.

AMODIO, G. et al. Endoplasmic Reticulum stress reduces COPII vesicle formation and modifies Sec23a cycling at ERESs. *FEBS Letters*, v. 587, n. 19, p. 3261–3266, 1 out. 2013.

ANDRADE, P. R. et al. CD 123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type 1 reaction. *British Journal of Dermatology*, v. 172, n. 1, p. 268–271, 2015a.

ANDRADE, P. R. et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert review of clinical immunology*, v. 11, n. 3, p. 391–407, 2015b.

ARIAS, E.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 23, n. 2, p. 184–189, 1 abr. 2011.

AZIZ, D. B. et al. Rifabutin Is Active against Mycobacterium abscessus Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 6, p. e00155-17, 1 jun. 2017.

BAH, A.; LACARRIÈRE, C.; VERGNE, I. Autophagy-related proteins target ubiquitin-free mycobacterial compartment to promote killing in macrophages. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, n. 53, 11 maio 2016.

BAILEY, M. A. et al. Nitazoxanide is active against Mycobacterium leprae. *PLOS ONE*, v. 12, n. 8, p. e0184107, 1 ago. 2017.

BARBIERI, R. R. et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 109, n. 7, p. 944–947, 14 out. 2014.

BARBOSA, M. G. DE M. et al. Autophagy impairment is associated with increased inflammasome activation and reversal reaction development in multibacillary leprosy. Frontiers in Immunology, v. 9, n. JUN, p. 1223, 4 jun. 2018.

BELONE, A. DE F. F. et al. Genome-Wide Screening of mRNA Expression in Leprosy Patients. Frontiers in genetics, v. 6, n. 334, 2015.

BERGSON, P. et al. Verapamil block of T-type calcium channels. Molecular pharmacology, v. 79, n. 3, p. 411–419, mar. 2011.

BERNADES GOULART, I. M. et al. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35, n. 5, p. 453–460, 2002.

BHAT, S. A.; IQBAL, I. K.; KUMAR, A. Imaging the NADH:NAD + Homeostasis for Understanding the Metabolic Response of Mycobacterium to Physiologically Relevant Stresses. Frontiers in cellular and infection microbiology, v. 6, n. 145, 8 nov. 2016.

BONA, S. H. et al. Recidivas de hanseníase em Centros de Referência de Teresina, Piauí, 2001-2008. Epidemiologia e Serviços de Saúde, v. 24, n. 4, p. 731–738, out. 2015.

BRADFUTE, S. B. et al. Autophagy as an immune effector against tuberculosis. Current opinion in microbiology, v. 16, n. 3, p. 355, jun. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. SCTIE. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2020 [Internet]. Brasília/DF; 217 p. 2020. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Rename-2020-final.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. SCTIE. Formulário Terapêutico Nacional - FTN [Internet]. Brasília; 2018. Disponível em: APP MEDSUS

BRASIL. Laboratório Farmacêutico da Marinha. Bula LFM-Ofloxacino 400mg [Internet]. 2021b. Disponível em: [https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=LFM – OFLOXACINO](https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=LFM-OFLOXACINO)

BRASIL. Anvisa. Ranbaxy - Bula Cloridrato de Minociclina [Internet]. 2021c. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/bulario/q/?nomeProduto=CLORIDRATO DE MINOCICLINA>

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Relatório Conitec nº 310: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. 2021a. [acessado fev 11 2022]. Disponível em:



[http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211223\\_PCDT\\_Hansenias e.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211223_PCDT_Hansenias e.pdf)

BRATSCHI, M. W. et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Leprosy review*, v. 86, n. 2, p. 142–155, 2015.

BRICKMAN, M.; PARSA, A. A.; PARSA, F. D. *Mycobacterium chelonae* infection after breast augmentation. *Aesthetic plastic surgery*, v. 29, n. 2, p. 116–118, abr. 2005.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. *Lancet*, v. 363, n. 9416, p. 1209–1219, 10 abr. 2004.

BROWN, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 10, p. 620–630, 2015.

CAMPOY, E.; COLOMBO, M. I. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1793, n. 9, p. 1465–1477, 1 set. 2009.

CANEZIN, P. H. et al. Intramacrophage *Mycobacterium tuberculosis* efflux pump gene regulation after rifampicin and Verapamil exposure. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 73, n. 7, p. 1770–1776, 1 jul. 2018.

CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N. et al. Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models. *Oxidative medicine and cellular longevity*, v. 2013, n. 598493, 2013.

CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology*, v. 6, n. 5, p. 533–549, 2011.

CELDRÁN, A. et al. Wound infections due to *Mycobacterium fortuitum* after polypropylene mesh inguinal hernia repair. *The Journal of hospital infection*, v. 66, n. 4, p. 374–377, ago. 2007.

CEMMA, M.; BRUMELL, J. H. H. Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. *Current biology: CB*, v. 22, n. 13, p. R540–R545, 1 jul. 2012.

CHAITANYA, V. S. et al. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. *Immunology letters*, v. 156, n. 1–2, p. 159–167, nov. 2013.

CHAUHAN, S.; MANDELL, M. A.; DERETIC, V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Molecular cell*, v. 58, n. 3, p. 507–521, 7 maio 2015.

CHEN, C. et al. Verapamil Targets Membrane Energetics in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 5, p. e02107-17, 1 maio 2018.

CHEN, Y.; KLIONSKY, D. J. The regulation of autophagy – unanswered questions. *Journal of Cell Science*, v. 124, n. 2, p. 161–170, 15 jan. 2011.

CHEUK, S. et al. CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8 + T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity*, v. 46, n. 2, p. 287–300, 21 fev. 2017.

CHOI, A. M. K.; RYTER, S. W.; LEVINE, B. Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 368, n. 7, p. 651–662, 14 fev. 2013.

CHOI, S. W. et al. Ambroxol Induces Autophagy and Potentiates Rifampin Antimycobacterial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 9, p. e01019-18, set. 2018.

CHOPRA, S. et al. Identification of antimicrobial activity among FDA-approved drugs for combating Mycobacterium abscessus and Mycobacterium chelonae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 66, n. 7, p. 1533–1536, jul. 2011.

COELHO, A. A. M. et al. Micobactérias isoladas de tatus dasypus novemcinctus inoculados com Mycobacterium leprae. *Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas*, v. 13, n. 2, p. 42–46, 1988.

COELHO, T. et al. Enhancement of antibiotic activity by efflux inhibitors against multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Brazil. *Frontiers in microbiology*, v. 6, n. 630, p. 1–12, 2015.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 2001.

COONEY, R. et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nature Medicine*, v. 16, n. 1, p. 90–97, 6 dez. 2009.

COOPER, C. L. et al. Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *The Journal of experimental medicine*, v. 169, n. 5, p. 1565–1581, 1989.

CROFT, R. P. et al. A clinical prediction rule for nerve-function impairment in leprosy patients. *Lancet*, v. 355, n. 9215, p. 1603–1606, 2000.

CUERVO, A. M.; WONG, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Research*, v. 24, n. 1, p. 92–104, 26 nov. 2013.

D. MILITELLO, R.; I. COLOMBO, M. A membrane is born: origin of the autophagosomal compartment. *Current molecular medicine*, v. 11, n. 3, p. 197–203, 1 nov. 2011.

DANG, A. T. et al. Autophagy links antimicrobial activity with antigen presentation in Langerhans cells. *JCI Insight*, v. 4, n. 8, p. e126955, 4 abr. 2019.

DE CARVALHO, F. M. et al. Interruption of persistent exposure to leprosy combined or not with recent BCG vaccination enhances the response to *Mycobacterium leprae* specific antigens. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 5, p. e0005560, 3 maio 2017.

DE CHASTELLIER, C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology*, v. 214, n. 7, p. 526–542, 2009.

DE OLIVEIRA, A. L. et al. Role of CD8+ T cells in triggering reversal reaction in HIV/leprosy patients. *Immunology*, v. 140, n. 1, p. 47–60, set. 2013.

DE TOLEDO-PINTO, T. G. et al. STING-Dependent 2'-5' Oligoadenylate Synthetase-Like Production Is Required for Intracellular *Mycobacterium leprae* Survival. *The Journal of infectious diseases*, v. 214, n. 2, p. 311–320, 15 jul. 2016.

DEPS, P.; COLLIN, S. M. *Mycobacterium lepromatosis* as a Second Agent of Hansen's Disease. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, 10 set. 2021.

DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews Immunology*, v. 13, n. 10, p. 722–737, out. 2013.

DETER, R. L.; DE DUVE, C. Influence of Glucagon, an Inducer of Cellular Autophagy, on Some Physical Properties of Rat Liver Lysosomes. *Journal of Cell Biology*, v. 33, n. 2, p. 437–449, 1 maio 1967.

DEWEY, A. et al. Dapsone as an oral corticosteroid sparing agent for asthma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 4, p. CD003268, 21 out. 2002.

DEWI, F. R. P. et al. Nucleoporin TPR (translocated promoter region, nuclear basket protein) upregulation alters MTOR-HSF1 trails and suppresses autophagy induction in ependymoma. *Autophagy*, v. 17, n. 4, p. 1001–1012, 2021.

DICE, J. F. et al. A selective pathway for degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Seminars in Cell Biology*, v. 1, n. 6, p. 449–455, 1 dez. 1990.

DINIZ, L. M.; CATABRIGA, M. D. DE S.; FILHO, E. B. DE S. Avaliação de hansenianos tratados com esquema alternativo dose única ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina), após sete a nove anos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 6, p. 695–699, 2010.

DOS SANTOS, L. N. et al. Role of TEFECTOR/MEMORY Cells, TBX21 Gene Expression and T-Cell Homing Receptor on Type 1 Reaction in Borderline Lepromatous Leprosy Patients. *PLOS ONE*, v. 11, n. 10, p. e0164543, 1 out. 2016.

DOUSA, K. M. et al. Ibrutinib Therapy and *Mycobacterium chelonae* Skin and Soft Tissue Infection. *Open forum infectious diseases*, v. 5, n. 7, 1 jul. 2018.

DÜPPRE, N. C. et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 102, n. 7, p. 631–638, 1 jul. 2008.

DUTTA, N. K.; PINN, M. L.; KARAKOUSIS, P. C. Metformin Adjunctive Therapy Does Not Improve the Sterilizing Activity of the First-Line Antitubercular Regimen in Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 8, p. e00652-17, 1 ago. 2017.

DWIVEDI, M.; SONG, H. O.; AHNN, J. Autophagy genes mediate the effect of calcineurin on life span in *C. elegans*. *Autophagy*, v. 5, n. 5, p. 604–607, 1 jul. 2009.

FABRI, M. et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Science translational medicine*, v. 3, n. 104, 12 out. 2011.

FALKINHAM, J. O. Nontuberculous Mycobacteria from Household Plumbing of Patients with Nontuberculous Mycobacteria Disease. *Emerging Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 419–424, mar. 2011.

FENG, Y. et al. The machinery of macroautophagy. *Cell Research*, v. 24, n. 1, p. 24–41, 24 dez. 2013.

FERRARI, E. et al. Cysteamine re-establishes the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophages bearing the cystic fibrosis-relevant F508del-CFTR mutation. *Cell Death & Disease*, v. 8, n. 1, p. e2544, 1 jan. 2017.

FIORCARI, S. et al. Ibrutinib modifies the function of monocyte/macrophage population in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, v. 7, n. 40, p. 65968–65981, 2016.

FOSS, N. T. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 30, n. 3, p. 335–339, 1997.

FRANCO, L. H. et al. The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of *Mycobacterium tuberculosis* and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 1, p. 59–72, 11 jan. 2017.

FRANCO-PAREDES, C. et al. Cutaneous Mycobacterial Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 1, p. e00069-18, 1 jan. 2019.

FREEZE, B. S.; MCNULTY, M. M.; HANCK, D. A. State-dependent Verapamil block of the cloned human Ca(v)3.1 T-type Ca(2+) channel. *Molecular pharmacology*, v. 70, n. 2, p. 718–726, 2006.

FRETHAM, S. J. B.; CARLSON, E. S.; GEORGIEFF, M. K. Neuronal-Specific Iron Deficiency Dysregulates Mammalian Target of Rapamycin Signaling during Hippocampal Development in Nonanemic Genetic Mouse Models. *The Journal of Nutrition*, v. 143, n. 3, p. 260–266, mar. 2013.

FUNASAKA, T.; TSUKA, E.; WONG, R. W. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Scientific Reports*, v. 2, n. 1, p. 1–9, 20 nov. 2012.

GATICA, D.; LAHIRI, V.; KLIONSKY, D. J. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature cell biology*, v. 20, n. 3, p. 233–242, 1 mar. 2018.

GE, Y.; HUANG, M.; YAO, Y. MING. Autophagy and proinflammatory cytokines: Interactions and clinical implications. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 43, p. 38–46, 1 out. 2018.

GEISLER, S. et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, v. 12, n. 2, p. 119–131, 24 jan. 2010.

GELUK, A. et al. New Biomarkers with Relevance to Leprosy Diagnosis Applicable in Areas Hyperendemic for Leprosy. *Journal of Immunology*, v. 188, n. 10, p. 4782–4791, 5 maio 2012.

GELUK, A. et al. Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. *Journal of clinical immunology*, v. 34, n. 2, p. 245–255, 1 fev. 2014.

GENESTET, C. et al. Antituberculous drugs modulate bacterial phagolysosome avoidance and autophagy in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. *Tuberculosis*, v. 111, p. 67–70, 1 jul. 2018.

GIRARDIN, S. E.; HUGOT, J. P.; SANSONETTI, P. J. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends in Immunology*, v. 24, n. 12, p. 652–658, 1 dez. 2003.

GOLDMAN, J. et al. Infections from tattooing. Outbreak of *Mycobacterium chelonae* in France. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 341, n. 7779, 30 out. 2010.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, p. 363–375, 2002.

GRAEF, M. et al. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Molecular biology of the cell*, v. 24, n. 18, p. 2918–2931, 15 set. 2013.

GRAVANTE, G. et al. Infections after plastic procedures: incidences, etiologies, risk factors, and antibiotic prophylaxis. *Aesthetic plastic surgery*, v. 32, n. 2, p. 243–251, mar. 2008.

GREENSTEIN, R. J. et al. On the action of cyclosporine A, rapamycin and tacrolimus on *M. avium* including subspecies paratuberculosis. *PloS one*, v. 3, n. 6, p. e2496, 25 jun. 2008.

GRIFFITH, D. E. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine*, v. 175, n. 4, p. 367–416, 15 fev. 2007.

GRIFFITH, D. E. Treatment of *Mycobacterium avium* Complex (MAC). *Seminars in respiratory and critical care medicine*, v. 39, n. 3, p. 351–361, 2018.

GUPTA, S. et al. Acceleration of tuberculosis treatment by adjunctive therapy with Verapamil as an efflux inhibitor. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 188, n. 5, p. 600–607, 1 set. 2013.

GUTIERREZ, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, v. 119, n. 6, p. 753–766, 17 dez. 2004.

HANADA, T. et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 52, p. 37298–37302, 28 dez. 2007.

HANSEN, G. A. *Causes of leprosy*. Translated by Pallamary P. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 23:307-9.40(6):363-70.1955.

HARDIE, D. G.; ROSS, F. A.; HAWLEY, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 4, p. 251–262, 22 mar. 2012.

HASTINGS, R. C.; JOB, C. K. Reversal reactions in lepromatous leprosy following transfer factor therapy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 27, n. 5, p. 995–1004, 1978.

HAWN, T. R. et al. Host-Directed Therapeutics for Tuberculosis: Can We Harness the Host? *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 77, n. 4, p. 608–627, dez. 2013.

HERB, M.; GLUSCHKO, A.; SCHRAMM, M. LC3-associated phagocytosis - The highway to hell for phagocytosed microbes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 101, p. 68–76, 1 maio 2020.

HIKITA, H.; SAKANE, S.; TAKEHARA, T. Mechanisms of the autophagosome-lysosome fusion step and its relation to non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Research*, v. 2, n. 3, p. 120–124, 1 set. 2018.

HIRAI, K. E. et al. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. *Microbial Pathogenesis*, v. 91, p. 18–25, 1 fev. 2016.

HU, Y. et al. Ibrutinib suppresses intracellular mycobacterium tuberculosis growth by inducing macrophage autophagy. *The Journal of infection*, v. 80, n. 6, p. e19–e26, 1 jun. 2020.

HURLEY, J. H.; YOUNG, L. N. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual Review of Biochemistry*, v. 86, p. 225–244, 27 jun. 2017.

ISHIHARA, N. et al. Autophagosome Requires Specific Early Sec Proteins for Its Formation and NSF/SNARE for Vacuolar Fusion. *Molecular Biology of the Cell*, v. 12, n. 11, p. 3690, 2001.

JARDIM, M. R. et al. Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Leprosy review*, v. 76, n. 3, p. 232–240, 2005.

JIANG, P.; MIZUSHIMA, N. Autophagy and human diseases. *Cell Research*, v. 24, n. 1, p. 69–79, 10 dez. 2013.

JING, J.; WANG, B.; LIU, P. The functional role of sec23 in vesicle transportation, autophagy and cancer. *International Journal of Biological Sciences*, v. 15, n. 11, p. 2419–2426, 2019.

JOHANSEN, T.; LAMARK, T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, v. 7, n. 3, p. 279–296, 2011.

JOHNSTONE, P.A. The Search For Animal Models For Leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 55, 535–547.1987.

JOUBERT, P. E. et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *The Journal of experimental medicine*, v. 209, n. 5, p. 1029–1047, 7 maio 2012.

JUÁREZ, E. et al. Loperamide Restricts Intracellular Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Lung Macrophages. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, v. 55, n. 6, p. 837–847, 1 dez. 2016.

JUENEMANN, K.; REITS, E. A. Alternative macroautophagic pathways. *International Journal of Cell Biology*, v. 2012, p. 1–8, 2012.

JUNQUEIRA A.V., CAIXETA L.F. Hanseníase: Revisão para o neurologista. *Rev. bras. neurol.* jul-set 44(3): 27-30.2008

KAIZUKA, T. et al. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. *Molecular cell*, v. 64, n. 4, p. 835–849, 17 nov. 2016.

KAMATH, S. et al. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 71, n. 4, p. 795–803, 2014.

KANIA, E. et al. Verapamil treatment induces cytoprotective autophagy by modulating cellular metabolism. *The FEBS journal*, v. 284, n. 9, p. 1370–1387, 1 maio 2017.

KAR, B. R.; JOB, C. K. Reversal reaction and Mitsuda conversion in polar lepromatous leprosy: a case report. *Leprosy review*, v. 76, n. 3, p. 258–262, 2005.

KELLY, D. Verapamil in angina pectoris. *British journal of clinical pharmacology*, v. 21 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 191S-195S, 1986.

KHADGE, S. et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC infectious diseases*, v. 15, n. 477, p. 1–12, 28 out. 2015.

KHAN, M.; GIBBONS, J. L.; FERRAJOLI, A. Spotlight on ibrutinib and its potential in frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia. *OncoTargets and therapy*, v. 10, p. 1909–1914, 29 mar. 2017.

KIM, J. et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology*, v. 13, n. 2, p. 132–141, 23 jan. 2011.

KIM, J. J. et al. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell host & microbe*, v. 11, n. 5, p. 457–468, 17 maio 2012.

KIM, J. K. et al. MIR144\* inhibits antimicrobial responses against *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes and macrophages by targeting the autophagy protein DRAM2. *Autophagy*, v. 13, n. 2, p. 423–441, 1 fev. 2017.

KIM, Y. S. et al. Autophagy-activating strategies to promote innate defense against mycobacteria. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 51, n. 12, p. 151, 1 dez. 2019.

KIMURA, T. et al. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *Journal of Cell Biology*, v. 210, n. 6, p. 973–989, 14 set. 2015.

KIMURA, T.; MANDELL, M.; DERETIC, V. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *Journal of cell science*, v. 129, n. 5, p. 881–891, 2016.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORKS, E. E.; BINFORD, C. H. Attempts to establish the Armadillo (*Dasyus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the Armadillo. *International Journal of Leprosy*, v. 40, n. 3, p. 229–242, 1972.

KIRKIN, V. et al. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy*, v. 5, n. 5, p. 732–733, 1 jul. 2009.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, v. 12, n. 1, p. 1–222, 21 jan. 2016.

KLIONSKY, D. J.; ESKELINEN, E. L.; DERETIC, V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy*, v. 10, n. 4, p. 549–551, 4 abr. 2014.

KNORR, R. L.; LIPOWSKY, R.; DIMOVA, R. Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*, v. 11, n. 11, p. 2134–2137, 1 jan. 2015.

KROEMER, G.; MARIÑO, G.; LEVINE, B. Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, v. 40, n. 2, p. 280–293, out. 2010.

KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Medicine*, v. 9, n. 5, p. 525–532, 14 abr. 2003.



KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature Medicine*, v. 11, n. 6, p. 653–660, 8 maio 2005.

KRUTZIK, S. R. et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *Journal of immunology*, v. 181, n. 10, p. 7115–7120, 15 nov. 2008.

KUMAR, D.; RAO, K. V. S. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 2, p. 121–133, 1 fev. 2011.

KURŠVIETIENĖ, L. et al. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (Kaunas)*, v. 52, n. 3, p. 148–155, 2016.

LAHIRI, R.; RANDHAWA, B.; KRAHENBUHL, J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *Journal of medical microbiology*, v. 54, n. 3, p. 235–242, 2005.

LAI, J. L. et al. Verapamil induces autophagy to improve liver regeneration in non-alcoholic fatty liver mice. *Adipocyte*, v. 10, n. 1, p. 532–545, 2021.

LANA, F. C. F. Organização tecnológica do trabalho em hanseníase com a introdução da poliquimioterapia. *Revista Brasileira de Enfermagem*, v. 46, p. 199–210, 1993.

LANCASTER, R. D. et al. *Mycobacterium leprae* infection in nude mice: bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. *Infection and immunity*, v. 39, n. 2, p. 865–872, 1983.

LANE, J. D. et al. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in Biochemistry*, v. 61, n. 6, p. 585–596, 12 dez. 2017.

LAPAQUETTE, P.; BRINGER, M. A.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cellular microbiology*, v. 14, n. 6, p. 791–807, jun. 2012.

LÁZARO, F. P. et al. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *The Journal of infectious diseases*, v. 201, n. 10, p. 1598–1605, 2010.

LEE, P. L. et al. Raptor/mTORC1 loss in adipocytes causes progressive lipodystrophy and fatty liver disease. *Molecular metabolism*, v. 5, n. 6, p. 422–432, 1 jun. 2016.

LEE, S. A.; KIM, Y. J.; LEE, C. S. Brefeldin A induces apoptosis by activating the mitochondrial and death receptor pathways and inhibits focal adhesion kinase-mediated cell invasion. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 113, n. 5, p. 329–338, nov. 2013.

LEMUS, L. et al. An ER-Localized SNARE Protein Is Exported in Specific COPII Vesicles for Autophagosome Biogenesis. *Cell reports*, v. 14, n. 7, p. 1710–1722, 23 fev. 2016.

LERENA, M. C.; COLOMBO, M. I. Mycobacterium marinum induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cellular microbiology*, v. 13, n. 6, p. 814–835, jun. 2011.

LEVINE, B.; MIZUSHIMA, N.; VIRGIN, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, v. 469, n. 7330, p. 323–335, 20 jan. 2011.

LI, J. et al. Subversion of Cellular Autophagy Machinery by Hepatitis B Virus for Viral Envelopment. *Journal of Virology*, v. 85, n. 13, p. 6319–6333, jul. 2011.

LIM, C. Y.; ZONCU, R. The lysosome as a command-and-control center for cellular metabolism. *Journal of Cell Biology*, v. 214, n. 6, p. 653–664, 12 set. 2016.

LIN, X. et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA and cell biology*, v. 32, n. 5, p. 220–227, 1 maio 2013.

LIU, F. et al. The effect of survivin on multidrug resistance mediated by P-glycoprotein in MCF-7 and its adriamycin resistant cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 12, p. 2279–2283, dez. 2007.

LIU, M. et al. Resveratrol inhibits mTOR signaling by promoting the interaction between mTOR and DEPTOR. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, n. 47, p. 36387–36394, 19 nov. 2010.

LIU, P. T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, v. 311, n. 5768, p. 1770–1773, 24 mar. 2006.

LIU, P. T. et al. Convergence of IL-1 $\beta$  and VDR Activation Pathways in Human TLR2/1-Induced Antimicrobial Responses. *PLOS ONE*, v. 4, n. 6, p. e5810, 5 jun. 2009.

LIU, P. T. et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nature medicine*, v. 18, n. 2, p. 267–273, fev. 2012.

LIU, W. et al. Verapamil extends lifespan in *Caenorhabditis elegans* by inhibiting calcineurin activity and promoting autophagy. *Aging*, v. 12, n. 6, p. 5300–5317, 3 mar. 2020.

LOBATO, L. S. et al. Statins increase rifampin Mycobactericidal effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 10, p. 5766–5774, 1 out. 2014.

LUTHRA, S.; ROMINSKI, A.; SANDER, P. The Role of Antibiotic-Target-Modifying and Antibiotic-Modifying Enzymes in Mycobacterium abscessus Drug Resistance. *Frontiers in microbiology*, v. 9, n. 2179, 12 set. 2018.

MACHELART, A. et al. Host-directed therapies offer novel opportunities for the fight against tuberculosis. *Drug discovery today*, v. 22, n. 8, p. 1250–1257, 1 ago. 2017.

MANANDHAR, R.; LEMASTER, J. W.; ROCHE, P. W. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, v. 67, n. 3, p. 270–278, 1999.

MANZANILLO, P. S. et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*, v. 501, n. 7468, p. 512–516, 2013.

MARTINEAU, A. R. et al. Vitamin D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 103, n. 3–5, p. 793–798, mar. 2007a.

MARTINEAU, A. R. et al. IFN- $\gamma$ - and TNF-Independent Vitamin D-Inducible Human Suppression of Mycobacteria: The Role of Cathelicidin LL-37. *The Journal of Immunology*, v. 178, n. 11, p. 7190–7198, 1 jun. 2007b.

MARTINEZ, A. N. et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 7, p. 2124–2130, 2009.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 10, p. e1354, out. 2011.

MARTINEZ, J. et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature Cell Biology*, v. 17, n. 7, p. 893–906, 22 jun. 2015.

MATTOS, K. A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 87, n. 3, p. 371–384, 1 mar. 2010.

MATTOS, K. A. et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 6, p. 797–815, 1 jun. 2014.

MAURIELLO, J. A. Atypical mycobacterial infection of the periocular region after periocular and facial surgery. *Ophthalmic plastic and reconstructive surgery*, v. 19, n. 3, p. 182–188, maio 2003.

MÉGARBANE, B. et al. Predictors of Mortality in Verapamil Overdose: Usefulness of Serum Verapamil Concentrations. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, v. 108, n. 6, p. 385–389, 1 jun. 2011.

MIAO, Y. et al. A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell*, v. 161, n. 6, p. 1306–1319, 5 jun. 2015.

MIDTBO, K. et al. Studies on Verapamil in the treatment of essential hypertension: a review. *British journal of clinical pharmacology*, v. 21 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 165S-171S, 1986.

MIJALJICA, D.; PRESCOTT, M.; DEVENISH, R. J. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, v. 7, n. 7, p. 673–682, 2011.

MILLER, E. N. et al. Genome-wide scans for leprosy and tuberculosis susceptibility genes in Brazilians. *Genes & Immunity*, v. 5, n. 1, p. 63–67, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia para o Controle da Hanseníase. Brasília, Ministério da Saúde., p. 12–57, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico de Hanseníase. [s.l: s.n.]. v. Número especial

MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*, v. 427, n. 6975, p. 636–640, 2004.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the human genome. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 74, n. 4, p. 589–620, 2010.

MIZUSHIMA, N. Physiological functions of autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 335, n. 1, p. 71–84, 2009.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, v. 147, n. 4, p. 728–741, 1 nov. 2011.

MOCHIZUKI, N. et al. Identification and cDNA cloning of a novel human mosaic protein, LGN, based on interaction with G alpha i2. *Gene*, v. 181, n. 1–2, p. 39–43, 28 nov. 1996.

MOHANTY, P. et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology*, v. 82, n. 1, 2016.

MONTOYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell host & microbe*, v. 6, n. 4, p. 343–353, 22 nov. 2009.

MONTOYA, D.; MODLIN, R. L. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Advances in immunology*, v. 105, p. 1–24, 2010.

MOURA, D. F. et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *European journal of immunology*, v. 42, n. 11, p. 2925–2936, 2012.

MULLER, C. et al. Verapamil decreases P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human leukemic cell lines. *International journal of cancer*, v. 56, n. 5, p. 749–754, 1994.

MULLER, C. et al. Evidence for transcriptional control of human *mdr1* gene expression by Verapamil in multidrug-resistant leukemic cells. *Molecular Pharmacology*, v. 47, n. 1, p. 51–56, 1995.

MÜNZ, C. Enhancing immunity through autophagy. *Annual review of immunology*, v. 27, p. 423–449, 2009.

MURILLO, J. et al. Skin and wound infection by rapidly growing mycobacteria: an unexpected complication of liposuction and liposculpture. *The Venezuelan*

Collaborative Infectious and Tropical Diseases Study Group. Archives of dermatology, v. 136, n. 11, p. 1347–1352, 2000.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a Stress-Response and Quality-Control Mechanism: Implications for Cell Injury and Human Disease. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 8, p. 105–137, 24 jan. 2013.

NAKAMURA, S.; YOSHIMORI, T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. Journal of Cell Science, v. 130, n. 7, p. 1209–1216, 1 abr. 2017.

NAZIO, F. et al. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. Nature Cell Biology, v. 15, n. 4, p. 406–416, 24 mar. 2013.

NERY, J. A. C. et al. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. Revista do Instituto de medicina tropical de São Paulo, v. 40, p. 363–370, 1998.

NEYROLLES, O. et al. Is Adipose Tissue a Place for Mycobacterium tuberculosis Persistence? PLoS ONE, v. 1, n. 1, p. e43, 20 dez. 2006.

NOZAWA, T. Selective autophagy mechanism against Group A Streptococcus infection. Nihon saikingaku zasshi. Japanese journal of bacteriology., v. 73, n. 3, p. 193–199, 2018.

O'KEEFFE, K. M. et al. Manipulation of Autophagy in Phagocytes Facilitates Staphylococcus aureus Bloodstream Infection. Infection and Immunity, v. 83, n. 9, p. 3445–3457, 2015.

OLIVEIRA, J. A. P. et al. Mycobacterium leprae induces a tolerogenic profile in monocyte-derived dendritic cells via TLR2 induction of IDO. Journal of Leukocyte Biology, v. 110, n. 1, p. 167–176, 1 jul. 2021.

OLIVEIRA, R. B. et al. Expression of toll-like receptor 2 on human schwann cells: A mechanism of nerve damage in leprosy. Infection and Immunity, v. 71, n. 3, p. 1427–1433, 1 mar. 2003.

OLIVEROS, J. C. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Disponível em: <[https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny\\_old/venny.php](https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny_old/venny.php)>. Acesso em: 18 jun. 2022.

O'RIORDAN, W. et al. Omadacycline for Acute Bacterial Skin and Skin-Structure Infections. The New England journal of medicine, v. 380, n. 6, p. 528–538, 7 fev. 2019.

PAGE, C. et al. Farmacologia integrada. 2ª ed. Barueri: Manole, 2004.

PANG, H. et al. Drug Susceptibility Testing of 31 Antimicrobial Agents on Rapidly Growing Mycobacteria Isolates from China. BioMed research international, v. 2015, n. 419392, 2015.

PARK, D. et al. Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. Scientific Reports, v. 6, n. 21772, 23 fev. 2016a.

PARK, H. W.; LEE, J. H. Calcium channel blockers as potential therapeutics for obesity-associated autophagy defects and fatty liver pathologies. *Autophagy*, v. 10, n. 12, p. 2385–2386, 1 dez. 2014.

PARK, J. M. et al. The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy*, v. 12, n. 3, p. 547–564, 5 abr. 2016b.

PARZYCH, K. R.; KLIONSKY, D. J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, n. 3, p. 460–473, 15 jan. 2014.

PETTIT, J. H. S.; REES, R. J. W. Sulphone Resistance in Leprosy. An Experimental and Clinical Study. *Lancet*, p. 673–674, 1964.

PFALTZGRAFF R.E.; BRYCESON A. Clinical leprosy. In: Hasting RC, editor. *Leprosy*. New York: Churchill Livingstone; p. 134-76.1989.

PICCARO, G. et al. Rifampin Induces Hydroxyl Radical Formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 12, p. 7527–7533, 1 dez. 2014.

PLUCHINO, K. M. et al. Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, v. 15, n. 1–2, p. 98–105, 2012.

PUA, H. H. et al. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *The Journal of experimental medicine*, v. 204, n. 1, p. 25–31, 22 jan. 2007.

PY, B. F.; LIPINSKI, M. M.; YUAN, J. Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy*, v. 3, n. 2, p. 117–125, 2007.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, v. 339, n. 1, p. 62–66, 13 mar. 2003.

RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Current opinion in microbiology*, v. 4, n. 1, p. 21–27, 2001.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, v. 90, n. 4, p. 1383–1435, out. 2010.

REES R.F.W. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*, 1st edition, New York: Churchill Livingstone; p. 31-52.1985.

REGGIORI, F. et al. Early Stages of the Secretory Pathway, but Not Endosomes, Are Required for Cvt Vesicle and Autophagosome Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, n. 5, p. 2189–2204, maio 2004.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 45, n. 9, p. 383–393, 1 set. 2015.

REICHEN, J. et al. Repeat-dose sirolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with hepatic allografts. *European journal of clinical pharmacology*, v. 68, n. 5, p. 589–597, maio 2012.

RENNA, M. et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *The Journal of clinical investigation*, v. 121, n. 9, p. 3554–3563, 1 set. 2011.

RIBEIRO, C. M. S. et al. Receptor usage dictates HIV-1 restriction by human TRIM5 $\alpha$  in dendritic cell subsets. *Nature*, v. 540, n. 7633, p. 448–452, 7 dez. 2016.

RICHTER, S. et al. Functional diversification of closely related ARF-GEFs in protein secretion and recycling. *Nature*, v. 448, n. 7152, p. 488–492, 26 jul. 2007.

RIDLEY, D. S. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 49, n. 5, p. 449–452, 1955.

RIDLEY, D. S.; HILSON, G. R. F. A logarithmic index of bacilli in biopsies. *International Journal of Leprosy*, v. 35, p. 184–186, 1967.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, v. 34, p. 255–273, 1966.

RIDLEY, D. S.; WATERS, M. F. Significance of variations within the lepromatous group. *Leprosy review*, v. 40, n. 3, p. 143–152, jul. 1969.

ROMANOV, J. et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5–Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO Journal*, v. 31, n. 22, p. 4304–4317, 14 nov. 2012.

ROVETTA, A. I. et al. IFNG-mediated immune responses enhance autophagy against *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with active tuberculosis. *Autophagy*, v. 10, n. 12, p. 2109–2121, 1 jan. 2014.

RUBINSTEIN, A. D. et al. The autophagy protein atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, v. 44, n. 5, p. 698–709, 9 dez. 2011.

RUIJTER, J. M. et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic acids research*, v. 37, n. 6, p. e45, 2009.

RUSSELL, R. C.; YUAN, H. X.; GUAN, K. L. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Research*, v. 24, n. 1, p. 42–57, 17 dez. 2013.

SAKOWSKI, E. T. et al. Ubiquilin 1 Promotes IFN- $\gamma$ -Induced Xenophagy of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 7, p. e1005076, 1 jul. 2015.

SALABEI, J. K. et al. Verapamil stereoisomers induce antiproliferative effects in vascular smooth muscle cells via autophagy. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 262, n. 3, p. 265–272, 1 ago. 2012.

SALES J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* Aug;165(2):251–63. 2011

SALMON, S. et al. Multidrug-resistant myeloma: laboratory and clinical effects of Verapamil as a chemosensitizer. *Blood*, v. 78, n. 1, p. 44–50, 1 jul. 1991.

SAMPAIO, E. et al. Effect of rhILFN-gamma treatment in multibacillary leprosy patients. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, v. 64, n. 3, p. 268–273, set. 1996.

SAMPAIO, E. P. et al. T Cell—Monocyte Contact Enhances Tumor Necrosis Factor— $\alpha$  Production in Response to Mycobacterium leprae. *The Journal of infectious diseases*, v. 182, n. 5, p. 1463–1472, 2000.

SANDOZ DO BRASIL INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA. Cloridrato de Verapamil. Disponível em: <<https://www.sandoz.com.br/sites/www.sandoz.com.br/files/PC-CLOR.%20VERAPAMIL.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

SARNO, E. N.; SAMPAIO, E. P. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, v. 64, n. 4, p. S69–S73, 1996.

SATOO, K. et al. The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *The EMBO Journal*, v. 28, n. 9, p. 1341, 5 maio 2009.

SCHENK, M. et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nature medicine*, v. 18, n. 4, p. 555–563, abr. 2012.

SCHIEBLER, M. et al. Functional drug screening reveals anticonvulsants as enhancers of mTOR-independent autophagic killing of Mycobacterium tuberculosis through inositol depletion. *EMBO molecular medicine*, v. 7, n. 2, p. 127–139, fev. 2015.

SCHLESINGER, L. S.; HORWITZ, M. A. Phenolic glycolipid-1 of Mycobacterium leprae binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *The Journal of experimental medicine*, v. 174, n. 5, p. 1031–1038, 1991.

SCHNEIDER, J. et al. Differential effects of human ether-a-go-go-related gene (HERG) blocking agents on QT duration variability in conscious dogs. *European journal of pharmacology*, v. 512, n. 1, p. 53–60, 4 abr. 2005.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.



SCOLLARD D.M. Pathogenesis and Pathology of Leprosy. Int Textb Lepr [Internet]. (Figure1):1–26.2017. Disponível em: <https://www.internationaltextbookofleprosy.org/>

SELVARAJ, P. Vitamin D, vitamin D receptor, and cathelicidin in the treatment of tuberculosis. *Vitamins and hormones*, v. 86, p. 307–325, 2011.

SERRA, A. DE J. M. A Importância do Seguimento Farmacoterapêutico Voltado ao Paciente com Hanseníase. São Luis: Faculdade Pitágoras, 2018.

SETTEMBRE, C. et al. Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 14, n. 5, p. 283–296, maio 2013.

SHRIDHAR, S. et al. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell death and differentiation*, v. 20, n. 1, p. 21–30, jan. 2013.

SHEN, H. M.; CODOGNO, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*, v. 7, n. 5, p. 457–465, 2011.

SHEPARD, C. C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *The Journal of experimental medicine*, v. 112, n. 3, p. 445–454, 1960.

SHEPARD, C. C.; CHANG, Y. T. Effect of several anti-leprosy drugs on multiplication of human leprosy bacilli in foot-pads of mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 109, n. 3, p. 636–638, 1962.

SHI, C. S. et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology*, v. 13, n. 3, p. 255–263, mar. 2012.

SHIBUTANI, S. T.; YOSHIMORI, T. Autophagosome formation in response to intracellular bacterial invasion. *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 11, p. 1619–1626, 1 nov. 2014.

SHIMOJI, Y. et al. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 17, p. 9857–9862, 1999.

SHOEN, C. et al. In Vitro Activities of Omadacycline against Rapidly Growing Mycobacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 5, p. e02522-18, 1 maio 2019.

SHPIGLA, T. et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*, v. 34, n. 16, p. 2117–2131, 13 ago. 2015.

SILVA, B. J. DE A. et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 1, p. e1006103, 1 jan. 2017a.

SILVA, T. et al. Lactoferricin Peptides Increase Macrophages' Capacity To Kill *Mycobacterium avium*. *mSphere*, v. 2, n. 4, p. e00301-17, 30 ago. 2017b.

SINGH, R. et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*, v. 458, n. 7242, p. 1131–1135, 30 abr. 2009.

SINGH, S. B. et al. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*, v. 313, n. 5792, p. 1438–1441, 8 set. 2006.

SINGHAL, A. et al. Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Science translational medicine*, v. 6, n. 263, p. 263ra159, 19 nov. 2014.

SOILLEUX, E. J. et al. Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of leukocyte biology*, v. 71, n. 3, p. 445–457, 2002.

SRIKRISHNA, G. et al. Can the addition of Verapamil to bedaquiline-containing regimens improve tuberculosis treatment outcomes? A novel approach to optimizing TB treatment. *Future microbiology*, v. 10, n. 8, p. 1257–1260, 1 ago. 2015.

STANLEY, R. E.; RAGUSA, M. J.; HURLEY, J. H. The beginning of the end: how scaffolds nucleate autophagosome biogenesis. *Trends in cell biology*, v. 24, n. 1, p. 73–81, jan. 2014.

STARR, T. et al. Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell host & microbe*, v. 11, n. 1, p. 33–45, 19 jan. 2012.

SUBAUSTE, C. S. Interplay Between *Toxoplasma gondii*, Autophagy, and Autophagy Proteins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, n. 139, 2019.

SUN, D. et al. Evaluation of flavonoid and resveratrol chemical libraries reveals abyssinone II as a promising antibacterial lead. *ChemMedChem*, v. 7, n. 9, p. 1541–1545, set. 2012.

SUNDARAMURTHY, V. et al. Integration of chemical and RNAi multiparametric profiles identifies triggers of intracellular mycobacterial killing. *Cell host & microbe*, v. 13, n. 2, p. 129–142, 13 fev. 2013.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 8 jan. 2019.

TAN, D. et al. The em structure of the TRAPPIII complex leads to the identification of a requirement for COPII vesicles on the macroautophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 48, p. 19432–19437, 26 nov. 2013.

TANIDA, I. et al. HsAtg4B/HsApg4B/Autophagin-1 Cleaves the Carboxyl Termini of Three Human Atg8 Homologues and Delipidates Microtubule-associated Protein Light Chain 3- and GABAA Receptor-associated Protein-Phospholipid

Conjugates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 35, p. 36268–36276, 27 ago. 2004.

TELES, R. M. B. et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science*, v. 339, n. 6126, p. 1448–1453, 28 fev. 2013.

TELES, R. M. B. et al. Identification of a systemic interferon- $\gamma$  inducible antimicrobial gene signature in leprosy patients undergoing reversal reaction. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 10, p. e0007764, 2019.

THOMA-USZYNSKI, S. et al. Induction of Direct Antimicrobial Activity Through Mammalian Toll-Like Receptors. *Science*, v. 291, n. 5508, p. 1544–1547, 23 fev. 2001.

THURSTON, T. et al. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nature immunology*, v. 10, n. 11, p. 1215–1222, 2009.

TIÓ-COMA, M. et al. Whole blood RNA signatures in leprosy patients identify reversal reactions before clinical onset: a prospective, multicenter study. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 17931, 1 dez. 2019.

TOKURA, Y. et al. Pathophysiology of Skin Resident Memory T Cells. *Frontiers in immunology*, v. 11, n. 618897, p. 1–19, 3 fev. 2021.

TRABULSI LR; ALTERTHUM F. *Microbiologia*. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRAN, P. N.; O'BRIEN, S. The safety of Bruton's tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Drug Safety Evaluation*, v. 16, n. 9, p. 1079–1088, 2 set. 2017.

TRAVASSOS, L. H. et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nature immunology*, v. 11, n. 1, p. 55–62, jan. 2010.

TROMBONE, A. P. F. et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *Journal of visualized experiments*, v. 85, n. 50620, 23 mar. 2014.

TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 11, p. e328, 2008.

TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, v. 69, n. 1, p. 1, 2001.

TSURUO T. et al. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by Verapamil. *Cancer Res.* 41(5): 1967-72. 1981.

VAN LIMBERGEN, J. et al. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunology*, v. 2, n. 4, p. 315–330, 6 maio 2009.

VICKERS, N. J. Animal Communication: When I'm Calling You, Will You Answer Too? *Current biology: CB*, v. 27, n. 14, p. R713–R715, 24 jul. 2017.

VILJOEN, A. et al. Verapamil Improves the Activity of Bedaquiline against *Mycobacterium abscessus* In Vitro and in Macrophages. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 9, p. e00705- 19., 2019.

VIRGIN, H. W.; LEVINE, B. Autophagy genes in immunity. *Nature immunology*, v. 10, n. 5, p. 461–470, 2009.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*, v. 2, n. 8, 2001.

WALKER, S. L. et al. Development and Validation of a Severity Scale for Leprosy Type 1 Reactions. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 2, n. 12, p. e351, 2008.

WANG, R. C.; LEVINE, B. Calcipotriol Induces Autophagy in HeLa Cells and Keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*, v. 131, n. 4, p. 990–993, 2011.

WANG, Y. et al. Stress-activated Dendritic Cells (DC) Induce Dual Interleukin (IL)-15- and IL1 $\beta$ -mediated Pathways, Which May Elicit CD4+ Memory T Cells and Interferon (IFN)-stimulated Genes. *The Journal of biological chemistry*, v. 290, n. 25, p. 15595–15609, 19 jun. 2015.

WATSON, A. et al. Iron depletion suppresses mTORC1-directed signalling in intestinal Caco-2 cells via induction of REDD1. *Cellular signalling*, v. 28, n. 5, p. 412–424, 1 maio 2016.

WATSON, R. O.; MANZANILLO, P. S.; COX, J. S. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, v. 150, n. 4, p. 803–815, 17 ago. 2012.

WHO, World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes: report of a WHO study group [meeting held in Geneva from 12 to 16 October 1981]. [s.l.] World Health Organization, 1982.

WHO, world health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Weekly epidemiological record*, v. 95, n. 36, p. 417–440, 2020.

WHO, World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. 10 Sep, n<sup>o</sup> 36; (96): 421–444, 2021.

WHO, World Health Organization. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 35, 405–420. 2016.

WHO, World Health Organization. Multidrug therapy against leprosy: development and implementation over the past 25 years. Sansarricq H, editor. 2004.

WU, M. L. et al. NTM drug discovery: status, gaps and the way forward. *Drug discovery today*, v. 23, n. 8, p. 1502–1519, 1 ago. 2018.

WU, Y. et al. Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 alpha and induction of autophagy in SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International*, v. 57, n. 3, p. 198–205, 28 maio 2010.

XU, J. et al. Primary Clofazimine and Bedaquiline Resistance among Isolates from Patients with Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, p. e00239-17, 1 jun. 2017.

YANG, C. S. Advancing host-directed therapy for tuberculosis: new therapeutic insights from the *Toxoplasma gondii*. *Microbial Cell*, v. 4, n. 3, p. 105–107, 3 mar. 2017.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eat or be eaten: a history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, v. 12, n. 9, p. 814–822, 2010.

YAWALKAR, S. Leprosy-for medical practioners and paramedical workers. 8<sup>a</sup> ed. [s.l.] Novartis Foundation for Sustainable Development, 2009.

YEDINAK, K. C. Use of calcium channel antagonists for cardiovascular disease. *American pharmacy*, v. NS33, n. 8, p. 49–64, 1993.

YOSHIKAWA Y. et al. *Listeria Monocytogenes* ActA is a Key Player in Evading Autophagic Recognition. *Autophagy* 5(8):1220–1. 2009.

YOUNG, D. B.; MEHLERT, A. Serology of mycobacteria: characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. *Reviews of infectious diseases*, v. 11, p. S431–S435, 1989.

YU, X. et al. Autophagy during *Mycobacterium tuberculosis* infection and implications for future tuberculosis medications. *Cellular signalling*, v. 25, n. 5, p. 1272–1278, maio 2013.

YU, X.; LONG, Y. C.; SHEN, H. M. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy*, v. 11, n. 10, p. 1711–1728, 2015.

YUK, J. M. et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell host & microbe*, v. 6, n. 3, p. 231–243, 17 set. 2009.

ZANETTI, G. et al. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature cell biology*, v. 14, n. 1, p. 20–28, jan. 2011.

ZHANG, F.-R. et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 31 dez. 2009.

ZHANG, R. et al. The selective autophagy receptors Optineurin and p62 are both required for zebrafish host resistance to mycobacterial infection. *PLOS Pathogens*, v. 15, n. 2, p. e1007329, 1 fev. 2019.

ZHAO, L. M. et al. Influence of ABCB1 gene polymorphisms on the pharmacokinetics of Verapamil among healthy Chinese Han ethnic subjects. *British journal of clinical pharmacology*, v. 68, n. 3, p. 395–401, set. 2009.

ZHAO, Z. et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell host & microbe*, v. 4, n. 5, p. 458–469, 13 nov. 2008.

ZHOU, Y.; RUCKER, E. B.; ZHOU, B. P. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 48, n. 1, p. 60–74, 27 maio 2016.

ZHOU, Y. Y. et al. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Bioscience Reports*, v. 35, n. 3, p. 1–10, 2015.

ZULLO, A. J.; JURCIC SMITH, K. L.; LEE, S. Mammalian target of Rapamycin inhibition and mycobacterial survival are uncoupled in murine macrophages. *BMC biochemistry*, v. 15, n. 4, 14 fev. 2014.

ZUMLA, A. et al. Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 4, p. e47–e63, 1 abr. 2016.

## 8 APÊNDICES

**APÊNDICE A** - Análise de expressão de genes da via autofágica (PCR “array” da via de autofagia) em lesões de pele de pacientes lepromatosos (L-lep) e com reação tipo 1(T1R). Os dados foram originalmente publicados por Silva et al., 2017a (parte 1).

| <b>“Upregulated in L-lep lesions”</b> | <b>“Upregulated in T1R lesions”</b> |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Símbolo do gene                       | Símbolo do gene                     |
| BCL2L1                                | TPR                                 |
| ULK2                                  | GFI1B                               |
| EIF4G1                                | GNAI3                               |
| WIPI2                                 | BECN1                               |
| MAP1LC3B2                             | SEC16A                              |
| SEC24C                                | SH3GLB2                             |
| EIF4EBP2                              | GPSM1                               |
| RICTOR                                | SEC16B                              |
| ATG4A                                 | GPSM2                               |
| MAP1LC3B                              | SEC23A                              |
| PPM1K                                 | TP73                                |
| ATG16L2                               | LETM2                               |
| MCL1                                  | BECN2                               |
| RB1CC1                                | RASD1                               |
| AKT1S1                                | ATG14                               |
| RGS19                                 | LETM1                               |
| BCL2                                  | RPTOR                               |
| FKBP15                                | APOL1                               |
| ATG9A                                 | MAP1LC3C                            |
| MLST8                                 | FRS3                                |
| ATG4D                                 | UVRAG                               |
| TP53                                  | SEC24A                              |
| GABARAPL2                             | BIRC5                               |
| SNX30                                 | ATF4                                |
| ULK3                                  | SEC24D                              |
| LAMP1                                 | SEC23B                              |
| DRAM1                                 | ULK4                                |
| SQSTM1                                | MAP1LC3A                            |
| ATG16L1                               |                                     |
| PIK3R4                                |                                     |
| HIF1A                                 |                                     |
| SEC24B                                |                                     |
| ATG4C                                 |                                     |
| ATG2A                                 |                                     |
| ATG2B                                 |                                     |

Análise de expressão de genes da via autofágica (PCR “array” da via de autofagia) de macrófagos THP-1 tratados como indicado abaixo. Os dados estão relacionados à figura 19. Os valores de expressão gênica foram normalizados pelo gene “housekeeping” HPRT1 e, em seguida, o “fold-change” para cada tratamento foi calculado em relação as células sem tratamento. Finalmente, as assinaturas específicas de IFN- $\gamma$  ou rapamicina foram obtidas comparando células infectadas com *M. leprae* tratadas *versus* não tratadas. O valor de “fold-change” $\geq$ 1.5 (ou  $\text{Log}_2\text{FC}\geq 0.6$ ) foi considerado “upregulated” (parte 2).

| <i>M. leprae</i> vs Meio |                         | IFN- $\gamma$ + <i>M. leprae</i> vs Meio |                         | Rapamycin+ <i>M. leprae</i> vs Meio |                         | IFN- $\gamma$ + <i>M. leprae</i> vs <i>M. leprae</i> |                         | Rapamicina+ <i>M. leprae</i> vs <i>M. leprae</i> |                         |
|--------------------------|-------------------------|--|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|--|-------------------------|--|-------------------------|
| Símbolo do gene          | $\text{Log}_2\text{FC}$ | Símbolo do gene                          | $\text{Log}_2\text{FC}$ | Símbolo do gene                     | $\text{Log}_2\text{FC}$ | Símbolo do gene                                      | $\text{Log}_2\text{FC}$ | Símbolo do gene                                  | $\text{Log}_2\text{FC}$ |
| ATG3                     | 16,59                   | ATG3                                     | 15,84                   | LAMP2                               | 18,69                   | SEC23B   | 15,76                   | SEC23B   | 22,33                   |
| ATG4C                    | 15,32                   | PIK3R4                                   | 15,32                   | PIK3R4                              | 17,46                   | ATG16L2  | 13,89                   | RPTOR  | 18,22                   |
| LAMP2                    | 14,48                   | LAMP2                                    | 15,18                   | ATG4B                               | 17,31                   | LETM2  | 12,26                   | ATG16L2  | 17,72                   |
| PIK3R4                   | 14,33                   | ULK3                                     | 13,01                   | ATG3                                | 17,20                   | RPTOR  | 11,55                   | ATG2B  | 15,66                   |
| DRAM1                    | 13,36                   | ATG4C                                    | 12,75                   | HIF1A                               | 16,81                   | GPSM1  | 11,05                   | AMBRA1   | 14,22                   |
| ATG10                    | 10,82                   | MLST8                                    | 11,80                   | SEC23B                              | 16,27                   | FRS3   | 8,56                    | ATG4B  | 14,01                   |
| WIPI1                    | 9,63                    | WIPI1                                    | 10,89                   | ULK3                                | 15,38                   | ATG4B  | 7,12                    | LETM2  | 13,44                   |
| PIK3C3                   | 8,44                    | PIK3C3                                   | 10,78                   | GBL                                 | 15,15                   | RGS19  | 5,80                    | HSPA5  | 10,46                   |
| HIF1A                    | 8,37                    | DRAM1                                    | 10,77                   | ATG4C                               | 15,15                   | AMBRA1   | 5,00                    | FRS3   | 10,25                   |
| ULK4                     | 8,20                    | HIF1A                                    | 10,50                   | SEC24A                              | 15,00                   | ULK3   | 4,98                    | SQSTM1   | 9,28                    |
| ULK3                     | 8,03                    | ATG4B                                    | 10,43                   | PIK3C3                              | 14,75                   | SQSTM1   | 4,59                    | TPR  | 8,86                    |
| MLST8                    | 7,80                    | SEC23B                                   | 9,71                    | SEC24B                              | 14,30                   | ATG9A  | 4,54                    | RGS19  | 8,58                    |
| SEC24A                   | 7,47                    | SEC24A                                   | 9,12                    | ATG10                               | 13,34                   | ATG7   | 4,30                    | HIF1A  | 8,45                    |
| SEC24B                   | 6,45                    | ATG10                                    | 8,27                    | DRAM                                | 13,21                   | HSPA5  | 4,00                    | ATG9A  | 7,92                    |
| ULK2                     | 6,12                    | ULK4                                     | 7,64                    | WIPI1                               | 12,88                   | MLST8  | 4,00                    | ATG7   | 7,89                    |
| SEC24D                   | 4,19                    | SEC24B                                   | 7,26                    | RAPTOR                              | 11,58                   | WDR45B   | 3,89                    | SEC24B   | 7,86                    |
| BECN1                    | 3,86                    | ULK2                                     | 6,96                    | ULK4                                | 9,19                    | WIPI2  | 3,70                    | SEC24A   | 7,53                    |
| ATG4B                    | 3,30                    | ATG4D                                    | 5,65                    | ATG2B                               | 9,02                    | ATG4D  | 2,98                    | MLST8  | 7,35                    |
| GABARAP                  | 3,01                    | RPTOR                                    | 4,90                    | SQSTM1                              | 8,85                    | MCL1   | 2,49                    | ULK3   | 7,35                    |
| ATG4D                    | 2,67                    | GPSM1                                    | 4,41                    | ATG4D                               | 8,81                    | PIK3C3   | 2,34                    | AKT1S1   | 7,05                    |
| BIRC5                    | 2,49                    | LETM2                                    | 4,29                    | ULK2                                | 8,74                    | GPSM2  | 2,28                    | WDR45B   | 6,86                    |
| EIF4G1                   | 1,62                    | SQSTM1                                   | 4,17                    | AMBRA1                              | 7,57                    | RASD1  | 2,22                    | GPSM2  | 6,44                    |
| EIF4EBP1                 | 0,97                    | ATG7                                     | 3,78                    | ATG7                                | 7,37                    | HIF1A  | 2,13                    | PIK3C3   | 6,31                    |
|                          |                         | BECN1                                    | 3,55                    | GPSM2                               | 6,72                    | BCL2L1   | 1,91                    | ATG4D  | 6,14                    |
|                          |                         | SEC24D                                   | 3,19                    | TPR                                 | 6,70                    | MTOR   | 1,85                    | SEC23A   | 5,89                    |
|                          |                         | GPSM2                                    | 2,57                    | BECLIN1                             | 5,71                    | SEC24A   | 1,65                    | EIF4EBP2   | 5,05                    |
|                          |                         | EIF4G1                                   | 2,06                    | LETM2                               | 5,47                    | AKT1S1   | 1,58                    | WIPI2  | 4,91                    |
|                          |                         | MTOR                                     | 1,77                    | ATG16L2                             | 5,31                    | GFI1B  | 1,46                    | ATG16L1  | 4,67                    |
|                          |                         | BIRC5                                    | 1,67                    | SEC24D                              | 4,13                    | GNAI3  | 1,46                    | MCL1   | 4,61                    |

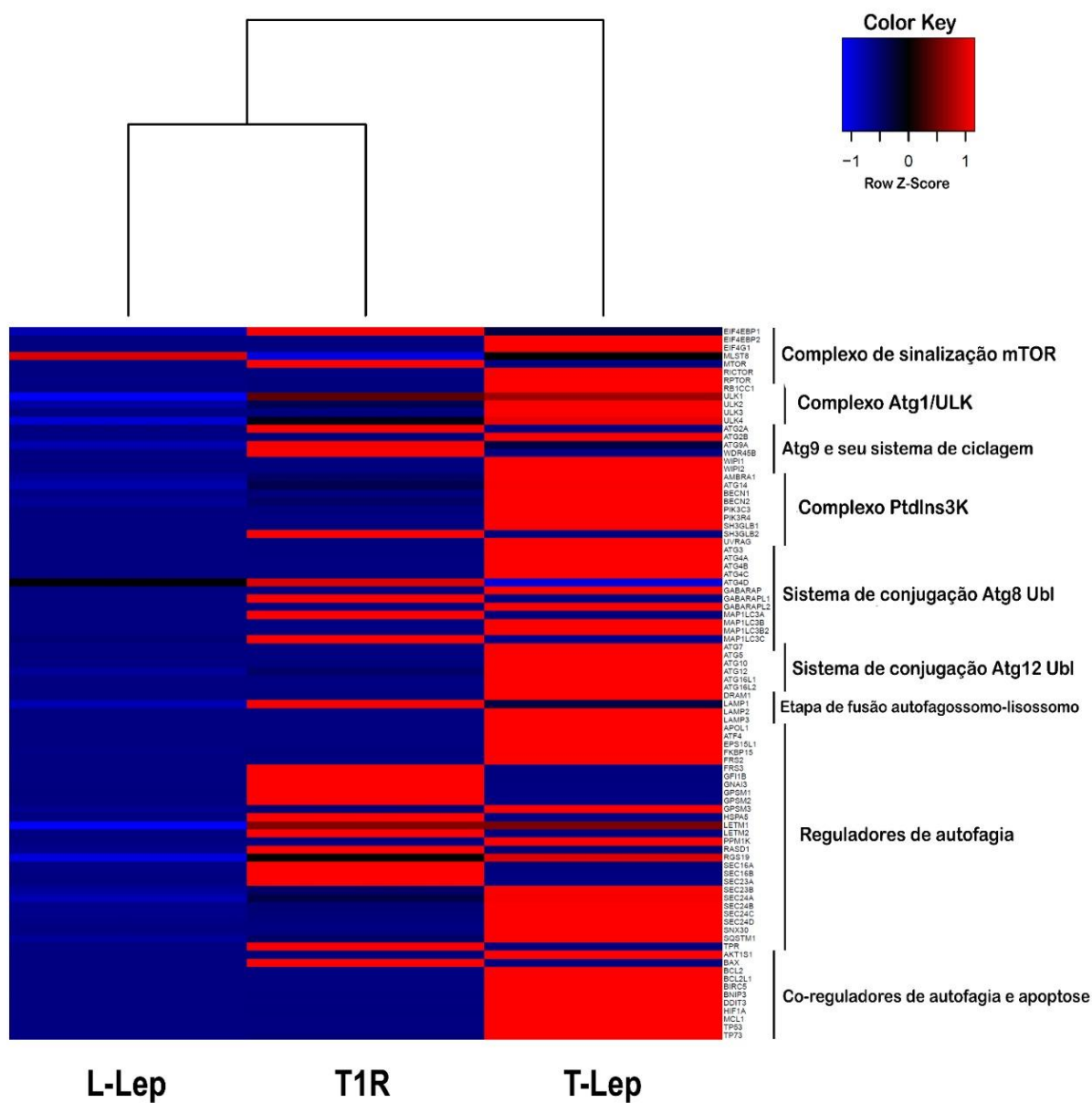


|         |      |           |      |           |      |           |      |
|---------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| FKBP15  | 1,58 | FKBP15    | 4,06 | FKBP15    | 1,28 | GNAI3     | 4,39 |
| ATG16L2 | 1,48 | EIF4G1    | 4,03 | WIPI1     | 1,27 | LAMP2     | 4,21 |
|         |      | HSPA5     | 3,81 | EIF4EBP2  | 1,21 | GABARAPL1 | 3,92 |
|         |      | BIRC5     | 3,68 | BECN2     | 1,00 | GPSM1     | 3,78 |
|         |      | GABARAP   | 3,24 | PIK3R4    | 0,99 | FKBP15    | 3,77 |
|         |      | FRAP1     | 2,85 | GABARAPL1 | 0,91 | GABARAPL2 | 3,60 |
|         |      | EIF4EBP2  | 2,27 | TPR       | 0,86 | BCL2L1    | 3,56 |
|         |      | SH3GLB1   | 2,06 | ULK2      | 0,85 | WIPI1     | 3,26 |
|         |      | ATF4      | 2,03 | SEC24B    | 0,81 | PIK3R4    | 3,13 |
|         |      | RGS19     | 1,94 | LAMP2     | 0,71 | MTOR      | 2,92 |
|         |      | WDR45L    | 1,70 | UVRAG     | 0,69 | RICTOR    | 2,71 |
|         |      | GPSM3     | 1,20 |           |      | ULK2      | 2,63 |
|         |      | SEC24C    | 1,17 |           |      | ATG10     | 2,52 |
|         |      | LETM1     | 1,08 |           |      | APOL1     | 2,45 |
|         |      | GABARAPL2 | 0,63 |           |      | EIF4G1    | 2,41 |
|         |      |           |      |           |      | GPSM3     | 2,20 |
|         |      |           |      |           |      | RB1CC1    | 1,86 |
|         |      |           |      |           |      | SH3GLB1   | 1,86 |
|         |      |           |      |           |      | BECN1     | 1,85 |
|         |      |           |      |           |      | SEC24C    | 1,69 |
|         |      |           |      |           |      | BAX       | 1,60 |
|         |      |           |      |           |      | ATF4      | 1,60 |
|         |      |           |      |           |      | SEC16B    | 1,58 |
|         |      |           |      |           |      | ATG14     | 1,25 |
|         |      |           |      |           |      | SEC16A    | 1,24 |
|         |      |           |      |           |      | BIRC5     | 1,19 |
|         |      |           |      |           |      | SNX30     | 1,17 |
|         |      |           |      |           |      | LETM1     | 1,07 |
|         |      |           |      |           |      | RASD1     | 1,00 |
|         |      |           |      |           |      | ULK4      | 0,99 |
|         |      |           |      |           |      | ATG2A     | 0,95 |
|         |      |           |      |           |      | TP53      | 0,75 |
|         |      |           |      |           |      | FRS2      | 0,74 |
|         |      |           |      |           |      | ATG12     | 0,64 |
|         |      |           |      |           |      | ATG3      | 0,61 |

Análise do diagrama de Venn mostrando os genes de assinatura de autofagia em macrófagos THP-1 infectados com *M. leprae*, tratados com IFN- $\gamma$  ou rapamicina que se sobrepõem com conjuntos de dados de expressão de genes de autofagia de lesões de pele T1R ou L-lep. Os dados estão relacionados à figura 19(parte 3).

| 16 elementos comuns em "assinatura de autofagia L-lep" e "IFN- $\gamma$ + <i>M. leprae</i> vs <i>M. leprae</i> ": | 13 elementos comuns em "assinatura de autofagia T1R" e "IFN- $\gamma$ + <i>M. leprae</i> vs <i>M. leprae</i> ": | 26 elementos comuns em "assinatura de autofagia L-lep" e "Rapamicina+ <i>M. leprae</i> vs <i>M. leprae</i> ": | 20 elementos comuns em "assinatura de autofagia T1R" e "Rapamicina+ <i>M. leprae</i> vs <i>M. leprae</i> ": |
|---|---|---|---|
| BCL2L1  | TPR   | BCL2L1  | TPR   |
| ULK2  | GFI1B   | ULK2  | GNAI3   |
| EIF4EBP2  | GNAI3   | EIF4G1  | BECN1   |
| ATG16L2   | GPSM1   | SEC24C  | SEC16A  |
| MCL1  | GPSM2   | EIF4EBP2  | GPSM1   |
| AKT1S1  | LETM2   | RICTOR  | SEC16B  |
| RGS19   | BECN2   | ATG16L2   | GPSM2   |
| FKBP15  | RASD1   | MCL1  | SEC23A  |
| ATG9A   | RPTOR   | RB1CC1  | LETM2   |
| MLST8   | FRS3  | AKT1S1  | RASD1   |
| ATG4D   | UVRAG   | RGS19   | ATG14   |
| ULK3  | SEC24A  | FKBP15  | LETM1   |
| SQSTM1  | SEC23B  | ATG9A   | RPTOR   |
| PIK3R4  |   | MLST8   | APOL1   |
| HIF1A   |   | ATG4D   | FRS3  |
| SEC24B  |   | TP53  | SEC24A  |
|   |   | GABARAPL2   | BIRC5   |
|   |   | SNX30   | ATF4  |
|   |   | ULK3  | SEC23B  |
|   |   | SQSTM1  | ULK4  |
|   |   | ATG16L1   |   |
|   |   | PIK3R4  |   |
|   |   | HIF1A   |   |
|   |   | SEC24B  |   |
|   |   | ATG2A   |   |
|   |   | ATG2B   |   |

**APÊNDICE B** –Perfil de expressão gênica de autofagia de lesões de hanseníase. Os mRNAs purificados de lesões de pele de pacientes reação tipo 1 (T1R), multibacilares (MB) e paucibacilares (PB) foram analisados por RT-qPCR usando um kit de PCR “array” da via de autofagia. Heatmap mostra a análise de genes relacionados à autofagia agregados em diferentes categorias. Cada linha é representativa de um gene. Os dados são representativos de 4 amostras (PB), 7 (MB) e 7 (T1R).



Artigo 1 – Publicado (primeiro artigo dos dados obtidos no doutorado – dividido a autoria principal com Bruno Jorge de Andrade Silva)



Article

## Autophagy-Associated IL-15 Production Is Involved in the Pathogenesis of Leprosy Type 1 Reaction

Bruno Jorge de Andrade Silva <sup>1,†,‡</sup>, Tamiris Lameira Bittencourt <sup>1,†</sup>, Thyago Leal-Calvo <sup>1</sup>,  
Mayara Abud Mendes <sup>1</sup>, Rhana Berto da Silva Prata <sup>1</sup>, Mayara Garcia de Mattos Barbosa <sup>1,§</sup>,  
Priscila Ribeiro Andrade <sup>1,‡</sup>, Suzana Côrte-Real <sup>2</sup>, Gilberto Marcelo Sperandio da Silva <sup>3</sup>,  
Milton Ozório Moraes <sup>1</sup>, Euzenir Nunes Sarno <sup>1</sup> and Roberta Olmo Pinheiro <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil; brunojas85@outlook.com (B.J.d.A.S.); tamiris.lameira@gmail.com (T.L.B.); thyagoleal@yahoo.com (T.L.-C.); mayarah.rj@gmail.com (M.A.M.); rhana.prata@gmail.com (R.B.d.S.P.); may.barbosa.87@gmail.com (M.G.d.M.B.); prandrade86@gmail.com (P.R.A.); milton.moraes@fiocruz.br (M.O.M.); euzenir.sarno@fiocruz.br (E.N.S.)

<sup>2</sup> Structural Biology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil; scrif@ioc.fiocruz.br

<sup>3</sup> Evandro Chagas National Institute of Infectology, FIOCRUZ, Rio de Janeiro 21040-360, Brazil; gilbertomarcelo@gmail.com

\* Correspondence: robertaolmo@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

‡ Present address: Division of Dermatology, Department of Medicine, David Geffen School of Medicine at University of California (UCLA), Los Angeles, CA 90095, USA.

§ Present address: Department of Surgery, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA.



**Citation:** Silva, B.J.d.A.; Bittencourt, T.L.; Leal-Calvo, T.; Mendes, M.A.; Prata, R.B.d.S.; Barbosa, M.G.d.M.; Andrade, P.R.; Côrte-Real, S.; Sperandio da Silva, G.M.; Moraes, M.O.; et al. Autophagy-Associated IL-15 Production Is Involved in the Pathogenesis of Leprosy Type 1 Reaction. *Cells* **2021**, *10*, 2215. <https://doi.org/10.3390/cells10092215>

Academic Editors: Christian Münz and Mireille Verdier

Received: 1 May 2021

Accepted: 10 June 2021

Published: 27 August 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Abstract:** Leprosy reactional episodes are acute inflammatory events that may occur during the clinical course of the disease. Type 1 reaction (T1R) is associated with an increase in neural damage, and the understanding of the molecular pathways related to T1R onset is pivotal for the development of strategies that may effectively control the reaction. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is a key cytokine associated with T1R onset and is also associated with autophagy induction. Here, we evaluated the modulation of the autophagy pathway in *Mycobacterium leprae*-stimulated cells in the presence or absence of IFN- $\gamma$ . We observed that IFN- $\gamma$  treatment promoted autophagy activation and increased the expression of genes related to the formation of phagosomes, autophagy regulation and function, or lysosomal pathways in *M. leprae*-stimulated cells. IFN- $\gamma$  increased interleukin (IL)-15 secretion in *M. leprae*-stimulated THP-1 cells in a process associated with autophagy activation. We also observed higher *IL15* gene expression in multibacillary (MB) patients who later developed T1R during clinical follow-up when compared to MB patients who did not develop the episode. By overlapping gene expression patterns, we observed 13 common elements shared between T1R skin lesion cells and THP-1 cells stimulated with both *M. leprae* and IFN- $\gamma$ . Among these genes, the autophagy regulator Translocated Promoter Region, Nuclear Basket Protein (*TPR*) was significantly increased in T1R cells when compared with non-reactional MB cells. Overall, our results indicate that IFN- $\gamma$  may induce a *TPR*-mediated autophagy transcriptional program in *M. leprae*-stimulated cells similar to that observed in skin cells during T1R by a pathway that involves IL-15 production, suggesting the involvement of this cytokine in the pathogenesis of T1R.



# Autophagy as a Target for Drug Development Of Skin Infection Caused by Mycobacteria

Tamiris Lameira Bittencourt<sup>1</sup>, Rhana Berto da Silva Prata<sup>1</sup>,  
Bruno Jorge de Andrade Silva<sup>2</sup>, Mayara Garcia de Mattos Barbosa<sup>3</sup>,  
Margareth Pretti Dalcolmo<sup>4</sup> and Roberta Olmo Pinheiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup> Division of Dermatology, David Geffen School of Medicine, Los Angeles, CA, United States, <sup>3</sup> Department of Surgery, University of Michigan, Ann Arbor, MI, United States, <sup>4</sup> Helió Fraga Reference Center, Sergio Arouca National School of Public Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Esther Christina De Jong,  
Academic Medical Center,  
Netherlands

### Reviewed by:

Eun-Kyeong Jo,  
Chungnam National University,  
South Korea  
Mirian Nacagami Sotto,  
University of São Paulo, Brazil

### \*Correspondence:

Roberta Olmo Pinheiro  
robertaolmo@gmail.com

### Specialty section:

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

Pathogenic mycobacteria species may subvert the innate immune mechanisms and can modulate the activation of cells that cause disease in the skin. Cutaneous mycobacterial infection may present different clinical presentations and it is associated with stigma, deformity, and disability. The understanding of the immunopathogenic mechanisms related to mycobacterial infection in human skin is of pivotal importance to identify targets for new therapeutic strategies. The occurrence of reactional episodes and relapse in leprosy patients, the emergence of resistant mycobacteria strains, and the absence of effective drugs to treat mycobacterial cutaneous infection increased the interest in the development of therapies based on repurposed drugs against mycobacteria. The mechanism of action of many of these therapies evaluated is linked to the activation of autophagy. Autophagy is an evolutionary conserved lysosomal degradation pathway that has been associated with the control of the mycobacterial bacillary load. Here, we review the role of autophagy in the pathogenesis of cutaneous mycobacterial infection and discuss the perspectives of autophagy as a target for drug development and repurposing against cutaneous mycobacterial infection.

**Keywords:** autophagy, skin, mycobacteria, drug development, skin cells



Artigo 3 – Publicado (não relacionado ao tema da tese, participação como co-autora – divido a primeira autoria com Tatiana Pereira da Silva).



## Macrophage Polarization in Leprosy–HIV Co-infected Patients

Tatiana Pereira da Silva<sup>1†</sup>, Tamiris Lameira Bittencourt<sup>1†</sup>, Ariane Leite de Oliveira<sup>1</sup>, Rhana Berto da Silva Prata<sup>1</sup>, Vinicius Menezes<sup>1</sup>, Helen Ferreira<sup>1</sup>, José Augusto da Costa Nery<sup>1</sup>, Eliane Barbosa de Oliveira<sup>1</sup>, Gilberto Marcelo Sperandio da Silva<sup>2</sup>, Euzenir Nunes Sarno<sup>1†</sup> and Roberta Olmo Pinheiro<sup>1†</sup>

<sup>1</sup> Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup> Chagas Disease Clinic Research Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Lucia Lopalco,  
San Raffaele Hospital (IRCCS), Italy

#### Reviewed by:

Guido Poli,  
Vita-Salute San Raffaele  
University, Italy  
Karren M. Plain,  
University of Sydney, Brazil

#### \*Correspondence:

Roberta Olmo Pinheiro  
robertaolmo@gmail.com

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

#### Specialty section:

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

Received: 25 November 2019

Accepted: 08 June 2020


Published: 29 July 2020

In HIV-infected individuals, a paradoxical clinical deterioration may occur in preexisting leprosy when highly active antiretroviral therapy (HAART)-associated reversal reaction (RR) develops. Leprosy–HIV co-infected patients during HAART may present a more severe form of the disease (RR/HIV), but the immune mechanisms related to the pathogenesis of leprosy–HIV co-infection remain unknown. Although the adaptive immune responses have been extensively studied in leprosy–HIV co-infected individuals, recent studies have described that innate immune cells may drive the overall immune responses to mycobacterial antigens. Monocytes are critical to the innate immune system and play an important role in several inflammatory conditions associated with chronic infections. In leprosy, different tissue macrophage phenotypes have been associated with the different clinical forms of the disease, but it is not clear how HIV infection modulates the phenotype of innate immune cells (monocytes or macrophages) during leprosy. In the present study, we investigated the phenotype of monocytes and macrophages in leprosy–HIV co-infected individuals, with or without RR. We did not observe differences between the monocyte profiles in the studied groups; however, analysis of gene expression within the skin lesion cells revealed that the RR/HIV group presents a higher expression of macrophage scavenger receptor 1 (MRS1), CD209 molecule (CD209), vascular endothelial growth factor (VEGF), arginase 2 (ARG2), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG) when compared with the RR group. Our data suggest that different phenotypes of tissue macrophages found in the skin from RR and RR/HIV patients could differentially contribute to the progression of leprosy.

**Keywords:** leprosy, HIV-1, monocyte subsets, macrophage phenotype, co-infection

Capítulo de livro- Publicado (relacionado ao tema da tese)

PRATA, R. B. S.; DE MATTOS BARBOSA, MAYARA GARCIA ; DE ANDRADE SILVA, BRUNO JORGE ; DA PAIXÃO DE OLIVEIRA, JÉSSICA ARAÚJO ; **BITTENCOURT, T. L.** ; PINHEIRO, R. O. Macrophages in the Pathogenesis of Leprosy. In: Rhana Berto da Silva Prata; Mayara Garcia de Mattos Barbosa; Bruno Jorge de Andrade Silva; Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira; Tamiris Lameira Bittencourt; Roberta Olmo Pinheiro. (Org.) Macrophages in the Pathogenesis of Leprosy. 1ed.Londres: IntechOpen, 2019, v., p. 1-19.

 OPEN ACCESS PEER-REVIEWED CHAPTER

# Macrophages in the Pathogenesis of Leprosy

WRITTEN BY

Rhana Berto da Silva Prata, Mayara Garcia de Mattos Barbosa, Bruno Jorge de Andrade Silva, Jéssica Araujo da Paixão de Oliveira, Tamiris Lameira Bittencourt and Roberta Olmo Pinheiro

Submitted: December 3rd, 2018 , Reviewed: July 22nd, 2019 , Published: September 26th, 2019

DOI: 10.5772/intechopen.88754



FROM THE EDITED VOLUME

## Macrophage Activation

Edited by Khalid Hussain Bhat

[Book Details](#) | [Order Print](#)