



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-graduação em Biologia Parasitária**

**Envolvimento do receptor TLR-9 na resposta imune do hospedeiro  
durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae***

André Alves Dias

Rio de Janeiro  
Setembro/2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-graduação em Biologia Parasitária**

André Alves Dias

**Envolvimento do receptor TLR-9 na resposta imune do hospedeiro  
durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae***

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

**Orientadora:** Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Rio de Janeiro  
Setembro/2015

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

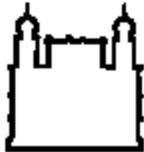
D541 Dias, André Alves

Envolvimento do receptor TLR-9 na resposta imune do hospedeiro durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae* / André Alves Dias. – Rio de Janeiro, 2015.  
xxi,152 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.  
Bibliografia: f. 135-151

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Proteína semelhante a histona (Hlp). 3. Histona. 4. DNA. 5. TLR-9. 6. Resposta imune inata. 7. Células epiteliais respiratórias. 8. Eritema nodoso hansênico. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-graduação em Biologia Parasitária**

André Alves Dias

**Envolvimento do receptor TLR-9 na resposta imune do hospedeiro  
durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae***

**Orientadora:** Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

**Aprovada em:** 10/09/2015

**EXAMINADORES:**

Dra. Roberta Olmo Pinheiro – IOC/Fundação Oswaldo Cruz (Presidente/Revisora)  
Dr. Fernando Augusto Bozza – INI/Fundação Oswaldo Cruz (Membro titular)  
Dra. Maria Bellio – IMPPG/Universidade Federal do Rio de Janeiro (Membro titular)  
Dr. Milton Ozório Moraes – IOC/Fundação Oswaldo Cruz (Suplente)  
Dra. Verônica Schmitz Pereira – IOC/Fundação Oswaldo Cruz (Suplente)

Rio de Janeiro  
Setembro/2015

A minhas avós Ad elk e Maria José,  
e a minha tia Marilza, que apesar de  
não terem me visto completar esta  
etapa em vida, me passaram os  
ensinamentos mais valiosos e foram  
verdadeiros exemplos de luta e  
superação.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Primeiramente agradeço a Deus, por me abençoar todos os dias e me permitir completar mais esta etapa;

Especialmente aos meus pais Idelci e Vera, pelo incansável apoio que me dão em todos os momentos e por acreditarem no meu sucesso;

Ao meu irmão Vitor, pela amizade verdadeira, pela cumplicidade e pelos dois melhores presentes que me deu: João Vitor e Luíze, que me fazem esquecer todos os problemas;

A todos da minha família, que por sermos tão unidos, não me deixam vacilar;

Aos meus amigos, por me proporcionarem momentos de distração e lazer;

À minha eterna orientadora Dra. Maria Cristina, por me ensinar tudo o que sei hoje sempre com muita paciência, dedicação e maestria;

Ao Dr. Geraldo, pelos importantes ensinamentos de imunologia e por deixar o seu laboratório sempre de portas abertas para mim;

À Dra. Euzenir, por permitir trabalhar no Laboratório de Hanseníase e por cuidadosamente me ajudar a entender e diagnosticar os casos;

Ao Dr. José Augusto, pelo apoio essencial no recrutamento dos pacientes;

À Dra. Alice, por ter me explicado tudo sobre as lâminas de histologia e me ensinado bastante sobre processos inflamatórios na hanseníase;

À minha querida aluna Camila, pelo comprometimento com o trabalho e por ter ajudado tanto em todas as etapas. Sem você, este trabalho não teria sido possível;

Aos grandes amigos do Laboratório de Microbiologia Celular: Jéssica e Débora (pela diversão garantida e por sempre estarem dispostas a ajudar com muito bom humor); Chyntia (pela amizade e pelo apoio incondicional em todas as etapas deste trabalho), João e Léo (pela amizade de cada um e pela contribuição); Luciana (pela paciência em ajudar e ensinar sempre com muito carinho); Robertha (pela amizade e por ser sempre tão solícita quando precisamos); Rychelle Clayde e Márcia (por ouvirem minhas reclamações e pelos momentos de descontração); Cristiana (por ser tão carinhosa e atenciosa); Fernanda, Fabrício, Karina, Sabrina, Thabatta, Larissa e Arthur (pela amizade e pelo apoio nos experimentos); Natasha (pela ajuda no início de tudo); Ângela (pela ajuda nas importações de reagentes); Katherine (por ser uma verdadeira conselheira); Fernanda Luz, Sueyde, Plínio e Michele (novas e essenciais aquisições do laboratório); Letícia e Flávio (pelos conselhos);

A todos do Pavilhão de Hanseníase: Thiago (pela amizade e pela ajuda nos experimentos de PCR); Priscila Ellen (pela doçura e pela amizade); Amanda (pela ajuda no artigo e pelo profissionalismo); Eliane, Rhana e Mayara Mendes (pela imensa contribuição na disponibilidade do material do Laboratório de Hanseníase); Hellen (pela ajuda na confecção de lâminas de histologia); Harrison (por ter sempre uma palavra de apoio); Dra. Verônica (por me ajudar em vários momentos sempre com muita boa vontade), Dr. Milton (pelos ensinamentos de sempre); Íris (por sempre “quebrar meus galhos” quando eu me enrolava, às vezes sem muita paciência, mas sempre com muito carinho), Sidra, Marcinha, Phillip, Raquel, Fernanda Manta, Ohanna, Lucia, Suellen, Carolzinha, Paula, Carol “Baiana”, Renuka, Danuza, Isabela, Mariana, Rafael Petito, Otto, Vilma e Tamiris (pelo apoio e suporte a todo momento); Andréa e Jean (por carregarem todo o departamento nas costas sem nunca perderem o humor); Solange (por ser diversão garantida e por todo apoio técnico no pavilhão); Elisa, Andréa, Lúcia e Sig (por aturarem minhas

brincadeiras); Seu Salles (pelas palavras de apoio e companhia nas noites e madrugadas do laboratório);

À Dra. Roberta Olmo, pela criteriosa revisão da tese e pela ajuda intelectual;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária pelos valorosos ensinamentos e pelas excelentes aulas ministradas;

Ao IOC, pela bolsa concedida.

**“Há mais mistérios neste mundo,  
do que a nossa vã filosofia pode  
imaginar.”**

Willian Shakespeare

*Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase, expressa em abundância uma proteína catiônica semelhante às histonas, denominada Hlp, presente tanto no envelope como no nucleóide bacteriano. O reconhecimento do DNA bacteriano, rico em motivos CpG não metilados, pelo receptor TLR-9 representa uma importante via para a ativação da resposta imune inata, a qual pode levar à eliminação do agente infeccioso ou mediar manifestações patológicas. Foi mostrado ainda que complexos DNA-histona são mais potentes agonistas de TLR-9 que DNA sozinho. Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o envolvimento do receptor TLR-9 na ativação da resposta imune do hospedeiro durante o curso da infecção pelo *M. leprae*. Inicialmente foi analisada a participação do TLR-9 na ativação da resposta imune inata em células epiteliais alveolares da linhagem A549 após estímulo com *M. leprae*. *M. leprae* foi capaz de induzir aumento das quimiocinas IL-8 e MCP-1 e a transcrição gênica do peptídeo antimicrobiano H $\beta$ D-2 nas células epiteliais. O aumento da expressão de CD80 na superfície celular também foi observada após estímulo com o bacilo. O complexo CpG-Hlp micobacteriano solúvel também induziu aumento na produção de IL-8 nas células A549. Foi observado que o aumento de IL-8 induzido pelo *M. leprae* ocorre de forma dependente da translocação nuclear do NF- $\kappa$ B e que o antagonista sintético de TLR-9 afetou a secreção de IL-8 induzida pelo *M. leprae*. A adição de CpG ao *M. smegmatis* selvagem, mas não mutante para o gene *hlp*, aumentou a produção de IL-8 pelas células epiteliais. Em conjunto, esses dados sugerem que as células epiteliais respiratórias podem reconhecer *M. leprae* via TLR-9 e, assim, participar da resposta imune inata no sítio inicial da infecção. Uma vez que o aparecimento do eritema nodoso hansênico (ENH) está associado a liberação massiva de antígenos micobacterianos, foi investigado o envolvimento do TLR-9 na patogênese do ENH. Neste sentido, foi verificado o aumento da expressão de TLR-9, tanto em lesões de pele como em células mononucleares periféricas de pacientes reacionais, quando comparados com pacientes não reacionais. Posteriormente foram quantificados os níveis de ligantes de TLR-9 na circulação dos pacientes. Além de DNA de *M. leprae*, altos níveis de Hlp foram detectados no soro de pacientes reacionais. Como o TLR-9 também reconhece DNA endógeno, os níveis circulantes do complexo DNA-histona humano foram quantificados e observou-se um aumento destes complexos no soro de pacientes reacionais. Demonstramos que PBMCs de pacientes reacionais secretam níveis aumentados das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  em resposta ao complexo CpG-Hlp em comparação a pacientes não reacionais e indivíduos saudáveis. Finalmente, o antagonista sintético de TLR-9 inibiu a secreção das citocinas pelas PBMCs em resposta ao lisado de *M. leprae*. Em conjunto, esses resultados sugerem um importante envolvimento do receptor TLR-9 no processo inflamatório desencadeado no ENH abrindo perspectivas para novas abordagens imunoproláticas e terapêuticas.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*, proteína semelhante a histona (Hlp), histona, DNA, TLR-9, resposta imune inata, células epiteliais respiratórias e eritema nodoso hansênico.

## ABSTRACT

---

*Mycobacterium leprae*, etiological agent of leprosy, expresses in abundance a cationic protein similar to histones, called histone-like protein (Hlp), present in the envelope as well as in bacterial nucleoid. The recognition of bacterial DNA rich in unmethylated CpG motifs by TLR-9 is an important pathway for activation of the innate immune response, which can lead to the elimination of the infectious agent or mediate pathological manifestations. Moreover, studies showed that DNA-histone complexes are more potent agonists of TLR-9 than DNA alone. This study aimed to investigate the involvement of TLR-9 in the activation of the host immune response during the course of *M. leprae* infection. Initially, we analyzed the participation of TLR-9 activation on the innate immune response in A549 alveolar epithelial cells after stimulation with *M. leprae*. It was shown that *M. leprae* was able to induce the chemokines IL-8 and MCP-1, and gene transcription of antimicrobial peptide H $\beta$ D-2 in epithelial cells. The increase of CD80 expression on the cell surface was also observed after stimulation with bacillus. Soluble mycobacterial CpG-Hlp complex also induced an increase in IL-8 in A549 cells. It was observed that the increase of IL-8, induced by *M. leprae*, occurs dependently nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and synthetic TLR-9 antagonist affected IL-8 secretion induced by *M. leprae*. The addition of CpG to wild type *M. smegmatis*, but not to the mutant gene hlp, increased IL-8 production by epithelial cells. As a whole, these results suggest that respiratory epithelial cells can recognize *M. leprae* via TLR-9 and thus participate in the innate immune response in the initial infection site. Since the appearance of erythema nodosum leprosum (ENL) is associated with the massive release of mycobacterial antigens, it was investigated the involvement of TLR-9 in the pathogenesis of ENL. In this sense, we observed an increase in expression of TLR-9, both in skin lesions and peripheral mononuclear cells of ENL patients, when compared with nonreactional patients. Subsequently, we measured the levels of TLR-9 ligands in the circulation of patients. In addition to *M. leprae* DNA, high levels of Hlp were detected in the serum of ENL patients. As TLR-9 also recognizes endogenous DNA, circulating levels of the human DNA-histone complex were quantified, and we also observed an increase of these complexes in the serum of ENL patients. Furthermore, PBMCs from ENL patients secreted elevated levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  cytokines in response to CpG-Hlp complex, when compared to nonreactional patients and healthy individuals. Finally, synthetic antagonist of TLR-9 inhibited the secretion of cytokines by PBMCs in response to *M. leprae* lysates. The results described in the second part of the study suggest a major involvement of TLR-9 receptor in the inflammatory process triggered in ENL, opening up prospects for new immunoprophylactic and therapeutic approaches.

**Key-words:** *Mycobacterium leprae*, histone-like protein (Hlp), histone, DNA, TLR-9, innate immune response, respiratory epithelial cells and erythema nodosum leprosum.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ADC	Albumina de soro bovino, dextrose e catalase
APC	Célula apresentadora de antígeno
APC	Aloficocianina
ATCC	American Type Culture Collection
ATF-4	Fator ativador de transcrição 4
BB	Borderline borderline
BI	Índice baciloscópio
bp	Pares de base
BSA	Albumina sérica bovina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BL	Borderline lepromatoso
BT	Borderline tuberculóide
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CLR	Receptor de lectina do tipo C
CpG-ODN	Oligonucleotídeo CpG (Citosina-fosfato-Guanina)
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato (N=A, C, G ou T)
D.O.	Densidade óptica
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HBHA	Adesina hemaglutinina ligante de heparina
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina-N`-2-ácido etanosulfônico
HHV-8	Herpesvírus 8 humano
Hlp	Proteína semelhante a histona
HU	Proteína histona-símile de bactéria
H $\beta$ D	Beta-defensina
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma

IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
Jak2/STAT3	Janus quinases ativadas 2/ativador de transcrição e transdução de sinal 3
kDa	Quilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
LM	Lipomanana
LPS	Lipopolissacarídeo
LL	Lepromatoso lepromatoso
LL-37	Catelecidina
LT	Linfotoxina
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MDP-1	Proteína-1 ligante de DNA
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
MOI	Multiplicidade de infecção
Myd88	Fator de diferenciação mielóide 88
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator nuclear-kappa B
NK	Do inglês, <i>natural killer</i>
NLR	Receptor Nod-like
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PB	Paucibacilar
PE	Ficoeritrina
PIM	Fosfatidilinositol manosídeos
PBS	Salina tamponada com fosfato
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDIM	Ácido micocerosóico

PEES	Penicilina e estreptomicina
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
PL	Fosfolípidos
PQT	Poliquimioterapia
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RANTES	Molécula regulada na ativação normal de célula T expressa e secretada
rHlp	Proteína semelhante a histona recombinante
RLR	Receptor RIG-1-like
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RR	Reação Reversa
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Tampão tris-salina
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TMM	Monomicolato de trealose
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alpha
WHO	Organização Mundial de Saúde
wt	Selvagem
x g	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
$\Delta hlp$	Mutante para o gene <i>hlp</i>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

---

Ilustração	Páginas
<b>Tabela 1:</b> O genoma do <i>M. leprae</i> (adaptado de Cole <i>et al.</i> , 2001) .....	02
<b>Table 1:</b> Demographic characteristics and epidemiological data of individuals included in the study .....	106
<b>Figura 1:</b> Organização espacial do envelope celular do <i>M. leprae</i> (Adaptado de Vissa & Brennan, 2001) .....	03
<b>Figura 2:</b> Mapa representativo da distribuição mundial da hanseníase no ano de 2012 (acesso em 20 de julho de 2015) .....	05
<b>Figura 3:</b> Espectro de formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley & Jopling (1966) (Adaptado de Walker & Looockwood (2006) .....	07
<b>Figura 4:</b> Aspecto das lesões cutâneas durante eritema nodoso hansênico. Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Jason Antônio Barreto do Instituto Lauro Souza Lima (ILSL), Bauru/SP .....	11
<b>Figura 5:</b> A imunidade inata no epitélio respiratório (Parker & Prince, 2011) .....	15
<b>Figura 6:</b> Modulação da resposta imune por células epiteliais respiratórias (Mayer & Dalpke, 2007) .....	17
<b>Figura 7:</b> Esquema representativo da Hlp de <i>M. leprae</i> , mostrando sua homologia com proteínas histona-símile (HU) de bactérias e histonas da classe H1 de eucariotos .....	19

<b>Figura 8:</b> Alinhamento da seqüência de aminoácidos da Hlp de diferentes micobactérias (Lefrançois <i>et al.</i> , 2011) .....	21
<b>Figura 9:</b> Seqüência de aminoácidos da Hlp de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> e identificação dos sítios de ligação da proteína (região I na porção N-terminal e II na C-terminal) à matriz extracelular do hospedeiro (Portugal <i>et al.</i> , 2008) .....	21
<b>Figura 10:</b> Via de sinalização mediada por TLR-9 (adaptado de Kumagai <i>et al.</i> , 2008) .....	25
<b>Figura 11:</b> Secreção de quimiocinas induzidas por <i>M. leprae</i> em células epiteliais alveolares .....	45
<b>Figura 12:</b> Níveis de RNAm de IL-8 e H $\beta$ D-2 em células epiteliais alveolares estimuladas com <i>M. leprae</i> .....	47
<b>Figura 13:</b> Expressão de CD80 induzida por <i>M. leprae</i> na superfície de células epiteliais alveolares .....	49
<b>Figura 14:</b> Translocação nuclear de NF- $\kappa$ B em células epiteliais alveolares estimuladas com <i>M. leprae</i> .....	52
<b>Figura 15:</b> Secreção de IL-8 e MCP-1 por células epiteliais alveolares pré-tratadas com wedelolactone e estimuladas com <i>M. leprae</i> .....	53
<b>Figura 16:</b> Secreção de TNF- $\alpha$ por PBMCs humanas após tratamento com rHlp de <i>M. leprae</i> .....	56
<b>Figura 17:</b> Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo do complexo CpG-rHlp .....	56

<b>Figura 18:</b> Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares pré-tratadas com E6446 e estimuladas com <i>M. leprae</i> .....	58
<b>Figura 19:</b> Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com <i>M. smegmatis</i> wt ou $\Delta hlp$ na presença ou ausência do oligonucleotídeo CpG .....	60
<b>Figura 20:</b> Modelo representando o possível envolvimento do receptor TLR-9 na ativação da resposta imune de células epiteliais respiratórias infectadas com <i>M. leprae</i> .....	126
<b>Figura 21:</b> Modelo representando o possível envolvimento do receptor TLR-9 na patogênese do ENH .....	131
<b>Figure 1:</b> TLR-9 is up-regulated in ENL skin lesions .....	107
<b>Figure 2:</b> Peripheral mononuclear cells of ENL express higher levels of TLR-9 .....	108
<b>Figure 3:</b> Circulating pathogen- and host-derived DNA-histone complexes levels are higher in ENL patients .....	109
<b>Figure 4:</b> PBMCs from ENL are more responsive to CpG-Hlp than BL/LL cells producing higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ .....	110
<b>Figure 5:</b> A TLR-9 antagonist inhibits <i>M. leprae</i> -induced pro-inflammatory cytokines secretion by peripheral mononuclear cells of ENL patients .....	111
<b>Supplementary figure 1:</b> Circulating pathogen- and host-derived DNA-histone complexes levels are higher in ENL patients .....	112

<b>Supplementary figure 2:</b> Circulating levels of Hsp in untreated BL/LL and ENL patients .....	113
<b>Supplementary figure 3:</b> Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ by PBMCs from ENL and nonreactive multibacillary leprosy patients (BL/LL) in response to <i>M. leprae</i> sonicate .....	114

<b>Conteúdo</b>	<b>Páginas</b>
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	xv
<b>SUMÁRIO</b> .....	xix
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
1. <i>Mycobacterium leprae</i> .....	01
2. A Hanseníase .....	04
2.1. Eritema Nodoso Hansênico: uma reação do tipo II .....	10
3. O epitélio do trato respiratório: provável via de entrada do <i>M. leprae</i> no hospedeiro .....	14
4. A proteína Hlp e sua importância na patogênese das micobactérias .....	18
5. Envolvimento do TLR-9 na geração da resposta imune: proteção e imunopatologia .....	22
<b>OBJETIVOS</b> .....	30
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	32
1. Linhagem celular .....	32
2. Meio de cultivo de células eucarióticas .....	32
3. Micobactérias .....	32
4. Meio de cultivo de micobactérias .....	33
5. Quantificação de micobactérias .....	34
6. Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas .....	34
7. Proteína recombinante de <i>M. leprae</i> .....	35
8. Ensaios de estimulação de células epiteliais alveolares .....	35

9. Dosagem de citocinas e quimiocinas (ELISA) .....	36
10. Dosagem de óxido nítrico (Método de Griess) .....	37
11. Isolamento de RNA total e síntese de cDNA .....	37
12. Análise da transcrição gênica (PCR em tempo real) .....	39
13. Análise da expressão de moléculas de superfície celular (citometria de fluxo) .....	39
14. Purificação de extrato nuclear .....	40
15. Determinação da translocação nuclear de NF- $\kappa$ B (ELISA e <i>immunoblotting</i> ) .....	40
15.1. ELISA .....	40
15.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e <i>immunoblotting</i> ...	41
16. Análise estatística .....	42
<b>RESULTADOS – parte 1</b> .....	43
1. Efeito do <i>M. leprae</i> na secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares .....	43
2. Efeito do <i>M. leprae</i> na transcrição gênica de IL-8 e H $\beta$ D-2 em células epiteliais alveolares .....	46
3. Efeito do <i>M. leprae</i> na expressão de CD80 na superfície de células epiteliais alveolares .....	48
4. Translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e seu envolvimento na produção de mediadores inflamatórios em células epiteliais alveolares tratadas com <i>M. leprae</i> .....	50
5. Efeito da proteína rHlp ligada ao oligonucleotídeo CpG na secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares .....	54
6. Envolvimento do receptor TLR-9 na secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares tratadas com <i>M. leprae</i> .....	57
7. Análise do envolvimento da Hlp na ligação de DNA com a superfície micobacteriana .....	59

<b>RESULTADOS – parte 2</b> .....	61
<b>Artigo:</b> DNA sensing via TLR-9 constitutes a major innate immunity pathway activated during erythema nodosum leprosum (situação: em preparação) .....	63
<b>DISCUSSÃO</b> .....	115
<b>CONCLUSÕES</b> .....	132
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	135
<b>ANEXO</b> .....	152
<b>Artigo:</b> Mycobacterial laminin-binding histone-like protein mediates collagen-dependent cytoadherence (situação: publicado)	

### 1. *Mycobacterium leprae*

*M. leprae*, também conhecido como bacilo de Hansen, foi descoberto por Gerhard Henrick Armauer Hansen em 1873 na Noruega, sendo a primeira bactéria apontada como agente causador de uma doença infecciosa. Este bacilo é um patógeno intracelular obrigatório de crescimento lento com tropismo preferencial por células de Schwann e macrófagos (Kaufmann *et al.*, 1989), não sendo possível cultivá-lo *in vitro* até os dias atuais, o que tem dificultado, durante todos esses anos, o seu estudo.

Em 1960, Shepard demonstrou que o coxim plantar de camundongos Balb/c infectados com  $10^3$  a  $10^4$  bacilos podia sustentar uma multiplicação limitada da bactéria por 9 a 12 meses (Shepard, 1960). Por outro lado, foi demonstrado que camundongos timentomizados apresentavam uma infecção generalizada após serem inoculados com *M. leprae* (Shepard, 1962). Visto isso, o desenvolvimento do modelo murino *nu/nu* atímico, para cultivo do bacilo em coxim plantar e posterior obtenção de grandes concentrações de bactérias viáveis, se tornou possível para uso experimental (Truman & Krahenbuhl, 2001; Lahiri *et al.*, 2005). Alguns anos depois, o tatu da espécie *Dasypus novencintus*, conhecido como tatu de nove bandas, foi apontado como um hospedeiro susceptível à infecção por *M. leprae*, revolucionando os estudos sobre este patógeno. O bacilo se propaga no tatu de forma disseminada durante 18 a 24 meses, e os órgãos mais afetados são o baço e o fígado que chegam a apresentar mais de  $10^9$  bacilos por grama de tecido (Kirchleimer & Storrs, 1971; Lloyd & Draper, 1986).

A conclusão do seqüenciamento do genoma do *M. leprae* ocorreu somente em 2001, revelando que o seu tamanho é muito menor quando comparado a outras micobactérias (em torno de 3,3 bp) (Cole *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 2001). Além disto, a capacidade codificante do genoma do *M. leprae* é extremamente baixa, pois se todos os genes deste patógeno fossem ativos, esperaríamos em torno de 3.000 proteínas produzidas. Entretanto, foi mostrado que o *M. leprae* possui apenas aproximadamente 50% da capacidade

codificante, sendo observado uma enorme quantidade de pseudogenes no seu genoma (Cole *et al.*, 2001) (**Tabela 1**).

**Tabela 1:** O genoma do *M. leprae* (adaptado de Cole *et al.*, 2001)

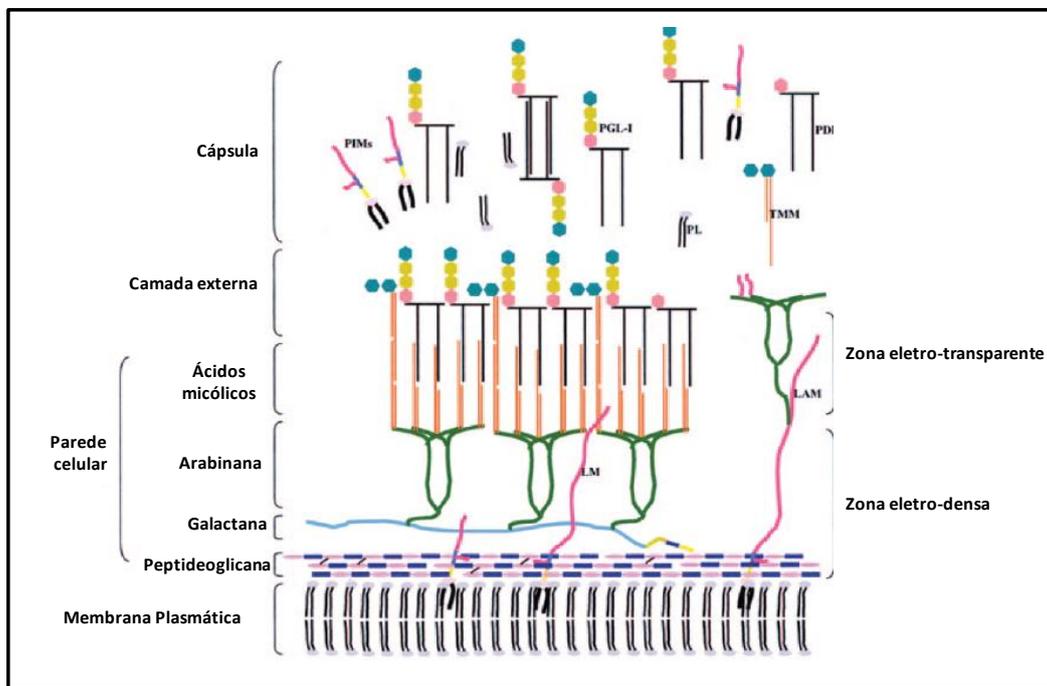
Característica	<i>M. leprae</i>
Tamanho do genoma (bp)	3.268.203
Conteúdo G+C (%)	57,79
Proteínas codificantes (%)	49,5
Genes que codificam proteínas (nº)	1.604
Pseudogenes (nº)	1.116

Os dados apresentados na tabela 1 indicam que o *M. leprae* foi submetido a uma evolução reductiva, isto é, evolução no qual ocorreu a perda de genes pelo microrganismo. Esta perda massiva de genes pode, em parte, explicar a taxa de crescimento lenta do bacilo e a razão do *M. leprae* ser um parasito intracelular obrigatório, pois as funções controladas pelos genes que foram inativados não se mostram importantes para o modo de vida intracelular do bacilo.

Uma importante característica do *M. leprae*, compartilhada com as outras micobactérias, é a presença de um envoltório celular extremamente rico em lipídeos complexos que não são encontrados em outros gêneros de bactérias. Este envelope complexo contribui para a integridade estrutural das micobactérias, atuando como uma barreira impermeável às moléculas tóxicas (Hoffman *et al.*, 2008). Neste sentido, uma das grandes preocupações em relação às infecções causadas por estes microrganismos é que a maioria deles é resistente a vários antibióticos e aos agentes quimioterápicos, devido à complexa e peculiar estrutura do envelope celular destas bactérias (Zuber *et al.*, 2008), dificultando, assim, a prevenção da transmissão do patógeno.

O envelope celular do *M. leprae* possui uma estrutura química semelhante a de outras micobactérias, sendo composto por peptidoglicanos ligados à camada de galactana, a qual se unem a cadeias ramificadas de arabinana, formando uma zona eletro-densa em torno do *M. leprae*. Os ácidos micólicos são ligados nas extremidades das cadeias de arabinana constituindo o folheto interno de uma falsa bicamada lipídica. Lipoglicanas como

lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM), conhecidas por se ancorarem à membrana plasmática, também são encontradas na parede celular do *M. leprae*. Na região mais superficial do envelope é encontrada a camada capsular, que consiste de uma complexa matriz composta de proteínas, além de componentes lipídicos e carboidratos. (Vissa & Brennan, 2001) (**Figura 1**). Dentre os lipídeos encontrados na camada mais externa do envelope do *M. leprae*, é importante destacar o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), específico desta espécie e encontrado em abundância na superfície do bacilo (Hunter & Brennan, 1981; Ng *et al.*, 2000).



**Figura 1: Organização espacial do envelope celular do *M. leprae*.** A parede celular é composta por peptideoglicanos ligados covalentemente a arabinogalactana. Ácidos micólicos estão ligados aos resíduos terminais de arabinose. A camada mais externa apresenta: glicolípido fenólico 1 (PGL-1), monomicolato de trealose (TMM), ácidos micocerosóicos (PDIMs), fosfatidilinositol monosídeos (PIMs) e fosfolipídeos (PL) (Adaptado de Vissa & Brennan, 2001).

Estudos recentes realizados com *M. tuberculosis* indicaram também a presença de moléculas de DNA ligados na parede celular da bactéria (Watson *et al.* 2012; Manzanillo *et al.*, 2012). A presença de DNA extracelular provavelmente é resultante de lise bacteriana que faz com que ocorra o extravasamento da molécula e, devido ao seu alto grau de estabilidade, não

ocorra degradação da mesma, sendo possível a sua ligação na parede de bactérias viáveis. Neste sentido, podemos sugerir que o mesmo efeito ocorre com outras espécies de micobactérias, inclusive com *M. leprae*, já que a viabilidade deste patógeno é reconhecidamente baixa no hospedeiro (Silva *et al.*, 1984).

Durante vários anos tem se estudado o mecanismo utilizado pelo *M. leprae* para aderir às células hospedeiras. Rambukkana e colaboradores (1997) publicaram um trabalho mostrando que *M. leprae* se liga preferencialmente à cadeia  $\alpha$ -2 da laminina, sendo esta ligação responsável pela aderência do bacilo às células de Schwann (Rambukkana *et al.*, 1997). Mais tarde foi mostrado que a proteína semelhante à histona (Hlp) e o PGL-1, componentes da parede celular de *M. leprae*, são capazes de mediar a interação de *M. leprae* com a célula de Schwann via laminina-2 (Shimoji *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2000). A proteína Hlp também se mostrou potencialmente capaz de mediar a ligação do bacilo aos macrófagos, devido a sua afinidade com componentes da matriz extracelular (Lima *et al.*, 2005; Dias *et al.*, 2012). Além disso, através de estudos histopatológicos, foi mostrado também que *M. leprae* expressa a proteína Hlp durante a infecção humana (Lima *et al.*, 2005).

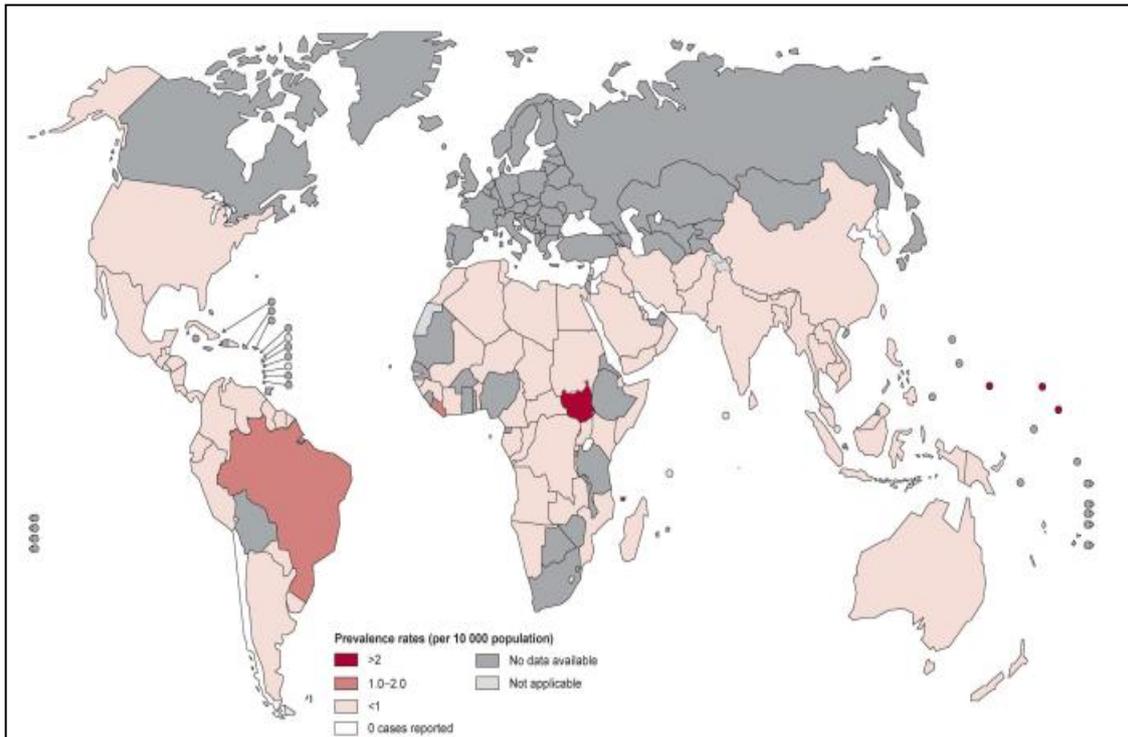
## **2. A Hanseníase**

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, cujo agente etiológico é o *M. leprae*, e que afeta a pele e os nervos periféricos, o que pode resultar em degeneração do axônio, desmielinização e fibrose, muitas vezes causando a perda de sensibilidade protetora que leva a deformações físicas (revisado por Scollard *et al.*, 2006).

O tratamento da doença surgiu em 1940 com a introdução da dapsona e seus derivados, causando uma revolução no controle da enfermidade, já que o isolamento do paciente não se tornou mais necessário (revisado por Barr, 2011).

Apesar de ter sido descoberta há tanto tempo, a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública em alguns países. De acordo com o relatório oficial recebido de 103 países e territórios, a prevalência global registrada no final do primeiro trimestre de 2014 foi de 180.464 casos,

enquanto que o número de novos casos detectados durante o ano de 2013 foi de 215.557. Na América Latina, o Brasil se destaca, apresentando aproximadamente 80% dos casos do continente, com 33.303 novos casos registrados em 2012, e a prevalência neste mesmo ano foi de 29.311 casos (com taxa de prevalência de 14,8 casos em 100.000 habitantes) (WHO, 2015) (Figura 2).



**Figura 2: Mapa representativo da distribuição mundial da hanseníase no ano de 2012** (Fonte: [http://www.who.int/lep/situation/Leprosy\\_PR\\_2011.pdf?ua=1](http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2011.pdf?ua=1); acesso em 20 de julho de 2015).

A hanseníase pode afetar indivíduos em todas as faixas etárias e em ambos os sexos. Embora a forma de transmissão do patógeno não esteja bem estabelecida, acredita-se que ela ocorra por contato pessoa-a-pessoa e que o *M. leprae* se dissemine através da inalação de aerossóis ou pelo contato cutâneo com secreções respiratórias e exsudatos de feridas (Job *et al.*, 2008).

A infecção causada pelo *M. leprae* apresenta um longo período de latência, sendo que o tempo médio de incubação nos pacientes varia desde dois até dez anos, aproximadamente (Noordeen *et al.*, 1992). Acredita-se que este longo período de incubação contribua para a transmissão do bacilo, pois

antes mesmo da manifestação clínica dos sintomas, o indivíduo já seria um transmissor em potencial.

A suscetibilidade ou resistência à infecção pelo *M. leprae* depende de fatores imunológicos e predisposição genética do indivíduo (Yamamura *et al.*, 1991; revisto por Fernando & Britton, 2006; revisto por Schurr *et al.*, 2006; revisto por Misch *et al.*, 2010). Desta maneira, a maioria dos indivíduos que entram em contato com o bacilo é capaz de desenvolver uma resposta imune eficiente e, conseqüentemente, são resistentes ao patógeno. Apenas uma pequena porcentagem adoece e passa a manifestar uma das diferentes formas clínicas que constituem um espectro contínuo dos estados da doença. Este espectro resulta do grau de resistência do hospedeiro à infecção, ou seja, da sua capacidade de gerar uma resposta imune celular específica mediada por interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) (revisto por Pinheiro *et al.*, 2011). De acordo com Ridley e Jopling (1966), este espectro apresenta duas formas polares opostas, consideradas imunologicamente estáveis. Em um dos pólos do espectro estão os pacientes que possuem uma resposta imune celular parcialmente eficiente e baixa carga bacilar, apresentando a forma tuberculóide polar (TT); no outro pólo estão os pacientes que possuem uma imunidade celular deficiente e, conseqüentemente, uma infecção generalizada, manifestando a forma lepromatosa polar (LL). Os estados intermediários do espectro são: *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL) (**Figura 3**).

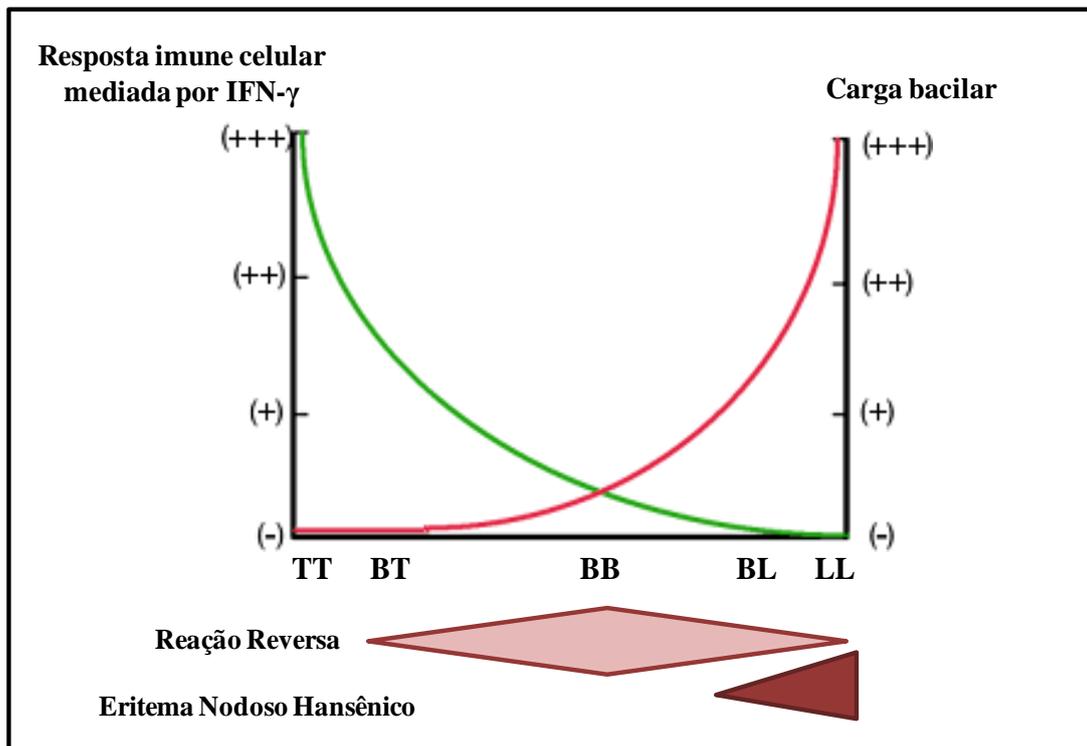


Figura 3: Espectro de formas clínicas da hanseníase de acordo com a classificação de Ridley & Jopling (1966). Modelo esquemático adaptado de Walker & Lookwood (2006).

A Organização Mundial de Saúde (WHO) estabeleceu a classificação clínica dos pacientes em dois grupos para melhor delimitar os esquemas terapêuticos: 1) Multibacilar (LL, BL, BB), caracterizada pela presença de carga bacilar positiva na biopsia, seis ou mais lesões cutâneas e esfregaço positivo para a presença da bactéria; e 2) Paucibacilar (TT, BT), onde raros bacilos são observados, apresentando cinco ou menos lesões cutâneas e esfregaço negativo (WHO, 1998).

Ao longo da evolução da hanseníase, aproximadamente metade dos pacientes apresentam episódios inflamatórios (Nery *et al.*, 1998; Nery *et al.*, 2013) conhecidos como estados reacionais ou reações hansênicas. As reações representam episódios inflamatórios agudos ou subagudos, tanto nos pacientes paucibacilares como nos multibacilares. Existem dois tipos de reações hansênicas, que refletem o processo inflamatório mediado pela resposta imune envolvendo mecanismos de hipersensibilidade distintos e que, provavelmente, constituem as bases para as manifestações clínicas de ambos os estados reacionais: a reação do tipo I, também conhecida como reação reversa (RR) e

a reação do tipo II, que se manifesta, principalmente, através do eritema nodoso hansênico (ENH) (**Figura 3**) (Nery *et al.* 1998; revisto por Harboe, 2000). A RR caracteriza-se por uma inflamação aguda desencadeada por um desenvolvimento súbito de imunidade celular. Já o ENH normalmente é referido como uma reação provocada por imunocomplexos, no entanto alguns autores demonstraram aumento transitório da imunidade celular durante esses episódios (revisto por Foss *et al.*, 2003; Gallo *et al.*, 2005; revisto por Kahawita & Lockwood, 2008; revisto por Pinheiro *et al.*, 2011; Martiniuk *et al.*, 2012).

O tratamento da doença é feito através de poliquimioterapia (PQT), que é uma associação de antibióticos empregada para eliminar o bacilo (WHO, 2015). Para tratar os pacientes multibacilares é utilizada a combinação das drogas rifampicina, clofazimina e dapsona em doses mensais e diárias por 12 a 24 meses. Já os pacientes paucibacilares são tratados com rifampicina e dapsona por 6 meses. Até o momento nenhuma vacina foi elaborada para a prevenção da doença, no entanto a vacina BCG (bacilo Calmette-Guérin), elaborada a partir de uma bactéria atenuada de origem bovina (*Mycobacterium bovis*) usada na prevenção da tuberculose, se mostrou capaz de conferir proteção parcial contra a hanseníase (Rodrigues *et al.*, 2007). Sendo assim, em adição ao tratamento com a PQT, o programa de controle da hanseníase no Brasil recomenda a vacinação intradérmica com BCG em contatos intradomiciliares de pacientes multibacilares e que se apresentem sem presença de sinais e sintomas, considerados o grupo com maior risco de desenvolver a doença. (Ministério da Saúde, 2009).

As diferenças entre as formas clínicas tuberculóide e lepromatosa podem ser observadas através dos padrões de citocinas produzidas e os tipos de células inflamatórias apresentados por esses pacientes. Através de análises por imunohistoquímica e da expressão gênica de citocinas a partir de RNA mensageiro (RNAm) purificado de lesões hansênicas, foi identificado aumento de interleucina-2 (IL-2), IL-12, IL-15, IL-18, linfotóxina (LT), INF- $\gamma$  e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) em pacientes da forma tuberculóide. Além disso, as lesões foram caracterizadas pela formação de granulomas epitelióides bem definidos e infiltrados de linfócitos CD4<sup>+</sup> produtores de INF- $\gamma$ . Por outro lado, na pele de pacientes lepromatosos, a

expressão dos genes para IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13 foi mais evidente (Yamamura *et al.*, 1991; revisto por Modlin, 1994; revisto por Sieling & Modlin, 1994; Moraes *et al.*, 1999). Nestes pacientes, as lesões cutâneas apresentam atrofia epidérmica, e na derme ocorrem poucos granulomas e a presença de linfócitos T predominantemente CD8<sup>+</sup>. O infiltrado inflamatório pode ser identificado em vários níveis da pele e predominam os macrófagos vacuolizados, caracterizados pelo aumento de lipídeos e que estão altamente infectados com *M. leprae* (revisto por Walker e Lockwood, 2006). Todos estes dados foram reforçados por análises de expressão gênica e secreção de citocinas em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), além da dosagem de citocinas circulantes em pacientes tuberculóides e lepromatosos (Misra *et al.*, 1995; Belgaumkar *et al.*, 2007). Importante ressaltar que muitos pacientes podem exibir um perfil de resposta mista, com produção de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 (revisto por Scollard *et al.*, 2006), quebrando o paradigma Th1/Th2 que prevaleceu durante anos para diferenciar os tipos de resposta imune dentro do espectro de formas clínicas da doença. Além disso, atualmente também já está sendo descrito o envolvimento da resposta do tipo Th17 na discriminação dos grupos dos pacientes. Através de análises de expressão gênica, foi observada uma diminuição de IL-17 tanto em lesões de pele quanto em PBMCs de pacientes lepromatosos quando comparados aos tuberculóides e indivíduos saudáveis. O mesmo efeito foi observado ao analisar a presença de IL-21 e IL-22 em PBMCs nestes mesmos grupos (Saini *et al.*, 2013). Um outro estudo mostrou que pacientes com hanseníase apresentavam baixos níveis séricos de IL-17 em relação a indivíduos saudáveis, porém com nenhuma diferença significativa entre os subgrupos de pacientes analisados (Attia *et al.*, 2014).

O reconhecimento do *M. leprae* pelo heterodímero dos receptores Toll-like 1 e 2 (TLR-1/2) leva a diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas desencadeando a produção de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-12 (Krutzik *et al.*, 2003; revisto por Montoya e Modlin, 2010). Análises imunohistoquímicas revelaram que os receptores TLR-1 e 2 são mais expressos em macrófagos presentes nas lesões de pacientes tuberculóides, quando comparados aos presentes nas lesões de pacientes lepromatosos. O padrão de secreção de citocinas afeta diferencialmente a ativação de TLR-1/2

por lipopetídeos do *M. leprae*. Citocinas Th1, como IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-12 e IL-18, presentes no pólo tuberculóide, aumentam a ativação de TLR-1/2, enquanto citocinas do tipo Th2, como IL-4 e IL-10, inibem sua ativação (revisto por Montoya e Modlin, 2010).

Os grupos *borderline* variam no grau de resposta imune de acordo com a proximidade no espectro com as formas polares, e a distinção entre os subgrupos de maior resistência (BT) para os de menor resistência (BL) baseia-se no balanço de mediadores inflamatórios, no fenótipo de macrófagos e no aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos (Ridley, 1990; revisto por Goulart *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que os danos nos nervos periféricos estão presentes em todas as formas de manifestação da doença. Nas formas iniciais, os nervos sensoriais e motores da pele são afetados, levando a perda da sensibilidade a estímulos externos, enquanto os danos em nervos cutâneos mais profundos podem levar a perda da função muscular e a paralisia. A perda das pontas dos dedos e de outras extremidades do corpo, uma característica da desfiguração dos pacientes com hanseníase que não procuram tratamento, ocorre devido à osteoporose resultante da inflamação, traumas e a infecções bacterianas secundárias (revisto por Wilder-Smith & Brakel, 2008).

## **2.1. Eritema Nodoso Hansênico: uma reação do tipo II**

Um dos aspectos mais intrigantes da hanseníase é a interrupção de seu curso clínico por episódios reacionais, que constituem estados inflamatórios agudos, sobrepostos à evolução crônica da doença, que podem ocorrer dentro do espectro dos pacientes *borderline* e lepromatosos polares (Nery *et al.*, 1998; revisto por Harboe, 2000). Os episódios reacionais, cuja fisiopatologia ainda não foi totalmente esclarecida, podem ocorrer durante ou até mesmo após o tratamento dos pacientes. Além disso, freqüentemente levam a piora do quadro clínico dos pacientes, aumentando o dano neural e contribuindo para a instalação de incapacidades e deformidades físicas. Por inúmeras vezes as manifestações clínicas, oriundas dos quadros reacionais, levam o paciente a procurar ajuda médica e, só então, a doença é diagnosticada. Pacientes

multibacilares das formas clínicas BL e LL podem desenvolver a reação do tipo II, na qual a manifestação clínica mais freqüente é o ENH (Gallo *et al.*, 2005; revisto por Pinheiro *et al.*, 2011).

A hipótese mais provável para a dinâmica do aparecimento deste episódio é de que ocorra a destruição massiva do bacilo, com intensa liberação de frações moleculares do *M. leprae* e conseqüente estimulação da imunidade inata, resultando em um acentuado processo imunológico desencadeado pelo aumento exacerbado de mediadores inflamatórios. Essas alterações imunológicas levam ao aparecimento abrupto de nódulos cutâneos e/ou placas infiltradas, avermelhadas e dolorosas, que podem evoluir para pústulas e bolhas, com posterior ulceração e formação de necrose. O ENH se apresenta como um quadro sistêmico, onde os pacientes acometidos apresentam lesões disseminadas, além de inflamações, que podem atingir nervos, olhos e testículos, seguidas de febre alta, cefaléias, náuseas, vômitos e mal-estar geral. O surgimento das lesões obedece a uma distribuição simétrica, bilateral e difusa que atinge a face, tronco e membros (**Figura 4**) (Guerra *et al.*, 2004; Gallo *et al.*, 2005; revisto por Nery *et al.*, 2006).



**Figura 4: Aspecto das lesões cutâneas durante eritema nodoso hansênico.** Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Jason Antônio Barreto do Instituto Lauro Souza Lima (ILSL), Bauru/SP.

Vários fatores, ligados a mudanças no equilíbrio do sistema imunológico dos pacientes, têm sido reconhecidos como passíveis de desencadear o ENH. Esses fatores incluem cirurgias, vacinações, gravidez e parto, traumas, infecções intercorrentes, fadiga física e mental (Pfaltzgraff & Ramu, 1994), no entanto são necessários mais estudos para comprovar esta afirmação. Importantes fatores de riscos já foram confirmados, tais como a manifestação da forma lepromatosa da doença, assim como o índice baciloscópico (BI) elevado ( $\geq 4$ ) (Manandhar *et al.*, 1999; Pocaterra *et al.*, 2006). Aliado a estes fatores, é importante salientar que estes episódios acontecem com maior frequência durante o tratamento com PQT e após a alta (Gallo *et al.*, 1997). Nery (1995) observou que 57% dos pacientes com ENH desencadearam reação no primeiro ano, e 20% já estavam em reação no momento do diagnóstico clínico inicial.

Exames laboratoriais podem mostrar leucocitose com neutrofilia e aumento de plaquetas e de proteínas da reação inflamatória aguda, como a proteína C reativa. A histopatologia das lesões cutâneas evidencia infiltrado inflamatório neutrofílico, perivascular, compatível com vasculite (Foss *et al.*, 2003). Apesar de menos frequentes, também são identificados macrófagos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos no infiltrado inflamatório (Massone *et al.*, 2015). A presença de bacilos fragmentados e granulosos nas lesões é uma constante no ENH, variando em quantidade de acordo com o tempo da doença e do tratamento específico (Ray *et al.*, 2013; Massone *et al.*, 2015). No hemograma, pode-se observar leucocitose importante, às vezes até configurando uma reação leucemóide. A neutrofilia invariavelmente acompanha os quadros de leucocitose, caracterizando um hemograma semelhante à sepse (Nery *et al.*, 2006).

O ENH foi descrito inicialmente como uma reação mediada por imunocomplexos (Wemambu *et al.*, 1969; Moran *et al.*, 1972), formados após a liberação de frações antigênicas do *M. leprae* fragmentado e posterior indução de anticorpos específicos. Os imunocomplexos ativariam o sistema complemento desencadeando a reação, no entanto alguns autores demonstraram também aumento transitório da imunidade celular durante esses

episódios (Modlin *et al.*,1983; Rao & Rao, 1987; Sarno *et al.*,1991; revisto por Kahawita & Lockwood, 2008; Abdallah *et al.*,2014).

Como já mencionado anteriormente, a patogênese do ENH tem sido sugerida como resultante do efeito direto de citocinas inflamatórias sobre componentes dos vasos sanguíneos, o que pode levar à ativação de células endoteliais e leucócitos na derme, além de agirem como mediadores de dano tecidual. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 são observados sistemicamente em soro ou plasma de pacientes (Sarno *et al.*, 1991; Iyer *et al.* 2007; Stefani *et al.* 2009), além da IL-17 (Martiniuk *et al.*, 2012). Abdallah e colaboradores (2014) sugeriram que a alta presença de IL-4 encontrada no soro dos pacientes lepromatosos poderia ser o responsável pelo desencadeamento da reação (Abdallah *et al.*, 2012). O recrutamento de neutrófilos em direção à lesão do ENH está relacionado com a produção de IL-1 $\beta$  por macrófagos. Foi demonstrado que esta citocina, juntamente com IFN- $\gamma$ , contribuem para que ocorra a regulação positiva de E-selectina, o qual medeia a adesão inicial dos neutrófilos às células endoteliais da derme durante a reação (Lee *et al.*, 2010). PBMCs de indivíduos com ENH secretaram níveis significativamente mais elevados de TNF- $\alpha$  quando comparados com pacientes não reacionais (Barnes *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1993). Outros estudos, a partir de lesões cutâneas obtidas por biópsias, mostram um aumento nos níveis de RNAm para as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 (Yamamura *et al.*,1992; Sreenivasan *et al.*, 1998; Moraes *et al.*, 1999; Teles *et al.*, 2002), indicando a ativação de uma resposta celular do tipo Th1 a nível local, embora Yamamura e colaboradores (1992) tenham evidenciado um concomitante e persistente aumento de RNAm para citocinas com perfil de resposta Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10.

No Brasil, a droga de escolha para o tratamento do ENH é a Talidomida, um medicamento com propriedades anti-inflamatórias que é empregado de forma supervisionada. Devido à teratogenicidade da Talidomida alguns países proibiram a sua utilização para tratamento dos pacientes (WHO, 2014). Outras drogas vêm sendo usadas para o tratamento alternativo da reação, como a

pentoxifilina, administrada isoladamente ou em associação com a prednisona (Ministério da Saúde, 1994).

### **3. O epitélio do trato respiratório: provável via de entrada do *M. leprae* no hospedeiro**

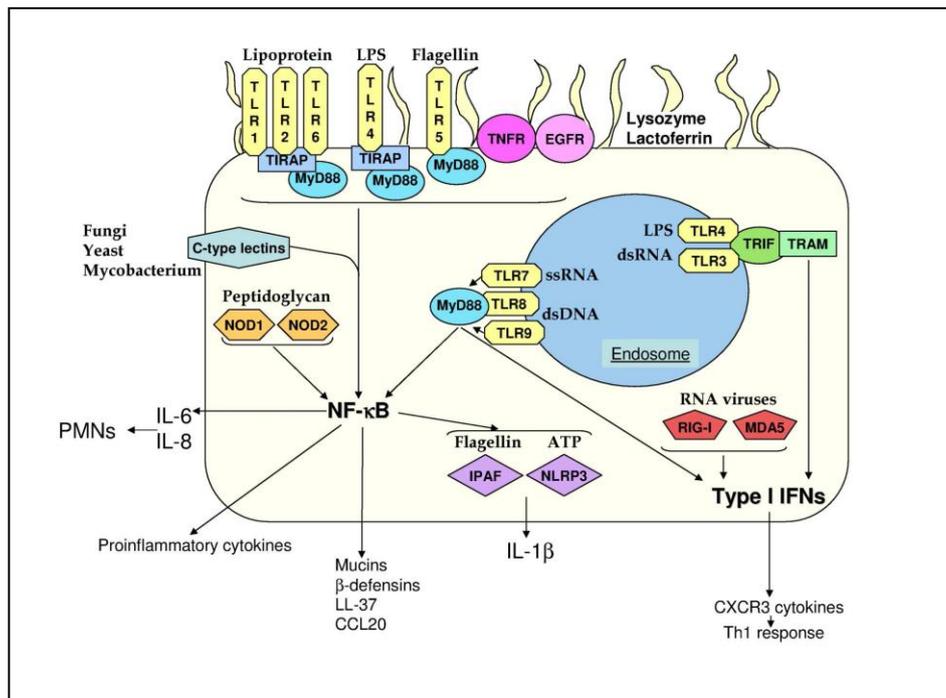
Atualmente muitos estudos têm sido realizados para investigar a relação entre as células epiteliais e os patógenos. Isto se justifica pelo fato de grande parte dos patógenos utilizarem as mucosas dos tratos gastrintestinal e respiratório como porta de entrada para atingir os tecidos internos do hospedeiro (Tortora *et al.*, 2005).

Os órgãos que constituem o sistema respiratório são: fossas nasais, faringe (nasofaringe), laringe, traquéia, brônquios (e suas subdivisões) e os pulmões, propriamente ditos, divididos em bronquíolos (e suas subdivisões), e os alvéolos pulmonares reunidos em sacos alveolares (Junqueira & Carneiro, 2003). O pulmão representa a maior superfície epitelial do corpo, sendo continuamente exposto a um enorme conjunto de partículas transportadas pelo ar e organismos invasores durante a respiração (Zhang *et al.*, 2000). Esta é a principal forma pela qual o bacilo da tuberculose pode alcançar o epitélio alveolar e os macrófagos presentes ali, que, apesar de não possuírem características epiteliais, mantém estreita relação com as células constituintes do trato respiratório (Junqueira & Carneiro, 2003).

Em relação a *M. leprae*, estudos histopatológicos da mucosa nasal de pacientes que apresentam hanseníase em estágio avançado mostram que a principal fonte de dispersão do bacilo é a mucosa nasal e não a pele. Esses estudos sugerem que a liberação de *M. leprae* pela mucosa nasal possa ser a principal forma de transmissão da bactéria, além de ser a principal porta de entrada para o patógeno, constituindo as células epiteliais respiratórias, as primeiras células a interagirem com o bacilo (Job *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011). De fato, em trabalho recente do nosso grupo, demonstramos que tanto células epiteliais nasais como pulmonares são infectadas por *M. leprae*, sendo que as células pulmonares apresentaram uma maior concentração de bacilos internalizados. Além disso, após desafio

intranasal com *M. leprae*, foi identificada a presença de bacilos álcool-ácido resistentes no interior de macrófagos e de células epiteliais pulmonares de camundongos C57BL/6 (Silva *et al.*, 2013).

Neste sentido, por representar o sítio primário para a introdução e deposição de microrganismos patogênicos, incluindo *M. leprae*, no corpo humano, o epitélio mantém um efetivo ambiente antimicrobiano para prevenir a colonização por patógenos (revisto por Parker & Prince, 2011) (**Figura 5**).



**Figura 5: A imunidade inata no epitélio respiratório.** Esquema representativo de uma célula epitelial das vias aéreas reconhecendo, através de receptores Toll-like (TLRs) e Nod-like (NLRs), ligantes como lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS), flagelina, DNA e RNA, levando a ativação da resposta imune inata e consequente produção de proteínas antimicrobianas (mucinas, β-defensinas, LL-37 e CCL20) e citocinas pró-inflamatórias que irão manter um efetivo ambiente antimicrobiano para prevenir a colonização por patógenos (Parker & Prince, 2011).

A primeira barreira para conter a infecção é através da remoção física feita pelos cílios presentes nas células epiteliais. Contudo, as células epiteliais também podem responder à presença de microrganismos através de duas vias complementares de resposta imune inata. A primeira via induz o aumento da produção de agentes antimicrobianos de amplo espectro, como por exemplo, as β-defensinas (HβD), as catelecidinas (LL-37) e as mucinas. A segunda via

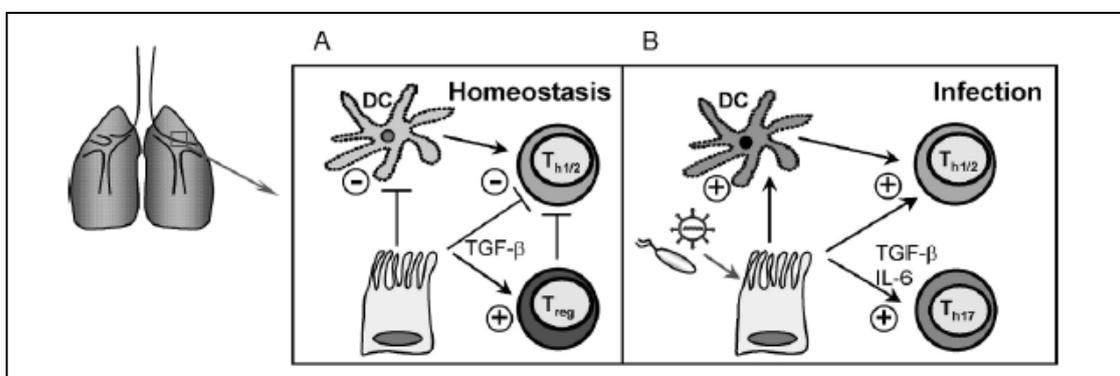
leva à indução de uma rede de sinais para recrutar células do sistema imune ao local da infecção (revisito por Diamond *et al.*, 2000).

Os pneumócitos do tipo II são capazes de internalizar e controlar o crescimento de *M. tuberculosis* (Chuquimia *et al.*, 2012), e podem atuar como células apresentadoras de antígenos (Cunningham & Kirby *et al.*, 1995; Corbière *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2014) revelando uma atividade multifuncional para as células epiteliais. Além disso, um estudo demonstrou que a infecção *in vitro* de células epiteliais alveolares com *M. tuberculosis* induz a secreção de IFN- $\gamma$  por essas células. Esta citocina possui um papel importante na resposta imune contra as micobacterioses, pois ativa a resposta celular do tipo Th1, importante na contenção das micobactérias durante a infecção (Sharma *et al.*, 2007). Outro trabalho mostrou que pneumócitos infectados com *M. tuberculosis* secretam IL-8 e a proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), moléculas importantes na quimiotaxia de leucócitos para o sítio de infecção (Lin *et al.*, 1998).

Foi demonstrado, ainda, que pneumócitos da linhagem A549 são capazes de produzir óxido nítrico (NO) após uma estimulação *in vitro* com *M. tuberculosis* ou com lisados totais da parede micobacteriana. Após a produção de NO, foi observada uma redução no número de micobactérias associadas a estas células, demonstrando uma correlação na produção de NO com a resposta imune inata no local da infecção (Roy *et al.*, 2004). Além disso, células alveolares, tanto primárias quanto da linhagem A549, foram capazes de produzir RANTES (molécula regulada na ativação normal de célula T expressa e secretada) após uma estimulação com meio condicionado por monócitos humanos infectados com *M. tuberculosis*. RANTES possui um papel crucial na imunidade inata por recrutar linfócitos T e monócitos (Wickremasinghe *et al.*, 2004). Importante mencionar também que, após um estímulo com *M. tuberculosis* ou BCG, as células A549 também passam a expressar significativamente o peptídeo antimicrobiano H $\beta$ D-2 (Rivas-Santiago *et al.*, 2005; Méndez-Samperio *et al.*, 2006). Outras micobactérias, tais como o *M. avium*, tem como evento chave em sua patogenia a sua interação com as células brônquicas o que irá ocasionar inflamação granulomatosa evoluindo

para uma bronquiectasia, o que raramente ocorre na tuberculose (Middleton *et al.*, 2003).

Todos estes dados reforçam a idéia de que o epitélio respiratório é capaz de modular uma resposta imune local. Esta modulação é regida principalmente pelas moléculas secretadas pelo epitélio, após entrarem em contato com o patógeno. Como já mencionado, estas moléculas são capazes de recrutar e ativar células profissionais do sistema imune, como as células dendríticas, que irão promover a diferenciação de linfócitos Th1, Th2 e Th17, passando a orquestrar defesas contra a infecção (revisto por Mayer & Dalpke, 2007) (**Figura 6**).



**Figura 6: Modulação da resposta imune por células epiteliais respiratórias.** Participação do epitélio respiratório na regulação da resposta imune antes (A) e durante (B) uma infecção. A) Em condições em que não a presença de agentes infecciosos, as células epiteliais respiratórias inibem as DCs e os linfócitos T (Th1/Th2). A inibição é conseguida devido a presença de fatores solúveis, incluindo fator de transformação do crescimento (TGF-β). Além disso, as células T reguladoras são ativadas, contribuindo para a inibição. B) Infecções são detectadas pelas células epiteliais, que passam a agir como ativadores do sistema imune. Fatores produzidos pelo epitélio, incluindo TGF-β e IL-6, modificam agora a imunidade das células T a um padrão de resposta Th17, além da Th1/2 e células apresentadoras de antígenos profissionais (incluindo DCs) são ativados. (Mayer & Dalpke, 2007).

Devido à participação ativa do epitélio respiratório na resposta imune contra patógenos, a via intranasal de vacinação vem sendo estudada como uma nova estratégia para controlar infecções micobacterianas (revisto por Oliveira *et al.*, 2007). De fato, trabalhos têm mostrado que a inoculação de vacinas, construídas a partir de produtos micobacterianos, em mucosas respiratórias, tem sido eficiente na prevenção de infecções por *M. tuberculosis* e BCG. Um estudo demonstrou que imunização intranasal com adenovírus,

expressando antígeno 85 micobacteriano foi capaz de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* em camundongos (Ronan *et al.*, 2009). Outro trabalho mostrou que a proteína HBHA, reconhecida como fator de virulência micobacteriano, ao ser administrada pela via intranasal, foi capaz de suprimir a disseminação extrapulmonar de BCG em camundongos infectados (Kohama *et al.*, 2008).

#### **4. A proteína Hlp e sua importância na patogênese das micobactérias**

*M. leprae* expressa em abundância uma proteína catiônica semelhante às histonas H1 de eucariotos, denominada Hlp (*histone-like protein*), presente tanto no envelope como no nucleóide bacteriano (Shimoji *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2013). A Hlp também apresenta homologia parcial com proteínas histona-símile de outras espécies de bactérias (**Figura 7**). A Hlp foi caracterizada primeiramente em *M. leprae* pelo grupo de Shimoji e colaboradores (1999). Neste estudo, foi descrita a identificação e a caracterização molecular da Hlp como uma proteína de superfície, de 21 quilodaltons (kDa), capaz de se ligar à laminina-2 presente nos nervos periféricos. Além disso, a Hlp recombinante de *M. leprae* foi capaz de aumentar a aderência da bactéria a uma linhagem de célula de Schwann ST88-14 após adição exógena desta proteína (Marques *et al.*, 2000). Estes achados foram reforçados quando experimentos utilizando técnicas de proteômica revelaram que *M. leprae* expressa um conjunto diverso de potenciais adesinas na sua superfície, incluindo a Hlp (Silva *et al.*, 2013).

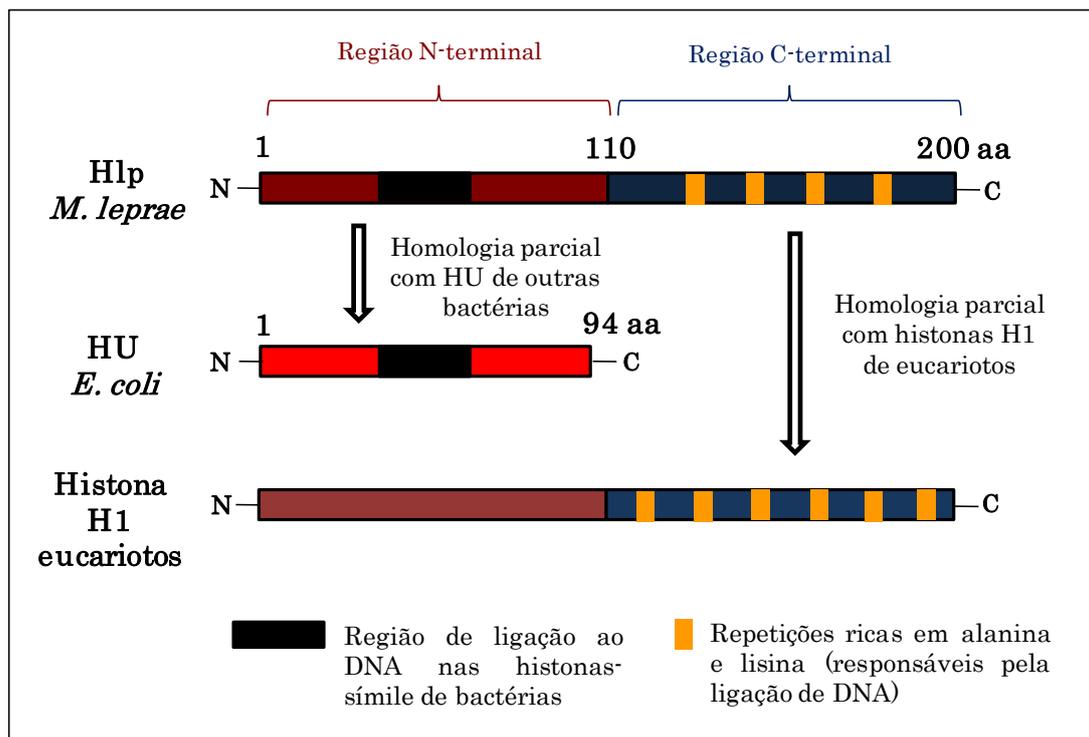


Figura 7: Esquema representativo da Hlp de *M. leprae*, mostrando sua homologia com proteínas histona-símile (HU) de bactérias e histonas da classe H1 de eucariotos.

Shimoji mostrou também que microesferas recobertas com Hlp são internalizadas por células de Schwann primárias (Shimoji *et al.*, 1999). Além disso, a Hlp atua como uma adesina provocando a infecção por *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* em células epiteliais alveolares da linhagem A549 através de sua ligação ao ácido hialurônico. A utilização de anticorpo neutralizante para Hlp foi capaz de bloquear a adesão de *M. tuberculosis* e de BCG às células A549. Este estudo sugere, então, um importante papel da Hlp na interação das micobactérias com o epitélio pulmonar (Aoki *et al.*, 2004). Neste trabalho foi mostrado também que a ligação da Hlp de BCG às células A549 é inibida quando as células são tratadas com heparinase, hialuronidase ou então com condroitinase. Contudo, esta inibição é mais acentuada quando são tratadas com hialuronidase (Aoki *et al.*, 2004). A Hlp de BCG também é capaz de mediar a citoaderência devido a sua capacidade de se ligar ao colágeno (Dias *et al.*, 2012), abundantemente expresso na superfície de diversas células eucarióticas.

Em um trabalho realizado através de ensaios de interação em fase sólida, utilizando Hlp de *M. avium paratuberculosis*, foi demonstrado que a

proteína é capaz de se ligar à heparina, à laminina-2 e ao colágeno I, além de aumentar a adesão de microesferas a células epiteliais brônquicas da linhagem 16HBE, confirmando a interação direta e específica entre a Hlp e a matriz extracelular (Lefrançois *et al.*, 2011).

A presença da Hlp também foi analisada nas diferentes subfrações celulares de BCG e verificou-se que a proteína está presente na fração da parede celular e no citoplasma, mais especificamente ligado aos ribossomos (Aoki *et al.*, 2004). Além de desempenhar papel de adesina, a Hlp também é conhecida como proteína-1 ligante de DNA (MDP-1), e corresponde a 7% do total de proteínas presentes em *M. bovis* BCG (Matsumoto *et al.*, 1999). A Hlp se liga a resíduos de citosina e guanina e é capaz de inibir a transcrição, regulando a expressão gênica e subsequente biossíntese de macromoléculas *in vitro*, suprimindo substancialmente o crescimento bacteriano (Matsumoto *et al.*, 2000; Furugen *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que a Hlp é importante para o metabolismo celular das micobactérias, mas ainda não se sabe que tipos de vias metabólicas são regulados por esta proteína.

O alinhamento das sequências de aminoácidos da Hlp de diferentes espécies de micobactérias indicou que esta proteína é altamente conservada (Lefrançois *et al.*, 2011) (**Figura 8**). Em trabalhos realizados em nosso laboratório, utilizando peptídeos sintéticos derivados das regiões N e C-terminais da Hlp de *M. leprae*, foi mostrado que a proteína interage com proteoglicanas da superfície celular do hospedeiro, principalmente através de dois sítios distintos, ricos em alanina e lisina, pertencentes tanto à porção N (região I) quanto à porção C-terminal (região II) (Portugal *et al.*, 2008) (**Figura 9**).

Mtb	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
Mb	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
BCG	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
MI	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
Map	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
Maa	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
Mah	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
Ms	1	MNKAELI DVL TQKLGSDRRQATAAVENVVDTIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	80
C		***** *.:*****	
Mtb	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPAGPAVKGVGASAAKK-VA-KKAPAKKA---TKAAKKAATKAPARKAAT-KAPAKKAATKAP	153
Mb	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPAGPAVKGVGASAAKK-VA-KKAPAKKA---TKAAKKAATKAPARKAAT-KAPAKKAATKAP	153
BCG	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPAGPAVKGVGASAAKK-VA-KKAPAKKA---TKAAK-----KAAT-KAPAKKAATKAP	144
MI	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPAGPAVKGVGATSAAKK-AAIKKAPVKK-----LAK-----KAAT-KAPAKK-AVKAP	142
Map	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKGVGAAAKKTA--KKAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKAPAKKAAVKKAPARKAATKAP	159
Maa	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKGVGAAAKKTA--KKAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKAPAKKAAVKKAPARKAATKAP	159
Mah	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPSEGPVKGVGAAAKKTA--KKAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKAPAKKAAVKKAPARKAATKAP	159
Ms	81	PGAQFKAVVSGAQRLEPAGPAVKGVTAGPAKK-AA-KKAPAKKAAAKK-ATKAAAKKAPAKKAAT-KAPAKKAATKAP	156
C		*****.:***:*:*****.***.******.****.********	
Mtb	154	AKKAVKATKSPAKKVTKAVKKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPATKAPAKKAT-ARRGRK	214
Mb	154	AKKAVKATKSPAKKVTKAVKKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPATKAPAKKAT-ARRGRK	214
BCG	145	AKKAVKATKSPAKKVTKAVKKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPATKAPAKKAT-ARRGRK	205
MI	143	AKKITTAVKVPKAKKTKVVKVAAKAPVRKATTRALAKKAAVK---KAPAKKVTAAKGRK	200
Map	160	VRKA--ATKAPAKKV-----AAKKAAPAKKAAKAPAKKAAKAPARKAAAKKTT-ARRGRK	212
Maa	160	VRKA--ATKAPAKKV-----AAKKAAPAKKAAKAPAKKAAKAPARKAAAKKTT-ARRGRK	212
Mah	160	VRKA--ATKAPAKKV-----AAKKAAPAKKAAKAPAKKAAKAPARKAAAKKTT-ARRGRK	212
Ms	157	AKKA--ATKAPAKK-----AATKAPAKKAAAKKAPAKKAAKAPARKAAAKKAP-ARRGRK	208
C		.* ** * ** * .*.***.:***:.* ***** * ** *.***. *.:***:	

Figura 8: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da Hlp de diferentes micobactérias. \*, resíduos idênticos; :, substituições conservadas; ., substituições semi-conservadas. Mtb, *M. tuberculosis*; Mb, *M. bovis*; BCG, *M. bovis* BCG; MI, *M. leprae*; Map, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; Maa, *M. avium* subsp. *avium*; Mah, *M. avium* subsp. *hominissuis*; Ms, *M. smegmatis*; C, consenso (Lefrançois *et al.*, 2011).

		region I			
Hlp/LBP	Mle	MNK AEL I DVL TQK LGSD RRQATAAVENVVDT I VRAVHKGDSVT I TGFVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	75		
MDP1	Mtb	MNK AEL I DVL TQK LGSD RRQATAAVENVVDT I VRAVHKGDSVT I TGFVFEQRRRAARVARNPRTGETVVKVPTS	75		
		region II			
Hlp/LBP	Mle	VP AFRPGAQFKAVVGAQRLEPAGPAVKGVGATSAAKKAAIKKAPVKKALAKKAAATKAPAKKAVKAPAKKITTAV	150		
MDP1	Mtb	VP AFRPGAQFKAVVGAQRLEPAGPAVKGVGASAAKKVAKKAPAKKATKAAKKAATKAPARKAATKAPAKKAAAT	150		
Hlp/LBP	Mle	KVP AKKATK VVKVAAKAPVRKATTRALAKKAAVKKAPAKKVTAAKRRK-----	200		
MDP1	Mtb	KAPAKKAVKATKSPAKKVTKAVKKTAVKASVRKAATKAPAKKAAAKRPATKAPAKKATARRGRK	214		
		HBHA HS binding site	160	KK AAPAKK AAPAKK AAPAKK AAKKAPAKKAAAKKVTQK	199

Figura 9: Seqüência de aminoácidos da Hlp de *M. leprae* e *M. tuberculosis* e identificação dos sítios de ligação da proteína (região I na porção N-terminal e II na C-terminal) à matriz extracelular do hospedeiro (Portugal *et al.*, 2008)

A Hlp também possui propriedades antigênicas, sendo reconhecida pelo sistema imune durante a infecção por micobactérias (Prabhakar *et al.*, 1998). Além disso, foi mostrado que a imunização simultânea utilizando Hlp e oligonucleotídeo CpG (Citosina-fosfato-Guanina) promoveu proteção contra a infecção com *M. tuberculosis* em camundongos da linhagem C3H/HeJ (Matsumoto, *et al.*, 2005). O complexo CpG-Hlp, gerado devido à capacidade da Hlp de se ligar ao DNA, foi capaz de ser reconhecido pelo receptor Toll-like-

9 (TLR-9), ativando a resposta imune inata e aumentando a resposta imune celular e humoral específica contra a H1p.

## **5. Envolvimento do TLR-9 na geração da resposta imune: proteção e imunopatologia**

A defesa contra microrganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e as respostas tardias da imunidade adquirida. A imunidade inata é a proteção de primeira linha contra microrganismos invasores, sendo que os mecanismos de defesa já existem antes do estabelecimento da infecção, sem ocorrer especificidade ao patógeno e nem memória imunológica (Abbas *et al.*, 2008).

Os principais componentes do sistema imune inato são: barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; proteínas e peptídeos antimicrobianos de amplo espectro; células fagocitárias profissionais (neutrófilos e macrófagos) e células NK (*natural killer*); proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação e proteínas denominadas citocinas e quimiocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade inata. Os mecanismos da imunidade inata são específicos para estruturas comuns a grupos de microrganismos semelhantes e não conseguem distinguir diferenças discretas entre substâncias estranhas (Akira, 2011).

A ativação da imunidade inata ocorre, principalmente, após a interação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são estruturas microbianas conservadas, com seus respectivos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células hospedeiras. Além disso, os PRRs também são capazes de reconhecer moléculas próprias provenientes de células lesionadas, conhecidas como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Após a interação de PAMPs e/ou DAMPs com PRRs, ocorre a liberação de sinais intracelulares que culminam na indução da transcrição de genes importantes para a ativação celular ou a indução da fagocitose. Diferentes PRRs são expressos numa mesma célula, o que faz com que esta tenha capacidade de reconhecer várias classes de microrganismos e diferentes

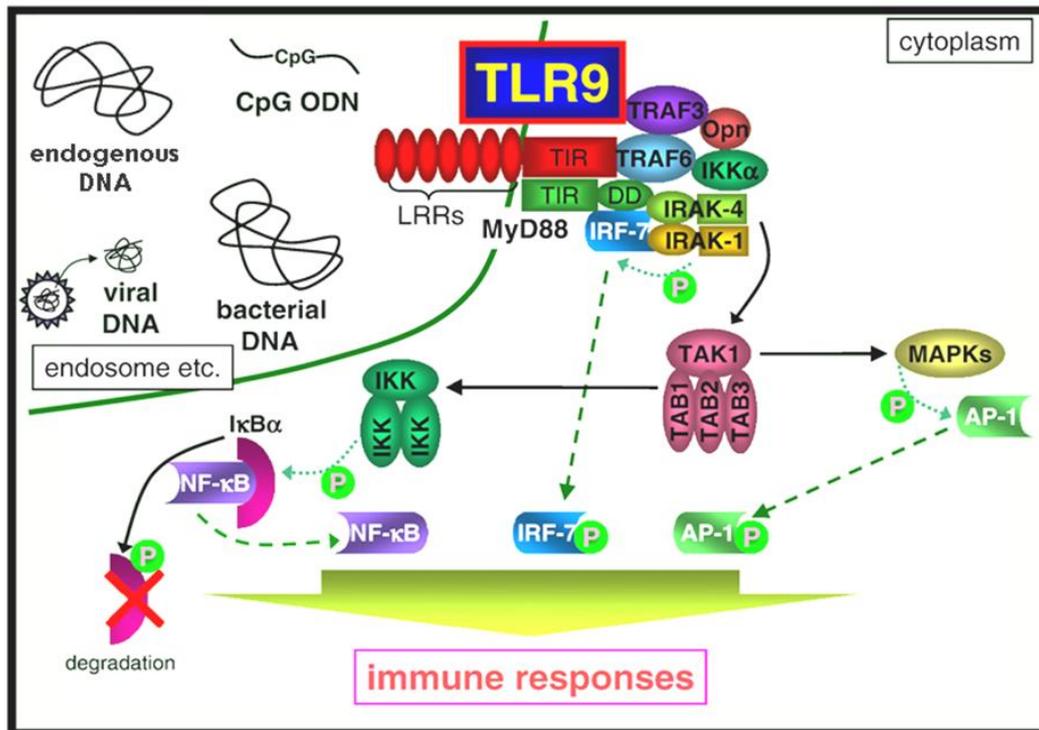
moléculas endógenas. Os PRRs descritos até o momento são os receptores de lectina do tipo C (CLRs), os Nod-like (NLRs), os RIG-1-like (RLRs) e os Toll-like (TLRs) (revisito por Medzhitov & Janeway, 1997; Girardin *et al.*, 2003; revisito por Takeuchi & Akira, 2010).

Diversos estudos indicam que o reconhecimento das micobactérias pelos receptores TLRs representa uma etapa essencial na geração de uma resposta imune capaz de conter a infecção. Camundongos deficientes do fator de diferenciação mielóide 88 (Myd88), uma proteína adaptadora que participa da sinalização intracelular da maioria dos receptores TLR, mostram um grande aumento de susceptibilidade à infecção por via aérea por *M. tuberculosis*, semelhante aos animais deficientes em IFN- $\gamma$  (Scanga *et al.*, 2004; Fremont *et al.*, 2004). Igualmente, células apresentadoras de antígenos (APCs) destes animais, quando estimuladas *in vitro* com *M. tuberculosis* mostram uma marcante redução na produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO (Fremont *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2003).

Dentre as moléculas que constituem as micobactérias, várias têm sido caracterizadas como ligantes e potentes estimuladoras de receptores TLR *in vitro*, envolvendo principalmente o TLR-2. Krutzik e colaboradores (2003), por exemplo, mostraram que o heterodímero TLR-1/2 mediou a ativação de monócitos promovida por *M. leprae*, indicando a presença de lipoproteínas na parede do bacilo (Krutzik *et al.*, 2003). Além das lipoproteínas, LAMs e PIMs constituem exemplos de componentes micobacterianos ligantes de TLR-2 bem caracterizados (revisito por Krutzik & Modlin, 2004). Contudo, o reconhecimento *in vivo* das micobactérias parece depender de múltiplos receptores TLRs, uma vez que, camundongos deficientes em um único tipo de receptor, como o TLR-2 por exemplo, se mostram apenas um pouco mais susceptíveis quando expostos a aerossóis de *M. tuberculosis* (Drennan *et al.*, 2004), em contraste com a grande susceptibilidade observada nos camundongos Myd88<sup>-/-</sup> (Scanga *et al.*, 2004; Fremont *et al.*, 2004). Além disso, já foi demonstrado que a deleção de TLR-6 em células de Schwann aboliu completamente a formação de corpúsculos lipídeos induzida pelo *M. leprae* nas células, sendo que o mesmo efeito não foi observado em células nocauteadas para TLR-2 (Mattos *et al.*, 2011).

Um outro estudo demonstrou que o reconhecimento concomitante de micobactérias via TLR-2 e TLR-9 gera a maior parte, ou até mesmo todo o estímulo necessário para indução de resposta imune protetora antimicobacteriana dependente de receptores TLR (Bafica *et al.*, 2005). Os ligantes clássicos de TLR-9 são DNA de origem viral ou bacteriana, além de oligonucleotídeos CpG não metilados sintéticos (revisto por Krieg, 2002). Por outro lado, estudos têm demonstrado que o TLR-9 também é capaz de reconhecer DNA endógeno acarretando em um aumento na resposta inflamatória (Barrat *et al.*, 2005; Hsiao *et al.*, 2014). Sendo assim, o TLR-9 serve como uma via comum para o reconhecimento imunológico de moléculas endógenas ou provenientes de microrganismos.

O receptor TLR-9 está localizado em compartimentos de membrana intracelular, tais como o retículo endoplasmático, o endossomo e o lisossomo (**Figura 10**) (Leifer *et al.*, 2004; Latz *et al.*, 2004). Em seres humanos, a expressão de TLR-9 tem sido descrita principalmente em linfócitos B, monócitos e em células dendríticas plasmocitóides (Huang *et al.*, 2014; Cepika *et al.*, 2012; Poth *et al.*, 2010). Contudo, diferentes autores têm mostrado a expressão de TLR-9 também em células epiteliais respiratórias (Platz *et al.*, 2004; Tengroth *et al.*, 2014).



**Figura 10: Via de sinalização mediada por TLR-9.** Visão geral do TLR-9 presente no endossomo celular reconhecendo seus ligantes (DNA endógeno, viral e bacteriano e oligonucleotídeo CpG), desencadeando complexas vias de sinalização intracelular e, conseqüentemente, ativando a resposta imune inata (adaptado de Kumagai *et al.*, 2008).

A sinalização via reconhecimento por TLR-9 tem sido reconhecida como importante para a geração de resposta imune adaptativa do tipo Th1, específica contra vírus e bactérias (Bafica *et al.*, 2005). Ligantes de TLR-9 são capazes de aumentar a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e modular a atividade de células T supressoras (Chiffolleau *et al.*, 2007). No processo de diferenciação dos linfócitos T CD4 virgens para células T CD4 efetoras com o fenótipo Th1, as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) desempenham papel central, produzindo a citocina IL-12, fator determinante para que esta diferenciação ocorra (Zhu *et al.*, 2010). Um estudo comparou o grau de magnitude da expressão de IL-12, assim como os TLRs envolvidos, em células dendríticas e macrófagos em resposta a *M. tuberculosis* (Pompei *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as células dendríticas produzem níveis bem maiores de IL-12 em resposta a *M. tuberculosis*, sendo esta expressão dependente de TLR-9. Já os macrófagos mostraram uma expressão

significativamente menor de IL-12 quando estimuladas com *M. tuberculosis*, sendo a mesma regulada através da ativação de TLR-2 e não TLR-9. A importância da sinalização via TLR-9 na resistência a infecções por micobactérias foi reforçada por um trabalho que demonstrou a participação de TLR-9 na formação do granuloma e diferenciação de células Th17 via aumento da expressão do ligante Notch dII4 nas células dendríticas (Ito *et al.*, 2009). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos com adjuvantes, baseados na combinação de CpG com veículos catiônicos, como peptídeos anti-bacterianos, que têm se mostrado eficientes na geração de resposta imune anti-*M. tuberculosis* (Parra *et al.*, 2004; Agger *et al.*, 2006).

Um estudo analisou a interação de *M. avium paratuberculosis*, agente etiológico da doença de Johnes, uma enfermidade crônica intestinal muito prevalente em ruminantes, com células epiteliais do intestino e o envolvimento do TLR-9 nesta interação (Pott *et al.*, 2009). Os autores mostraram que estas células são ativadas pelo patógeno, passando a produzir a quimiocina MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago-2), e que esta ativação é dependente da internalização da bactéria na célula e do seu subsequente reconhecimento pelos receptores TLR-9 e NOD-1. Estes dados foram incrementados por Carvalho e colaboradores (2011), que também mostraram o envolvimento de TLR-9 na resistência ao patógeno. Camundongos nocautes para o receptor apresentaram reduzidos números de macrófagos, células epitelióides e linfócitos em granulomas induzidos por *M. avium*. (Carvalho *et al.*, 2011).

Também foi mostrado que células epiteliais da faringe da linhagem Hep-2 são capazes de controlar a multiplicação do vírus H1N1 da Influenza A, quando pré-tratadas com ligantes de TLR-9. Uma regulação positiva do receptor também foi observada nas células quando as mesmas foram infectadas com o vírus (Han *et al.*, 2014). Em relação a outras linhagens de células epiteliais da faringe, como Detroit-562 e FaDu, foi observado um aumento na produção de GM-CSF e IL-8 respectivamente, após estímulo com oligonucleotídeo CpG sintético, clássico ligante de TLR-9, análogo a DNA bacteriano (Tengroth *et al.*, 2014). Além disso, um trabalho mostrou que o CpG é capaz de induzir a produção de MCP-1 pelas células epiteliais alveolares da linhagem A549, além de ter a expressão de TLR-9 aumentada após esta

estimulação (Droemann *et al.*, 2005). Outro estudo demonstrou uma regulação positiva de CD40, CD80, CD86 e do complexo principal de histocompatibilidade II (MHC-II) nas células A549 tratadas com o CpG, além da produção de citocinas Th1. Neste caso, também ocorreu a diminuição na expressão de TLR-4 e aumento da expressão de TLR-9 (Li *et al.*, 2011).

Apesar da função protetora do TLR-9 contra diferentes infecções, evidências sugerem uma participação deste receptor também em diversas doenças inflamatórias. A produção acentuada de mediadores pró-inflamatórios, induzidos pela intensa ativação do TLR-9, pode levar ao desenvolvimento de imunopatologias.

Marques e colaboradores (2014) demonstraram o surgimento de inflamação aguda e lesão tecidual no fígado de camundongos C57BL/6 após liberação de DNA hepático induzida por medicamentos. Além disso, a análise de leucócitos do fígado destes animais revelou uma migração direcional de neutrófilos para áreas ricas em DNA e de um aumento da expressão de TLR-9 nas células residuais (Marques *et al.*, 2014). Um trabalho anterior relatou que após uma isquemia induzida no fígado de camundongos, histonas endógenas liberadas passam a agir como DAMPs ativando TLR-9 e, conseqüentemente, induzindo inflamação e lesão hepática (Huang *et al.*, 2011). O grupo também demonstrou que a injeção de histonas exógenas agravou a lesão devido aos efeitos citotóxicos causados e aumentou a ativação de TLR-9 mediada por DNA em células não-parenquimatosas, através de uma interação direta com o receptor (Huang *et al.*, 2011). Interessantemente, já havia sido mostrado que a inibição de TLR-9 foi capaz de conferir proteção evitando danos hepáticos em animais que sofreram isquemia seguida de reperfusão (Bamboot *et al.*, 2010). Neste mesmo contexto, outros autores demonstraram que DNA bacteriano, contendo motivos ricos em CpG não metilados, também pode causar inflamação pulmonar através do seu reconhecimento por TLR-9. Neste caso, foram mostrados aumentos da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pulmonar e sérico, de mieloperoxidase pulmonar e da concentração de neutrófilos no lavado broncoalveolar de camundongos estimulados com DNA (Knuefermann *et al.*, 2007).

O envolvimento do TLR-9 também foi estudado na sepse, um modelo de infecção sistêmica onde o processo inflamatório é intenso. Indivíduos acometidos por sepse apresentam níveis elevados de DNA (nuclear, mitocondrial e bacteriano) livre circulante. A ativação de TLR-9, desencadeada pelo reconhecimento das moléculas de origem mitocondrial e bacteriana, contribui para o aumento da inflamação já que prolongam a viabilidade de neutrófilos, células relacionadas com a severidade do processo inflamatório. Além disso, o DNA bacteriano é capaz de induzir aumento na produção de IL-6 por estas células (Bhagirath *et al.*, 2015).

No lúpus eritematoso sistêmico, uma doença inflamatória de natureza autoimune, foi mostrado que moléculas de DNA endógeno ligadas a auto-anticorpos são capazes de induzir a sinalização de TLR-9 e estimular a produção de altos níveis de INF- $\alpha$  por células dendríticas plasmocitóides, ocasionando a inflamação crônica característica da doença (Barrat *et al.*, 2005).

No que diz respeito à infecção por plasmódio, os nucleossomos (complexo DNA-histona) foram identificados como os principais componentes do parasito responsáveis pela ativação de células dendríticas e produção de mediadores inflamatórios. Estes trabalhos também mostraram que a formação do complexo DNA-proteína é essencial para a internalização do DNA pela célula dendrítica e para o seu posterior reconhecimento por TLR-9 (Wu *et al.*, 2010; Gowda *et al.*, 2011). As respostas pró-inflamatórias iniciais são essenciais para o controle da infecção por plasmódio. Por outro lado, os sinais mais severos de malária têm sido associados diretamente à produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, em um modelo de malária cerebral, foi demonstrado que utilizando um antagonista de receptores de ácidos nucléicos foi possível diminuir a ativação de TLR-9 e impedir a resposta acentuada e nociva causada por citocinas durante a infecção pelo patógeno (Franklin, *et al.*, 2011).

Todos os dados apresentados anteriormente nos levam a acreditar que durante o curso da infecção pelo *M. leprae*, o receptor TLR-9 tem uma importante participação na ativação da resposta imune do hospedeiro, a qual pode levar a uma proteção no início da infecção, ou a uma imunopatologia

característica dos episódios agudos de inflamação observados no ENH. Sendo assim, a compreensão das bases imunológicas envolvidas na relação patógeno-hospedeiro durante a hanseníase pode ser utilizada no desenvolvimento de esquemas preventivos e terapêuticos mais eficazes visando o controle da doença.

### 1. Geral

Investigar o envolvimento do receptor TLR-9 na ativação da resposta imune do hospedeiro em dois momentos distintos durante o curso natural da infecção pelo *M. leprae*.

### 2. Específicos

**2.1. Parte 1** – Analisar o envolvimento do TLR-9 na ativação da resposta imune inata em células epiteliais alveolares infectadas com *M. leprae*:

2.1.1. Analisar a capacidade do *M. leprae* em induzir mediadores inflamatórios e moléculas microbidas em células epiteliais alveolares;

2.1.2. Avaliar a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão da molécula co-estimuladora CD80 e do MHC-II na superfície de células epiteliais alveolares;

2.1.3. Verificar a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e a sua participação na secreção dos mediadores inflamatórios induzidos pelo *M. leprae* em células epiteliais alveolares;

2.1.4. Analisar a capacidade do oligonucleotídeo CpG complexado à Hlp de *M. leprae* em induzir mediadores inflamatórios e moléculas microbidas em células epiteliais alveolares;

2.1.5. Avaliar a participação do receptor TLR-9 na secreção da quimiocina IL-8 em células epiteliais alveolares estimuladas com *M. leprae*;

2.1.6. Investigar o envolvimento da proteína Hlp na ligação de DNA com a superfície micobacteriana;

2.1.7. Investigar a capacidade da proteína Hlp de *M. leprae* de se ligar a diferentes tipos de colágeno promovendo a citoaderência da bactéria.

**2.2. Parte 2** – Investigar o envolvimento do TLR-9 no processo inflamatório desencadeado no eritema nodoso hansênico (ENH):

2.2.1. Analisar os níveis de expressão de TLR-9 em lesão de pele e em PBMCs purificados de indivíduos sadios e de pacientes BL e LL reacionais (ENH) e não-reacionais;

2.2.2. Determinar os níveis séricos de Hlp, bem como detectar a presença de DNA de *M. leprae* circulante, em pacientes BL e LL reacionais (ENH) e não-reacionais;

2.2.3. Comparar os níveis circulantes de complexos DNA-histona humanos entre indivíduos sadios, pacientes BL e LL reacionais (ENH) e não-reacionais;

2.2.4. Quantificar, após estímulos com sonicado de *M. leprae* ou com complexo oligonucleotídeo CpG-Hlp, os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  em sobrenadantes de culturas de PBMCs isoladas de indivíduos sadios e de pacientes BL e LL reacionais (ENH) e não-reacionais;

2.2.5. Investigar se a inibição da ativação do receptor TLR-9 reduz os níveis das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  secretadas de PBMCs isolados de pacientes BL e LL reacionais (ENH) em resposta ao sonicado de *M. leprae*.

A seguir, descrevemos a metodologia utilizada na **parte 1** do trabalho:

### 1. Linhagem celular

As células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 foram adquiridas do banco de células ATCC (American Type Cultures Collection, E.U.A.). Para o início do cultivo, as células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37<sup>0</sup>C, e ressuspensas em um volume de 10 mL de meio D-MEM/F12 suplementado. As células foram incubadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (NUNC A/S) em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37<sup>0</sup>C. Após obter uma confluência de 80%, o meio foi removido e as células foram descoladas adicionando-se 1 mL de solução salina contendo 8,5 g/L de NaCl e 25 g/L de tripsina 1x (Sigma), mantendo-se por 2 minutos a 37<sup>0</sup>C. Em seguida, 5 mL de meio de cultura completo foram adicionados e a suspensão centrifugada por 10 minutos a 514 x *g* a 4<sup>0</sup>C. As células foram ressuspensas em meio de cultura, contadas em câmara de Neubauer e inoculadas em nova garrafa para a manutenção da cultura, ou então plaqueadas para serem utilizadas nos experimentos.

### 2. Meio de cultivo de células eucarióticas

Para o cultivo das células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 foi utilizado meio D-MEM/F12 (LGC Biotecnologia) suplementado com 10 nM de HEPES, 1 mM de glutamax e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen), assim como a combinação de antibióticos penicilina/estreptomicina a 100 U/mL (PEES; Sigma).

### 3. Micobactérias

As cepas selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* ( $\Delta hlp$ ) do *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 foram doadas pelo Doutor Thomas Dick da Universidade

de Singapura. *M. bovis* BCG (cepa Pasteur) foi doado pelo Doutor Franco Menozzi do Instituto Pasteur, Lille, França (linhagem 1173P2). Para o início do cultivo, um inóculo de 1% de cada amostra foi adicionado a 5 mL de meio Middlebrook 7H9 completo em tubos de vidro de rosca de 15 mL com barras magnéticas e mantidos a 37<sup>0</sup>C sob constante agitação. A cepa mutante de *M. smegmatis* foi cultivada na presença de 20 µg/mL de kanamicina. O cultivo foi interrompido quando a cultura atingiu uma densidade óptica a 600 nm igual a 1,8 em um espectrofotômetro (Ultrospec 2000 pro UV/visible) (Amersham Biosciences) correspondente ao final da fase exponencial de crescimento. Alíquotas foram congeladas a -70<sup>0</sup>C em 25% de glicerol estéril até o momento da utilização em experimentos ou para novo cultivo.

*M. leprae* Thai-53 vivo, proveniente do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*), foi cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL, Bauru, SP). Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, as patas foram colhidas e enviadas ao Laboratório de Microbiologia Celular (FIOCRUZ, RJ) para purificação. As patas foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) sob condições estéreis. A suspensão de bacilos foi tratada com hidróxido de sódio 0,1 M por 1 minuto, posteriormente ressuspensa em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e incubada a 33<sup>0</sup>C por 3h. Para os ensaios com *M. leprae* morto, as bactérias foram letalmente irradiadas por 5 minutos utilizando dois aceleradores lineares de elétrons de 18 kW de potência e 10 MeV de energia cada um (Acelétron, Rio de Janeiro, RJ).

#### **4. Meio de cultivo de micobactérias**

O meio líquido 7H9 foi preparado dissolvendo 4,7 g da base Middlebrook 7H9 (Difco), 0,05% (v/v) de Tween 80 (Difco) e 0,2% (v/v) de glicerol (LGC Biotecnologia) num volume final de 1 L de água deionizada. Após esterilização a 121<sup>0</sup>C por 15 minutos, adicionou-se ao meio frio 10% (v/v) de Middlebrook ADC (cloreto de sódio 8,5 g/L; albumina sérica bovina 50 g/L, dextrose 20 g/L e

catalase 0,03 g/L; BD) no momento da sua utilização. Quando necessário, foi adicionado 20 µg/mL do antibiótico kanamicina (LGC Biotecnologia).

## **5. Quantificação de micobactérias**

Os bacilos foram quantificados pelo método de Shepard & McRae (1968). Para tal, 10 µL de suspensão bacteriana foram utilizadas para preparação de esfregaços em lâminas de vidro com anel gravado (Fisher brand), nas diluições de 10 e 100 vezes ou sem diluição. Após esta etapa, o material foi fixado por calor e corado através da coloração de Kynion. Seguindo este método de coloração, as lâminas foram coradas com fucsina básica por 5 minutos e lavadas com água corrente. As lâminas foram, então, tratadas com solução álcool-ácida e, em seguida, lavadas com água novamente para a retirada de excesso do corante. Finalmente, os esfregaços foram corados com azul de metileno por 3 minutos e lavados com água. A contagem do número de bacilos foi realizada em microscópio óptico com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 1000x.

## **6. Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humanas**

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos heparinizados e então processadas para obtenção das PBMCs. O sangue coletado foi diluído numa proporção 1:1 em solução salina tamponada (PBS) e centrifugado a 913 x *g* sobre gradiente de densidade Ficoll-Paque (LGC Biotecnologia) por 30 minutos, a temperatura ambiente. O anel contendo as PBMCs, que se encontram na interface Ficoll-Paque/plasma, foi coletado, lavado com PBS e centrifugado a 329 x *g* por 10 minutos a 4<sup>0</sup>C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de PBS gelado, havendo, então, uma nova centrifugação a 514 x *g* por 10 minutos a 4<sup>0</sup>C. Esse processo foi repetido e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de meio AIM-V. A quantificação de células viáveis foi feita pelo método de exclusão por meio de coloração pelo azul Trypan (corante vital). O processamento do sangue dos indivíduos incluídos

neste estudo foi realizado em câmara de fluxo laminar respeitando as normas de precauções para manipulação de material biológico.

## **7. Proteína Hlp recombinante de *M. leprae***

A proteína Hlp recombinante (rHlp) de *M. leprae* foi obtida em nosso laboratório após sua expressão em *E. coli* BL21 utilizando o plasmídeo pDEST17-Hlp, doado pelo Dr. Franck Biet do Instituto de Infectologia Animal/INRA de Nouzilly (França) seguindo, de forma semelhante, a metodologia descrita previamente (Lefrançois *et al.*, 2011). Para a análise de contaminação com lipopolissacarídeo (LPS) na amostra, PBMCs de doadores sadios foram purificadas e em seguida estimuladas com 0,5  $\mu$ M da proteína ou com 10 ng/mL de LPS de *E. coli* (Sigma), utilizado como controle positivo, diluídos em meio AIM-V (GIBCO). As células foram incubadas por 24 horas a 37<sup>0</sup>C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e, após este período, o sobrenadante foi recuperado para posterior quantificação de TNF- $\alpha$ .

## **8. Ensaios de estimulação de células epiteliais alveolares**

As células epiteliais da linhagem A549 foram semeadas por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37<sup>0</sup>C em placas de 6 poços (5 x 10<sup>5</sup> células por poço) para os experimentos de PCR ou de 24 poços (5 x 10<sup>4</sup> células por poço) para os demais experimentos. A seguir, os sobrenadantes das células foram descartados e foram adicionados diferentes estímulos diluídos em meio de cultura sem antibiótico. As células foram, então, incubadas por diferentes tempos em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 33<sup>0</sup>C (para os experimentos com *M. leprae* vivo) ou 37<sup>0</sup>C (para os demais estímulos). Ao término de cada período de incubação, os sobrenadantes das culturas celulares foram centrifugados a 16000 x g por 5 minutos, aliqüotados e estocados a -70<sup>0</sup>C para posterior dosagem de citocinas, quimiocinas e/ou óxido nítrico. As células foram processadas para realização das técnicas de *immunoblotting*, citometria ou PCR. Os estímulos usados foram: *M. leprae* vivo e morto, oligonucleotídeo CpG (ODN 2395; Invivogen), proteína rHlp de *M.*

*leprae* pré-incubada ou não a 37<sup>0</sup>C por 10 minutos com o CpG e os *M. smegmatis* wt e  $\Delta hlp$  pré-incubados ou não com o CpG. Em alguns ensaios, BCG ou LPS de *E. coli* foram usados como controles positivos. Para os experimentos de inibição da translocação de NF- $\kappa$ B foi realizado um pré-tratamento das células com a droga wedelolactone (Sigma) a 80  $\mu$ M e para os ensaios de bloqueio de TLR-9, com o antagonista sintético E6446 (Eisai) a 0,2  $\mu$ M. A concentração dos estímulos e os tempos de incubação variaram de acordo com o tipo de experimento e encontram-se especificados no capítulo dos resultados. Cada experimento foi feito em duplicata. O número de experimentos de cada ensaio está compreendido no capítulo de resultados.

## **9. Dosagem de citocinas e quimiocinas (ELISA)**

As citocinas e quimiocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, RANTES e MCP-1 foram quantificadas separadamente por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando kit DuoSet<sup>®</sup> (R&D Systems) específico para cada mediador. De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, placas de 96 poços de fundo chato (NUNC) foram recobertas com 50  $\mu$ L do anticorpo de captura específico para cada molécula, diluído em PBS por 16 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS) e bloqueados com 1% de BSA diluído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados 3 vezes e foram adicionados 50  $\mu$ L de concentrações conhecidas de moléculas recombinantes (utilizadas para a geração da curva padrão) diluídas em reagente diluente ou 50  $\mu$ L da amostra de sobrenadantes das culturas. A placa permaneceu incubada por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens. Logo após, foram adicionados 50  $\mu$ L do anticorpo de detecção específico para cada molécula, conjugado a biotina e diluído em reagente diluente, e a placa foi incubada por mais 2 horas a temperatura ambiente. Os poços foram lavados mais 3 vezes e incubados com 50  $\mu$ L de estreptoavidina conjugada a peroxidase, diluída a 1:200 em reagente diluente por 20 minutos a temperatura ambiente. Após mais 3 lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada com

peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB; LGC Biotecnologia) em um volume final de 100  $\mu\text{L}$ . A reação colorimétrica foi interrompida com 50  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico a 2,5 N e a leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro usando o programa SOFTmax<sup>®</sup> PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation) a 450 nm. Após a leitura, os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão. As concentrações de cada anticorpo, os pontos da proteína padrão e os componentes do reagente diluente variavam de acordo com a molécula quantificada. As dosagens foram feitas em duplicatas.

#### **10. Dosagem de óxido nítrico (Método de Griess)**

Os níveis de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas das células foram estimados de forma indireta pela dosagem de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) utilizando o método de Griess (adaptado de Green *et al.*, 1982). Baseado neste método, foram adicionados em placas de 96 poços de fundo chato (NUNC) um volume de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaNO}_2$  em concentrações que variam de 5 a 100  $\mu\text{M}$  (para elaboração da curva padrão) ou amostras de sobrenadantes de cultura das células e 50  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess (Sigma). A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e a leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro usando o programa SOFTmax<sup>®</sup> PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation) a 570 nm. Após a leitura os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão. As dosagens foram feitas em duplicatas.

#### **11. Isolamento de RNA total e síntese de cDNA**

O RNA total das células foi extraído com 1 mL do reagente Trizol (Life Technologies), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, o material foi homogeneizado em vórtex antes da adição de 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck Whitehouse Station). Posteriormente, as amostras foram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4<sup>o</sup>C. A fase aquosa foi, então,

transferida para um novo tubo e misturada a 500  $\mu$ L de isopropanol (Sigma). Após incubação por 24 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  para recuperação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado cuidadosamente com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 10000 x g por 10min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi removido, o sedimento seco à temperatura ambiente por 10 minutos e, então, ressuspenso em água deionizada previamente tratada com dietilpicrocarbonato 0,01% (DEPC, Life Technologies). O RNA total purificado foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND1000; Thermo Scientific) e sua integridade avaliada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2% (Life Technologies) em presença de formaldeído. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  apresentaram valores  $> 1,8$ . O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

Com o objetivo de eliminar DNA genômico contaminante, o RNA total purificado de cada uma das amostras foi tratado com DNase. Para tal, foi utilizado o kit DNA-free™ (Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30  $\mu$ L. Inicialmente, em tubos de 0,6 mL, foi adicionado 3  $\mu$ g de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10X e 1  $\mu$ L da enzima DNase, seguido por incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. 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 minutos, agitando-os manualmente 2-3 vezes para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 2 minutos, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado.

Cada amostra foi dividida em alíquotas de 5  $\mu$ L para realização das reações de síntese de cDNA. O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas celulares mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III® (Life Technologies) em uma reação com volume final de 20  $\mu$ L. Inicialmente, 1  $\mu$ g de RNA e de Oligo (dT) foram incubados a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação, foi

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

## **12. Análise da transcrição gênica (PCR em tempo real)**

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativo-qPCR) foram realizadas utilizando-se o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), com os pares de iniciadores específicos para as seqüências codificantes dos genes IL-8, H $\beta$ D-2 e RPL-13 humanos. De acordo com as recomendações do fabricante, foi realizada uma reação de 20  $\mu$ L, onde foram adicionados 5  $\mu$ L de cDNA, 0,25  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix 1X. As reações foram incubadas no sistema de qPCR ViiA-7<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Condições da reação: 95<sup>o</sup>C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95<sup>o</sup>C por 15 segundos e 60<sup>o</sup>C por 1 minuto. Em cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse (IL-8 e H $\beta$ D-2) e o gene constitutivo utilizado como normalizador (RPL-13). A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta C_T$ ). Uma vez determinado o  $\Delta C_T$  das amostras, foi escolhido como amostra normalizadora o cDNA referente à condição experimental de células não estimuladas. Os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

## **13. Análise da expressão de moléculas de superfície celular (citometria de fluxo)**

No final dos tempos de estimulação, as células foram lavadas 1x com PBS e descoladas com EDTA 10 mM. Em seguida, foram lavadas 1x com PBS contendo 1% SFB e incubadas com os anticorpos monoclonais para CD80 conjugado a ficoeritrina (PE) e MHC-II conjugado a alofocianina (APC) e seus respectivos controles de isotipo (todos da Biolegend) na concentração de 1:10

(v/v) a 4<sup>0</sup>C na ausência de luz por 30 minutos. Por fim, a suspensão de células foi lavada 1x com PBS e fixadas com paraformaldeído a 1%. A expressão dos marcadores foi analisada em citômetro de fluxo FACSAccuri (BD Bioscience) utilizando o programa Cflow Plus. Cada experimento foi feito em duplicata. Os dados foram analisados usando o software C6 BD Accuri, versão 1.0.

#### **14. Purificação de extrato nuclear**

Para a preparação dos extratos, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 0,4 mL de tampão de lise hipotônico (10 mmol/L de HEPES [pH 7,9], 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 10 nmol/L de KCl, 0,05 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoreto, 0,5 mmol/L de dithiotheitrol e um coquetel de inibidores de proteases a 1x [Complete Mini<sup>®</sup> - Roche]) por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 12,5 µL de Igepal a 10% para completar a lise. Os homogenatos foram centrifugados (13000 x g) por 30 segundos e o pellet contendo os núcleos foi ressuspensado em 100 µL em tampão hipertônico de extração nuclear (10 mmol/L de HEPES [pH 7,9], 0,42 M de NaCl, 1,5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 10 nmol/L de KCl, 0,5 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoreto, 1 mmol/L de dithiotheitrol e inibidores de proteases). Após 40 minutos de agitação contínua, os extratos foram centrifugados (13000 x g, 4<sup>0</sup>C) por 10 minutos, e os sobrenadantes contendo os extratos nucleares foram armazenados a -70<sup>0</sup>C para posterior análise. A concentração das proteínas foi estimada através da técnica de BCA (Pierce).

#### **15. Determinação da translocação nuclear de NF-κB (ELISA e immunoblotting)**

Para determinar a atividade do NF-κB, foram utilizadas duas diferentes metodologias: ELISA e eletroforese seguida de *immunoblotting*.

##### **15.1. ELISA**

Para esta análise, foram utilizados 10 µg de proteína do extrato nuclear conforme o protocolo do fabricante (NF-κB p65 ELISA kit; e-Bioscience). O método se baseia na detecção da quimioluminescência provocada pela ligação do NF-κB ativo (detecção da subunidade p65) na sequência oligonucleotídica consenso aderida na placa. Como controle positivo, o kit fornece proteínas de extratos nucleares purificados de células ativadas.

## 15.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e *immunoblotting*

Nesta etapa, aproximadamente 10 µg do extrato protéico nuclear foram aplicados em gel com 15% de poliacrilamida e 0,1% de SDS. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris 0,25 M/Glicina 19,2 M; 0,1% de SDS), utilizando-se cuba Might Small Transphor (Amersham Biosciences) sob amperagem de 25 mA por 2 horas, ou até o indicador da frente da corrida (azul de bromofenol) chegar ao final do gel. O padrão de massa molecular (GE Healthcare) utilizado é composto pelas seguintes proteínas: fosforilase b (97 kDa); albumina (66 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa).

Para a realização do *immunoblotting*, as proteínas submetidas ao gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra – GE Healthcare) em mini cuba de transferência (Amersham Biosciences) contendo tampão de transferência (Tris 0,25 M/Glicina 19,2 M) sob amperagem de 400 mA durante 1 hora a 4<sup>0</sup>C. Logo após, a membrana foi corada com solução de 0,1% de *amido black* para a confirmação da eficiência da transferência e identificação do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi lavada com TBS (Tris/HCl 1 M; NaCl 5 M) contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T) e bloqueada por 2 horas com solução de TBS-T contendo 3% de BSA (TBS-T/BSA 3%). Após esta etapa, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo monoclonal anti-p65 (subunidade de NF-κB; Santa Cruz) diluído 1:1000 em TBS-T/BSA 3%. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com TBS-T por 5 minutos e incubada por 1 hora com IgG anti-mouse

conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:30000 em TBS-T/BSA 3%. A membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T e, então, revelada com o substrato quimioluminescente ECL (GE Healthcare) por exposição da membrana a um filme, que posteriormente foi analisado por densitometria através do software Image-J®.

## **16. Análise estatística**

Os resultados dos ensaios tiveram suas médias aritméticas e erros padrões das médias calculados. Diferenças estatisticamente significativas entre os valores foram determinadas com o uso do programa GraphPad Prism 5 Project (GraphPad Software Inc.), após aplicação do teste *t* não-pareado ou do teste *One-way analysis of variance* (ANOVA) com pós-teste Bonferroni ou *linear trend*, tendo sido considerado significativo um valor de  $p < 0,05$ .

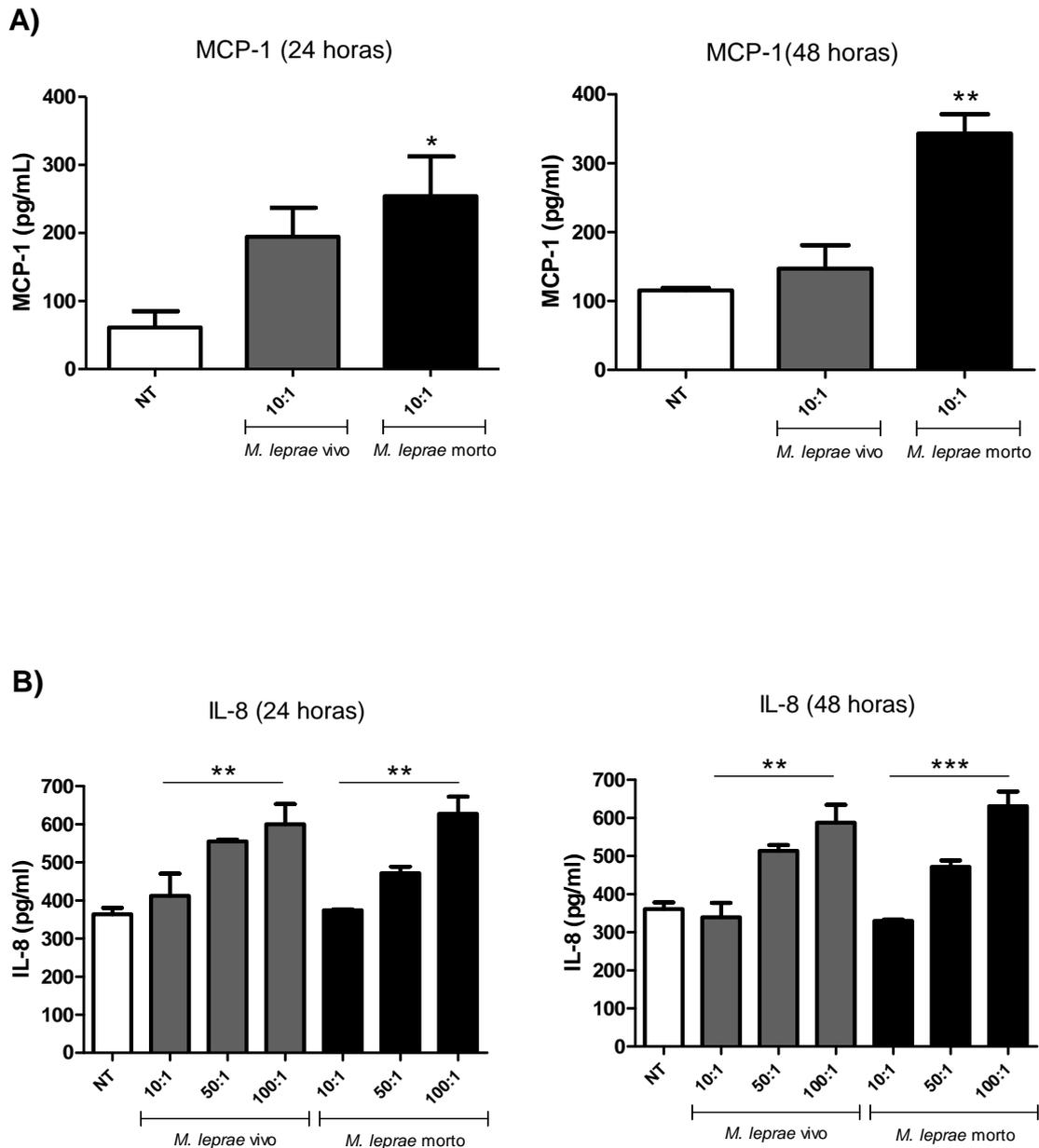
A seguir, estão representados os resultados da **parte 1** do trabalho:

### 1. Efeito do *M. leprae* na secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares

Nosso grupo mostrou em um trabalho publicado recentemente que *M. leprae* é capaz de infectar com sucesso as células epiteliais alveolares da linhagem A549 (Silva *et al.*, 2013). Como atualmente as células epiteliais são reconhecidamente importantes na geração de uma resposta imune, e a indução da produção de uma série de mediadores pró-inflamatórios em tais células por micobactérias já foi mostrada em outros trabalhos (Lin *et al.*, 1998; Wickremasinghe *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007), nosso primeiro passo foi investigar a secreção de citocinas, quimiocinas e NO pelas células A549 após estímulo com *M. leprae*. Para tal, as células foram cultivadas em placas de 24 poços (aproximadamente  $5 \times 10^4$  células por poço) e tratadas com diferentes MOIs (relação bactéria:célula) de *M. leprae* vivo ou morto por 24 e 48 horas. Após cada período, foram realizados ELISAs para quantificar diferentes citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes das culturas celulares. A secreção de NO foi quantificada de forma indireta, através da mensuração de nitrito com o reagente de Griess.

Através do resultado representado pela **figura 11A**, observamos que as células epiteliais respondem ao *M. leprae* secretando níveis aumentados de MCP-1 em relação ao controle não tratado tanto em 24 como em 48 horas, porém somente *M. leprae* morto foi capaz de induzir aumento significativo (*M. leprae* morto,  $231.3 \pm 58.19$  pg/mL *versus* NT,  $54.95 \pm 23.87$  pg/mL;  $p < 0.05$  e *M. leprae* morto,  $315 \pm 28$  pg/mL *versus* NT,  $112 \pm 3.33$  pg/mL;  $p < 0.01$ ; 24 e 48 horas respectivamente). Ao quantificarmos a concentração de outros mediadores (IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$  e RANTES) e de NO nos sobrenadantes das culturas, não conseguimos observar diferença utilizando a relação 10:1 (bactéria:célula). Sendo assim, confeccionamos uma curva-dose de estímulo.

Desta maneira, ao interpretarmos os dados representados pela **figura 11B**, podemos sugerir que as células também respondem ao *M. leprae* produzindo IL-8 de modo dose-dependente tanto em 24 (NT,  $363.9 \pm 16.49$  pg/mL; *M. leprae* vivo 10:1,  $412.1 \pm 58.18$  pg/mL; *M. leprae* vivo 50:1,  $555 \pm 4.87$  pg/mL; *M. leprae* vivo 100:1,  $599.9 \pm 53.27$  pg/mL;  $p < 0.01$  e *M. leprae* morto 10:1,  $374.4 \pm 1.92$  pg/mL; *M. leprae* morto 50:1,  $471.6 \pm 17.08$  pg/mL; *M. leprae* morto 100:1,  $627.4 \pm 44.96$  pg/mL;  $p < 0.01$ ) como em 48 horas (NT,  $361 \pm 17.32$  pg/mL; *M. leprae* vivo 10:1,  $339.2 \pm 37.93$  pg/mL; *M. leprae* vivo 50:1,  $513.7 \pm 14.84$  pg/mL; *M. leprae* vivo 100:1,  $588 \pm 46.3$  pg/mL;  $p < 0.01$  e *M. leprae* morto 10:1,  $329.7 \pm 3.63$  pg/mL; *M. leprae* morto 50:1,  $471.6 \pm 17.08$  pg/mL; *M. leprae* morto 100:1,  $630.8 \pm 38.45$  pg/mL;  $p < 0.001$ ). Não foi possível observar diferença significativa na secreção de IL-6, RANTES, TNF- $\alpha$  e NO pelas células A549 após o estímulo com a bactéria em nenhum tempo nem dose utilizados (dados não mostrados).

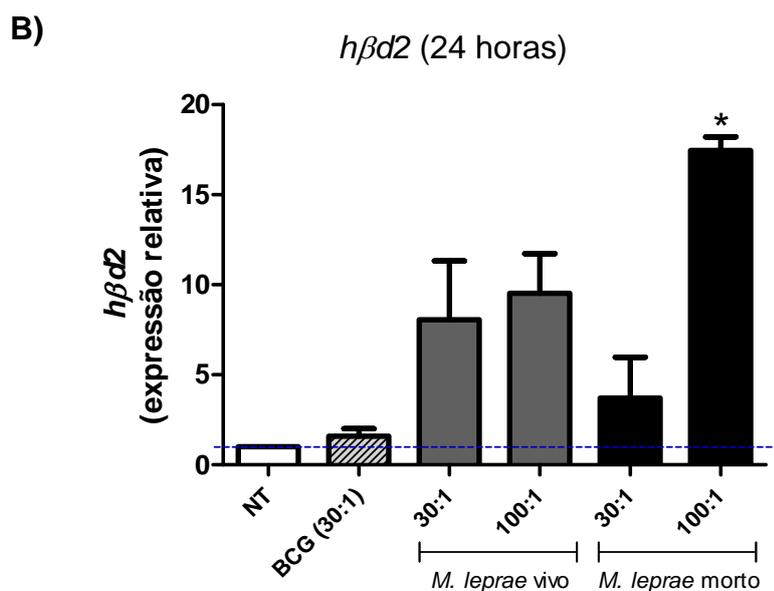
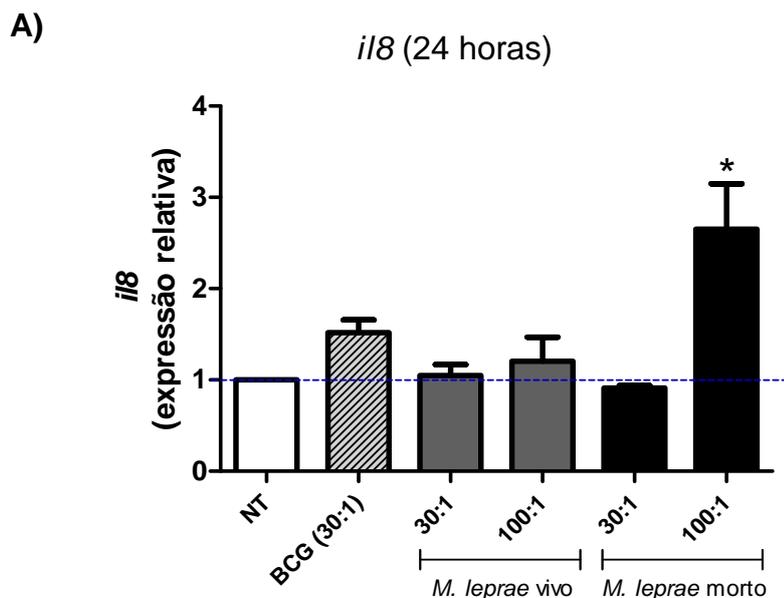


**Figura 11: Secreção de quimiocinas induzidas por *M. leprae* em células epiteliais alveolares.** Células da linhagem A549 foram estimuladas com *M. leprae* vivo ou morto em diferentes proporções (bactéria:célula) por 24 e 48 horas. Após cada período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de MCP-1 (A) e IL-8 (B) presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; teste ANOVA; diferenças consideradas estatisticamente significativas em relação às células não tratadas aplicando pós-teste Bonferroni (A) ou comparando as diferentes doses aplicando pós-teste *linear trend* (B).

## 2. Efeito do *M. leprae* na transcrição gênica de IL-8 e H $\beta$ D-2 em células epiteliais alveolares

Para dar suporte aos dados obtidos anteriormente, foi feita a análise da expressão de IL-8 em células A549, utilizando agora RNAm proveniente de células infectadas com *M. leprae*. Como a indução da expressão de peptídeos antimicrobianos em células epiteliais estimuladas com micobactérias, como *M. tuberculosis* e BCG, por exemplo, já foi demonstrada em estudos anteriores (Rivas-Santiago *et al.*, 2005; Méndez-Samperio *et al.*, 2006), resolvemos também analisar a expressão de H $\beta$ D-2 nestas mesmas amostras. Sendo assim, as células A549 foram estimuladas com *M. leprae* em duas diferentes MOIs (relação bactéria:célula) e também com BCG, usado como controle positivo (Méndez-Samperio *et al.*, 2006), na proporção de 30:1. Após 6 e 24 horas de infecção, o RNA foi extraído das células para posterior análise através de PCR quantitativo.

Os dados representados na **figura 12** demonstram que o estímulo com *M. leprae* vivo ou morto, durante 24 horas, foi capaz de induzir um aumento da expressão tanto de IL-8 como de H $\beta$ D-2 nas células, no entanto, somente *M. leprae* morto na proporção de 100:1 foi capaz de levar a um aumento significativo (em torno de 3 e 17 vezes, respectivamente). Nenhuma diferença foi detectada utilizando BCG como estímulo. No período de 6 horas não foi observada diferença na expressão das moléculas com nenhum dos estímulos utilizados (dados não mostrados).

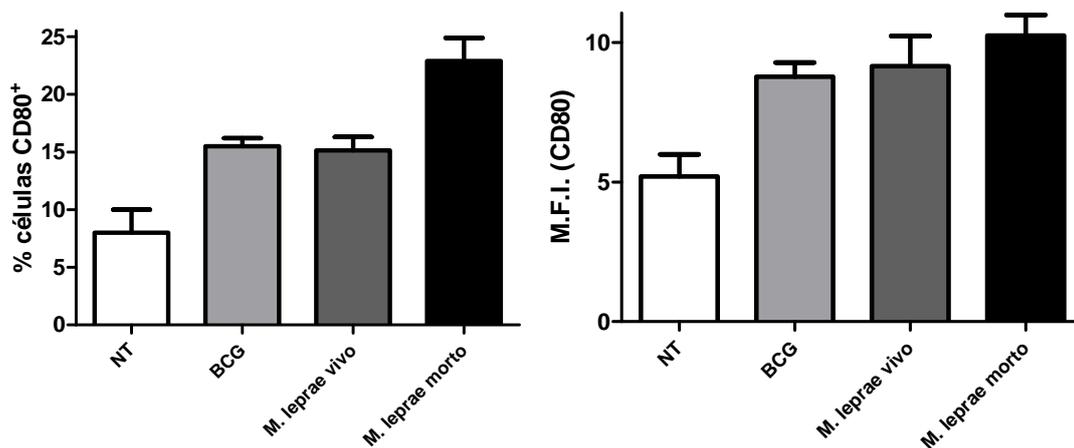
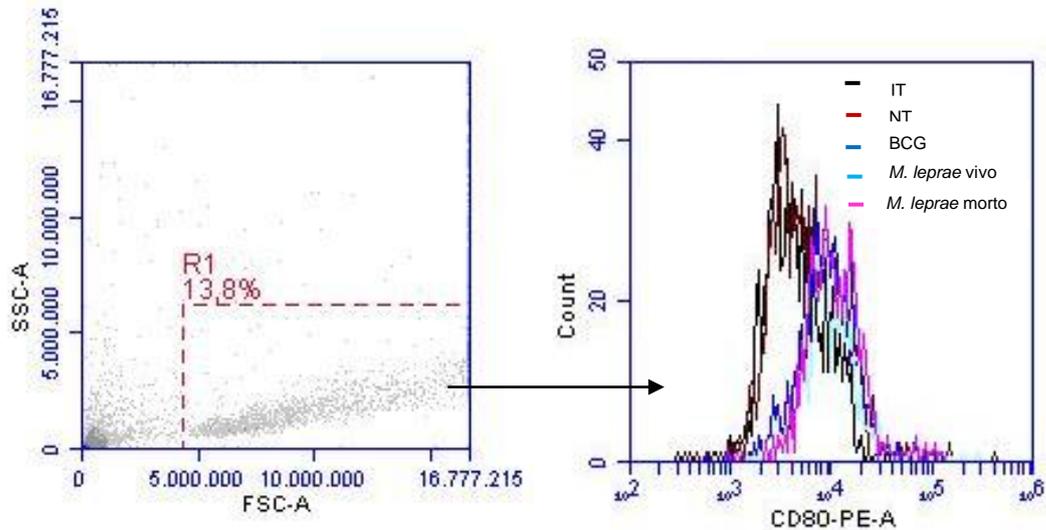


**Figura 12: Níveis de RNAm de IL-8 e HβD-2 em células epiteliais alveolares estimuladas com *M. leprae*.** Células da linhagem A549 foram estimuladas com *M. leprae* vivo ou morto em diferentes proporções (bactéria:célula), ou então com BCG na proporção de 30:1. Após 24 horas, foi feita a extração de RNAm das células para posterior análise da expressão de IL-8 (A) e HβD-2 (B) por PCR quantitativo. Os valores representam a média ± desvio padrão. Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ ; teste ANOVA; diferenças consideradas estatisticamente significativas em relação às células não tratadas aplicando pós-teste Bonferroni.

### 3. Efeito do *M. leprae* na expressão de CD80 na superfície de células epiteliais alveolares

As células epiteliais alveolares podem também atuar como células apresentadoras de antígenos. Já foi demonstrado que pneumócitos do tipo II podem expressar diferentes moléculas co-estimuladoras, além de MHC-II, após diferentes estímulos (Cunningham & Kirby *et al*, 1995; Corbière *et al*, 2011; Li *et al.*, 2011; Shen *et al*, 2014). Com base nesta informação, nosso próximo passo foi analisar a expressão de CD80 e MHC-II na superfície das células A549 estimuladas com *M. leprae*.

A **figura 13** mostra que, ao tratarmos as células por 48 horas com *M. leprae* vivo ou morto, foi possível detectar um aumento em torno de 2 vezes na intensidade de fluorescência de CD80 na superfície das células A549 quando comparamos com as células que não receberam nenhum estímulo. Neste ensaio, utilizamos o BCG também como controle positivo e observamos resultado semelhante, um aumento da intensidade de fluorescência da molécula em torno de 2 vezes em relação ao controle não tratado. Nenhum efeito foi observado ao investigarmos a expressão de MHC-II nas células nas diferentes condições utilizadas (dado não mostrado).



**Figura 13: Expressão de CD80 induzida por *M. leprae* na superfície de células epiteliais alveolares.** Células da linhagem A549 foram estimuladas com *M. leprae* vivo ou morto na proporção de 100:1 (bactéria:célula), ou então com BCG na proporção de 50:1. Após 48 horas, as células foram processadas, marcadas com anticorpo para CD80 (conjugado a PE) e analisadas em citômetro de fluxo. Acima: separação das células por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e deslocamento de células positivas para CD80. Abaixo: Porcentagem de células positivas para CD80 (esquerda) e mediana da intensidade de fluorescência (M.F.I.) de CD80 (direita). Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. IT, controle de isotipo; NT, não tratadas.

#### 4. Translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e seu envolvimento na produção de mediadores inflamatórios em células epiteliais alveolares tratadas com *M. leprae*

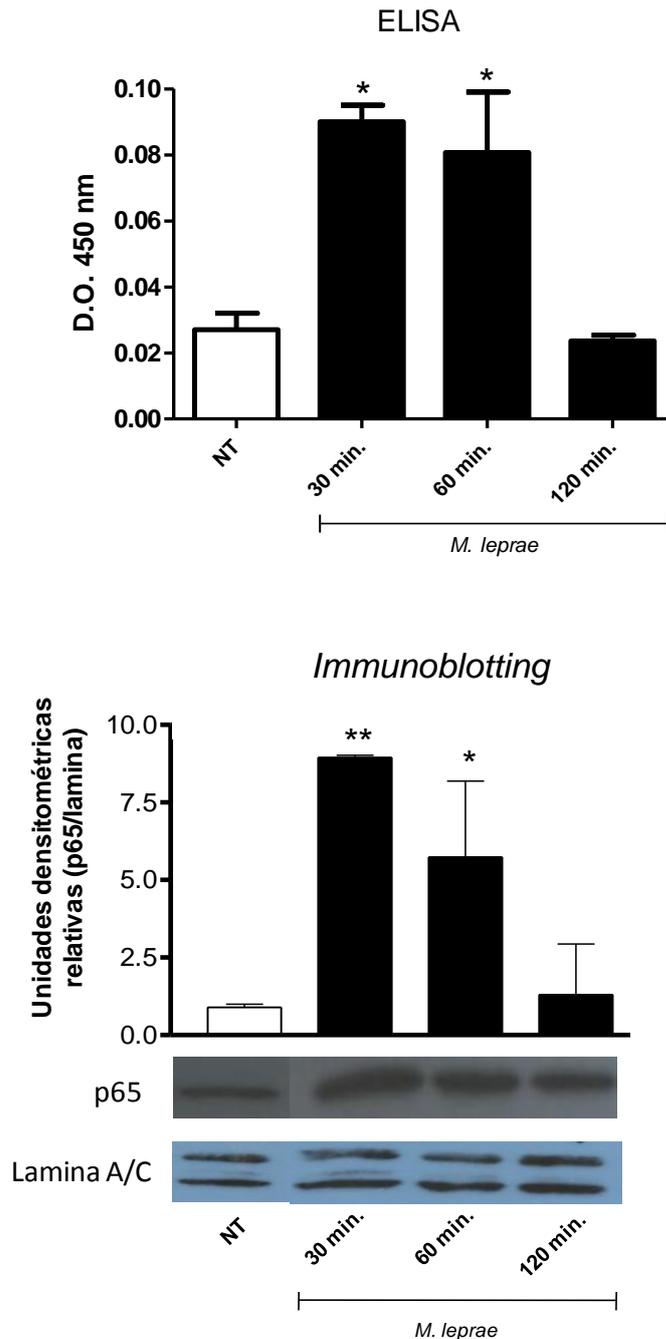
A invasão celular por um patógeno está frequentemente associada com a translocação nuclear de fatores de transcrição como o fator nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B), o qual coordena vários aspectos da função imune necessários para a resistência à infecção, principalmente por estar envolvido na expressão de mediadores inflamatórios (revisto por May & Ghosh, 1998). Neste sentido, para avaliar a influência do *M. leprae* na ativação deste fator de transcrição no epitélio respiratório, as células A549 foram estimuladas com a bactéria em diferentes tempos e a translocação do NF- $\kappa$ B foi analisada no extrato nuclear por ELISA ou por *immunoblotting*.

Através dos resultados representados pela **figura 14**, podemos observar, por ELISA, que *M. leprae* é capaz de induzir, em relação ao controle não infectado, um aumento significativo da concentração da subunidade p65, que compõe o dímero protéico de NF- $\kappa$ B, no núcleo das células nos tempos de 30 e 60 minutos de estímulo (em torno de 4 e 5 vezes, respectivamente). A análise por *immunoblotting* foi feita utilizando anticorpo específico para a subunidade p65 e verificamos o mesmo efeito, ou seja, um aumento do fator de transcrição no núcleo das células A549 tratadas com *M. leprae* nos tempos de 30 e 60 minutos (em torno de 9 e 5 vezes, respectivamente) (**Figura 14**).

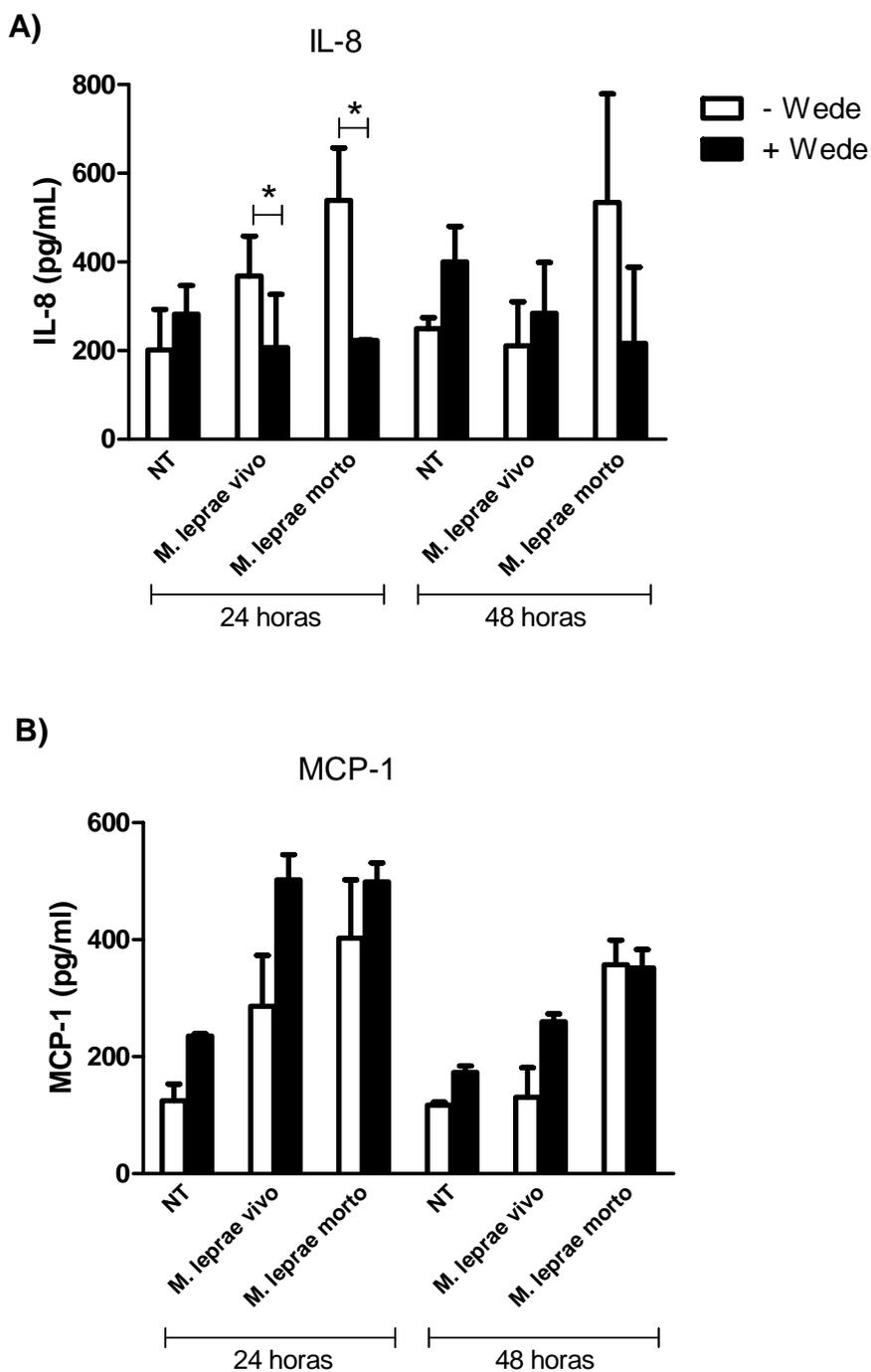
Nosso próximo passo, então, foi investigar se o NF- $\kappa$ B estaria envolvido na produção de mediadores inflamatórios pelas células epiteliais alveolares em resposta a uma infecção com *M. leprae*. Para tal, células A549 foram pré-tratadas por 1 hora com wedelolactone, uma droga que inibe a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B, e em seguida, incubadas com *M. leprae* vivo ou morto por 24 ou 48 horas. Após os períodos de incubação, os níveis dos mediadores inflamatórios foram dosados no sobrenadante.

A **figura 15** mostra que *M. leprae* foi capaz de induzir um aumento tanto de IL-8 (*M. leprae* vivo,  $368 \pm 90$  pg/mL; *M. leprae* morto,  $539 \pm 118$  pg/mL versus NT,  $201.5 \pm 91.5$  pg/mL em 24 horas e *M. leprae* morto,  $534.5 \pm 244.5$

pg/mL *versus* NT,  $249.5 \pm 24.5$  pg/mL em 48 horas) quanto de MCP-1 (*M. leprae* vivo,  $286 \pm 87$  pg/mL; *M. leprae* morto,  $402.5 \pm 99.5$  pg/mL *versus* NT,  $124.5 \pm 28.5$  pg/mL em 24 horas e *M. leprae* morto,  $357 \pm 42$  pg/mL *versus* NT,  $117 \pm 5$  pg/mL em 48 horas) em comparação às células não tratadas, como já visto anteriormente, porém somente a produção de IL-8 se mostrou dependente da ativação de NF- $\kappa$ B neste modelo, já que nas células pré-tratadas com a droga, o perfil de secreção da quimiocina se assemelha aos níveis basais. Importante ressaltar que este efeito foi observado somente em 24 horas.



**Figura 14: Translocação nuclear de NF- $\kappa$ B em células epiteliais alveolares estimuladas com *M. leprae*.** Células da linhagem A549 foram estimuladas com *M. leprae* morto em diferentes intervalos de tempo. Após a infecção, extratos nucleares foram obtidos e utilizados para quantificação dos níveis de p65 no núcleo. Os níveis de p65 no extrato nuclear foram determinados por ELISA ou então os extratos nucleares foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A porção p65 foi revelada por quimioluminescência e normalizada pelos níveis de lamina A. As unidades densitométricas são arbitrárias. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 (ELISA) ou 3 (*immunoblotting*) experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; teste ANOVA; diferenças consideradas estatisticamente significativas em relação às células não tratadas aplicando pós-teste Bonferroni.



**Figura 15: Secreção de IL-8 e MCP-1 por células epiteliais alveolares pré-tratadas com wedelolactone e estimuladas com *M. leprae*.** As células A549 foram pré-tratadas por 1 hora com a droga inibidora da translocação de NF- $\kappa$ B (wedelolactone), lavadas com PBS e, em seguida, estimuladas com *M. leprae* vivo ou morto na proporção de 100:1 (bactéria:célula) por 24 e 48 horas. Após cada período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 (**A**) e MCP-1 (**B**) presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ ; teste  $t$  não-pareado; diferenças consideradas estatisticamente significativas.

## 5. Efeito da proteína rHlp ligada ao oligonucleotídeo CpG na secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares

Estudos anteriores mostraram que o *M. tuberculosis* possui DNA ligado na sua superfície celular (Watson *et al.* 2012; Manzanillo *et al.*, 2012), o qual poderia ser resultante de lise bacteriana que faz com que ocorra a liberação da molécula e a sua ligação na parede de bactérias viáveis. Diante desta afirmação, podemos sugerir que o mesmo efeito ocorre com o *M. leprae*. Como a presença de Hlp já foi demonstrada no envelope bacteriano do *M. leprae* (Shimoji *et al.*, 1999), acreditamos que a proteína possa ser a principal molécula de superfície responsável por esta ligação, formando assim um complexo na parede celular e, conseqüentemente, ativando o receptor TLR-9 nas células hospedeiras. Sendo assim, nossos próximos experimentos serviram para analisar a capacidade da proteína Hlp, juntamente com o oligonucleotídeo CpG, de ativar as células epiteliais alveolares.

A proteína rHlp de *M. leprae* foi purificada em nosso laboratório e utilizada nos ensaios de estimulação de células realizados neste trabalho. Antes da sua utilização, a amostra foi submetida a eletroforese e *immunoblotting* utilizando um anticorpo específico para a proteína (anti-Hlp 5G9; Marques *et al.*, 2000) que confirmaram a sua integridade, grau de pureza e identidade (dados não mostrados).

Como a proteína foi expressa em *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa que apresenta altos níveis de LPS em seu envelope, a próxima etapa foi avaliar o grau de contaminação por LPS da rHlp

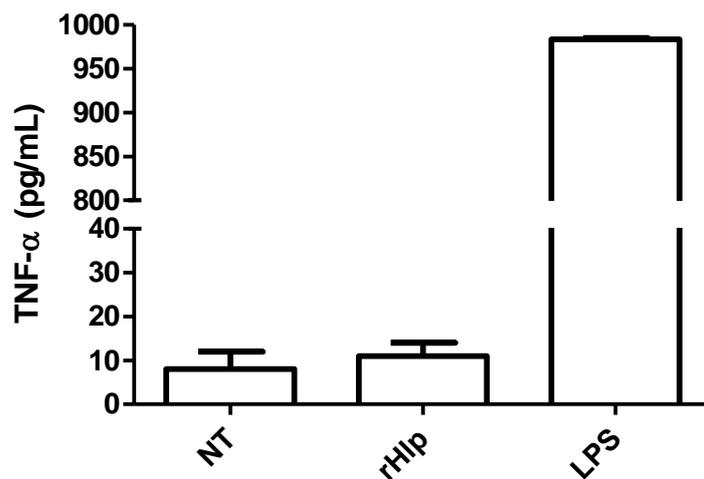
A Hlp, *per se*, não é capaz de induzir a secreção de mediadores inflamatórios em esplenócitos (Matsumoto *et al.*, 2005), em contraste com o LPS que é reconhecidamente um forte indutor destes mediadores nestas células. O grau de contaminação de LPS foi, então, estimado através da dosagem de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura de PBMCs tratadas com rHlp. O teste foi realizado utilizando LPS de *E. coli* como controle positivo.

A **figura 16** mostra que após o tratamento com a rHlp, os níveis de TNF- $\alpha$  secretados pelas células foram semelhantes aos níveis basais secretados pelas células não tratadas ( $8 \pm 4$  pg/mL e  $11 \pm 3$  pg/mL, respectivamente), ao

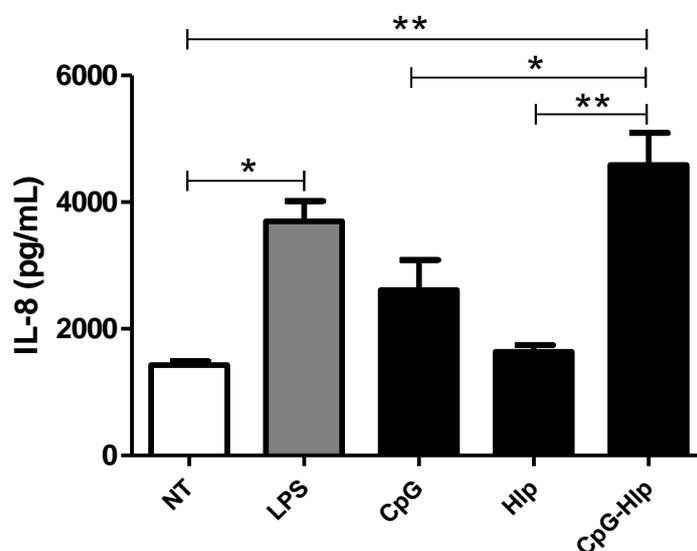
contrário do ocorrido quando as células foram estimuladas com LPS ( $983.5 \pm 1.5$  pg/mL). Sendo assim, com estes resultados foi possível inferir que a contaminação por LPS na amostra da rHlp era indetectável no ensaio utilizado.

Após os testes de controle de qualidade, foi feita a análise da secreção de citocinas, quimiocinas e NO pelas células epiteliais alveolares em resposta à rHlp ligada ou não ao oligonucleotídeo CpG, clássico ligante de TLR-9 análogo ao DNA bacteriano. Para tal, escolhemos a dose de  $1 \mu\text{M}$  do oligonucleotídeo para os estímulos, por ser a concentração sub-ótima necessária para induzir a secreção de mediadores nas células (dado não mostrado).

A **figura 17** mostra que, após 48 horas, a rHlp pré-incubada com o CpG foi capaz de induzir um maior aumento na secreção de IL-8 ( $4589 \pm 356$  pg/mL) nas células A549 em comparação ao estímulo com o CpG somente ( $2613 \pm 335$  pg/mL;  $p < 0.05$ ). Importante mencionar que, como esperado, os níveis de IL-8 no sobrenadante das células tratadas somente com a rHlp se mostraram semelhantes aos níveis basais ( $1637 \pm 75$  pg/mL e  $1426 \pm 45.5$  pg/mL, respectivamente), indicando que a proteína *per se* não foi capaz de induzir a secreção da quimiocina. O LPS foi utilizado como controle positivo induzindo  $3695 \pm 228$  pg/mL da quimiocina no sobrenadante e não foi possível observar diferença significativa na secreção de IL-6, RANTES, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e NO pelas células após os diferentes estímulos utilizados (dados não mostrados).



**Figura 16: Secreção de TNF- $\alpha$  por PBMCs humanas após tratamento com rHlp de *M. leprae*.** As células foram obtidas de indivíduos saudáveis e cultivadas na presença de rHlp (0,5  $\mu$ M). LPS de *E. coli* foi utilizado como controle positivo a 10 ng/mL. Após 24 horas, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de TNF- $\alpha$  presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas.

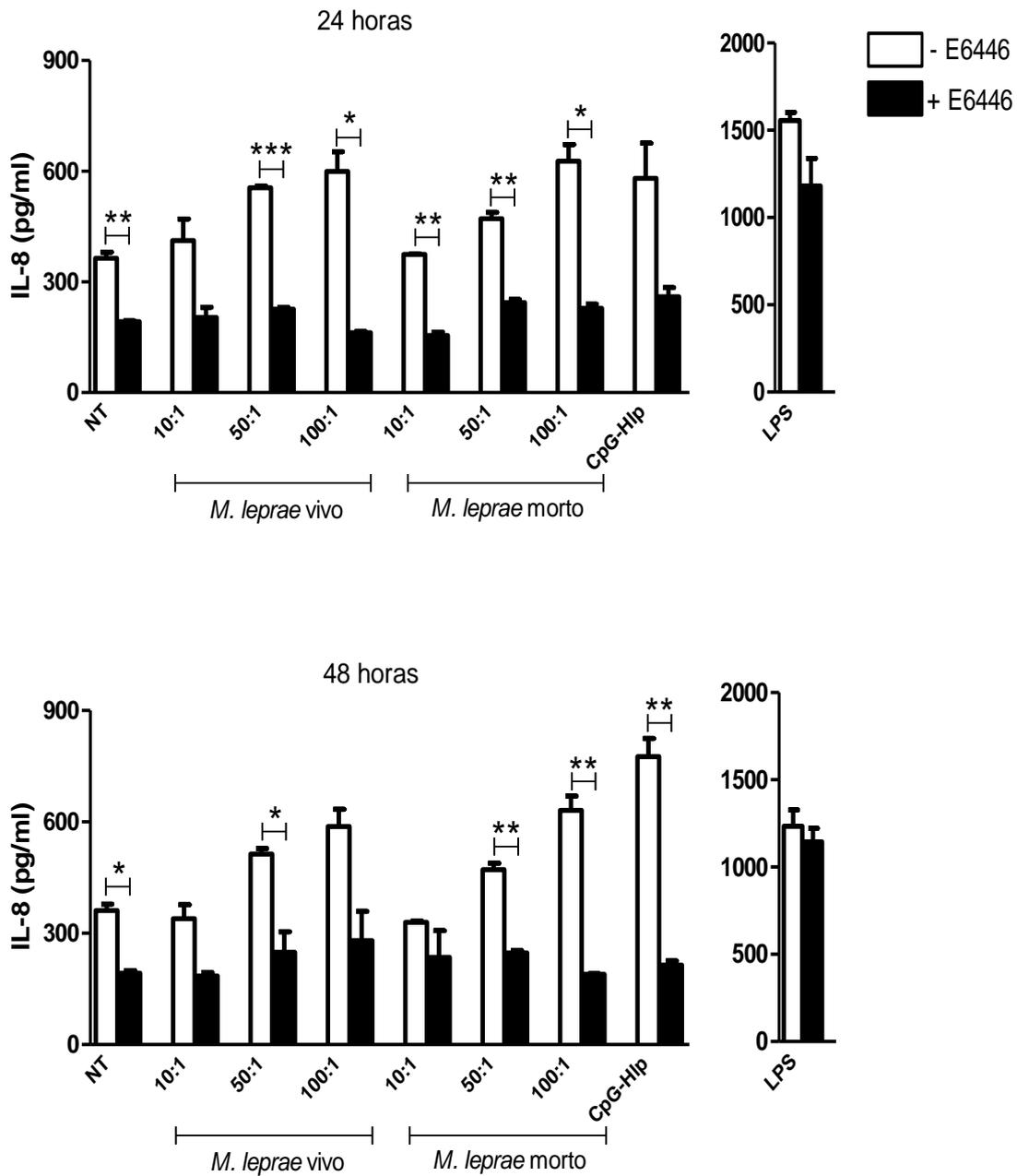


**Figura 17: Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo do complexo CpG-rHlp.** As células epiteliais A549 foram tratadas com CpG (1  $\mu$ M), rHlp (0,5  $\mu$ M) ou com o complexo CpG-Hlp. O LPS (1  $\mu$ g/mL) foi usado como controle positivo. Após 48 horas, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; teste ANOVA; diferenças consideradas estatisticamente significativas aplicando pós-teste Bonferroni.

## 6. Envolvimento do receptor TLR-9 na secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares tratadas com *M. leprae*

Nesta etapa do trabalho, avaliamos a participação do receptor TLR-9 na ativação das células epiteliais alveolares infectadas com *M. leprae*. Para a realização deste ensaio, as células A549 foram pré-tratadas, por 4 horas, com um antagonista sintético (E6446) que bloqueia os receptores TLR-7 e 9. Em seguida, as células foram estimuladas com *M. leprae* em diferentes proporções bactéria:célula nos tempos de 24 e 48 horas. LPS (ligante de TLR-4) e o complexo CpG-Hlp (ligante de TLR-9) foram incluídos como controles de especificidade do antagonista. Após os períodos de estímulo, os níveis de IL-8 foram quantificados nos sobrenadantes das culturas.

Como demonstrado pela **figura 18**, o antagonista inibiu a secreção de IL-8, induzida por *M. leprae* e pelo complexo CpG-Hlp, nas células A549 nos tempos de 24 (*M. leprae* vivo 50:1,  $555 \pm 4.87$  pg/mL versus + E6446,  $225.8 \pm 4.96$  pg/mL,  $p < 0.001$ ; *M. leprae* vivo 100:1,  $599.9 \pm 53.27$  pg/mL versus + E6446,  $162.2 \pm 3.08$  pg/mL,  $p < 0.05$ ; *M. leprae* morto 10:1,  $374.4 \pm 1.92$  pg/mL versus + E6446,  $155.2 \pm 8.33$  pg/mL,  $p < 0.01$ ; *M. leprae* morto 50:1,  $471.6 \pm 17.08$  pg/mL versus + E6446,  $244.2 \pm 7.76$  pg/mL,  $p < 0.01$ ; *M. leprae* morto 100:1,  $627.4 \pm 44.96$  pg/mL versus + E6446,  $228.5 \pm 11.05$  pg/mL,  $p < 0.05$ ) e 48 horas (*M. leprae* vivo 50:1,  $513.7 \pm 14.84$  pg/mL versus + E6446,  $248.7 \pm 55.45$  pg/mL,  $p < 0.05$ ; *M. leprae* morto 50:1,  $471.6 \pm 17.08$  pg/mL versus + E6446,  $247.1 \pm 6.03$  pg/mL,  $p < 0.01$ ; *M. leprae* morto 100:1,  $630.8 \pm 38.45$  pg/mL versus + E6446,  $189.2 \pm 1.54$  pg/mL,  $p < 0.01$ ; CpG-Hlp,  $775.6 \pm 48.99$  pg/mL versus + E6446,  $214.1 \pm 11.33$  pg/mL,  $p < 0.01$ ). Os níveis da quimiocina no sobrenadante das células estimuladas com LPS não se reduziram diante do pré-tratamento com E6446.



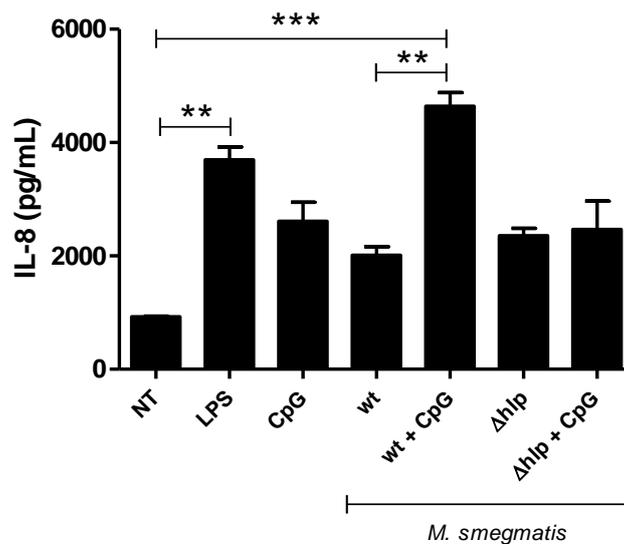
**Figura 18: Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares pré-tratadas com E6446 e estimuladas com *M. leprae*.** As células A549 foram pré-tratadas por 4 horas com antagonista sintético dos receptores TLR-7 e 9 (E6446) e, em seguida, estimuladas com *M. leprae* vivo ou morto em diferentes proporções (bactéria:célula) por 24 e 48 horas. Após cada período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 presentes no sobrenadante da cultura celular. LPS (1  $\mu\text{g/mL}$ ) e CpG-Hip foram usados como controles. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; teste  $t$  não-pareado; diferenças consideradas estatisticamente significativas.

## 7. Análise do envolvimento da Hlp na ligação de DNA com a superfície micobacteriana

No experimento a seguir, passamos a avaliar a capacidade do DNA bacteriano de se ligar à Hlp presente na parede das micobactérias, utilizando, para isso, cepas de *M. smegmatis* selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* ( $\Delta hlp$ ). A escolha desta espécie de micobactéria como ferramenta para a realização dos ensaios seguintes foi devido à impossibilidade de se construir cepas mutantes em *M. leprae* e à capacidade de *M. smegmatis* de se manter viável mesmo na ausência da Hlp. Além disso, a Hlp é uma proteína altamente conservada entre as diferentes espécies de micobactérias (Lefrançois *et al.*, 2011).

Após confirmar, através de *immunoblotting*, a presença da Hlp somente na cepa selvagem (dado não mostrado), foi feita a análise da secreção de citocinas, quimiocinas e NO nas células A549 após estímulo com *M. smegmatis* wt ou  $\Delta hlp$  pré-incubados ou não com o oligonucleotídeo CpG. Para tal, as células foram tratadas com os estímulos mencionados e também com o LPS, que foi usado como controle positivo.

É possível notar na **figura 19** que, após 48 horas de estímulo, as células alveolares secretaram aproximadamente 2 vezes mais IL-8 em resposta ao *M. smegmatis* wt pré-incubado com o CpG em comparação às células só estimuladas com a micobactéria, o mesmo não sendo observado com a cepa mutante. Não foram observadas diferenças significativas em relação à secreção de IL-6, RANTES, TNF- $\alpha$ , MCP-1 e NO (dados não mostrados).



**Figura 19: Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com *M. smegmatis* wt ou  $\Delta hlp$  na presença ou ausência do oligonucleotídeo CpG.** As células epiteliais A549 foram tratadas com *M. smegmatis* wt ou  $\Delta hlp$  pré-incubados ou não com CpG (1  $\mu$ M) na proporção de 10:1 (bactéria:célula), ou então com CpG somente por 48 horas. O LPS (1  $\mu$ g/mL) foi usado como controle positivo. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. NT, não tratadas. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; teste ANOVA diferenças consideradas estatisticamente significativas aplicando pós-teste Bonferroni.

### Envolvimento do TLR-9 na patogênese do eritema nodoso hansênico

Durante o curso crônico da hanseníase, entre 30 a 50% dos pacientes com a forma lepromatosa da doença apresentam quadro inflamatório, com intensidade de leve a grave, caracterizado pelo aparecimento súbito de nódulos eritomatosos na pele conhecido como eritema nodoso hansênico (ENH) (Nery *et al.*, 1998). Os episódios reacionais, como também são chamados, causam grande desconforto ao paciente e podem durar de poucos dias a anos, estendendo-se mesmo após o encerramento da PQT. O tratamento das reações, especialmente as persistentes e de longa duração, constitui um dos maiores desafios em hanseníase. O ENH é tradicionalmente tratado com corticóides e/ou Talidomida. Os corticóides têm uma eficácia limitada em muitos pacientes, requerendo muitas vezes altas doses e utilização por períodos muito longos, levando ao surgimento de efeitos colaterais. Já a Talidomida apresenta melhores resultados no controle do ENH, especialmente nas formas crônicas e recorrentes e ajuda a minimizar a dependência aos corticóides. Apesar disso, como já citado anteriormente, tem utilização restrita devido aos seus efeitos teratogênicos, limitando o seu uso a homens ou mulheres em idade não fértil.

Como as causas e patogenia do ENH ainda são pouco conhecidas, um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no desencadeamento deste episódio reacional é necessário para a proposição de tratamentos alternativos mais eficientes para o seu controle. O surgimento do ENH ocorre com maior frequência após início da PQT e está associado com a morte dos bacilos nos pacientes multibacilares, o qual resulta na liberação de diversas moléculas constituintes da bactéria capazes de estimular o sistema imune inato do hospedeiro. Dentre os receptores do sistema imune inato, o TLR-9, que reconhece tanto DNA bacteriano como endógeno, surge como um potencial candidato capaz de, quando ativado, desencadear um processo inflamatório como o observado no ENH. Deste modo, nesta segunda etapa do nosso estudo, foi investigada a participação do TLR-9 no ENH. Para atingir este

objetivo, comparamos os níveis de expressão do receptor em lesões de pele e também nas células mononucleares periféricas de pacientes reacionais e não reacionais. Sabendo-se que o TLR-9 é ativado por DNA de origem bacteriana ou endógena e que a atividade imunoestimuladora do DNA é aumentada na presença de histonas, comparamos também, nestes pacientes, os níveis circulantes de agonistas que são reconhecidos por este receptor. Por fim, avaliamos a produção de citocinas pró-inflamatórias por PBMCs isoladas destes pacientes frente a estímulos com ligantes de TLR-9 e investigamos se o bloqueio do receptor seria capaz de inibir a produção destas citocinas nas células de pacientes reacionais. Os resultados desta parte do trabalho foram compilados e podem ser encontrados no manuscrito que se encontra em preparação para submissão.

1 **DNA sensing via TLR-9 constitutes a major innate immunity pathway**  
2 **activated during erythema nodosum leprosum**

3

4

5 André Alves Dias<sup>a</sup>; Camila Oliveira da Silva<sup>a</sup>; Chyntia Carolina Díaz Acosta<sup>a</sup>;  
6 Amanda Nogueira Brum Fontes<sup>b</sup>; João Pedro Sousa Santos<sup>a</sup>; Leonardo Ribeiro  
7 Batista Silva<sup>c</sup>; Mayara Abud Mendes<sup>c</sup>; Roberta Olmo Pinheiro<sup>c</sup>; Flávio Alves  
8 Lara<sup>a</sup>; Geraldo Moura Batista Pereira<sup>a</sup>; José Augusto da Costa Nery<sup>c</sup>; Euzenir  
9 Nunes Sarno<sup>c</sup> and Maria Cristina Vidal Pessolani<sup>a\*</sup>.

10

11

12 <sup>a</sup>Laboratory of Cellular Microbiology; <sup>b</sup>Laboratory of Molecular Biology Applied  
13 to Mycobacteria and <sup>c</sup>Leprosy Laboratory – Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ  
14 – Rio de Janeiro, Brazil

15

16

17 \*Corresponding author:

18 Maria Cristina Vidal Pessolani

19 e-mail: cpessola@ioc.fiocruz.br

20 Fax: 55-21-2270-9997; Tel.: 55-21-2562-1553

21 Laboratório de Microbiologia Celular

22 Instituto Oswaldo Cruz

23 Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

24 Av. Brasil 4365 – Manguinhos

25 Rio de Janeiro, RJ 21045-900 - Brazil

26 **Abstract**

27

28 Multibacillary (MB) leprosy patients may be affected by type II reaction or  
29 erythema nodosum leprosum (ENL) that is a major cause of peripheral nerve  
30 damage. During ENL an abrupt release of pro-inflammatory cytokines occurs  
31 affecting the skin and nerves and accompanied by systemic symptoms. ENL  
32 has been related to the massive release of mycobacterial pathogen-associated  
33 molecular pattern (PAMPs) during chemotherapy with the consequent  
34 excessive activation of the innate immune response. The aim of the present  
35 work was to investigate whether DNA sensing via *Toll*-like receptor 9 (TLR-9)  
36 constitutes a major pathway of the innate immunity activated during ENL. Flow  
37 cytometry and immunohistochemistry analysis showed significantly higher  
38 expression of TLR-9 both locally in the skin lesions, as well as in circulating  
39 mononuclear cells in ENL when compared to nonreactive BL/LL patients. The  
40 levels of TLR-9 ligands in the circulation of BL/LL and ENL patients were also  
41 analyzed. Since DNA-histone complexes are known to be more potent TLR-9  
42 agonists than DNA alone, the mycobacterial histone-like protein (Hlp), ML DNA  
43 and human DNA-histone complexes were measured in serum samples. Higher  
44 levels of all these molecules were found in ENL patients. Furthermore,  
45 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from reactive patients  
46 secreted higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in response to unmethylated  
47 CpG dinucleotide-Hlp complex than nonreactive patients and healthy  
48 individuals. Finally, E6446, a synthetic antagonist of nucleic acid-sensing TLRs,  
49 was able to significantly inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines by  
50 PBMCs from reactive patients in response to *M. leprae* lysate. The median

51 values of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  showed a decrease of 68%, 38% and 42% in  
52 cultures treated with the TLR-9 antagonist. Our data suggest that bacterial and  
53 human DNA act as important PAMP and endogenous danger-associated  
54 molecular pattern (DAMP), respectively, inducing pro-inflammatory cytokines  
55 through TLR-9 activation during ENL. Thus, the use of TLR-9 antagonists  
56 emerges as a potential alternative for an effective treatment of ENL preventing  
57 nerve injury and deformities in leprosy.

58

59 Key Words:

60 Leprosy, innate immune response, TLR-9, DNA, histones, inflammation

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

## 76 Introduction

77

78 Leprosy, a disease associated with debilitating disfiguration, remains a  
79 public health threat in several low and middle income countries, including Brazil  
80 where more than 30,000 new cases are reported annually (WHO, 2015).  
81 *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, is an obligate  
82 intracellular pathogen that mainly infects macrophages of the skin and Schwann  
83 cells of the peripheral nerves.

84 The clinical manifestations of the disease depend on the immune  
85 response of infected individuals, and were described based on a continuous  
86 spectrum of disease states [1]. At one end of the spectrum is the polar  
87 tuberculoid form (TT), characterized by a high cellular immune response  
88 mediated by IFN- $\gamma$ , limited skin lesions and restricted growth of the bacillus. At  
89 the opposite end of the spectrum is the polar lepromatous form (LL),  
90 characterized by impaired cellular immunity, numerous skin lesions and  
91 widespread dissemination of the pathogen. The intermediate states of the  
92 spectrum are borderline tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB) and  
93 borderline-lepromatous (BL). The World Health Organization has established  
94 the clinical classification of patients into multibacillary (BB, BL, LL) and  
95 paucibacillary (TT, BT) leprosy to delimit the treatment regimens.

96 The chronic course of leprosy is interrupted in about 30 - 50% of the  
97 patients by acute inflammatory episodes that occur before or, more often,  
98 during or even after multidrug therapy treatment (MDT) [2]. These inflammatory  
99 states, also called "reactions" are classified as type I (reversal reaction; RR) or  
100 type II (ENL) and constitute the major cause of peripheral nerve damage in

101 leprosy patients [2,3]. Oral steroids have been used since the 1950s to treat  
102 reactions, however in the case of ENL thalidomide has been shown to be a  
103 more effective drug [4]. It is, however, contraindicated for women of  
104 childbearing age due to its teratogenicity. Early diagnosis and effective therapy  
105 are the solution for reducing the recurrence of reactional episodes. The  
106 comprehension of the immunopathogenesis and the mechanisms related to the  
107 onset of leprosy reactions may open up new avenues for novel and more  
108 effective therapeutic approaches, which will decrease the incidence of physical  
109 disabilities and deformities in individuals suffering from leprosy.

110 ENL only occurs in BL and LL (multibacillary) forms and is characterized  
111 by severe systemic symptoms, including fever, painful cutaneous lesions,  
112 arthritis, glomerulonephritis, and the presence of circulating immune complexes  
113 [5,6]. The fever, weight loss, and general debility of ENL, as in other forms of  
114 acute and chronic disease, including sepsis and cancer, is associated with the  
115 high production of pro-inflammatory cytokines [7,8] During ENL high circulating  
116 levels of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)  $1\beta$  and tumor necrosis  
117 factor (TNF)  $\alpha$  are detected [9,10]. In addition, it was noted that TNF- $\alpha$  levels  
118 were reduced after treatment of patients in ENL. These pro-inflammatory  
119 mediators seem to be produced both at the lesion sites, as well as by peripheral  
120 leukocytes [11–13] that during ENL have been shown to become more  
121 responsive to *M. leprae* sonicate producing higher levels of TNF- $\alpha$  *in vitro*  
122 [14,15]. The prompt beneficial effects obtained with thalidomide and steroids  
123 highlight the central role of host inflammatory mediators in this syndrome.

124 The extent of skin lesions and the bacterial load (bacteriological index - BI)  
125 have been identified as an important risk factor for reactions. Other risk factors

126 associated with the onset of reactional episodes include concomitant bacterial  
127 or viral infections, stress, childbirth, surgery, the presence of mycobacterial  
128 antigens in the lesions, and, especially, the massive bacillary death that occurs  
129 after the beginning of the treatment. Previous studies have described tissue  
130 localization of defined *M. leprae* antigens in skin and nerve at the time of active  
131 reactional immunopathology [16,17].

132         Despite the studies conducted so far, the *M. leprae* antigens involved  
133 and the physiopathological mechanisms of ENL remain ill defined. Specifically,  
134 the involvement of innate immunity activation pathways has been poorly  
135 analyzed. The innate immune system relies on pattern recognition receptors  
136 (PRRs), which recognize microbial pathogen-associated molecular patterns  
137 (PAMPs) and endogenous danger-associated molecular patterns (DAMPs),  
138 leading to the activation of host defense pathways. Mycobacteria express a  
139 plethora of PAMPs including lipids, glycolipids, lipoproteins, peptidoglycan  
140 fragments (muramyl dipeptide [MDP]) and DNA that can be sensed by surface  
141 (TLR-2/1, TLR-2/6, TLR-4) and intracellular (TLR-9, NOD-1 and NOD-2) PRRs  
142 activating inflammatory pathways [18].

143 The involvement of PRRs and their signaling pathways in the pathogenesis of  
144 chronic inflammatory diseases such as systemic lupus eritromatosus (SLE) and  
145 rheumatoid arthritis is now firmly established [19]. A PRR with a potential role in  
146 ENL is TLR-9, a major activation pathway of the host innate immunity during  
147 mycobacterial infections [20,21]. TLR-9 recognizes unmethylated CpG motifs  
148 more abundantly present in bacterial and viral DNA [22]. Moreover, it has been  
149 shown that DNA-histone complexes are more potent TLR-9 agonists than DNA  
150 alone, playing an important role in host-pathogen interactions [23,24]. *M. leprae*

151 express a major cationic histone-like protein (Hlp), which is present in the cell  
152 envelope and in the bacterial nucleoid [25–28], and is also abundantly found in  
153 LL skin lesions [29]. We hypothesize that bacterial killing during MDT allows the  
154 release of mycobacterial DNA-Hlp complexes that could act as TLR-9 ligands  
155 inducing pro-inflammatory mediators during ENL. Moreover, since expressive  
156 tissue destruction occurs during ENL, we propose that human DNA, a DAMP  
157 that also binds TLR-9, contribute to the amplification of the inflammatory  
158 response as it has been shown in other inflammatory diseases [30,31]. In the  
159 present study, we measured the levels of TLR-9 expression and its ligands  
160 during ENL. The significantly higher expression levels of this receptor and its  
161 ligands found in ENL when compared to BL/LL patients and the capacity of a  
162 TLR-9 antagonist to inhibit significantly the secretion of pro-inflammatory  
163 cytokines by PBMCs from reactional patients in response to lysed *M. leprae*  
164 strongly suggest the involvement of this innate immune activation pathway in  
165 the physiopathology of ENL.

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176 **Materials and Methods**

177

178 *Patients and healthy controls*

179 The study population consisted of healthy controls from endemic  
180 laboratory staff volunteers and leprosy patients referred to the Souza Araújo  
181 Ambulatory (Reference Center for Leprosy Diagnosis and Treatment, Oswaldo  
182 Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) for the diagnosis and treatment of  
183 leprosy. Each patient was assessed clinically throughout treatment and detailed  
184 analyses of medical and dermatological examinations were routinely carried  
185 out. Bacteriological examinations of slit-skin smears were performed to  
186 determine BI. The patients were categorized according to the Ridley and  
187 Jopling's classification scale [1] into borderline lepromatous (BL) or  
188 lepromatous (LL). The diagnosis of leprosy Type II reaction (ENL) was primarily  
189 based on the acute occurrence of nodular skin lesions, accompanied by fever  
190 with or without peripheral nerve pain and/or nerve dysfunction. Patients  
191 received World Health Organization-recommended leprosy multidrug therapy  
192 (MDT). Blood was collected from BL/LL patients with no signs of reaction at the  
193 time of leprosy diagnosis and prior to MDT. ENL patients, most of them already  
194 under MDT treatment, were selected for blood collection at the time of reaction  
195 diagnosis and prior to treatment with thalidomide or corticoids. One punch  
196 biopsy (6 mm diameter) from skin lesions was obtained from BL/LL and ENL  
197 patients. The baseline characteristics of the individuals enrolled in the study are  
198 shown in Table 1.

199

200 *Ethical considerations*

201 This study was approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz  
202 Foundation. Informed written consent was obtained from all patients or their  
203 guardians and healthy controls prior to specimen collection.

204

205 *Preparation of recombinant M. leprae Hlp protein*

206 The recombinant protein from *M. leprae* was purified from *Escherichia*  
207 *coli* BL21 (DE3) harboring the plasmid pDEST17-Hlp. The culture was grown  
208 and induced as previously described [32] and the purification accordingly, with  
209 minor modifications. The increasing molar gradient for protein elution from the  
210 affinity column was 5-250 mM imidazol, concomitant with decreasing urea  
211 molarity of 8-4 M assuring solubility of the protein. Both the imidazol and urea  
212 were discarded from the eluted protein by means of dialysis with phosphate-  
213 buffered saline (PBS) and decreasing urea molarity. The recombinant purified  
214 Hlp was filtered on 0.22  $\mu$ m and assessed for possible lipopolysaccharide (LPS)  
215 contamination through treatment of PBMC and subsequent Enzyme-Linked  
216 Immunosorbent Assay (ELISA) of TNF- $\alpha$  induction using DuoSet kit (R&D  
217 Systems; Minneapolis, MN), according to the manufacturers' instructions.

218

219 *Determination of histones and DNA in serum*

220 Quantification of Hlp levels in sera of healthy individuals and patients was  
221 performed by a sandwich ELISA. Polystyrene microtiter plates (NUNC; Thermo  
222 Fisher Scientific; Waltham, MA) were coated with monoclonal antibody specific  
223 for the N-terminal region of the protein Hlp (anti-Hlp 5G9) [26] in PBS at a  
224 concentration of 1:500 (v/v) and incubated overnight at room temperature. The  
225 wells were then washed with PBS and blocked for 2 h with PBS-1% bovine

226 serum albumin (BSA) (w/v) at room temperature. After washing with PBS/0.05%  
227 Tween 20 (v/v) (PBS/T), different concentrations of rHlp (used for standard  
228 curve generation), and serum samples were added to the wells and incubated  
229 for 2 hours at 37<sup>0</sup>C. Then, the wells were rinsed with PBS/T and incubated with  
230 the monoclonal antibody that recognizes the C-terminal region of Hlp (anti-  
231 HBHA 3921E4) [33] at a concentration of 1:1000 (v/v) for 1 hour at 37<sup>0</sup>C. After  
232 washing with PBS/T, rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma; St.  
233 Louis, MO) was added on the wells at a concentration of 1:1000 (v/v) and the  
234 plate was incubated for an additional period of 50 minutes at 37<sup>0</sup>C. The  
235 peroxidase activity was revealed with hydrogen peroxide and  
236 tetramethylbenzidine (TMB). The reaction was stopped with HCl and the optical  
237 density was determined at 450 nm in a spectrophotometer using SOFTmax<sup>®</sup>  
238 PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation). Hlp  
239 concentration in the samples was estimated based on a standard curve.

240 The levels of human histones (H1, H2A, H2B, H3 and H4)-associated-  
241 DNA fragments in the serum samples were quantified by a photometric  
242 enzyme-immunoassay (Roche Life Science; Indianapolis, IN) and the analysis  
243 was performed in accordance with the manufacturer's instructions.

244 Magnetic bead-based technology (Invitrogen, Carlsbad, CA) was used to  
245 capture DNA in serum samples. To confirm the presence of *M. leprae* DNA  
246 fragments in serum samples, amplification of 16 specific VNTR polymorphic  
247 loci was performed using multiplex PCR and fragment length analysis (FLA) as  
248 previously described [34].

249

250 *Immunohistochemical and immunofluorescence staining*

251 Immunohistochemical and immunofluorescence staining of frozen skin  
252 tissue was performed as previously described [35,36]. TLR-9 expression was  
253 immune evidenced by specific rabbit polyclonal antibody (Abcam; San Diego,  
254 CA; 1:500 for immunohistochemistry and 1:50 for immunofluorescence). The  
255 images of immunohistochemistry analysis were captured in a Nikon Eclipse  
256 microscope via Infinity software (Lumenera Corporation, Canada). For  
257 immunofluorescence detection, the sections were also incubated with IgG anti-  
258 rabbit conjugated to Alexa Fluor 532<sup>®</sup> (1:300, Molecular Probes, OR). Nuclei  
259 were evidenced by DAPI staining (Sigma, St Louis, MO, USA). Slides were  
260 mounted with Permafluor (Thermo Scientific, CA, USA) and analyzed by an  
261 AxiObserver Z1 Colibri microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). Images were  
262 processed by AxioVision software (Zeiss). TLR-9 fluorescent signal mean gray  
263 value from 30 images was measured from six skin biopsies using open source  
264 ImageJ<sup>®</sup>1 software (Wayne Rasband, NIH, USA).

265

#### 266 *TLR-9 expression analysis in PBMC*

267 PBMCs from healthy individuals and leprosy patients were isolated from  
268 whole blood by gradient centrifugation using Ficoll-paque (GE Healthcare Life  
269 Sciences; Piscataway, NJ) and divided into  $4 \times 10^5$  cells per tube, containing  
270 each 20  $\mu$ L of PBS-1% fetal bovine serum (v/v). PBMCs were treated with Fc-  
271 receptor blocking (human TruStain FcX; Biolegend; San Diego, CA) for 10  
272 minutes and then incubated with surface monoclonal antibodies against CD19,  
273 CD14, and CD123 conjugated with the fluorochromes phycoerythrin (PE),  
274 allophycocyanin (APC), and peridinin chlorophyllprotein (PerCP) respectively,  
275 and their corresponding isotype controls (all from Biolegend) at a concentration

276 of 1:10 (v/v) in darkness for 30 minutes at 4<sup>0</sup>C. The cells populations were  
277 identified as CD19<sup>+</sup> B cells, CD14<sup>+</sup> monocytes, and CD14<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup> pDCs.  
278 PBMCs were then washed in PBS, fixed with 1% paraformaldehyde,  
279 permeabilized with FACS Permeabilizing Solution 2 (PERM2; BD Bioscience;  
280 San Jose, CA) and incubated with monoclonal antibody against TLR-9  
281 conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) and its corresponding isotype  
282 control (Abcam), at a concentration of 1:40 (v/v) in darkness for 30 minutes at  
283 4<sup>0</sup>C. The cells were then washed in PBS and assessed using FACS Accuri flow  
284 cytometry (BD Bioscience). Data were analyzed using BD Accuri C6 Software,  
285 version 1.0.

286

#### 287 *In vitro stimulation assays and ELISA*

288 PBMCs from healthy individuals and leprosy patients were isolated as  
289 described above. The cells were cultivated in oval-bottom 96-wells plates at a  
290 concentration of  $2 \times 10^5$  cells/well in 200  $\mu$ L of AIM-V medium (GIBCO;  
291 Carlsbad, CA), in humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> at 37<sup>0</sup>C. The  
292 compound E6446-02 (Eisai Co; Bunkyo-ku, Tokyo, Japan) was dissolved in  
293 non-pyrogenic water and used to treat the PBMCs before addition of stimuli at a  
294 final concentration of 0,2  $\mu$ M/well for 2 hours. Then, the following stimuli were  
295 used in the cells for additional period of 24 hours: *M. leprae* whole cell lysate (1  
296  $\mu$ g/mL), rHlp (0,25  $\mu$ M), CpG-C ODN 2395 (0,5  $\mu$ M; Invivogen; San Diego, Ca),  
297 LPS (100 ng/mL; Sigma) and PAM3CSK (30 ng/mL; Invivogen). When the cells  
298 were stimulated with CpG-Hlp complexes, the protein was pre-incubated with  
299 the oligonucleotide for 10 minutes at 37<sup>0</sup>C prior to the addition to the cells. After  
300 stimulation, the supernatants were harvested, centrifuged and stored at -70<sup>0</sup>C

301 for further mediators measurements. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in the  
302 supernatant of PBMC cultures were evaluated by ELISA using DuoSet kit (R&D  
303 Systems), according to the manufacturers' instructions.

304

#### 305 *Statistical analysis*

306 All data are analyzed using GraphPad Prism 5 Project (GraphPad  
307 Software Inc.). For the comparisons among the different group of individuals,  
308 the analyses were performed applying One-way analysis of variance test  
309 (ANOVA) and the Bonferroni pos-test. For the comparisons within the same  
310 group of individuals, it was applied the two-tailed Unpaired *t* test with confidence  
311 intervals of 95%. The value of  $p < 0.05$  was considered as statistically  
312 significant.

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326 **Results**

327

328 *Skin lesions and peripheral leukocytes of ENL patients express higher*  
329 *levels of TLR-9 than BL/LL patients*

330 To investigate whether TLR-9 activation is involved in the generation of  
331 the inflammatory cytokine storm observed during ENL, we evaluated the levels  
332 of expression of TLR-9 in skin tissues of ENL and LL patients. For this,  
333 immunoperoxidase technique using antibody against TLR-9 was performed in  
334 skin lesion biopsies from ENL (n=3) and LL (n=3) patients. Alternatively, TLR-9  
335 protein levels were also assessed by immunofluorescence staining.  
336 Immunohistochemistry analysis showed LL lesion characterized by a massive  
337 macrophages infiltration in dermis with faintly labeled cells for TLR-9 (fig. 1a).  
338 On the other hand, in ENL lesion it was possible to observe a more intense  
339 TLR-9 staining in perivascular inflammatory cells present in the dermal infiltrate  
340 (fig. 2b). Immunofluorescence method revealed a similar profile with weakly  
341 expression of TLR-9 in cells present in the LL skin specimen (fig. 1c and e) and  
342 marked labeled cells in the ENL lesion (fig. 1d and f). Quantification using  
343 image quantification revealed that the TLR-9 staining were about 3-fold higher  
344 in ENL than in LL lesions (fig. 1g).

345 Since ENL manifests as a systemic inflammation, we also analyzed the  
346 status of TLR-9 expression in peripheral leukocytes. In humans, TLR-9  
347 expression is associated to monocytes, pDCs and B cells among PBMCs [37–  
348 39]. TLR-9 expression levels were then measured in PBMC from ENL and  
349 BL/LL patients by flow cytometry to identify monocytes (CD14<sup>+</sup>), pDCs (CD14<sup>-</sup>  
350 CD123<sup>+</sup>) and B cells (CD19<sup>+</sup>) populations. Since TLR-9 expression is

351 constitutively expressed in these cells [40], its modulation was analyzed through  
352 the measure of the median fluorescence intensity (MFI) values. The *ex vivo*  
353 TLR-9 expression levels were higher in PBMCs from ENL (n=16) when  
354 compared to BL/LL (n=12) patients who showed expression levels similar to  
355 those observed in cells from healthy subjects (n=6) (fig. 2). Some demographic  
356 information of the groups compared in this analysis is shown in table 1. The MFI  
357 values in B cells from ENL were about 2-fold higher than in healthy individuals  
358 ( $22.1 \pm 3.5$  and  $9.1 \pm 1.6$ , respectively;  $p < 0.01$ ), and about 2-fold higher than  
359 BL/LL patients ( $22.1 \pm 3.5$  and  $12.7 \pm 2.1$ , respectively;  $p < 0.05$ ) (fig. 2a). The  
360 MFI values in monocytes from ENL were about 2-fold higher than in healthy  
361 individuals ( $31.6 \pm 5.7$  and  $17.4 \pm 3.6$ , respectively;  $p < 0.05$ ), and about 2-fold  
362 higher than BL/LL patients ( $31.6 \pm 5.7$  and  $19.0 \pm 2.3$ , respectively;  $p < 0.05$ )  
363 (fig. 2b). The MFI values in pDCs from ENL were about 2-fold higher than in  
364 healthy individuals ( $35.8 \pm 6.9$  and  $17.9 \pm 3.4$ , respectively;  $p < 0.05$ ), and about  
365 2-fold higher than BL/LL patients ( $35.8 \pm 6.9$  and  $19.1 \pm 3.0$ , respectively;  $p <$   
366  $0.05$ ) (fig. 2c).

367 Altogether these results indicate a higher expression of TLR-9 both  
368 locally in the skin lesions, as well as in circulating mononuclear cells in ENL  
369 when compared to nonreactive BL/LL patients. These data suggest an up-  
370 regulation of TLR-9 during ENL.

371

372 *Circulating DNA-histone complexes are higher in ENL patients.*

373 In a following step, we analyzed the presence of TLR-9 agonists in the  
374 circulation of BL/LL and ENL patients. Since DNA-histone complexes are known  
375 to be more potent TLR-9 agonists than DNA alone [23,24], a sandwich ELISA

376 was developed to specifically quantify Hlp, the mycobacterial histone-like  
377 protein, in serum samples. Some demographic information of the healthy  
378 individuals (n=10), BL/LL patients (n=9) and ENL group (n=6) compared in this  
379 analysis is shown in Table 1. As shown in fig. 3a, baseline signals of circulating  
380 Hlp (median=32.5 pg/ml, ranging from 11 to 88 pg/ml) were observed in healthy  
381 individuals. However, significantly higher levels of circulating Hlp was detected  
382 in both groups of patients when compared to healthy individuals (median value  
383 BL/LL=227.5 ± 40.0 pg/ml;  $p < 0.001$ ; median value ENL=445.3 ± 29.9 pg/ml;  $p$   
384  $< 0.001$ ). Of note, ENL patients showed about 2-fold higher levels of Hlp than  
385 BL/LL patients ( $p < 0.001$ ). Interesting, the two BL/LL patients with the highest  
386 Hlp concentration (421 and 397 pg/ml), developed ENL 3 and 2 months after  
387 MDT onset, respectively. Indeed, excluding from the BL/LL group those who  
388 developed ENL 2 to 6 months after beginning of MDT (5 out of the 9 patients),  
389 the median value of this group dropped to 171.8 pg/ml of Hlp, maintaining a  $p$   
390 value less than 0.001 when compared to ENL patients (suppl. fig. 1a). A new  
391 analysis was also performed comparing circulating Hlp concentration only in  
392 untreated patients. Treatment and subsequent bacterial killing is supposed to  
393 allow the release of bacterial components into the blood. In contrast to the  
394 BL/LL group, whose serum samples were obtained before the onset of MDT  
395 treatment, most of the ENL patients developed reaction during treatment (4 out  
396 of 6). As shown in supplementary fig. 2, higher levels of Hlp were already  
397 present in ENL patients (n=2) who developed reaction before the beginning of  
398 MDT (405,5 and 522 pg/ml). We also investigated the presence of *M. leprae*  
399 DNA by a semi-quantitative PCR targeting VNTRs (variable number *tandem*  
400 repeats) present in pseudogenes or intergenic segments of the *M. leprae*

401 genome. *M. leprae* DNA was detected 2 out of 5 BL/LL patients and in 3 out of  
402 5 ENL patients (data not shown).

403 Nucleic acid-sensing TLRs, apart from pathogen recognition and initiation  
404 of innate immunity in response to infection, are also capable of recognizing  
405 endogenous ligands, being implicated in diseases and sterile inflammation  
406 [30,31]. During ENL, an extensive tissue damage occurs [41] leading to the  
407 release of human DNA-histone complexes that can finally reach the blood. Our  
408 next step was, then, to investigate the potential concomitant input of host-  
409 derived DNA-histone complexes in ENL. Some demographic information of the  
410 healthy individuals (n=17), BL/LL patients (n=19) and ENL group (n=21)  
411 compared in this analysis is shown in table 1. As shown in fig. 3b, baseline  
412 signals of circulating human DNA-histone complexes were observed in healthy  
413 individuals (median O.D. = 0.06, ranging from 0 to 0.39). The median value of  
414 BL/LL (0.26 ± 0.12) was higher but not significantly different from the healthy  
415 group. However, significantly higher levels of circulating human DNA-histone  
416 complexes were detected in ENL patients when compared to healthy individuals  
417 and BL/LL patients (median value = 0.88 ± 0.14;  $p < 0,001$  and  $p < 0.05$ ,  
418 respectively). Interesting, among the BL/LL patients with the highest levels,  
419 most developed ENL between 2 to 6 months after MDT onset. Indeed,  
420 excluding from the BL/LL group those individuals (9 out of the 19 patients), the  
421 ENL patients showed about 4-fold higher levels of human DNA-histone  
422 complexes than BL/LL patients ( $p < 0,01$ ) (suppl. fig. 1b). Altogether, these  
423 results show that ENL patients display higher levels of human and  
424 mycobacterial DNA-histone complexes than BL/LL patients and healthy  
425 subjects that could potentially act as TLR-9 ligands during ENL.

426

427 *PBMCs from ENL patients secrete higher levels of pro-inflammatory*  
428 *cytokines in response to the CpG-Hlp complex*

429 The occurrence of ENL is associated with high levels of circulating TNF-  
430  $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  [9,42–44]. It has been also shown that PBMCs from ENL  
431 patients secrete higher levels of TNF- $\alpha$  in response to *M. leprae* sonicate  
432 [14,15]. In the previous sections of this study we were able to show that PBMCs  
433 from ENL express higher levels of TLR-9 and that ligands for this receptor were  
434 also found in higher concentrations in the circulation of these patients. In the  
435 next step of this study we evaluated the contribution of TLR-9 to the known  
436 higher responsiveness of ENL PBMCs to *M. leprae*. Some demographic  
437 information of the healthy individuals (n=13), BL/LL patients (n=17) and ENL  
438 group (n=20) compared in this analysis is shown in table 1. PBMCs were  
439 isolated and stimulated *in vitro* with suboptimal dose of CpG complexed to Hlp  
440 or *M. leprae* sonicate used as a positive control. It is important to mention that  
441 Hlp augments the immunostimulatory activity of CpG [45], which is recognized  
442 by the TLR-9 receptor. As the TLR-1/2 involvement in the leprosy evolution has  
443 been previously described [46], the cells were also treated with PAM3CSK, a  
444 TLR-1/2 ligand. After 24 hours of treatment TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  were  
445 quantified in the supernatant by ELISA. The results presented in supplementary  
446 fig. 3 confirmed that PBMCs from ENL patients produce significantly more pro-  
447 inflammatory mediators in response to *M. leprae* sonicate than PBMCs from  
448 nonreactive BL/LL patients and healthy individuals. TNF- $\alpha$  median values  
449 were significantly higher in stimulated cultures of ENL patients when compared  
450 to BL/LL ( $p < 0.001$ ) and healthy subjects ( $p < 0.001$ ) (Healthy=193  $\pm$  77.7

451 pg/ml, BL/LL=490 ± 103.5 pg/ml and ENL=1141 ± 150.6 pg/ml). A similar  
452 behavior was found when IL-6 was monitored. IL-6 median values were  
453 significantly higher in stimulated cultures of ENL patients when compared to  
454 BL/LL ( $p < 0.001$ ) and healthy subjects ( $p < 0.001$ ) (Healthy=198.5 ± 153.5  
455 pg/ml; BL/LL=581 ± 98.87 pg/ml and ENL=1108 ± 95.7 pg/ml). In the context of  
456 IL- $\beta$ , significantly higher median levels were observed when stimulated cultures  
457 of ENL were compared with those of healthy individuals ( $p < 0.03$ ), and a trend  
458 of significant difference was observed when compared to BL/LL patients ( $p =$   
459 0.059) (Healthy=37.5 ± 22.8 pg/ml; BL/LL=94.5 ± 34.1 pg/ml and ENL=180 ±  
460 62.7 pg/ml).

461 PBMCs stimulated with CpG or Hlp alone did not release detectable  
462 levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  the baseline levels observed in unstimulated  
463 cultures (fig. 4). In contrast, stimulation with the CpG-Hlp complex significantly  
464 enhanced the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the group of ENL patients in  
465 comparison to BL/LL patients (TNF- $\alpha$ ,  $p < 0.001$ ; IL-6,  $p < 0.001$ ) and healthy  
466 subjects (TNF- $\alpha$ ,  $p < 0.001$ ; IL-6,  $p < 0.01$ ). The median values for TNF- $\alpha$  were  
467 healthy=543 ± 165.1 pg/ml, BL/LL=448 ± 138.2 pg/ml and ENL=1613 ± 253.2  
468 pg/ml; and for IL-6 were healthy=360 ± 123.8 pg/ml, BL/LL=389 ± 66.73 pg/ml  
469 and ENL=846.3 ± 165.8 pg/ml. It was possible to observe a tendency of  
470 increased levels of IL-1 $\beta$  in PBMC culture supernatants from ENL patients  
471 stimulated with CpG-Hlp but this increase did not achieve a significant level (fig.  
472 4). When compared to paired unstimulated cultures, PAM3CSK also induced  
473 the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in PBMC cultures of all groups. However  
474 when PAM3CSK-stimulated cultures of healthy subjects, BL/LL patients and

475 ENL patients were compared, no significant difference in the levels of secreted  
476 TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  was observed, indicating the not involvement of TLR-1/2  
477 in the higher responsiveness of ENL PBMCs to *M. leprae*. These results  
478 suggest that the exacerbated inflammatory response of peripheral mononuclear  
479 cells to *M.leprae* components during ENL is due at least in part to an  
480 upregulation of TLR-9 expression in these cells.

481

482 *DNA-sensing receptors play a major role in M. leprae innate recognition*  
483 *during ENL*

484 To confirm the involvement of TLR-9 in the pathogenesis of ENL, we tested the  
485 capacity of a synthetic antagonist of nucleic acid-sensing TLRs (TLR-7 and  
486 TLR-9), named E6446, to inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines by  
487 PBMCs isolated from ENL patients in response to *M. leprae*. Cells were pre-  
488 treated with E6446 and then stimulated for 24 hours with *M. leprae* sonicate.  
489 Alternatively, cultures were stimulated with the CpG-Hlp complex and also with  
490 LPS included as controls for checking drug specificity. Measurements of pro-  
491 inflammatory mediators in the PBMC supernatants showed that E6446  
492 significantly diminished TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  production in response to *M.*  
493 *leprae* sonicate (fig. 5). The median values of TNF- $\alpha$  showed a decrease of  
494 about 68% (control=1151  $\pm$  150.6 pg/ml; + drug=372  $\pm$  83.4 pg/ml;  $p < 0.001$ )  
495 within a range between 54 and 78%; and 17 out of the 18 patients responded to  
496 the drug. IL-6 levels diminished by 38% (control=1107  $\pm$  99 pg/ml; + drug=681  $\pm$   
497 121.4 pg/ml;  $p < 0.01$ ) within a range between 20 and 54 % (13 out of 18  
498 patients responded). IL-1 $\beta$  of 42% (control=195  $\pm$  65.7; + drug=92  $\pm$  38.4;  $p <$   
499 0.05) within a range between 3 and 66% (10 out of 18 patients responded). As

500 expected, the TLR-9 antagonist showed no effect in the levels of cytokines  
501 secreted in response to a TLR-4 agonist (LPS), while the median values of  
502 TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  decreased about 83% ( $p < 0.01$ ), 53% ( $p < 0.01$ ), and  
503 68% ( $p < 0.001$ ), respectively, in response to CpG-Hlp (fig. 5). These data  
504 indicate a major involvement of TLR-9 in ML triggering pro-inflammatory  
505 cytokine secretion during ENL.

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525 **Discussion**

526

527         The critical role of Toll-like receptors (TLRs) as mediators of pathogen  
528 recognition by the innate immune system is now firmly established. Such  
529 recognition results in the initiation of an inflammatory immune response and  
530 subsequent instruction of the adaptive immune system, both of which are  
531 designed to rid the host of the invading. However, the excessive activation of  
532 TLRs has been implicated in the pathogenesis of several inflammatory and  
533 autoimmune diseases [47]. Nucleic acids are very highly immunostimulatory  
534 molecules, being among the preferable ligands recognized by TLRs [48].  
535 Among the nucleic acid sensing TLRs, TLR-9 has been implicated in the  
536 recognition of mycobacterial DNA [20]. In a previous study, it was demonstrated  
537 that 57% of patients undergoing MDT presented reaction, with 55% having ENL  
538 [2]. During MDT a massive bacterial killing allows the release of mycobacterial  
539 components including DNA, which can stimulate the innate immune system  
540 favoring the release of pro-inflammatory cytokines. The data presented in this  
541 study suggest a major role of TLR-9 activation in the generation of pro-  
542 inflammatory cytokines during ENL triggered by both bacterial and self ligands.

543         The higher levels of TLR-9 simultaneously found in the skin lesions as  
544 well as in circulating mononuclear cells of ENL, together with the higher  
545 detection levels of TLR-9 ligands in sera of ENL patients, points to an important  
546 role of this innate immunity pathway in the activation of inflammation that occurs  
547 during ENL. In the blood, B cells, monocytes and pDCs, the three major cell  
548 types known to express TLR-9 [37–39], were found with enriched expression  
549 of this receptor. Whether TLR-9 is upregulated in these cell types as a

550 consequence of ENL, or whether lepromatous leprosy patients displaying higher  
551 constitutive levels of this receptor are more susceptible to develop ENL is  
552 something that needs future investigation. We also confirmed that TLR-9 is  
553 functional, since higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  were produced by ENL  
554 PBMCs in response to complexes of oligodesoxynucleotides containing  
555 unmethylated CpG motifs with the mycobacterial histone-like protein Hlp. The  
556 higher expression of TLR-9 in the skin lesions could be related in part to  
557 monocytes, found in large abundance in the inflammatory infiltrate [49], with  
558 potentially some contribution of pDCs and B cells which might also migrate to  
559 the lesions [49–52]. Actually pDCs and their activation by self nucleic acids  
560 have been implicated in several skin inflammatory diseases such as cutaneous  
561 lupus [53] and psoriasis [54]. Finally, neutrophils, frequently found in ENL  
562 lesions [55] and known to express high levels of TLR-9 [56,57], might also be  
563 contributing to the higher levels of TLR-9 seen in ENL lesions.

564 ML DNA probably complexed to Hlp likely constitutes a major trigger of  
565 endosomal TLR-9 activation during ENL since higher levels of Hlp and a higher  
566 detection rate of ML DNA were found in ENL patient's serum samples as  
567 compared to nonreactive BL/LL patients. Both MDT and ENL itself, which has  
568 been described to enhance bacterial killing [58], might be responsible for the  
569 release of bacterial components in the infected tissues that ultimately will reach  
570 the circulation. The capacity of oligonucleotide CpG-Hlp complexes to activate  
571 the TLR-9 pathway in ENL was confirmed by *in vitro* assays. Our results  
572 showed hyperresponsiveness of ENL PBMCs upon stimulation of the cells with  
573 sub-optimal concentrations of CpG-Hlp complexes. ENL PBMCs secreted  
574 higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , known to be prevalent in ENL serum

575 [9,42,43] correlating with the higher expression of TLR-9 detected in these cells.  
576 Among PBMCs, besides monocytes, pDCs are also able to produce these  
577 cytokines in response to TLR-9 ligands [59] and can be contributing to the  
578 inflammation state of these patients. Of note, this higher production of pro-  
579 inflammatory cytokines by PBMCs derived from ENL patients was not observed  
580 when a TLR-2 ligand was used as stimulant, suggesting that although TLR-2  
581 has been described as important recognition pathway for the leprosy bacillus  
582 [46] and potentially involved in neutrophil recruitment to ENL lesions [60], is not  
583 upregulated during ENL, at least in the context of circulating mononuclear cells.  
584 Thus, the hyperresponsiveness of ENL PBMCs described in previous studies  
585 [14,15] and herein confirmed can at least be partially attributed to the higher  
586 level of TLR-9 expression in these cells.

587         A second physiological TLR-9 ligand found in ENL sera was endogenous  
588 DNA-histone complexes probably derived from the extensive tissue damage  
589 observed in these episodes [41]. It is well established the major role that self  
590 nucleic acids, when complexed to basic proteins or to autoantibodies, play in  
591 the pathogenesis of several inflammatory and autoimmune diseases by  
592 triggering TLR-7/TLR-9 with subsequent pro-inflammatory cytokine production  
593 [54,61]. It has been recently shown that SLE neutrophils die by NETosis and  
594 that SLE NETs contain large amounts of DNA and basic proteins that can  
595 activate pDCs to produce high levels of IFN- $\alpha$  in a DNA and TLR-9 dependent  
596 manner [62]. Due to its involvement in ENL, neutrophils are among the cell  
597 candidates in ENL lesions that could act as major sources of these complexes.  
598 Further investigation is necessary to confirm whether this is also the case in  
599 ENL.

600 It is also tentative to propose that endogenous nucleic acids-containing  
601 immune complexes (IC) could be acting as a third category of TLR-9 ligands in  
602 ENL. The strong humoral immune response seen in BL/LL patients together  
603 with concomitant generation of autoantibodies described by several studies  
604 [63–68] and the detection of circulating IC [5] reinforce this possibility.

605 The magnitude of the nucleic acid sensing innate pathways in ENL  
606 pathogenesis was confirmed by the capacity of E6446, a bifunctional TLR-  
607 7/TLR-9 inhibitor, to block in an expressive way the production of TNF- $\alpha$ , IL-6  
608 and IL-1 $\beta$  by PBMCs from ENL patients in response to whole ML sonicate.  
609 Since E6446 also blocks the signaling by TLR-7, we cannot rule out the  
610 participation of this TLR in ENL. The activation of TLR-7 by RNA-containing  
611 immune complexes in conjunction with TLR-9 has been shown to play a critical  
612 role in SLE as well as other inflammatory and autoimmune states including  
613 cutaneous skin diseases [54]. The detection of anti-nuclear autoantibodies in  
614 multibacillary leprosy patients [65,69,70] reinforces this idea. So, the potential  
615 involvement of TLR-7 in ENL deserves to be explored in future studies. .

616 The capacity of TLR-7/TLR-9 antagonist to decrease the production of  
617 TNF- $\alpha$  by PBMCs from ENL patients in response of ML components resembles  
618 that seen with thalidomide, the drug of choice for the therapy of ENL [71,72].  
619 TNF- $\alpha$  is a key cytokine mediating the clinical manifestations and tissue injury in  
620 ENL, and thalidomide, a drug that specifically inhibits TNF- $\alpha$  production by  
621 monocytes *in vitro* [71,72], has a prompt and dramatic effect, decreasing  
622 inflammation and enhancing patient well-being. However, due to its teratogenic  
623 effects, thalidomide has a restricted use to males.

624 In conclusion, our findings strongly suggest a fundamental importance of  
625 ML nucleic acids and endogenous DNA in triggering inflammatory mediators  
626 during ENL. We propose that bacterial DNA-histone complexes would play a  
627 major role at the onset and early stages of ENL, followed by an amplification  
628 phase of the inflammation triggered by endogenous nucleic acids-protein  
629 complexes that would predominate in chronic ENL. Interestingly, ENL displays  
630 several similarities with SLE pathogenesis. In SLE, Type I IFNs are central to  
631 disease pathogenesis and pDCs activated by nucleic acid-containing immune  
632 complexes are the major source of these cytokines. Once activated by self  
633 DNA/chromatin or small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP)-containing  
634 immune complex, pDCs migrate from the blood into inflamed tissues including  
635 the skin and kidney. Of note, it has been recently shown that the TLR-7/TLR-9  
636 activation pathway is resistant to corticosteroid therapy in pDCs, explaining the  
637 requirement of high doses of the drug for the management of chronic SLE.  
638 Furthermore, an associating of corticoid with TLR-7/TLR-9 inhibitors renders a  
639 significant amelioration in experimental mouse models of SLE [53].  
640 Interestingly, patients with chronic and severe forms of ENL do not respond  
641 satisfactorily to corticosteroid treatment, thalidomide being particularly very  
642 effective in these cases [4]. Thalidomide has also been successfully used for  
643 control of SLE and several other inflammatory diseases [73], suggesting that  
644 the activation of endosomal nucleic acid TLRs is sensitive to this drug. This  
645 opens up the potential to use inhibitors of nucleic acids TLR signaling as novel  
646 alternative therapeutic agents for the treatment of ENL. Indeed, the  
647 development of ambiguous TLR-7/TLR-9 inhibitors for use as effective drugs for  
648 the treatment of several inflammatory diseases has become an active field in

649 the last decade. Currently several drugs are under clinical phase trials for  
650 treatment of diseases such as SLE, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis,  
651 psoriasis, and colitis [74]. Additionally, the suppressive action of these drugs,  
652 particularly E4664, has been shown previously in cerebral malaria models [75],  
653 where the major role of nucleosomes (histones+DNA) recognition with the  
654 subsequent production of inflammatory mediators has been demonstrated  
655 [23,24]. These drugs can complement the effects of corticoids emerging as a  
656 potential alternative for an effective treatment of ENL leading to nerve injury and  
657 deformities prevention in leprosy.

658

659

660

661

662

663

664

665

666

667

668

669

670

671

672

673

674 **References**

675

676 1. Ridley DS, Jopling WH: Classification of leprosy according to immunity. A  
677 five-group system. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc* 1966  
678 Sep;34:255–273.

679 2. Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN: Reactional states  
680 in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev*  
681 *Inst Med Trop São Paulo* 1998 Dec;40:363–370.

682 3. Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT: Recognizing and managing  
683 the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol* 2014  
684 Oct;71:795–803.

685 4. Sheskin J: The treatment of lepra reaction in lepromatous leprosy. Fifteen  
686 years' experience with thalidomide. *Int J Dermatol* 1980 Aug;19:318–322.

687 5. Ridley DS: Reactions in leprosy. *Lepr Rev* 1969 Apr;40:77–81.

688 6. Sehgal VN: Reactions in leprosy. Clinical aspects. *Int J Dermatol* 1987  
689 Jun;26:278–285.

690 7. Yao Y-M, Luan Y-Y, Zhang Q-H, Sheng Z-Y: Pathophysiological aspects of  
691 sepsis: an overview. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2015;1237:5–15.

692 8. Myers JS: Proinflammatory cytokines and sickness behavior: implications  
693 for depression and cancer-related symptoms. *Oncol Nurs Forum* 2008  
694 Sep;35:802–807.

- 695 9. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA: Serum levels of tumour necrosis  
696 factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. Clin  
697 Exp Immunol 1991 Apr;84:103–108.
- 698 10. Parida SK, Grau GE, Zaheer SA, Mukherjee R: Serum tumor necrosis  
699 factor and interleukin 1 in leprosy and during lepra reactions. Clin Immunol  
700 Immunopathol 1992 Apr;63:23–27.
- 701 11. Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et  
702 al.: Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-  
703 gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). Scand J Immunol  
704 1999 Nov;50:541–549.
- 705 12. Moraes MO, Sarno EN, Teles RM, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, et  
706 al.: Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin  
707 and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. J Invest  
708 Dermatol 2000 Dec;115:935–941.
- 709 13. Teles RMB, Moraes MO, Geraldo NTR, Salles AM, Sarno EN, Sampaio  
710 EP: Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of  
711 leprosy patients. Arch Dermatol Res 2002 Nov;294:355–362.
- 712 14. Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL: Tumor necrosis  
713 factor production in patients with leprosy. Infect Immun 1992 Apr;60:1441–  
714 1446.
- 715 15. Santos DO, Suffys PN, Bonifácio K, Marques MA, Sarno EN: In vitro tumor  
716 necrosis factor production by mononuclear cells from lepromatous leprosy

- 717 patients and from patients with erythema nodosum leprosum. Clin Immunol  
718 Immunopathol 1993 Jun;67:199–203.
- 719 16. Lockwood DNJ, Colston MJ, Khanolkar-Young SR: The detection of  
720 *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve  
721 from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. Am J Trop Med Hyg  
722 2002 Apr;66:409–415.
- 723 17. Bahia El Idrissi N, Das PK, Fluiter K, Rosa PS, Vreijling J, Troost D, et al.:  
724 *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation:  
725 identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator.  
726 Acta Neuropathol (Berl) 2015 May;129:653–667.
- 727 18. Montoya D, Modlin RL: Learning from leprosy: insight into the human  
728 innate immune response. Adv Immunol 2010;105:1–24.
- 729 19. Chen J-Q, Szodoray P, Zeher M: Toll-Like Receptor Pathways in  
730 Autoimmune Diseases. Clin Rev Allergy Immunol 2015 Feb 17; DOI:  
731 10.1007/s12016-015-8473-z
- 732 20. Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A: TLR-9  
733 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal  
734 resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med 2005 Dec  
735 19;202:1715–1724.
- 736 21. Pompei L, Jang S, Zamlynny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP, et  
737 al.: Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in

- 738 response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. J  
739 Immunol Baltim Md 1950 2007 Apr 15;178:5192–5199.
- 740 22. Krieg AM: CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu  
741 Rev Immunol 2002;20:709–760.
- 742 23. Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC: Protein-DNA complex is the  
743 exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and  
744 triggers innate immune responses. J Immunol Baltim Md 1950 2010 Apr  
745 15;184:4338–4348.
- 746 24. Gowda NM, Wu X, Gowda DC: The nucleosome (histone-DNA complex) is  
747 the TLR-9-specific immunostimulatory component of *Plasmodium*  
748 *falciparum* that activates DCs. PloS One 2011;6:e20398.
- 749 25. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A: A 21-kDa  
750 surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2  
751 and mediates Schwann cell invasion. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 Aug  
752 17;96:9857–9862.
- 753 26. De Melo Marques MA, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN,  
754 Brennan PJ, et al.: Bacterial and host-derived cationic proteins bind  
755 alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human  
756 Schwann cells. Microbes Infect Inst Pasteur 2000 Oct;2:1407–1417.
- 757 27. Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, et al.:  
758 Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in

- 759 mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. J  
760 Biol Chem 2004 Sep 17;279:39798–39806.
- 761 28. Silva CAM, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet  
762 F, et al.: Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial  
763 cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by  
764 surface proteome analysis. Infect Immun 2013 Jul;81:2645–2659.
- 765 29. Soares de Lima C, Zulianello L, Marques MA de M, Kim H, Portugal MI,  
766 Antunes SL, et al.: Mapping the laminin-binding and adhesive domain of  
767 the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*.  
768 Microbes Infect Inst Pasteur 2005 Jul;7:1097–1109.
- 769 30. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al.:  
770 Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-  
771 like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. J Exp Med  
772 2005 Oct 17;202:1131–1139.
- 773 31. Hsiao H-B, Chou A-H, Lin S-I, Chen I-H, Lien S-P, Liu C-C, et al.: Toll-like  
774 receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to  
775 the release of danger-associated molecular patterns. J Virol 2014  
776 Oct;88:11658–11670.
- 777 32. Lefrançois LH, Pujol C, Bodier CC, Teixeira-Gomez AP, Drobecq H, Rosso  
778 M-L, et al.: Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp.  
779 *paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts  
780 with sera from patients with Crohn's disease. Microbes Infect Inst Pasteur  
781 2011 Jun;13:585–594.

- 782 33. Biet F, Angela de Melo Marques M, Grayon M, Xavier da Silveira EK,  
783 Brennan PJ, Drobecq H, et al.: *Mycobacterium smegmatis* produces an  
784 HBHA homologue which is not involved in epithelial adherence. *Microbes*  
785 *Infect Inst Pasteur* 2007 Feb;9:175–182.
- 786 34. Fontes ANB, Sakamuri RM, Baptista IMFD, Ura S, Moraes MO, Martínez  
787 AN, et al.: Genetic diversity of *Mycobacterium leprae* isolates from  
788 Brazilian leprosy patients. *Lepr Rev* 2009 Sep;80:302–315.
- 789 35. De Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa  
790 Nery JA, Sampaio EP, et al.: The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in  
791 lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 2011  
792 Aug;165:251–263.
- 793 36. Andrade PR, Amadeu TP, Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN: CD123, the  
794 plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type  
795 1 reaction. *Br J Dermatol* 2015 Jan;172:268–271.
- 796 37. Poth JM, Coch C, Busch N, Boehm O, Schlee M, Janke M, et al.:  
797 Monocyte-mediated inhibition of TLR-9-dependent IFN- $\alpha$  induction in  
798 plasmacytoid dendritic cells questions bacterial DNA as the active  
799 ingredient of bacterial lysates. *J Immunol Baltim Md* 1950 2010 Dec  
800 15;185:7367–7373.
- 801 38. Cepika A-M, Soldo Jureša D, Morović Vergles J, Malenica B, Santak M,  
802 Kapitanović S, et al.: Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels  
803 in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine  
804 treatment. *Cell Immunol* 2012 Apr;276:196–203.

- 805 39. Huang Y-W, Hsu C-K, Lin S-C, Wei S-C, Hu J-T, Chang H-Y, et al.:  
806 Reduced toll-like receptor 9 expression on peripheral CD14+ monocytes of  
807 chronic hepatitis B patients and its restoration by effective therapy. *Antivir*  
808 *Ther* 2014;19:637–643.
- 809 40. Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, et al.:  
810 Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of  
811 human cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001 Oct 1;167:3555–3558.
- 812 41. Murphy GF, Sanchez NP, Flynn TC, Sanchez JL, Mihm MC, Soter NA:  
813 Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous  
814 microvascular alterations. *J Am Acad Dermatol* 1986 Jan;14:59–69.
- 815 42. Iyer A, Hatta M, Usman R, Luiten S, Oskam L, Faber W, et al.: Serum  
816 levels of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, soluble  
817 interleukin-6R and soluble cell activation markers for monitoring response  
818 to treatment of leprosy reactions. *Clin Exp Immunol* 2007 Nov;150:210–  
819 216.
- 820 43. Stefani MM, Guerra JG, Sousa ALM, Costa MB, Oliveira MLW, Martelli CT,  
821 et al.: Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a  
822 preliminary report. *BMC Infect Dis* 2009;9:75.
- 823 44. Abdallah M, Attia EAS, Saad AA, El-Khateeb EA, Lotfi RA, Abdallah M, et  
824 al.: Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy;  
825 correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-reg cells. *Exp*  
826 *Dermatol* 2014 Oct;23:742–747.

- 827 45. Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T,  
828 et al.: DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1  
829 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in  
830 mice. J Immunol Baltim Md 1950 2005 Jul 1;175:441–449.
- 831 46. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al.:  
832 Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy.  
833 Nat Med 2003 May;9:525–532.
- 834 47. Barrat FJ, Coffman RL: Development of TLR inhibitors for the treatment of  
835 autoimmune diseases. Immunol Rev 2008 Jun;223:271–283.
- 836 48. Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol 2004  
837 Jul;4:499–511.
- 838 49. Massone C, Belachew WA, Schettini A: Histopathology of the lepromatous  
839 skin biopsy. Clin Dermatol 2015 Feb;33:38–45.
- 840 50. Sehgal VN, Gautam RK, Sharma VK: Immunoprofile of reactions in  
841 leprosy. Int J Dermatol 1986 May;25:240–244.
- 842 51. Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, et al.: The effect  
843 of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional  
844 lepromatous leprosy patients. Immunol Lett 2000 Dec 1;75:69–76.
- 845 52. Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini  
846 APM, et al.: T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen  
847 disease: a new insight into pathogenesis? Am J Dermatopathol 2010  
848 May;32:251–256.

- 849 53. Guiducci C, Gong M, Xu Z, Gill M, Chaussabel D, Meeker T, et al.: TLR  
850 recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus.  
851 Nature 2010 Jun 17;465:937–941.
- 852 54. Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ: Signalling pathways leading to IFN-  
853 alpha production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use  
854 of agonists or antagonists of TLR7 and TLR-9 in clinical indications. J  
855 Intern Med 2009 Jan;265:43–57.
- 856 55. Kahawita IP, Lockwood DNJ: Towards understanding the pathology of  
857 erythema nodosum leprosum. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008  
858 Apr;102:329–337.
- 859 56. Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini  
860 J, et al.: Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent  
861 pathway. Eur J Immunol 2003 Nov;33:3164–3174.
- 862 57. József L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG: Activation of TLR-9 induces IL-8  
863 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. J Immunol  
864 Baltim Md 1950 2006 Jan 15;176:1195–1202.
- 865 58. Vieira LM, Sampaio EP, Nery JA, Duppre NC, Albuquerque EC,  
866 Scheinberg MA, et al.: Immunological status of ENL (erythema nodosum  
867 leprosum) patients: its relationship to bacterial load and levels of circulating  
868 IL-2R. Rev Inst Med Trop São Paulo 1996 Apr;38:103–111.
- 869 59. McKenna K, Beignon A-S, Bhardwaj N: Plasmacytoid Dendritic Cells:  
870 Linking Innate and Adaptive Immunity. J Virol 2005 Jan 1;79:17–27.

- 871 60. Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, et al.:  
872 Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy.  
873 *J Infect Dis* 2010 Feb 15;201:558–569.
- 874 61. Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A: Toll-  
875 like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease.  
876 *Immunol Rev* 2005 Apr;204:27–42.
- 877 62. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al.:  
878 Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric  
879 systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011 Mar 9;3:73ra20.
- 880 63. Mathew JM, Muthukkaruppan V: Class-specific immunoglobulins and  
881 antibodies to mycobacterial sonicates and autoantigens in leprosy patients  
882 and contacts. *Microb Pathog* 1993 Nov;15:367–376.
- 883 64. Drowart A, Huygen K, Launois P, Jann E, Nyabenda J, van Vooren JP: IgG  
884 humoral response against the antigen 85 complex homologues in leprosy.  
885 *Scand J Immunol* 1994 Dec;40:643–647.
- 886 65. Ochieng NA, Bwire MS, Orege PA, Nyawalo JO, K’Omollo JW:  
887 Autoantibodies in lepromatous leprosy. *Afr J Health Sci* 1994 May;1:79–83.
- 888 66. Wheeler PR, Raynes JG, McAdam KP: Autoantibodies to cerebroside  
889 sulphate (sulphatide) in leprosy. *Clin Exp Immunol* 1994 Oct;98:145–150.
- 890 67. Pradhan V, Badakere SS, Shankar Kumar U: Increased incidence of  
891 cytoplasmic ANCA (cANCA) and other autoantibodies in leprosy patients  
892 from western India. *Lepr Rev* 2004 Mar;75:50–56.

- 893 68. Baeza I, Wong-Baeza C, Valerdi E, Serafin-Lopez J, Ibáñez M, Estrada-  
894 Parra S, et al.: Lepromatous leprosy patients produce antibodies that  
895 recognise non-bilayer lipid arrangements containing mycolic acids. Mem  
896 Inst Oswaldo Cruz 2012 Dec;107 Suppl 1:95–103.
- 897 69. Lamas-Robles C, González-Mendoza A, Pérez-Suárez G, Mejía-Arreguín  
898 S: Use of human skin to demonstrate antinuclear antibodies in lepromatous  
899 leprosy patients. Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc 1985  
900 Sep;53:373–377.
- 901 70. Garcia-De La Torre I: Autoimmune phenomena in leprosy, particularly  
902 antinuclear antibodies and rheumatoid factor. J Rheumatol 1993  
903 May;20:900–903.
- 904 71. Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G: Thalidomide  
905 selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated  
906 human monocytes. J Exp Med 1991 Mar 1;173:699–703.
- 907 72. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G:  
908 Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by  
909 enhancing mRNA degradation. J Exp Med 1993 Jun 1;177:1675–1680.
- 910 73. Ordi-Ros J, Cosiglio FJ: [Current therapeutic indications of thalidomide and  
911 lenalidomide]. Med Clínica 2014 Apr 22;142:360–364.
- 912 74. Gosu V, Basith S, Kwon O-P, Choi S: Therapeutic applications of nucleic  
913 acids and their analogues in Toll-like receptor signaling. Mol Basel Switz  
914 2012;17:13503–13529.

915 75. Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, et  
916 al.: Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors  
917 prevents experimental cerebral malaria. Proc Natl Acad Sci U S A 2011  
918 Mar 1;108:3689–3694.

919

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930

931

932

933

934

935

936

937

938

939 **Table and figure legends**

940

941 **Table 1.** Demographic characteristics and epidemiological data of individuals  
942 included in the study.

943

944 **Fig. 1. TLR-9 is up-regulated in ENL skin lesions.** Representative skin  
945 lesions upper dermis images of immunohistochemistry (**a** and **b**) and  
946 immunofluorescence (c-f) of nonreactional LL (**a**, **c** and **e**) and ENL (**b**, **d** and **f**)  
947 patients evidencing TLR-9 in red. Inflammatory infiltrates observed during ENL  
948 (black and white asterisks) present high expression of TLR-9. **g** TLR-9 signal  
949 intensity from 30 fields, captured from three LL and three ENL patients is  
950 shown. Nuclei are evidenced in blue. Scales bar means 100  $\mu$ m in all figures.

951

952 **Fig. 2. Peripheral mononuclear cells of ENL express higher levels of TLR-**  
953 **9.** PBMCs were isolated and TLR-9 expression levels were quantified by flow  
954 cytometry in B cells (CD19<sup>+</sup>), monocytes (CD14<sup>+</sup>) and plasmacytoids dendritic  
955 cells (CD14<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>). M.F.I., Median Fluorescence Intensity. Box plots show  
956 median, interquartile range, sample minimum, and maximum. Dots represent  
957 individual donors. Green dot shows outlier. BL, borderline lepromatous; LL,  
958 lepromatous leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p <$   
959  $0,01$ ).

960

961 **Fig. 3. Circulating pathogen- and host-derived DNA-histone complexes**  
962 **levels are higher in ENL patients.** Serum samples from nonreactional BL/LL  
963 patients and patients undergoing ENL were analyzed for the levels of (**a**) *M.*

964 *leprae* histone-like protein (Hlp), and (b) human DNA-histone complexes.  
965 Serum samples from healthy volunteers were included as controls.  
966 Quantification of circulating Hlp was performed by a specific sandwich Elisa.  
967 Purified rHlp from *M. leprae* was used to build the standard curve. Human  
968 histone-DNA complexes levels were assessed using a commercial ELISA kit.  
969 Box plots show median, interquartile range, sample minimum, and maximum.  
970 Dots represent individual donors. BL, borderline lepromatous; LL, lepromatous  
971 leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

972

973 **Fig. 4. PBMCs from ENL are more responsive to CpG-Hlp than BL/LL cells**  
974 **producing higher levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ .** PBMCs were stimulated for  
975 24 hours with CpG, Hlp, CpG-Hlp or PAM3CSK and the cytokine levels were  
976 analyzed by commercial sandwich ELISA in the culture supernatants. UT,  
977 untreated; BL, borderline lepromatous; LL, lepromatous leprosy; ENL, erythema  
978 nodosum leprosum. Box plots show median, interquartile range, sample  
979 minimum, and maximum. Dots represent individual donors. Green dots show  
980 outliers (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

981

982 **Fig. 5. A TLR-9 antagonist inhibits *M. leprae*-induced pro-inflammatory**  
983 **cytokines secretion by peripheral mononuclear cells of ENL patients.**  
984 PBMCs were pretreated with E6446 followed by stimulation for 24 hours with *M.*  
985 *leprae* sonicate. The cytokines levels in the culture supernatants were analyzed  
986 by commercial ELISA. CpG-Hlp and LPS were used as positive and negative  
987 controls, respectively. UT., untreated; ML., *M. leprae* sonicate. Box plots show  
988 median, interquartile range, sample minimum, and maximum. Dots represent

989 individual donors. Green dots show outliers (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p <$   
990  $0,001$ ).

991

992 **Suppl. fig. 1. Circulating pathogen- and host-derived DNA-histone**

993 **complexes levels are higher in ENL patients.** Serum samples from

994 nonreactive BL/LL patients and patients undergoing ENL were analyzed for

995 the levels of (a) *M. leprae* histone-like protein (Hlp), and (b) human DNA-

996 histone complexes. Serum samples from healthy volunteers were included as

997 controls. Quantification of circulating Hlp was performed by a specific sandwich

998 Elisa. Purified rHlp from *M. leprae* was used to build the standard curve. Human

999 histone-DNA complexes levels were assessed using a commercial ELISA kit.

1000 Box plots show median, interquartile range, sample minimum, and maximum.

1001 Dots represent individual donors. BL, borderline lepromatous; LL, lepromatous

1002 leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

1003

1004 **Suppl. fig. 2. Circulating levels of Hlp in untreated BL/LL and ENL**

1005 **patients.** Serum samples from healthy volunteers were included as controls.

1006 Quantification of circulating Hlp was performed by a specific sandwich ELISA.

1007 Purified rHlp from *M. leprae* was used to build the standard curve. Box plots

1008 show median, interquartile range, sample minimum, and maximum. Dots

1009 represent individual donors. BL, borderline lepromatous; LL, lepromatous

1010 leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

1011

1012 **Suppl. fig. 3. Secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  by PBMCs from ENL and**

1013 **nonreactive multibacillary leprosy patients (BL/LL) in response to *M.***

1014 ***leprae sonicate***. PBMCs were stimulated for 24 hours with *M. leprae sonicate*  
1015 and the cytokine levels were analyzed by commercial sandwich ELISA in the  
1016 culture supernatants. UT, untreated; BL, borderline lepromatous; LL,  
1017 lepromatous leprosy; ENL, erythema nodosum leprosum. Box plots show  
1018 median, interquartile range, sample minimum, and maximum. Dots represent  
1019 individual donors. Green dots show outliers (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p <$   
1020  $0,001$ ).

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036  
1037  
1038  
1039  
1040  
1041  
1042  
1043  
1044  
1045  
1046  
1047  
1048  
1049  
1050  
1051  
1052  
1053  
1054  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1060

**Table 1:**

Group	Sample	Assay	Individuals (n)	Male	Female	Age (median)	Age (min-max)	BI (median)	BL (n)	LL (n)
Healthy	Serum	Hlp quantification	10	6	4	31,5	23-51	-	-	-
		Histone-DNA complex quantification	17	9	8	30	23-48	-	-	-
	PBMC	TLR-9 M.F.I.	6	3	3	28,5	23-56	-	-	-
	PBMC supernatant	Cytokines quantification	13	7	6	29	20-56	-	-	-
BL/LL	Serum	TLR-9 abundance	-	-	-	-	-	-	-	-
		Hlp quantification	9	8	1	37	26-69	5	2	7
	PBMC	Histone-DNA complex quantification	19	13	6	37	26-72	4,75	5	13
	PBMC supernatant	TLR-9 M.F.I.	12	8	4	38	26-72	4,75	3	9
ENL	Serum	Cytokines quantification	17	12	5	45	26-72	4,75	4	13
		TLR-9 abundance	3	3	0	49	32-54	4,5	0	3
	PBMC	Hlp quantification	6	5	1	28,5	22-55	5	0	6
	PBMC supernatant	Histone-DNA complex quantification	21	16	5	34	21-60	4,25	3	18
ENL	PBMC	TLR-9 M.F.I.	16	11	5	40	22-61	4,25	2	14
	PBMC supernatant	Cytokines quantification	20	15	5	35	21-83	4,5	3	17
	Skin lesions	TLR-9 abundance	3	2	1	33	22-62	3,75	0	3

1061 **Figure 1**

1062

1063

1064

1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075

1076

1077

1078

1079

1080

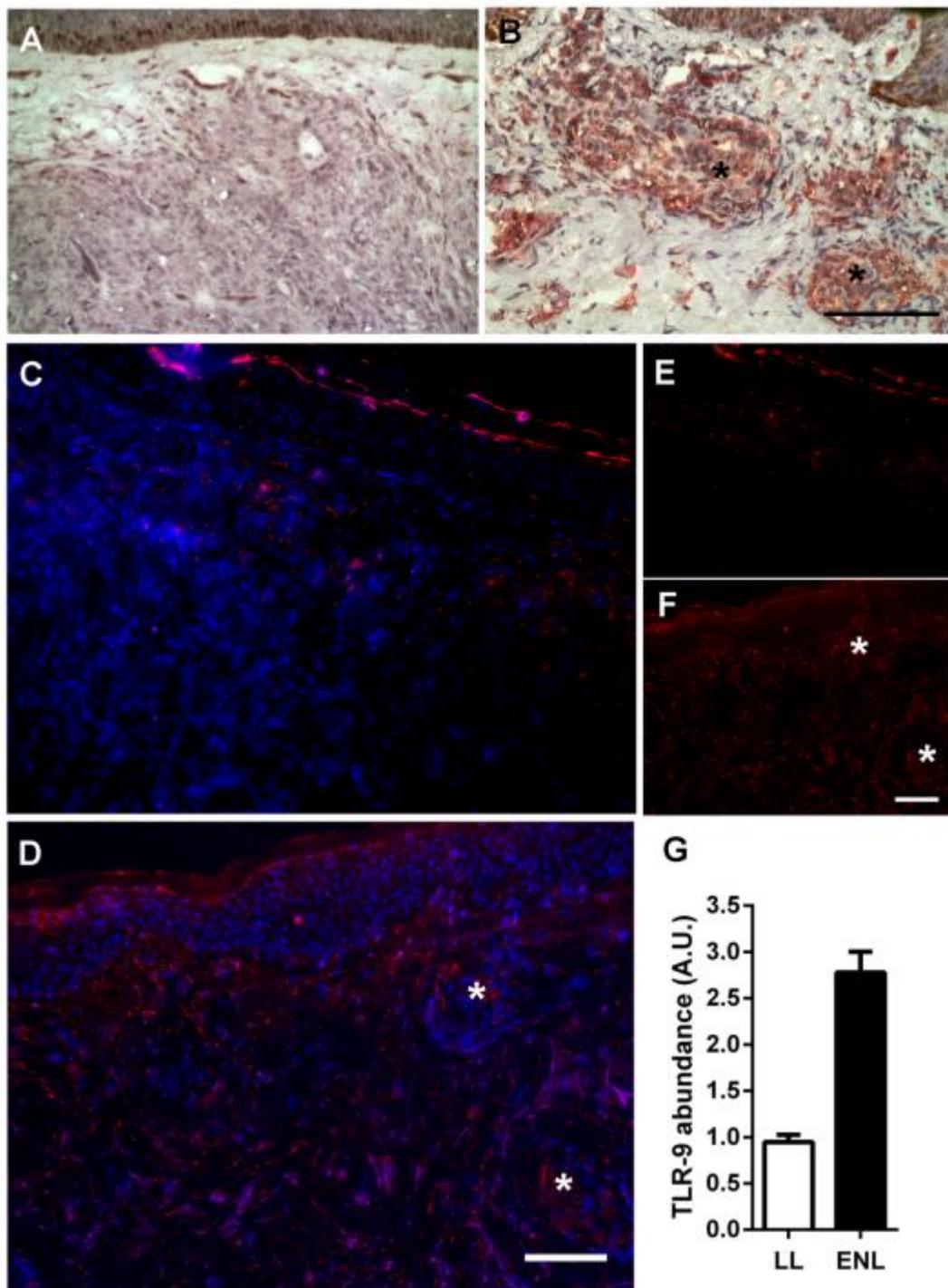
1081

1082

1083

1084

1085



1086 **Figure 2**

1087

1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

1095

1096

1097

1098

1099

1100

1101

1102

1103

1104

1105

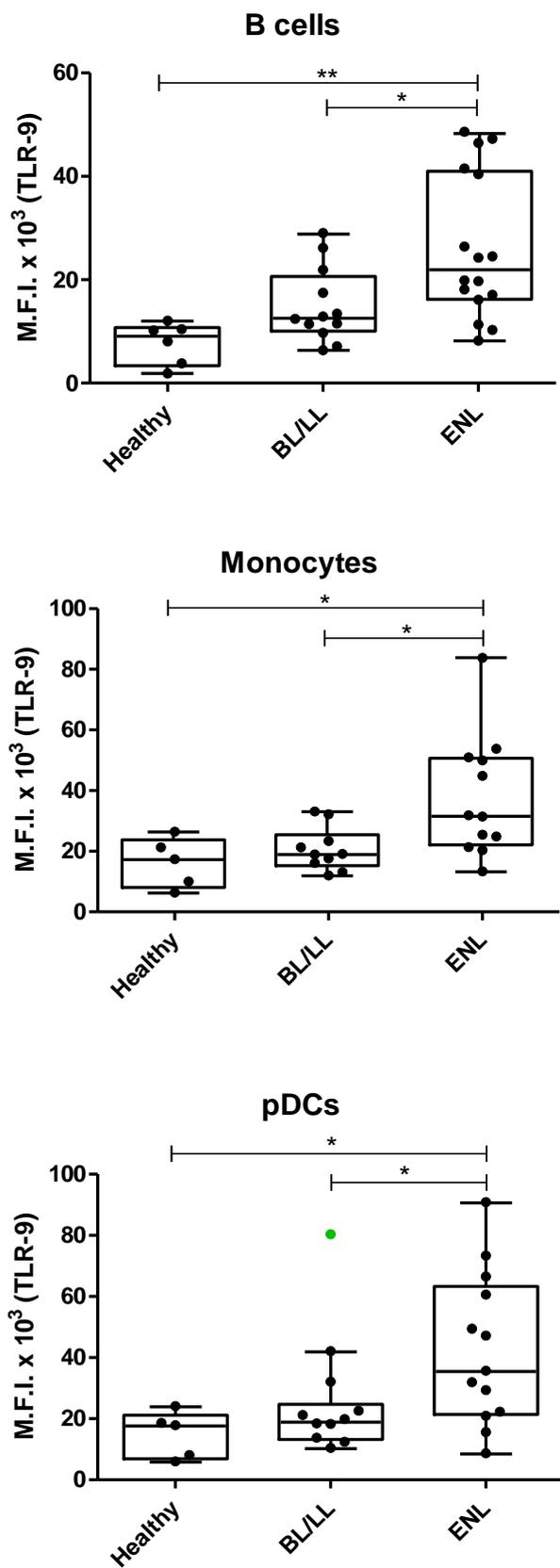
1106

1107

1108

1109

1110



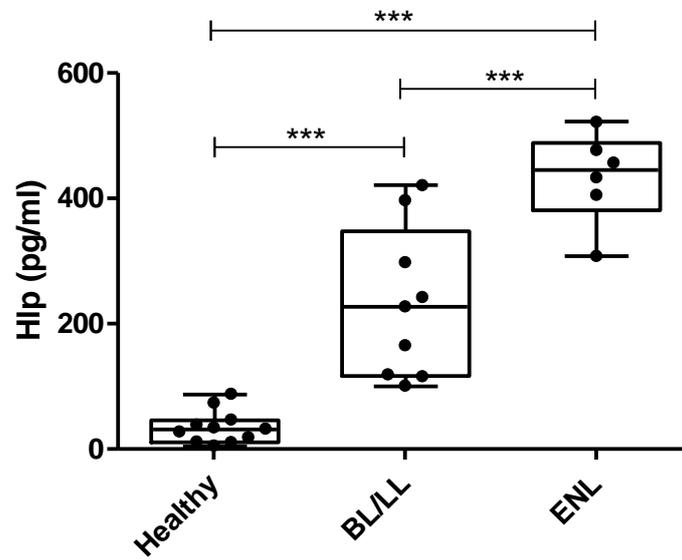
1111 **Figure 3**

1112

1113

1114

A)



1120

1121

1122

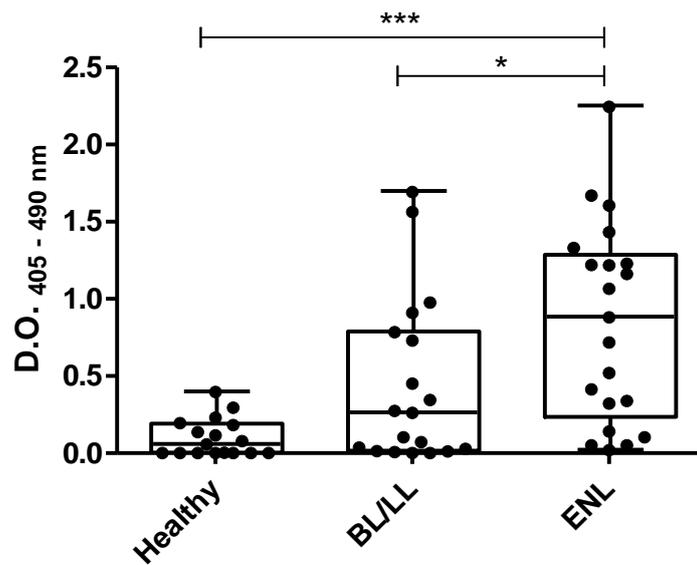
1123

1124

1125

1126

B)



1132

1133

1134

1135

1136 **Figure 4**

1137

1138

1139

1140

1141

1142

1143

1144

1145

1146

1147

1148

1149

1150

1151

1152

1153

1154

1155

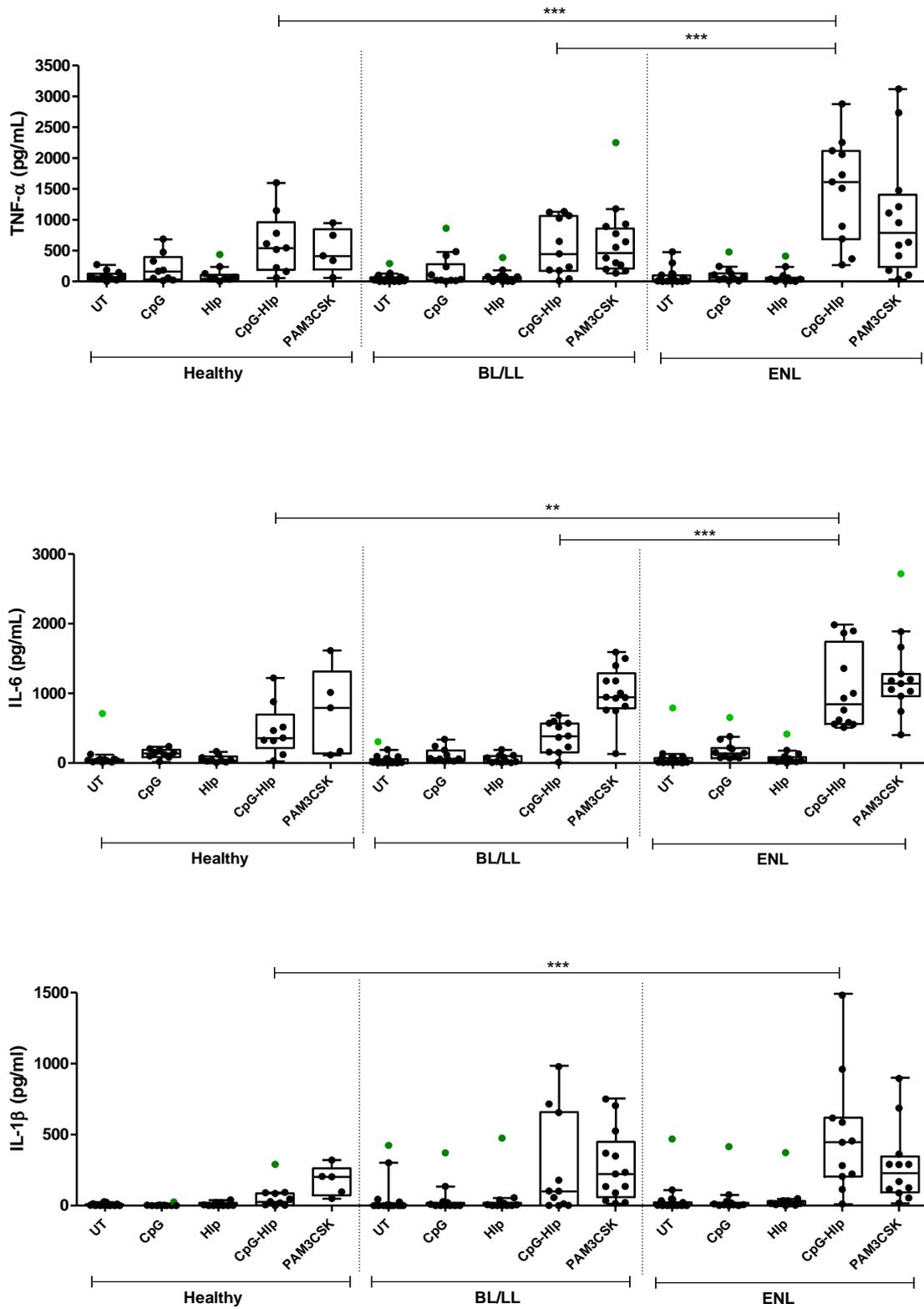
1156

1157

1158

1159

1160



1161 **Figure 5**

1162

1163

1164

1165

1166

1167

1168

1169

1170

1171

1172

1173

1174

1175

1176

1177

1178

1179

1180

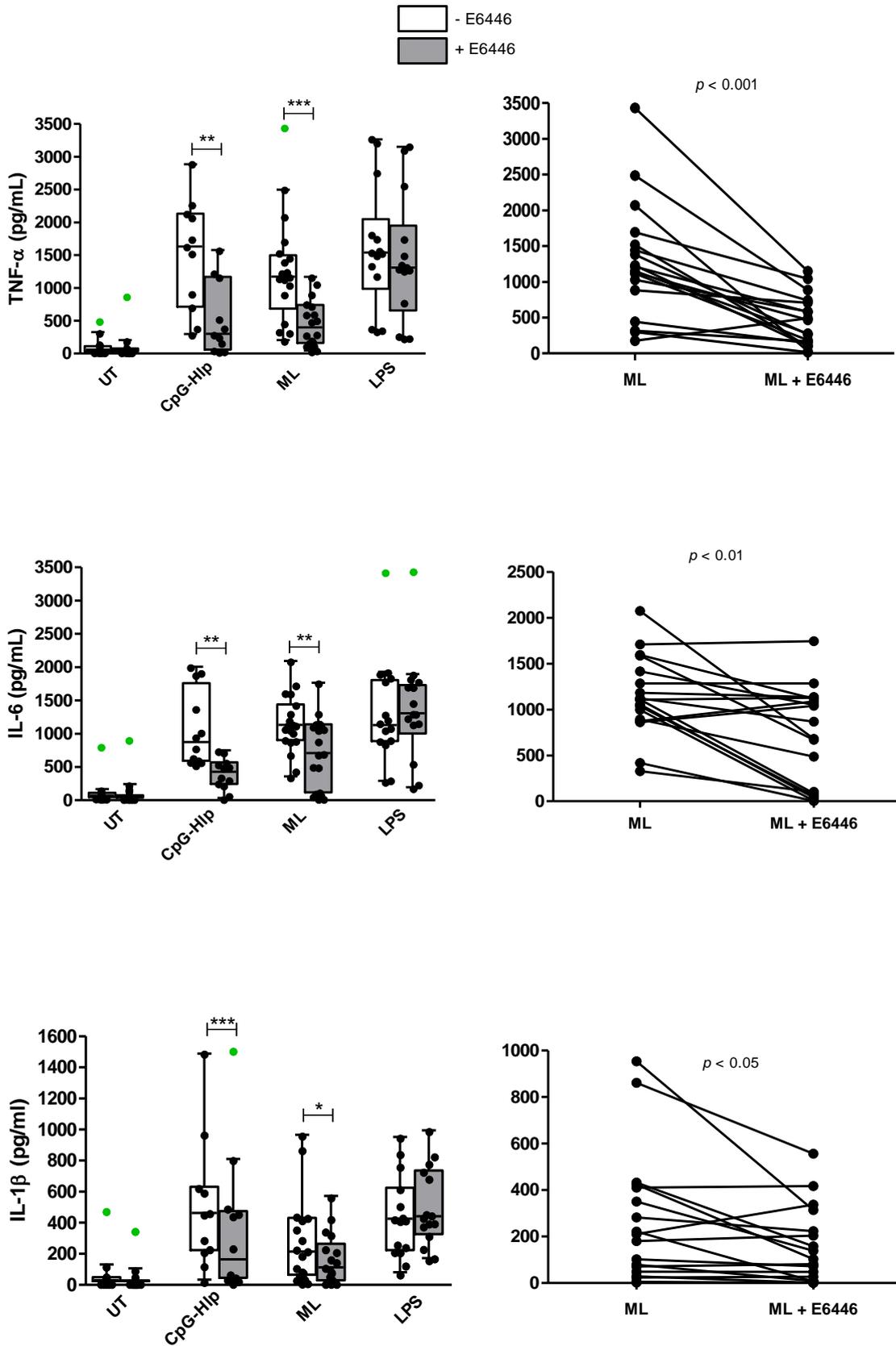
1181

1182

1183

1184

1185



1186 **Supplementary Figure 1**

1187

1188 **A)**

1189

1190

1191

1192

1193

1194

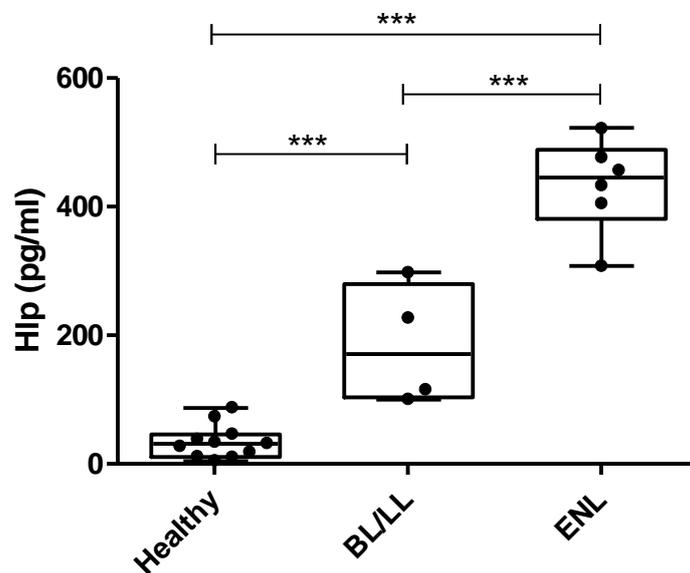
1195

1196

1197

1198

1199



1200 **B)**

1201

1202

1203

1204

1205

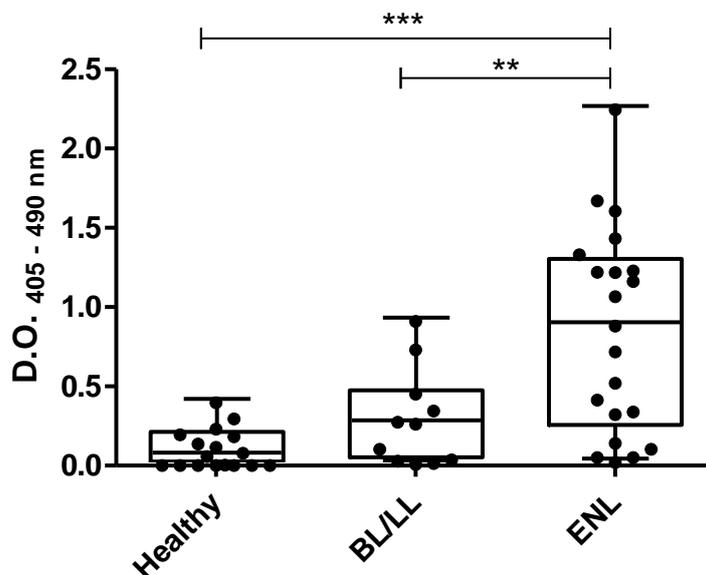
1206

1207

1208

1209

1210



1211 **Supplementary Figure 2**

1212

1213

1214

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224

1225

1226

1227

1228

1229

1230

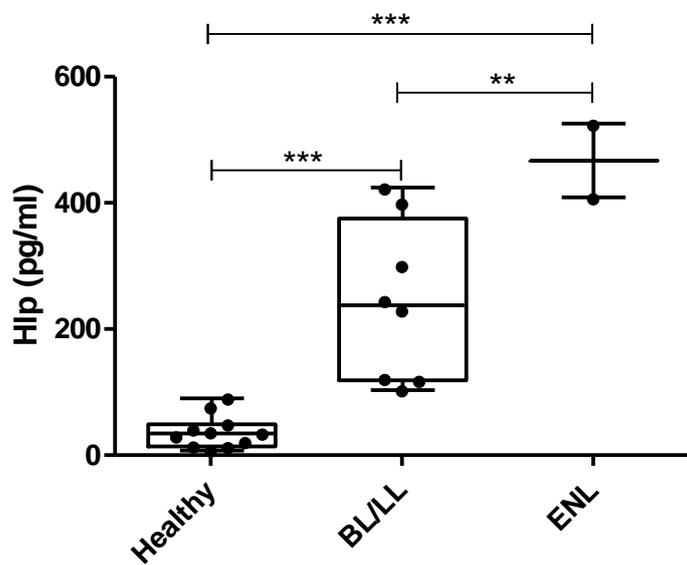
1231

1232

1233

1234

1235



1236 **Supplementary Figure 3**

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

1246

1247

1248

1249

1250

1251

1252

1253

1254

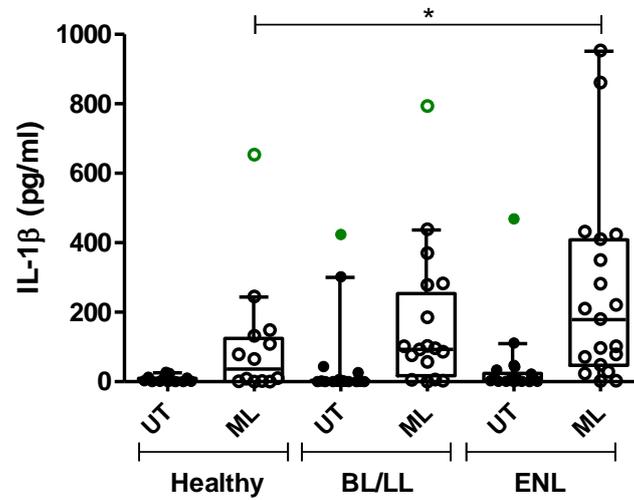
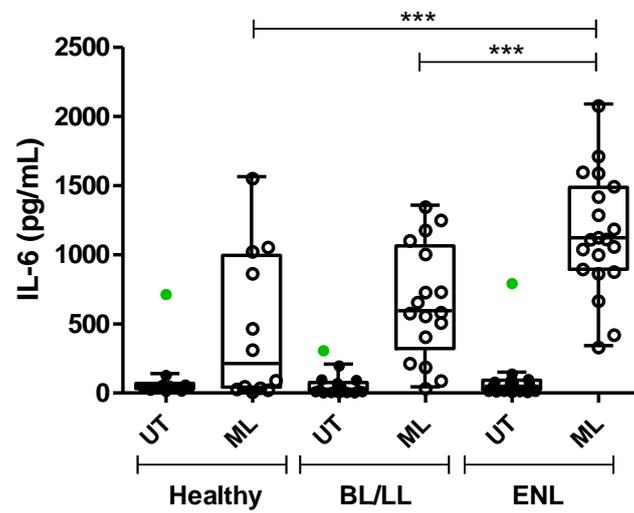
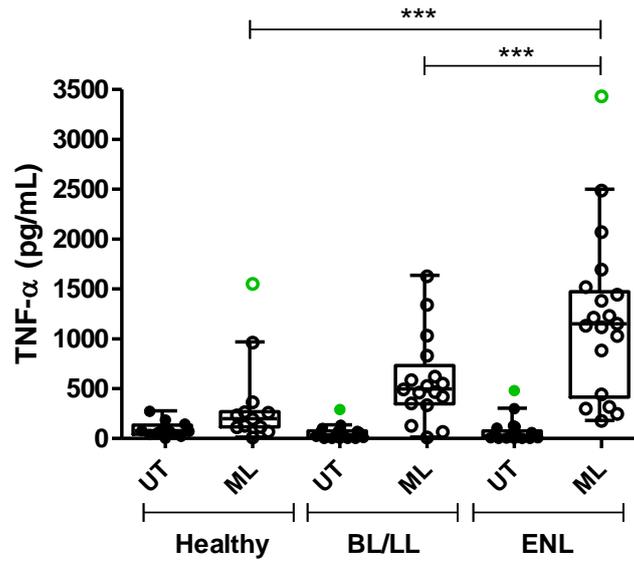
1255

1256

1257

1258

1259



Apesar do uso de antibióticos e programas de vacinação, as doenças infecciosas continuam sendo uma das grandes causas de morbidade e mortalidade mundial (WHO, 2014). Estudos epidemiológicos mostram que a maioria destas doenças ainda não estão próximas de serem erradicadas (Ministério da saúde, 2010). Associado a isso, há o aumento de cepas resistentes a múltiplas drogas. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos e métodos de prevenção e, conseqüentemente, a importância de entender como as bactérias causam doenças.

A hanseníase é um bom exemplo de doença que, apesar da disponibilidade de um regime efetivo de tratamento com antibióticos, ainda constitui um grave problema de saúde pública em alguns países do mundo, inclusive no Brasil, que se encontra em segundo lugar no número de casos da enfermidade (WHO, 2014).

Algumas características peculiares do *M. leprae*, agente etiológico da hanseníase, são a causa de algumas dificuldades no entendimento de sua patogenia. Este bacilo é um patógeno intracelular obrigatório que, até os dias de hoje, não é possível ser cultivado *in vitro*, o que representa uma limitação na utilização de técnicas genéticas, bioquímicas e imunológicas para o estudo de sua biologia. Além disso, possui um tempo de geração de quase duas semanas, apresentando um crescimento muito lento, que leva a uma doença crônica com longos períodos de incubação, podendo variar de dois a dez anos para o aparecimento das manifestações clínicas (revisto por Scollard *et al.*, 2006). Isto representa um desafio para os estudos epidemiológicos e para o entendimento dos eventos iniciais da doença, já que é difícil saber como e quando um indivíduo com sintomas clínicos da doença entrou em contato com a bactéria.

Outro fator importante a ser mencionado é que a grande maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolvem a doença e, uma minoria susceptível – possivelmente devido à associação de fatores imunológicos e genéticos – manifesta a doença dentro de um espectro de formas variáveis de

acordo com a resposta imunológica montada frente ao bacilo. Sabe-se também que ao longo do curso crônico da hanseníase, os pacientes podem apresentar abruptos episódios imuno-inflamatórios, como resultado de uma reativação da resposta imunológica do indivíduo.

A ativação da resposta imune inata está diretamente relacionada com a ligação de receptores de reconhecimento de padrões moleculares com seus respectivos agonistas, os quais podem estar presentes em patógenos (PAMPs) ou ter origem endógena (DAMPs). Estudos sobre a resposta do hospedeiro a infecção pelo *M. leprae* têm se centrado principalmente na análise do receptor TLR-2 (revisto por Krutzik & Modlin, 2004), que é ativado por peptídeos glicolipídicos e lipoproteínas. Contudo, o reconhecimento *in vivo* do patógeno parece depender de diferentes receptores TLRs. Deste modo, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar o envolvimento do receptor TLR-9 na ativação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção pelo *M. leprae*. O TLR-9 reconhece sequências ricas em motivos CpG não-metilados, mais abundantemente presentes em DNA de origem viral ou bacteriana (revisto por Krieg, 2002). Antes mesmo da caracterização do mecanismo de reconhecimento via TLR-9, as propriedades imunoestimuladoras do DNA isolado de BCG e de outras bactérias já haviam sido descritas (Tokunaga *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1992). O receptor TLR-9 está localizado em compartimentos de membrana intracelular, tais como o retículo endoplasmático, o endossomo e o lisossomo (Leifer *et al.*, 2004; Latz *et al.*, 2004).

Numa primeira etapa do nosso trabalho, avaliamos se o TLR-9 estaria envolvido na ativação da resposta imune inata em células epiteliais alveolares da linhagem A549 infectadas com *M. leprae*.

A célula epitelial respiratória constitui a primeira célula que o patógeno entra em contato, representando o primeiro desafio a ser vencido no processo de colonização do hospedeiro. A interação com a mucosa respiratória é um evento chave na patogênese da hanseníase, por constituir a provável porta de entrada para o *M. leprae* (Job *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010). Nosso grupo demonstrou anteriormente que as células A549 são altamente susceptíveis a uma infecção com *M. leprae* (Silva *et al.*, 2013). Por

outro lado, foi demonstrado em estudos anteriores que tais células são capazes de modular a inflamação local e gerar uma resposta imune específica contra as micobactérias, através da produção de uma série de mediadores que recrutam células do sistema imune ao local da infecção (Mayer *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007; Wickremasinghe *et al.*, 2004; Medzhitov *et al.*, 1997) e de moléculas microbidas que agem diretamente contra o patógeno (Roy *et al.*, 2004; Rivas-Santiago *et al.*, 2005, 2008; Méndez-Samperio *et al.*, 2006, 2008). Pneumócitos do tipo II também podem expressar moléculas na sua superfície que os tornam capazes de apresentar antígenos e/ou ativar os linfócitos T (Cunningham & Kirby *et al.*, 1995; Corbière *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2014). Como a maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não evoluem para a doença, acreditamos que estas células são essenciais na geração de uma resposta imune protetora necessária para conter a infecção. Sendo assim, o entendimento dos mecanismos imunopatogênicos associados com a interação *M. leprae* - células epiteliais poderá contribuir para o desenvolvimento de vacinas intranasais que possam controlar infecções micobacterianas (Kohama *et al.*, 2008; Dou *et al.*, 2012; Tyne *et al.*, 2013). Como os antígenos imunizantes são introduzidos no trato respiratório, desenvolve-se, com isso, uma reação imunológica local, impedindo um posterior estabelecimento da infecção (revisado por Oliveira *et al.*, 2007).

Para complementar os dados obtidos por Silva e colaboradores (2013) e baseado nos resultados publicados que mostraram uma ativação da imunidade inata em células epiteliais respiratórias pelo *M. tuberculosis* e por diferentes moléculas com propriedades imunoestimuladoras, os experimentos iniciais do presente trabalho buscaram avaliar a capacidade do *M. leprae* em estimular a resposta imune nas células epiteliais alveolares A549.

Nosso primeiro passo foi analisar se o *M. leprae* seria capaz de induzir a secreção de mediadores pró-inflamatórios e moléculas microbidas nas células A549. Como não é possível manter a viabilidade *in vitro* do *M. leprae* por longos períodos, as análises foram feitas utilizando a bactéria viva ou morta por radiação, o qual mantém sua estrutura intacta. Desta maneira, foi possível inferir se a viabilidade do patógeno teria alguma influência em nossas análises. Dentre os mediadores avaliados, somente as quimiocinas IL-8 e MCP-1

apresentaram níveis alterados nos sobrenadantes das culturas celulares infectadas com o bacilo (**Figura 11**), não sendo possível observar aumento na secreção de NO nem dos mediadores IL-6, TNF- $\alpha$  e RANTES (dados não mostrados). Tanto em 24 como em 48 horas o *M. leprae* induziu uma maior secreção de IL-8 e MCP-1 em relação às células não tratadas. Observamos também que esta indução se mostrou independente da viabilidade do bacilo. Os dados com IL-8 foram confirmados utilizando técnica de PCR quantitativo. Através desta metodologia, observamos em 24 horas um aumento na transcrição gênica da quimiocina nas células que receberam estímulo com *M. leprae* em comparação às culturas sem estímulo, no entanto, inesperadamente, este efeito somente ocorreu ao utilizarmos o bacilo morto (**Figura 12A**). O tempo de 6 horas de estímulo não foi suficiente para observarmos nenhum aumento da transcrição do gene *il8* induzido pela bactéria. Podemos pensar que um período intermediário entre 6 e 24 horas de estímulo seja necessário para detectarmos a expressão da citocina pelo bacilo vivo.

Apesar do *M. leprae* ser reconhecidamente um fraco indutor da ativação imune de macrófagos e células dendríticas *in vitro* (Suzuki *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 2007), nossos achados se assemelham com trabalhos anteriores no contexto de monócitos humanos, em que foi mostrado uma indução da produção de MCP-1 pelo *M. leprae* (Sinsimer *et al.*, 2010). Além disso, através de técnicas de imunohistoquímica, foi possível encontrar uma alta expressão desta quimiocina em biópsias de nervo de pacientes em estágio avançado de hanseníase, e a sua presença foi associada com o recrutamento de macrófagos ao local da infecção e o desenvolvimento de fibrose (Medeiros *et al.*, 2015). MCP-1 é uma molécula quimioatraente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e monócitos (Taub *et al.*, 1995) desempenhando, com isso, um papel crítico no início da resposta imune local. No que diz respeito a IL-8, já foi demonstrado que monócitos isolados de pacientes lepromatosos secretam espontaneamente a quimiocina *in vitro*, ao contrário do observado com TNF- $\alpha$ , em que nenhuma secreção foi observada (Hasan *et al.*, 2004). Neste mesmo trabalho foi demonstrado que monócitos de indivíduos sadios passam a secretar IL-8 frente a um estímulo com *M. leprae*. Além disso, a presença da quimiocina foi identificada em lesões de pele de pacientes lepromatosos (Yamamura *et al.*,

1992). IL-8 atrai predominantemente neutrófilos, células encontradas em abundância em infiltrados inflamatórios de pacientes com hanseníase que desenvolveram ENH (Foss *et al.*, 2003). Neste contexto, acreditamos que estas quimiocinas estariam participando na eliminação do patógeno ainda no trato respiratório através do recrutamento de células clássicas do sistema imune.

As células A549 também expressam peptídeos antimicrobianos, como H $\beta$ D-2, quando são infectadas com *M. tuberculosis* ou BCG (Rivas-Santiago *et al.*, 2005; Méndez-Samperio *et al.*, 2006). De posse desta informação, passamos a analisar o mesmo efeito utilizando agora o *M. leprae* como estímulo. Nossos dados indicam que tanto o bacilo vivo quanto o morto induziram um aumento na transcrição gênica de *h $\beta$ d2* nas células A549. (**Figura 12B**). Neste experimento utilizamos o BCG como controle positivo, no entanto não conseguimos observar nenhuma diferença na expressão de H $\beta$ D-2 após este estímulo. Este resultado contraditório pode ser devido à diferença na linhagem de BCG utilizada. No trabalho de Méndez-Samperio e colaboradores (2006) onde o BCG induz a produção de H $\beta$ D-2, foi utilizada a cepa Danish (ATCC 35733) e em nosso estudo utilizamos a cepa Pasteur 1173P2. Como as cepas de BCG apresentam diferenças nas suas propriedades imunológicas (Horwitz *et al.*, 2009), esta pode ser uma explicação para a ausência de H $\beta$ D-2 em resposta ao BCG nos nossos experimentos.

Os peptídeos antimicrobianos são moléculas efetoras que participam da imunidade inata devido a sua habilidade em atuar diretamente na eliminação de microrganismos (revisto por Bahar & Ren, 2013). Estudos *in vitro*, utilizando macrófagos humanos transfectados com o gene de *h $\beta$ d2* e infectados com *M. tuberculosis*, sugerem que o peptídeo está envolvido no controle do crescimento da bactéria (Kisich *et al.*, 2001). Sendo assim, podemos sugerir que o H $\beta$ D-2 poderia estar participando, juntamente com os mediadores pró-inflamatórios, na resposta imune contra o *M. leprae* no início da infecção pelo patógeno.

Numa etapa seguinte do trabalho, investigamos o efeito da estimulação das células A549 com o *M. leprae* sobre a expressão da molécula co-estimuladora CD80 e do MHC-II. Os resultados foram comparados com as

células não tratadas ou estimuladas com BCG. A idéia de realizar este experimento surgiu pelo fato das células epiteliais alveolares terem a capacidade de expressar diferentes moléculas de adesão, além do MHC-II, frente a diversos estímulos (Cunningham & Kirby *et al*, 1995; Corbière *et al*, 2011; Li *et al.*, 2011; Shen *et al*, 2014). Além disso, no pulmão reside um grande número de linfócitos T com fenótipos característicos de células de memória (Saltini *et al.*, 1988; Becker *et al.*, 1990). Os dados mostrados na **Figura 13** indicam que tanto o BCG, como o *M. leprae* vivo ou morto foram capazes de induzir um aumento na expressão de CD80 na superfície das células, não sendo possível observar o mesmo efeito na expressão de MHC-II (dado não mostrado). Estes resultados sugerem que, após a infecção com o *M. leprae*, as células epiteliais não somente recrutam linfócitos T, através da produção dos mediadores pró-inflamatórios, mas também podem auxiliar na sua ativação.

Para melhor entender o mecanismo de indução das quimiocinas IL-8 e MCP-1 nas células A549 pelo *M. leprae*, nós investigamos o envolvimento do fator de transcrição NF- $\kappa$ B na infecção pelo patógeno. Antes de analisarmos se a secreção das quimiocinas estaria relacionada com a ativação de NF- $\kappa$ B, nós verificamos a influência do *M. leprae* na translocação nuclear do fator de transcrição nas células A549 e constatamos que o bacilo é capaz de induzir um aumento significativo da concentração da subunidade p65, molécula que compõe o dímero protéico de NF- $\kappa$ B, no núcleo das células (**Figura 14**). Para analisarmos a participação do NF- $\kappa$ B na secreção das quimiocinas induzidas pelo *M. leprae*, utilizamos uma droga chamada wedelolactone. Esta droga impede a degradação do inibidor de NF- $\kappa$ B, conhecido como I $\kappa$ B, responsável por reter o fator de transcrição no citoplasma impedindo a sua translocação para o núcleo e a transcrição de genes. Deste modo, constatamos que somente o IL-8 foi dependente da ativação de NF- $\kappa$ B nas células infectadas pelo *M. leprae* (**Figura 15A**). Ao tratarmos as células A549 com a droga, o perfil de secreção da IL-8 nas culturas estimuladas com o *M. leprae* se assemelhou aos níveis basais. Este mesmo efeito não foi observado quando dosamos MCP-1 (**Figura 15B**), sugerindo a participação de outros fatores de

transcrição na produção desta quimiocina. Esta hipótese se suporta em estudos que mostraram outras vias transcricionais na produção de MCP-1. Caselli e colaboradores (2012) mostraram que a inibição da via de NF- $\kappa$ B em células endoteliais inibiu somente parcialmente a produção da quimiocina após uma infecção com herpesvírus 8 humano (HHV-8), ao contrário do observado após o silenciamento do fator ativador de transcrição 4 (ATF-4), onde a expressão de MCP-1 foi significativamente diminuída (Caselli *et al.*, 2012). Um outro estudo mostrou que a indução da produção de MCP-1 por *Helicobacter pylori*, em células epiteliais gástricas, foi dependente da via janus quinases ativadas 2/ativador de transcrição e transdução de sinal 3 (Jak2/STAT3) (Cho *et al.*, 2013).

Numa próxima etapa do estudo, passamos a investigar a capacidade da proteína Hlp de *M. leprae*, quando combinada ou não a DNA, de induzir a secreção de mediadores pró-inflamatórios e NO nas células A549. A Hlp foi descrita como uma adesina importante na interação de micobactérias com células epiteliais respiratórias devido a sua ligação a glicosaminoglicanas presentes na superfície celular (Aoki *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005; Lefrançois *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). Além de se ligar a glicosaminoglicanas, a Hlp possui a capacidade de se ligar ao DNA bacteriano regulando a expressão gênica (Furugen *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 1999). Um estudo mostrou que o complexo CpG-Hlp, gerado devido à capacidade da Hlp de se ligar ao DNA, foi capaz de ser reconhecido pelo receptor TLR-9, ativando a resposta imune inata e aumentando a resposta imune celular e humoral específica contra a Hlp em camundongos da linhagem C3H/HeJ infectados com *M. tuberculosis* (Matsumoto, *et al.*, 2005).

A Hlp recombinante de *M. leprae* usada no presente trabalho foi purificada em nosso laboratório. Como a proteína foi produzida em *E. coli*, uma etapa crítica para avançar no nosso estudo foi avaliar a possível contaminação da nossa preparação de rHlp com LPS, um forte indutor de resposta imune inata. Como as células epiteliais também expressam TLR-4 (MacRedmond *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008), o principal receptor de reconhecimento de patógenos que se liga a LPS, uma contaminação com este polissacarídeo poderia induzir a secreção de mediadores inflamatórios pela célula epitelial

confundindo nossa análise. Como já havia sido demonstrado que a Hlp *per se* é incapaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$  em esplenócitos (Matsumoto, *et al.*, 2005), nos valemos desta propriedade para avaliar o grau de contaminação de nossa preparação por LPS utilizando PBMCs purificadas de voluntários sadios e tratadas com a rHlp purificada. A partir dos dados mostrados na **Figura 16** concluímos que o grau de contaminação da nossa preparação de rHlp não interferiria na análise dos ensaios posteriores.

Foi investigado o efeito da estimulação das células A549 simultaneamente com CpG e rHlp, sobre a secreção dos mediadores inflamatórios e NO. Os resultados foram comparados com as células tratadas somente com o CpG ou com a rHlp. Foi possível observar um maior aumento na secreção de IL-8 após 48 horas de estímulo nas células, não sendo possível observar nenhuma diferença nos níveis de MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, RANTES e NO (dados não mostrados). Os dados mostrados na **Figura 17** indicam que a rHlp *per se* não foi capaz de estimular as células a secretarem os mediadores estudados, nas condições experimentais utilizadas, em níveis superiores a aqueles constitutivamente produzidos. Por outro lado, como esperado, as células responderam ao LPS e CpG produzindo mais IL-8. Já a combinação de rHlp com o CpG induziu uma secreção aproximadamente 2 vezes maior de IL-8 em relação às células só estimuladas com CpG e de quase quatro vezes mais em relação aos níveis observados com a célula só estimulada com rHlp, indicando um sinergismo entre estes dois estímulos. A Hlp foi a primeira proteína identificada que aumentava de forma considerável a resposta imune mediada por CpG (Matsumoto *et al.*, 2005). Uma possível explicação para o efeito sinérgico da Hlp sobre o CpG poderia ser explicada pela capacidade desta proteína de se ligar simultaneamente às moléculas de matriz extracelular presentes na superfície celular e ao DNA. Neste ponto, vale a pena ressaltar que a Hlp se mostrou capaz de interagir fortemente com diferentes tipos de colágeno (I, III, IV e VI) (Dias *et al.*, 2012), principal componente da matriz extracelular de células eucarióticas. Além disso, a proteína também se liga à heparan sulfato e laminina (Aoki *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005; Lefrançois *et al.*, 2011). Ao se ligar a componentes de matriz extracelular, a Hlp provavelmente facilitaria a internalização do CpG para os compartimentos endossomais e seu

subseqüente reconhecimento pelo receptor TLR-9, levando à ativação da resposta imune inata, com produção de mediadores inflamatórios que são críticos na migração, maturação e ativação de células apresentadoras de antígenos.

Estudos em modelo de malária experimental murina reforçam essa hipótese e confirmam as propriedades imunoestimuladoras de complexos resultantes da interação DNA-proteína (Wu *et al.*, 2010; Gowda *et al.*, 2011). O complexo DNA-histona se mostrou o principal componente do plasmódio capaz de ativar células dendríticas e induzir a produção de mediadores inflamatórios. Os autores também demonstraram a importância da ligação do DNA à proteína para que ocorra a internalização do DNA e o seu posterior reconhecimento por TLR-9. Assim, o DNA *per se* seria uma molécula imunologicamente fraca, mas a sua associação com proteínas ligantes de DNA, como as histonas, o transformaria em uma molécula com fortes propriedades imunoestimuladoras. Estes autores também mostraram que polímeros catiônicos, como a polilisina, são igualmente capazes de ativar o DNA, indicando o envolvimento de interações iônicas na formação do complexo. Neste ponto, vale a pena lembrar que veículos catiônicos são igualmente a base para protocolos de transfecção, pois, possivelmente, ao se complexarem ao DNA e interagirem com a superfície negativa das células eucariotas, facilitam sua entrada no interior das células (Dass, 2004).

Após observarmos que a proteína Hlp purificada de *M. leprae* exercia um efeito potencializador sobre o oligonucleotídeo CpG na ativação da resposta imune, decidimos finalizar a primeira etapa do nosso estudo investigando se o receptor TLR-9 estaria envolvido na produção de IL-8 induzida pelo *M. leprae* e se a presença de um complexo formado pela ligação do DNA à Hlp na superfície micobacteriana poderia estar participando desta indução.

O envolvimento do TLR-9 foi avaliado utilizando um antagonista sintético dos receptores TLR-7 e 9, chamado E6446. Sendo assim, as células A549 foram pré-tratadas com o antagonista e, posteriormente, foram estimuladas com *M. leprae* vivo ou morto por 24 e 48 horas. Como controles de especificidade do antagonista utilizamos o complexo CpG-Hlp e o LPS, que são reconhecidos pelos receptores TLR-9 e TLR-4 respectivamente. O uso do

antagonista diminuiu de forma significativa a secreção de IL-8 induzida pelo *M. leprae* e pelo complexo CpG-Hlp, sendo que este efeito não foi observado nas células estimuladas com LPS (**Figura 18**).

Os resultados descritos acima, aliados ao fato de que o *M. leprae* é capaz de invadir com sucesso as células A549 (Silva *et al.*, 2013) indicam que, uma vez internalizado, o bacilo pode ativar células epiteliais respiratórias via reconhecimento por TLR-9. Estes dados estão de acordo com um estudo que mostrou que a produção da quimiocina MIP-2 pelas células epiteliais intestinais, induzida pelo *M. avium paratuberculosis*, só ocorreu após a internalização da bactéria e o seu subsequente reconhecimento pelos receptores TLR-9 e NOD-1 (Pott *et al.*, 2009).

Silva e colaboradores (2013) mostraram que a invasão celular do *M. leprae* pode estar relacionada com a presença de Hlp presente na superfície da bactéria. Além disso, os autores também demonstraram que o processo de invasão celular foi independente da viabilidade do bacilo e da capacidade endocítica intrínseca das células A549, já que o *M. leprae* vivo se comportou de forma semelhante ao morto e o mesmo efeito não foi observado ao analisar a internalização de microesferas de poliestireno (Silva *et al.*, 2013). Da mesma maneira, em todas as condições de nossos experimentos a ativação da imunidade inata induzida pelo *M. leprae* também não dependeu da viabilidade do bacilo. Isto nos leva a acreditar que a ativação das células epiteliais não ocorreu devido a moléculas recentemente sintetizadas pelo *M. leprae* e sim por componentes intactos presentes na superfície bacteriana.

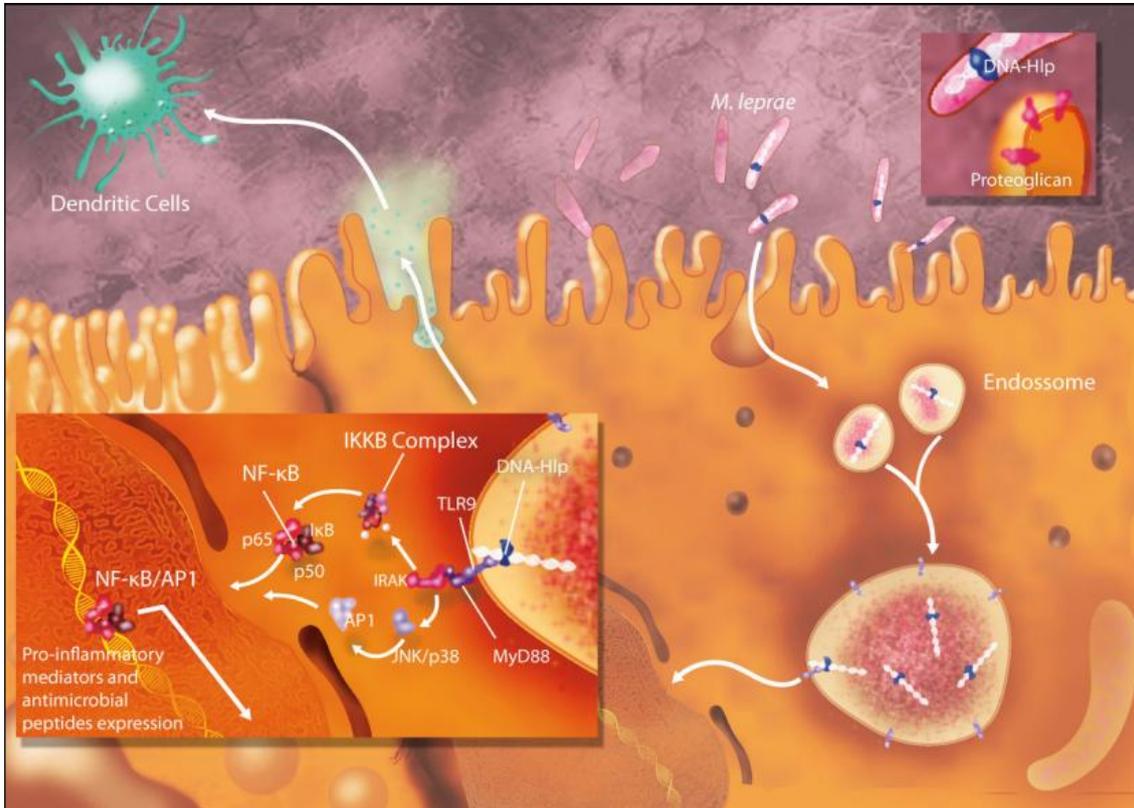
Sabendo-se que a Hlp está presente em abundância na superfície do *M. leprae* (Shimoji *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2013), finalizamos esta etapa do estudo avaliando se a proteína poderia ser a principal molécula que liga DNA na parede celular do bacilo, tornando-se o principal componente da bactéria que ativa TLR-9. A presença de DNA extracelular foi demonstrada no contexto de outros patógenos, como *M. tuberculosis* (Watson *et al.* 2012; Manzanillo *et al.*, 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* (Das *et al.*, 2013). Neste sentido, analisamos se a ativação da célula A549 por micobactérias poderia ser aumentada na presença de CpG. Como outras moléculas na superfície bacteriana poderiam ligar CpG, o envolvimento específico da Hlp nestes

ensaios foi monitorado comparando o comportamento de uma cepa de *M. smegmatis* mutante para o gene *hlp* com a cepa selvagem. A escolha da utilização desta micobactéria surgiu como estratégia pela impossibilidade de se construir cepa mutante para Hlp em *M. leprae* e da Hlp ser uma proteína altamente conservada, apresentando uma grande homologia entre as diferentes espécies de micobactérias (Lefrançois *et al.*, 2011).

Conforme observado na **Figura 19**, as células epiteliais alveolares passaram a secretar mais IL-8 quando foram estimuladas, por 48 horas, com a cepa selvagem pré-tratada com o CpG. O mesmo não ocorreu com a cepa mutante em que o pré-tratamento com o CpG não promoveu nenhum aumento de estímulo. Este resultado sugere que o CpG foi capaz de se ligar à Hlp presente no *M. smegmatis*, o qual interagiu com a superfície celular levando à sua internalização e facilitando a ativação do receptor TLR-9 promovida pelo CpG. Esta ativação resultou, então, na secreção da quimiocina.

Nossos resultados nos levam a acreditar que haja a deposição e concentração de complexos DNA-Hlp, extravasada de bactérias lisadas, na superfície de bacilos viáveis. A **Figura 20** resume de forma esquemática como o receptor TLR-9 estaria envolvido na geração da resposta imune nas células epiteliais durante a interação com o *M. leprae*. Podemos especular que no início da infecção, estes complexos facilitariam a adesão do *M. leprae* às células epiteliais respiratórias, devido à capacidade da Hlp de se ligar a proteoglicanas da matriz extracelular. Desta maneira, a Hlp provavelmente estaria facilitando a internalização do *M. leprae* para os compartimentos endossomais e o subsequente reconhecimento do DNA pelo receptor TLR-9, o qual induziria uma rede de sinais capazes de ativar diferentes fatores de transcrição (incluindo a via de NF- $\kappa$ B), levando à produção de mediadores inflamatórios que, juntamente com peptídeos antimicrobianos e moléculas co-estimuladoras, estariam participando na eliminação do patógeno e impedindo assim a progressão para a hanseníase propriamente dita. Os mediadores inflamatórios estariam participando através do recrutamento de células constituintes do sistema imune (incluindo as células dendríticas) ao local da infecção. Dentro deste contexto, aliado ao fato de tratar-se de uma proteína muito conservada, acreditamos que a Hlp tenha grande potencial de agir,

quando combinada a DNA, tanto como um bom imunógeno, assim como adjuvante em intervenções imunes contra a hanseníase, como na vacinação intranasal.



**Figura 20: Modelo representando o possível envolvimento do receptor TLR-9 na ativação da resposta imune de células epiteliais respiratórias infectadas com *M. leprae*.** O bacilo contendo complexos DNA-Hlp na superfície estaria sendo internalizado pelas células epiteliais e reconhecido pelo TLR-9, levando a produção de mediadores pró-inflamatórios e peptídeos antimicrobianos. Os mediadores pró-inflamatórios seriam responsáveis pelo recrutamento de células do sistema imune ao sítio de infecção (representado pela célula dendrítica).

Tanto na hanseníase, como em muitas outras doenças infecciosas, os mediadores pró-inflamatórios podem ativar a resposta imune no sentido de eliminar os agentes patogênicos ou podem mediar manifestações patológicas da doença. Como já mencionado anteriormente, pacientes com hanseníase podem desenvolver abruptos episódios reacionais durante o curso crônico da doença. Pacientes das formas clínicas BL e LL manifestam o ENH como resultado de um intenso processo imunológico desencadeado pelo aumento

exacerbado de citocinas pró-inflamatórias (Sarno *et al.*, 1991; Iyer *et al.* 2007; Stefani *et al.* 2009). Estes episódios ocorrem mais freqüentemente durante o tratamento quimioterápico para hanseníase, podendo ocorrer antes ou após o tratamento, estando possivelmente relacionado com a destruição massiva dos bacilos. Esta destruição massiva leva a liberação de diferentes moléculas do *M. leprae*, incluindo o DNA, que poderiam estar ativando diversas vias da imunidade inata. No entanto, as vias do sistema imune inato que participam do desencadeamento da resposta inflamatória exacerbada que ocorre no ENH ainda estão poucos descritas. Neste sentido, numa segunda etapa de nosso trabalho, passamos a investigar o envolvimento do TLR-9 no processo inflamatório ocorrido no ENH.

Nossos resultados mostraram um aumento nos níveis de expressão do TLR-9 tanto em lesões de pele como em PBMCs de pacientes com ENH, quando comparados com pacientes não reacionais. Dentre as PBMCs, a análise foi feita em linfócitos B, monócitos e células dendríticas plasmocitóides (pDCs) por serem os três principais tipos de células mononucleares do sangue que expressam TLR-9 (Poth *et al.*, 2010; Cepika *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014). Estes dados indicam que o TLR-9 pode ter um envolvimento na reação do tipo II tanto no local das lesões, como sistemicamente. No entanto, se o TLR-9 é regulado positivamente nestes tipos de células como consequência do ENH, ou se pacientes lepromatosos exibindo níveis constitutivos mais elevados deste receptor são mais susceptíveis a desenvolver ENH é algo que precisa ser investigado futuramente. A maior expressão de TLR-9 nas lesões de pele pode estar relacionada, em parte, a monócitos, encontrados em grande abundância no infiltrado inflamatório (Massone *et al.*, 2015), com alguma contribuição de pDCs e linfócitos B, que também pode migrar para as lesões (Sehgal *et al.*, 1986; Nath *et al.*, 2000 Massone *et al.*, 2010, 2015). Além disso, os neutrófilos, que são freqüentemente encontrados em lesões de ENH (Foss *et al.*, 2003) e expressam altos níveis de TLR-9 (Trevani *et al.*, 2003; József *et al.*, 2006), também podem estar contribuindo para esta regulação positiva do receptor que foi observada.

O DNA é considerado um estimulante da resposta imune, além de ser uma molécula extremamente estável, no entanto complexos DNA-histona são

conhecidos por serem mais potentes agonistas de TLR-9 que DNA sozinho (Wu *et al.*, 2010; Gowda *et al.*, 2011). Sendo assim, nós quantificamos os níveis de Hsp circulante nestes pacientes e observamos um aumento na concentração da proteína no soro de pacientes com ENH, quando comparados com pacientes não reacionais e indivíduos saudáveis. Além disso, foi possível detectar a presença de DNA de *M. leprae* na circulação de pacientes reacionais. O TLR-9 foi inicialmente descrito como receptor de reconhecimento de DNA, rico em motivos CpG, presente em vírus e bactérias, no entanto diversos trabalhos descreveram a capacidade do TLR-9 de reconhecer também DNA endógeno (Barrat *et al.*, 2005; Hsiao *et al.*, 2014). Neste sentido, decidimos quantificar os níveis séricos de complexos DNA-histona humanos nestes pacientes e conseguimos também observar que pacientes acometidos pelo ENH apresentam aumento na concentração circulante quando comparados com pacientes não reacionais. Estes dados, associados com os níveis elevados de expressão de TLR-9 em lesões da pele e PBMCs de pacientes com ENH, sugerem um importante envolvimento do TLR-9 durante a reação. Podemos também supor que imunocomplexos contendo ácidos nucléicos poderiam agir como importantes estimuladores de TLR-9 no ENH. A forte resposta imune humoral observada em pacientes multibacilares, juntamente com a geração de auto-anticorpos descritos em vários estudos (Mathew *et al.*, 1993; Drowart *et al.*, 1994; Ochieng *et al.*, 1994; Wheeler *et al.*, 1994; Pradhan *et al.*, 2004; Baeza *et al.*, 2012) e a detecção de imunocomplexos circulantes (Ridley, 1969) reforçam esta possibilidade. Importante mencionar que está bem estabelecida a participação de ácidos nucléicos endógenos, complexados a proteínas básicas ou a auto-anticorpos, na patogênese de várias doenças inflamatórias e auto-imunes onde as sinalizações de TLR-7 e TLR-9 estão envolvidas, com subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias (revisado por Rifkin *et al.*, 2005; revisado por Guiducci *et al.*, 2009).

Além do ENH, um bom modelo de infecção sistêmica seguida de inflamação aguda é a sepse, onde níveis elevados de DNA bacteriano e mitocondrial foram detectados no plasma de pacientes (Bhagirath *et al.*, 2015). Um outro estudo relatou que histonas extracelulares liberadas em resposta ao

processo inflamatório contribuem para a disfunção endotelial, falência de órgãos e morte durante a sepse (Xu *et al.*, 2009). Fenômeno semelhante ocorre no lúpus eritematoso sistêmico, uma doença inflamatória crônica de natureza autoimune, onde o DNA endógeno é capaz de induzir a sinalização de receptores TLR-9 (Barrat *et al.*, 2005). Durante o ENH ocorre um intenso dano tecidual (Murphy *et al.*, 1986), o qual pode levar à liberação de moléculas endógenas humanas no tecido inflamado e subsequente extravasamento para o sistema circulatório. Neste sentido, no que diz respeito à natureza do ENH, uma sugestão é que o DNA bacteriano poderia estar participando no início do aparecimento da inflamação e, após o estabelecimento da reação, o DNA de origem endógena, liberado por células lesionadas, estaria agravando o quadro inflamatório funcionando como uma alça de amplificação.

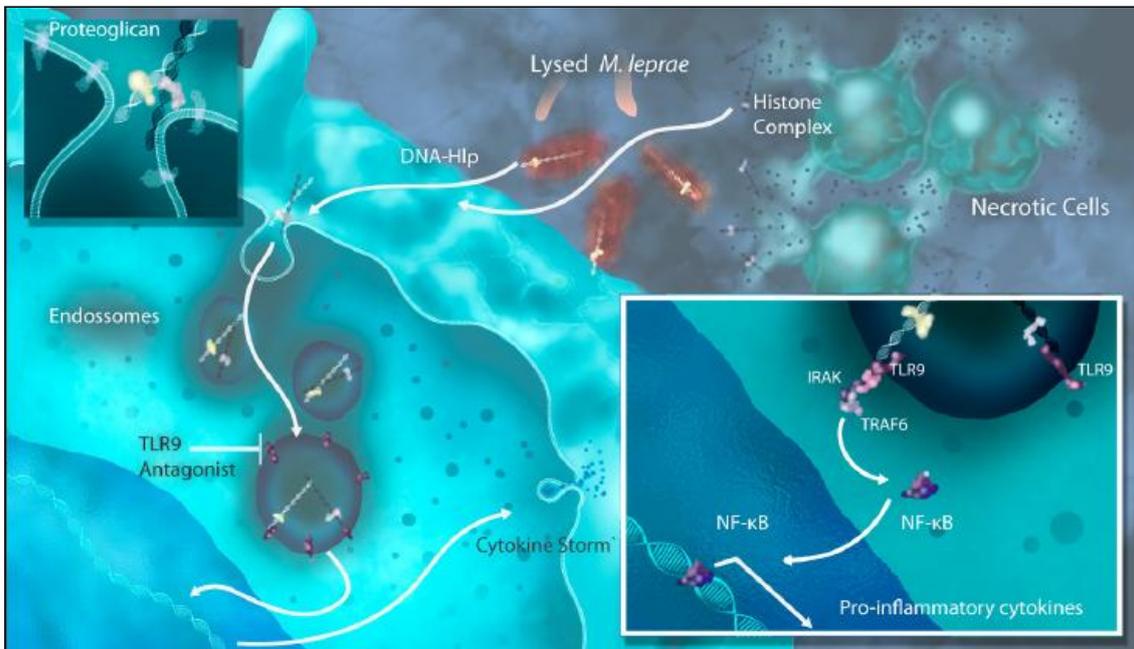
Como já mencionado anteriormente, as lesões de ENH são caracterizadas por infiltrados inflamatórios intensos, com a presença marcante de neutrófilos (Foss *et al.*, 2003). Sendo assim, estas células poderiam ser a principal fonte de complexos DNA-histona. Um estudo mostrou que neutrófilos circulantes isolados de pacientes com ENH sofrem morte espontânea a uma taxa maior do que os neutrófilos de indivíduos saudáveis e pacientes não reacionais (Oliveira *et al.*, 1999). O mesmo fenômeno foi observado no lúpus, onde os neutrófilos parecem estar desempenhando um papel no desenvolvimento da doença. Os neutrófilos oriundos de pacientes com lúpus sofrem NETose, liberando redes de NET contendo grandes quantidades de DNA e proteínas básicas que podem induzir pDCs a produzirem altos níveis de IFN- $\alpha$  de uma forma dependente de TLR-9 (Garcia-Romo *et al.*, 2011). Além disso, um estudo utilizando camundongos C57BL/6 mostrou que após o uso de altas doses de Paracetamol, ocorre um dano hepático devido a uma inflamação causada pela liberação de DNA endógeno e o seu subsequente reconhecimento por TLR-9. Neste trabalho, os autores mostraram que ocorreu uma intensa migração de neutrófilos para as áreas ricas em DNA (Marques *et al.*, 2015).

O ENH é caracterizado por respostas mistas Th1, Th2 e Th17, com presença predominante de citocinas pró-inflamatórias nas lesões e no soro (Sarno *et al.* 1991; Moraes *et al.*, 1999, 2000; Teles *et al.*, 2002; Iyer *et al.*

2007; Stefani *et al.* 2009; Martiniuk *et al.*, 2012). Durante o ENH, níveis circulantes elevados das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são detectados (Sarno *et al.*, 1991). Neste sentido, foi mostrado que PBMCs purificadas de pacientes em reação respondem a um estímulo com *M. leprae* lisado produzindo mais TNF- $\alpha$  do que as células de pacientes não reacionais e indivíduos sadios (Barnes *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1993). Sendo assim, em um próximo passo do presente estudo, nós avaliamos a contribuição do TLR-9 na resposta que as células de pacientes com ENH apresentam frente ao estímulo com *M. leprae*. Para tal, PBMCs foram isoladas de indivíduos sadios e de pacientes reacionais ou não reacionais e, em seguida, foram estimuladas com doses sub-ótimas do complexo CpG-Hlp ou com sonicação de *M. leprae*. Após os estímulos, observamos que os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  secretados foram maiores nas culturas celulares de pacientes com ENH. Como o heterodímero TLR-1/2 é bem descrito no reconhecimento de *M. leprae* (Krutzik *et al.*, 2003), utilizamos também neste ensaio o PAM3CSK (ligante de TLR-1/2) como estímulo, no entanto não observamos nenhuma diferença nos níveis dos mediadores pró-inflamatórios entre os grupos de indivíduos analisados, sugerindo que não há regulação da expressão deste receptor durante o ENH, pelo menos no contexto de PBMCs. De acordo com os nossos dados, o aumento da resposta aos agonistas de TLR-9 se correlaciona com a elevada expressão de TLR-9 em PBMCs de pacientes com ENH.

Finalmente, para confirmar o envolvimento do TLR-9 na patogênese do ENH, nós testamos a capacidade do antagonista sintético de TLR-7 e 9 (E6446) em inibir a secreção das citocinas pró-inflamatórias pelas PBMCs purificadas de pacientes com ENH em resposta ao *M. leprae*. Para isso, as células purificadas foram pré-tratadas com o antagonista e, posteriormente, estimuladas com lisado de *M. leprae*. A quantificação das citocinas no sobrenadante das culturas revelou que o antagonista foi capaz de diminuir os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  induzidas pelo *M. leprae*, confirmando nossos achados. Interessante mencionar que a inibição de TLR-9 com o propósito de frear um desequilíbrio na resposta imune já foi mostrada em diferentes modelos de inflamação aguda (Yasuda *et al.*, 2007; Plitas *et al.*, 2008; Franklin *et al.*, 2011; Hoque *et al.*, 2013).

O modelo esquemático representado pela **Figura 21** resume o possível envolvimento do TLR-9 na patogênese do ENH. Complexos formados pela ligação de DNA do *M. leprae* com Hlp, liberados após lise bacteriana, estariam sendo reconhecidos pelo receptor TLR-9, o qual induzira a produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias (“cytokine storm”) e o recrutamento de células do sistema imune resultando na inflamação. Esta inflamação estaria sendo agravada por complexos ácidos nucléicos-histona endógenos liberados por células necróticas e que também estariam ativando TLR-9, além do TLR-7. Sendo assim, a inibição da ativação de TLR-9 pode se tornar uma alternativa de tratamento mais eficiente para as reações, bloqueando a produção excessiva de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, prevenindo a lesão do nervo.



**Figura 21: Modelo representando o possível envolvimento do receptor TLR-9 na patogênese do ENH.** A lise de bactérias levaria à liberação de complexos DNA-Hlp do *M. leprae*, que seriam reconhecidos pelo TLR-9 levando a produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias (“cytokine storm”) ocasionando a inflamação. Os mediadores produzidos seriam responsáveis pelo recrutamento de células do sistema imune, que sofreriam morte celular levando a liberação de complexos formados pela ligação de histonas com ácidos nucléicos endógenos. Estes complexos funcionariam com uma alça de amplificação da inflamação através da ativação de TLR-9.

Os resultados do presente trabalho nos permitiram chegar às seguintes conclusões:

### Parte 1:

- O *M. leprae* se mostrou capaz de induzir o peptídeo antimicrobiano H $\beta$ D-2 e as quimiocinas IL-8 e MCP-1 nas células epiteliais alveolares humanas. Este dado sugere que células epiteliais respiratórias podem estar envolvidas na geração da resposta imune contra o *M. leprae*;
- O *M. leprae* induziu aumento na expressão da molécula co-estimuladora CD80 na superfície das células epiteliais alveolares humanas, indicando que estas células podem participar na ativação de linfócitos T recrutados ao local da infecção;
- A translocação nuclear de NF- $\kappa$ B foi observada nas células epiteliais alveolares após estímulo com *M. leprae* e o seu bloqueio inibiu a produção de IL-8, sugerindo a participação deste fator de transcrição na resposta imune à infecção;
- A proteína Hlp de *M. leprae* se mostrou imunologicamente inerte quando utilizada isoladamente como estímulo em culturas *in vitro* de células epiteliais alveolares. Porém, quando combinada ao oligonucleotídeo CpG, a Hlp potencializou a secreção de IL-8, indicando um sinergismo entre estas duas moléculas e sugerindo a participação de complexos DNA-Hlp na ativação da resposta imune induzida pelo *M. leprae*;
- A inibição do receptor TLR-9 diminuiu os níveis de IL-8 produzidos pelas células epiteliais alveolares em resposta ao *M. leprae*, indicando que este receptor pode estar envolvido no reconhecimento do bacilo;

- O oligonucleotídeo CpG, quando adicionado ao *M. smegmatis* selvagem, potencializou a secreção de IL-8 nas células epiteliais alveolares, sendo que este efeito não foi observado com a cepa de *M. smegmatis* mutante para o gene *hlp*. Estes resultados indicam que a proteína Hlp constitui um componente essencial de ligação de DNA na superfície micobacteriana e sugerem a presença de complexos DNA-Hlp na parede celular bacteriana;

- A Hlp purificada de *M. leprae* mostrou capacidade de se ligar a diferentes tipos de colágeno (I, III, IV e VI), proteína encontrada em abundância na matriz extracelular de células eucarióticas, podendo facilitar o acesso de complexos DNA-Hlp a compartimentos endossomais onde o TLR-9 se encontra;

Os resultados apresentados na primeira parte do presente estudo sugerem que o receptor TLR-9 participa da ativação da resposta imune inata em células epiteliais alveolares infectadas com *M. leprae*, e que a proteína Hlp teria potencial de agir, quando combinada a DNA, como adjuvante em intervenções imunes contra a hanseníase, como na vacinação intranasal.

## **Parte 2:**

- A expressão aumentada de TLR-9 em lesões de pele e em PBMCs de pacientes BL e LL reacionais (ENH) em comparação aos não reacionais sugere um importante envolvimento deste receptor no desenvolvimento da reação tanto a nível local como sistêmico;

- Além da presença de DNA de *M. leprae*, altos níveis de Hlp foram detectados no soro de pacientes reacionais (ENH) quando comparados a pacientes não reacionais e indivíduos saudáveis, sugerindo a presença de complexos DNA-Hlp micobacterianos circulantes capazes de induzir a ativação da resposta imune desencadeada na reação;

- Altos níveis de complexos DNA-histona humanos foram identificados no soro de pacientes reacionais (ENH) quando comparados a pacientes não reacionais

e indivíduos saudáveis, sugerindo a participação destes complexos na amplificação da resposta inflamatória característica do ENH;

- PBMCs isoladas de pacientes reacionais (ENH) secretaram níveis maiores de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  em resposta ao complexo CpG-Hlp que células isoladas de pacientes não reacionais e indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que o receptor TLR-9 desempenha um papel central na resposta celular ao *M. leprae* durante o ENH;

- O uso do antagonista para TLR-9 inibiu a secreção das citocinas pró-inflamatórias em PBMCs de pacientes reacionais (ENH) em resposta ao lisado de *M. leprae*. Este dado reforça a participação do receptor TLR-9 no aumento da produção de citocinas promovido por moléculas do *M. leprae* durante o ENH;

Os resultados descritos na segunda parte do trabalho sugerem um importante envolvimento do receptor TLR-9 no processo inflamatório desencadeado no ENH e que o uso de inibidores deste receptor pode se tornar uma alternativa de tratamento eficiente para a reação, bloqueando a produção excessiva de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, prevenindo o dano ao nervo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 2008. 6ª ed. Ed. Elsevier;

Abdallah M, Attia EA, Saad AA, El-Khateeb EA, Lotfi RA, Abdallah M, El-Shennawy D. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T regs cells. *Exp Dermatol*. 2014. 23(10):742-7;

Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*. 2006. 24(26):5452-60;

Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011. 12;366(1579):2748-55;

Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domenech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, Kobayashi K. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem*. 2004. 279(38):39798-806;

Attia EA, Abdallah M, El-Khateeb E, Saad AA, Lotfi RA, Abdallah M, El-Shennawy D. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4(+) CD25(high)FoxP3(+) T-regs cells, as well as down regulatory cytokines. *Arch Dermatol Res*. 2014. 306(9):793-801;

Baeza I, Wong-Baeza C, Valerdi E, Serafin-Lopez J, Ibáñez M, Estrada-Parra S, Wong C, Estrada-Garcia I. Lepromatous leprosy patients produce antibodies that recognise non-bilayer lipid arrangements containing mycolic acids. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012. 107 Suppl 1:95-103;

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR-9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR-2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2005. 202(12):1715-24;

Bahar AA, Ren D. *Antimicrobial peptides*. Pharmaceuticals (Basel). 2013. 28;6(12):1543-75;

Bamboot ZM, Balachandran VP, Ocuin LM, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 2010. 51(2):621-32;

Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect Immun*. 1992. 60(4):1441-6;

Barr J. A short history of dapsone, or an alternative model of drug development. *J Hist Med Allied Sci.* 2011. 66(4):425-67;

Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005. 17;202(8):1131-9;

Becker S, Harris DT, Koren HS. Characterization of normal human lung lymphocytes and interleukin-2-induced lung T cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990. 3(5):441-8;

Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev.* 2007. 78(3):223-30;

Bhagirath VC, Dwivedi DJ, Liaw PC. Comparison of the Pro-Inflammatory and Pro-Coagulant Properties of Nuclear, Mitochondrial, and Bacterial DNA. *Shock.* 2015;

Carvalho NB, Oliveira FS, Durães FV, de Almeida LA, Flório M, Prata LO, Caliarri MV, Appelberg R, Oliveira SC. Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to *Mycobacterium avium* infection but plays no role in induction of Th1 responses. *Infect Immun.* 2011. 79(4):1638-46;

Caselli E, Benedetti S, Grigolato J, Caruso A, Di Luca D. Activating transcription factor 4 (ATF4) is upregulated by human herpesvirus 8 infection, increases virus replication and promotes proangiogenic properties. *Arch Virol.* 2012. 157(1):63-74;

Cepika AM, Soldo Jureša D, Morović Vergles J, Malenica B, Santak M, Kapitanović S, Mayer M, Anić B, Sentić M, Gagro A. Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. *Cell Immunol.* 2012. 276(1-2):196-203;

Chiffolleau E, Heslan JM, Heslan M, Louvet C, Condamine T, Cuturi MC. TLR-9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. *Int Immunol.* 2007. 19(2):193-201;

Cho SO, Lim JW, Kim H. Red ginseng extract inhibits the expression of MCP-1 and iNOS in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells by suppressing the activation of NADPH oxidase and Jak2/Stat3. *J Ethnopharmacol.* 2013. 25;150(2):761-4;

Chuquimia OD, Petursdottir DH, Rahman MJ, Hartl K, Singh M, Fernández C. The role of alveolar epithelial cells in initiating and shaping pulmonary immune responses: communication between innate and adaptive immune systems. *PLoS One.* 2012. 7(2):e32125;

Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S.V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C.E. III; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, T.; Chillingworth, D.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Fetwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M.A.; Rajandream, M.A.; Rogers, J.; Rutter, J; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J.E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B.G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998. 393: 537-544;

Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S.V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C.E. III; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, T.; Chillingworth, D.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Fetwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M.A.; Rajandream, M.A.; Rogers, J.; Rutter, J; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J.E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001. 22:1007-1011;

Corbière V, Dirix V, Norrenberg S, Cappello M, Rimmelink M, Mascart F. Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respir Res*. 2011. 24;12:15;

Cunningham AC, Kirby JA. Regulation and function of adhesion molecule expression by human alveolar epithelial cells. *Immunology*. 1995. 86(2):279-86;

Das T, Kutty SK, Kumar N, Manefield M. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS One*. 2013. 8(3):e58299;

Dass CR. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med (Berl)*. 2004. 82(9):579-91;

Dias AA, Raze D, de Lima CS, Marques MA, Drobecq H, Debie AS, Ribeiro Guimarães ML, Biet F, Pessolani MC. Mycobacterial laminin-binding histone like protein mediates collagen-dependent cytoadherence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012. 107 Suppl 1:174-82;

Dou J, Wang Y, Yu F, Yang H, Wang J, He X, Xu W, Chen J, Hu K. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice by DNA vaccine Ag85A-ESAT-6-IL-21 priming and BCG boosting. *Int J Immunogenet*. 2012 Apr;39(2):183-90;

Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Frémond C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B. Toll-like receptor 2 deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol*. 2004. 164(1):49-57;

Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res.* 2005. 6:1;

Drowart A, Huygen K, Launois P, Jann E, Nyabenda J, van Vooren JP. IgG humoral response against the antigen 85 complex homologues in leprosy. *Scand J Immunol.* 1994. 40(6):643-7;

Fernando SL, Britton WJ. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol Cell Biol.* 2006. 84(2):125-37;

Foss NT. Episódios reacionais na hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2003. 36:453-459;

Franklin BS, Ishizaka ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, Zheng W, Ataíde MA, de Oliveira RB, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011. 1;108(9):3689-94;

Fremond CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest.* 2004. 114(12):1790-9;

Furugen M, Matsumoto S, Matsuo T, Matsumoto M, Yamada T. Identification of the mycobacterial DNA-binding protein 1 region which suppresses transcription *in vitro*. *Microb Pathog.* 2001. 30(3):129-38;

Gallo MEN, Alvin MFS, Nery JAC, Albuquerque ECA. Estudo comparativo com dois esquemas poliquimioterápicos (duração fixa) em hansenianos multibacilares – Seguimento de  $50.32 \pm 19.62$  e  $39.70 \pm 19.47$  meses. *Hansen Int.* 1997. 22:5-14;

Gallo MEN, Sampaio E, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora; 2005. p.1383-1394;

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, Punaro M, Baisch J, Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ, Banchereau J, Pascual V. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011. 9;3(73):73ra20;

Guerra JG, Penna GO, Castro LC, Martelli CM, Stefani MM, Costa MB. Erythema nodosum leprosum case series report: clinical profile, immunological basis and treatment implemented in health services. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2004. 37(5):384-90;

Guiducci C, Coffman RL, Barrat FJ. Signalling pathways leading to IFN alpha production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *J Intern Med*. 2009. 265(1):43-57;

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003. 278(11):8869-72;

Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002. 35(4):365-75;

Gowda NM, Wu X, Gowda DC. The nucleosome (histone-DNA complex) is the TLR-9-specific immunostimulatory component of *Plasmodium falciparum* that activates DCs. *PLoS One*. 2011. 6(6):e20398;

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982. 126(1):131-8;

Han Y, Bo ZJ, Xu MY, Sun N, Liu DH. The Protective Role of TLR-3 and TLR-9 Ligands in Human Pharyngeal Epithelial Cells Infected with Influenza A Virus. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014. 18(3):225-31;

Harboe M. Leprosy at a turning point? *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000. 68(3):312-8;

Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2004. 72(1):35-44;

Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(10):3963-7;

Hoque R, Farooq A, Malik A, Trawick BN, Berberich DW, McClurg JP, Galen KP, Mehal W. A novel small-molecule enantiomeric analogue of traditional (-)-morphinans has specific TLR9 antagonist properties and reduces sterile inflammation-induced organ damage. *J Immunol*. 2013. 190(8):4297-304;

Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galić S. Commonly administered BCG strains including an evolutionarily early strain and evolutionarily late strains of disparate genealogy induce comparable protective immunity against tuberculosis. *Vaccine*. 2009. 27(3):441-5;

Hsiao HB, Chou AH, Lin SI, Chen IH, Lien SP, Liu CC, Chong P, Liu SJ. Toll-like receptor 9-mediated protection of enterovirus 71 infection in mice is due to

the release of danger-associated molecular patterns. *J Virol*. 2014. 88(20):11658-70;

Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, Liao X, Billiar T, Xu J, Esmon CT, Tsung A. Endogenous histones function as alarmins in sterile inflammatory liver injury through Toll-like receptor 9 in mice. *Hepatology*. 2011. 2;54(3):999-1008;

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol*. 1981. 147(3):728-35;

Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Sandor M, Lukacs NW, Chensue SW, Kunkel SL. TLR-9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4. *J Clin Invest*. 2009. 119(1):33-46;

Iyer A, Hatta M, Usman R, Luiten S, Oskam L, Faber W, Geluk A, Das P. Serum levels of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, soluble interleukin-6R and soluble cell activation markers for monitoring response to treatment of leprosy reactions. *Clin Exp Immunol*. 2007. 150(2):210-6;

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2008. 78(3):518-21;

József L, Khreiss T, El Kebir D, Filep JG. Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol*. 2006. 15;176(2):1195-202;

Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. 10<sup>a</sup> Ed. 2003. Ed Lange Medical Books McGraw-Hill;

Kahawita IP, Lockwood DN. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008. 102(4):329-37;

Kaufmann SH, Golecki JR, Kazda J, Steinhoff U. T lymphocytes, mononuclear phagocytes, Schwann cells and *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol*. 1989. 7 Suppl 1:141-8;

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1971. 39(3):693-702;

Kisich KO, Heifets L, Higgins M, Diamond G. Antimycobacterial agent based on mRNA encoding human beta-defensin 2 enables primary macrophages to restrict growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 2001. 69(4):2692-9;

Knuefermann P, Baumgarten G, Koch A, Schwederski M, Velten M, Ehrentraut H, Mersmann J, Meyer R, Hoeft A, Zacharowski K, Grohé C. CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation *in vivo*. *Respir Res*. 2007. 9;8:72;

Kohama H, Umemura M, Okamoto Y, Yahagi A, Goga H, Harakuni T, Matsuzaki G, Arakawa T. Mucosal immunization with recombinant heparin binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) in infected mice. *Vaccine*. 2008. 26(7):924-32;

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002. 20:709-60;

Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol*. 2004. 16(1):35-41;

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, Liu PT, Cole ST, Godowski PJ, Maeda Y, Sarno EN, Norgard MV, Brennan PJ, Akira S, Rea TH, Modlin RL. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003. 9(5):525-32;

Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR-9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008. 60(7):795-804;

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. Effects of purification and fluorescent staining on viability of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2005. 73(3):194-202;

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR-9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*. 2004. 5(2):190-8;

Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, Burdick A, Sarno EN, Rea TH, Modlin RL. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis*. 2010. 15;201(4):558-69;

Lefrançois LH, Pujol C, Bodier CC, Teixeira-Gomez AP, Drobecq H, Rosso ML, Raze D, Dias AA, Hugot JP, Chacon O, Barletta RG, Loch C, Vidal Pessolani MC, Biet F. Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease. *Microbes Infect*. 2011. 13(6):585-94;

Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR-9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol*. 2004. 173(2):1179-83;

Li R, Song Y, Chen W. Enhancing radiosensitivity of human pulmonary adenocarcinoma cell line A549 by CpG ODN1826. *Cancer Biother Radiopharm*. 2011. 26(1):69-76;

Lima CS, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, Menozzi FD, Ottenhoff TH, Brennan PJ, Pessolani MC. Mapping the laminin binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. *Microbes Infect*. 2005. 7(9-10):1097-109

Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. 1998. 66(3):1121-6;

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001. 25(4):402-8;

Lloyd GM, Draper P. Separation of *Mycobacterium leprae* from contamination with armadillo-liver-derived "pigment" particles. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1986. 54(4):578-83;

MacRedmond R, Greene C, Taggart CC, McElvaney N, O'Neill S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir Res*. 2005. 12;6:116;

Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1999. 67(3):270-8;

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

Marques MAM, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Vidal Pessolani MC. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes Infect*. 2000. 2(12):1407-17;

Marques PE, Oliveira AG, Pereira RV, David BA, Gomides LF, Saraiva AM, Pires DA, Novaes JT, Patricio DO, Cisalpino D, Menezes-Garcia Z, Leevy WM, Chapman SE, Mahecha G, Marques RE, Guabiraba R, Martins VP, Souza DG, Mansur DS, Teixeira MM, Leite MF, Menezes GB. Hepatic DNA deposition drives drug-induced liver injury and inflammation in mice. *Hepatology*. 2015. 61(1):348-60;

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect*. 2011. 17(11):1653-8;

Martiniuk F, Giovinazzo J, Tan AU, Shahidullah R, Haslett P, Kaplan G, Levis WR. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. *J Drugs Dermatol*. 2012. 11(5):626-30;

Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Bühner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010. 76(5):579-87;

Massone C, Belachew WA, Schettini A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clin Dermatol*. 2015. 33(1):38-45;

Massone C, Nunzi E, Ribeiro-Rodrigues R, Talhari C, Talhari S, Schettini AP, Parente JN, Brunasso AM, Puntoni M, Clapasson A, Noto S, Cerroni L. T regulatory cells and plasmacytoid dendritic cells in hansen disease: a new insight into pathogenesis? *Am J Dermatopathol*. 2010. 32(3):251-6;

Mathew JM, Muthukkaruppan V. Class-specific immunoglobulins and antibodies to mycobacterial sonicates and autoantigens in leprosy patients and contacts. *Microb Pathog*. 1993. 15(5):367-76;

Matsumoto S, Furugen M, Yukitake H, Yamada T. The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDPI) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol Lett*. 2000. 15;182(2):297-301;

Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T, Hirayama Y, Yamamoto S, Yamada T, Kobayashi K. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol*. 2005. 1;175(1):441-9;

Matsumoto S, Yukitake H, Furugen M, Matsuo T, Mineta T, Yamada T. Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Microbiol Immunol*. 1999;43(11):1027-36;

Mattos KA, Oliveira VG, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol*. 2011. 1;187(5):2548-58;

May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today*. 1998. 19(2):80-8;

Mayer AK, Dalpke AH. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007. 55(6):353-62;

Medeiros MF, Rodrigues MM, Vital RT, da Costa Nery JA, Sales AM, de Andrea Hacker M, Ferreira H, Chimelli L, Sarno EN, Antunes SL. CXCL10, MCP-1, and

other immunologic markers involved in neural leprosy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015. 23(3):220-9;

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*. 1997. 31;91(3):295-8;

Méndez-Samperio P, Miranda E, Trejo A. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulates human beta-defensin-2 gene transcription in human epithelial cells. *Cell Immunol*. 2006. 239(1):61-6;

Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Feldman C, Wilson R. Investigation of mycobacterial colonisation and invasion of the respiratory mucosa. *Thorax*. 2003. 58(3):246-51;

Ministério da Saúde; 2009. *In*: <http://portal.saude.gov.br>;

Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8. ed. rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010;

Misch EA, Berrington WR, Vary JC Jr, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2010. 74(4):589-620;

Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, Singh S, Colston MJ, Nath I. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology*. 1995. 86(1):97-103;

Modlin RL, Gebhard JF, Taylor CR, Rea TH. *In situ* characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. *Clin Exp Immunol*. 1983. 53(1):17-24;

Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994. 102(6):828-32;

Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*. 2010. 105:1-24;

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 1999. 50(5):541-9;

Moran CJ, Ryder G, Turk JL, Waters MF. Evidence for circulating immunocomplexes in lepromatous leprosy. *Lancet*. 1972. 16;2(7777):572-3;

Murphy GF, Sanchez NP, Flynn TC, Sanchez JL, Mihm MC Jr, Soter NA. Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. *J Am Acad Dermatol*. 1986. 14(1):59-69;

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol*. 2007. 1;178(1):338-44;

Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, Misra RS, Ramesh V. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. *Immunol Lett*. 2000. 1;75(1):69-76;

Nery JA, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira Sde S, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2013. 88(5):787-92;

Nery JAC. Reação na Hanseníase: uma descrição epidemiológica [tese]. Niterói: Universidade Federal Fluminense. 1995. p. 129;

Nery JAC, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MR, Machado AM. Contribution to diagnosis and management of reactional states: a practical approach. *An Bras Dermatol*. 2006. 81(4):367-75;

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998. 40(6):363-70;

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000. 27;103(3):511-24;

Noordeen SK, Lopez Bravo L, Sundaresan TK. Estimated number of leprosy cases in the world. *Bull World Health Organ*. 1992. 70(1):7-10;

Ochieng NA, Bwire MS, Orege PA, Nyawalo JO, K'Omollo JW. Autoantibodies in lepromatous leprosy. . *Afr J Health Sci*. 1994. 1(2):79-83;

Oliveira ML, Arêas AP, Ho PL. Intranasal vaccines for protection against respiratory and systemic bacterial infections. *Expert Rev Vaccines*. 2007. 6(3):419-29;

Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JA, Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol*. 1999. 65(3):364-71;

Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011. 45(2):189-201;

- Parra M, Pickett T, Delogu G, Dheenadhayalan V, Debie AS, Loch C, Brennan MJ. The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin is a protective antigen in the mouse aerosol challenge model of tuberculosis. *Infect Immun*. 2004. 72(12):6799-805;
- Pfaltzgraff, R.E., Ramu, G. Clinical leprosy, in: Hastings, R.C. (Ed), *Leprosy*. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1994. pp. 237—290;
- Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. *Mycobacterium leprae*-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol*. 2011. 6(2):217-30;
- Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Bamboat ZM, DeMatteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med*. 2008. 9;205(6):1277-83;
- Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol*. 2004. 15;173(2):1219-23;
- Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, Lockwood DN. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg*. 2006. 74(5):868-79;
- Pompei L, Jang S, Zamlynny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP, Salgame P. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol*. 2007. 15;178(8):5192-9;
- Portugal MI, Todeschini AR, de Lima CS, Silva CA, Mohana-Borges R, Ottenhoff TH, Mendonça-Previato L, Previato JO, Pessolani MC. Characterization of two heparin sulphate-binding sites in the mycobacterial adhesion Hlp. *BMC Microbiol*. 2008. 15;8:75;
- Poth JM, Coch C, Busch N, Boehm O, Schlee M, Janke M, Zillinger T, Schildgen O, Barchet W, Hartmann G. Monocyte-mediated inhibition of TLR-9-dependent IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells questions bacterial DNA as the active ingredient of bacterial lysates. *J Immunol*. 2010. 15;185(12):7367-73;
- Pott J, Basler T, Duerr CU, Rohde M, Goethe R, Hornef MW. Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2009. 11(12):1802-15;
- Prabhakar S, Annapurna PS, Jain NK, Dey AB, Tyagi JS, Prasad HK. Identification of an immunogenic histone-like protein (HLPMt) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*. 1998. 79(1):43-53;

Pradhan V, Badakere SS, Shankar Kumar U. Increased incidence of cytoplasmic ANCA (cANCA) and other autoantibodies in leprosy patients from western India. *Lepr Rev.* 2004. 75(1):50-6;

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell.* 1997. 21;88(6):811-21;

Rao TD, Rao PR. Enhanced cell-mediated immune responses in erythema nodosum leprosum reactions of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1987. 55(1):36-41;

Ray R, Mondal RK, Pathak S. Diagnosis of erythema nodosum leprosum (type 2 reaction) by cytology. *Acta Cytol.* 2014. 58(1):29-32;

Ridley DS. Skin biopsy in leprosy. Documenta Geigy, 3rd edition. CIBA-GEIGY Limited. Basle, Switzerland. 1990;

Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2005. 204:27-42;

Ridley DS. Reactions in leprosy. *Lepr Rev.* 1969. 40(2):77-81;

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966. 34(3):255-73;

Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, Diamond G, Klein-Patel ME, Hernandez-Pando R, Ellner JJ, Sada E. Human beta-defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 2005. 73(8):4505-11;

Rodrigues LC, Kerr-Pontes LR, Frietas MV, Barreto ML. Long lasting BCG protection against leprosy. *Vaccine.* 2007 Sep 28;25(39-40):6842-4;

Ronan EO, Lee LN, Beverley PC, Tchilian EZ. Immunization of mice with a recombinant adenovirus vaccine inhibits the early growth of *Mycobacterium tuberculosis* after infection. *PLoS One.* 2009. 9;4(12):e8235;

Roy S, Sharma S, Sharma M, Aggarwal R, Bose M. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an *in vitro* correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 2004. 112(3):471-80;

Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013. 25;7(7):e2338;

Saltini C, Hemler ME, Crystal RG. T lymphocytes compartmentalized on the epithelial surface of the lower respiratory tract express the very late activation antigen complex VLA-1. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988. 46(2):221-33;

Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degraeve WM. Use of PCR mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol.* 1993. 39(4):298-304;

Santos DO, Suffys PN, Bonifácio K, Marques MA, Sarno EN. *In vitro* tumor necrosis factor production by mononuclear cells from lepromatous leprosy patients and from patients with erythema nodosum leprosum. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993. 67(3 Pt 1):199-203;

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol.* 1991. 84(1):103-8;

Scanga CA, Bafica A, Feng CG, Cheever AW, Hieny S, Sher A. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun.* 2004. 72(4):2400-4;

Schurr E, Alcaïs A, de Léséleuc L, Abel L. Genetic predisposition to leprosy: A major gene reveals novel pathways of immunity to *Mycobacterium leprae*. *Semin Immunol.* 2006. 18(6):404-10;

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006. 19(2):338-81;

Sehgal VN, Gautam RK, Sharma VK. Immunoprofile of reactions in leprosy. *Int J Dermatol.* 1986. 25(4):240-4;

Sharma M, Sharma S, Roy S, Varma S, Bose M. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol.* 2007. 85(3):229-37;

Shen H, Liu C, Shao P, Yi L, Wang Y, Mills Ko E, Tian Z, Zhao X, Wang J, Xing L, Zhang X. Enhanced phenotypic alterations of alveolar type II cells in response to Aflatoxin G1-induced lung inflammation. *J Cell Physiol.* 2015. 230(6):1199-211;

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med.* 1960. 1;112(3):445-54;

Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr.* 1962. 30:291-306;

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

Shi S, Nathan C, Schnappinger D, Drenkow J, Fuortes M, Block E, Ding A, Gingeras TR, Schoolnik G, Akira S, Takeda K, Ehrt S. MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon-gamma yet mediates few responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 2003. 198(7):987-97;

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96(17):9857-62;

Sieling PA, Modlin RL. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Ann N Y Acad Sci.* 1994. 730:42-52;

Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, Rodrigues LS, Oliveira AV, Bermudez LE, Pessolani MC. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.* 2013. 81(7):2645-59;

Silva MT, Macedo PM, Portaels F, Pattyn SR. Correlation viability/morphology in *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol.* 1984. 2(2-4):281-91;

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

Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology.* 1998. 95(4):529-36;

Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, Scollard DM. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis.* 2009. 9:75;

Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T, Oomoto Y, Onozaki K. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993. 61(4):609-18;

Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest.* 1995. 95(3):1370-6;

Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res.* 2002. 294(8):355-62;

- Tengroth L, Millrud CR, Kvarnhammar AM, Kumlien Georén S, Latif L, Cardell LO. Functional effects of Toll-like receptor (TLR)3, 7, 9, RIG-I and MDA-5 stimulation in nasal epithelial cells. PLoS One. 2014. 2;9(6):e98239;
- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. J Natl Cancer Inst. 1984. 72(4):955-62;
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia – Artmed. Rio de Janeiro. 2005;
- Trevani AS, Chorny A, Salamone G, Vermeulen M, Gamberale R, Schettini J, Raiden S, Geffner J. Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway. Eur J Immunol. 2003. 33(11):3164-74;
- Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2001. 69(1):1-12;
- Tyne AS, Chan JG, Shanahan ER, Atmosukarto I, Chan HK, Britton WJ, West NP. TLR2-targeted secreted proteins from *Mycobacterium tuberculosis* are protective as powdered pulmonary vaccines. Vaccine. 2013. 31(40):4322-9;
- Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. Genome Biol. 2001;2(8):REVIEWS1023;
- Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. Br Med Bull. 2006;77-78:103-21;
- Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. Cell. 2012. 150(4):803-15;
- Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, Rees RJ. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. Lancet. 1969. 1;2(7627):933-5;
- Wheeler PR, Raynes JG, McAdam KP. Autoantibodies to cerebroside sulphate(sulphatide) in leprosy. Clin Exp Immunol. 1994. 98(1):145-50;
- WHO/World Health Organization; 1998. In: <http://www.who.int>;
- WHO/World Health Organization; 2015. In: <http://www.who.int>;
- Wickremasinghe MI, Thomas LH, O'Kane CM, Uddin J, Friedland JS. Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. J Biol Chem. 2004;

- Wilder-Smith EP, Van Brakel WH. Nerve damage in leprosy and its management. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008. 4(12):656-63;
- Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. *J Immunol*. 2010. 15;184(8):4338-48;
- Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009. 15(11):1318-21;
- Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol*. 1992. 36(9):983-97;
- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991. 11;254(5029):277-9;
- Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*. 1992. 15;149(4):1470-5;
- Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R, Klinman DM, Yuen PS, Star RA. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008. 294(5):F1050-8;
- Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev*. 2000. 173:39-51;
- Zhou M, Wan HY, Huang SG, Li B, Li M. Expression of toll-like receptor 4 in human alveolar epithelial cells and its role in cellular inflammation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008. 5;88(30):2112-6;
- Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010. 238(1):247-62;
- Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol*. 2008. 190(16):5672-80.

**Artigo publicado:**

Dias AA, Raze D, de Lima CS, Marques MA, Drobecq H, Debie AS, Ribeiro Guimarães ML, Biet F, Pessolani MC. Mycobacterial laminin-binding histone like protein mediates collagen-dependent cytoadherence. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012. 107 Suppl 1:174-82.

## Mycobacterial laminin-binding histone-like protein mediates collagen-dependent cytoadherence

André Alves Dias<sup>1</sup>, Dominique Raze<sup>2, 3, 4, 5</sup>, Cristiana Soares de Lima<sup>1</sup>,  
 Maria Angela de Melo Marques<sup>6</sup>, Hervé Drobecq<sup>7</sup>, Anne-Sophie Debrie<sup>2, 3, 4, 5</sup>,  
 Michelle Lopes Ribeiro-Guimarães<sup>1</sup>, Franck Biet<sup>8</sup>, Maria Cristina Vidal Pessolani<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil <sup>2</sup>Inserm, U 1019, Lille, France  
<sup>3</sup>CNRS, UMR 8204 <sup>7</sup>CNRS, UMR 8525, Lille, France <sup>4</sup>Institut Pasteur de Lille, Centre for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France  
<sup>5</sup>Université Lille Nord de France, Lille, France <sup>6</sup>Department of Microbiology, Immunology and Patology, Colorado State University, Fort Collins, USA <sup>8</sup>INRA, UR1282, Infectiologie et Santé Publique, Centre de Tours, Nouzilly, France

*When grown in the presence of exogenous collagen I, Mycobacterium bovis BCG was shown to form clumps. Scanning electron microscopy examination of these clumps revealed the presence of collagen fibres cross-linking the bacilli. Since collagen is a major constituent of the eukaryotic extracellular matrices, we assayed BCG cytoadherence in the presence of exogenous collagen I. Collagen increased the interaction of the bacilli with A549 type II pneumocytes or U937 macrophages, suggesting that BCG is able to recruit collagen to facilitate its attachment to host cells. Using an affinity chromatography approach, we have isolated a BCG collagen-binding protein corresponding to the previously described mycobacterial laminin-binding histone-like protein (LBP/Hlp), a highly conserved protein associated with the mycobacterial cell wall. Moreover, Mycobacterium leprae LBP/Hlp, a well-characterized adhesin, was also able to bind collagen I. Finally, using recombinant fragments of M. leprae LBP/Hlp, we mapped the collagen-binding activity within the C-terminal domain of the adhesin. Since this protein was already shown to be involved in the recognition of laminin and heparan sulphate-containing proteoglycans, the present observations reinforce the adhesive activities of LBP/Hlp, which can be therefore considered as a multifaceted mycobacterial adhesin, playing an important role in both leprosy and tuberculosis pathogenesis.*

Key words: mycobacteria - cytoadherence - collagen - histone-like protein - leprosy - tuberculosis

Despite decades of investigations, tuberculosis and leprosy caused by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*, respectively, still represent major threats to human health. If *M. leprae* is a major concern in developing countries with an incidence of about 230.000 new cases per year (WHO 2010a), *M. tuberculosis* remains the world's leading cause of death due to a single infectious agent with 1.5 million deaths annually (WHO 2010b). Although these two bacterial species display different tropisms for human tissues, they both trigger infections characterized by a systemic dissemination step which requires specific interactions of the pathogen with host cell (Pessolani et al. 2003). The mechanisms responsible for the systemic mycobacterial dissemination remain poorly understood and their deciphering constitutes a major challenge since it may lead to the development of new prophylactic and/or therapeutic strategies. To better understand the molecular interplay between mycobacteria and host cells, we have initiated investigations dealing with the identification and characteriza-

tion of mycobacterial adhesins that interact with human host cells. These studies led us to identify a 22-kDa surface-exposed heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) which is involved in the interaction of *M. tuberculosis* and *M. leprae* with epithelial cells, but not with professional phagocytes (Menozzi et al. 2006, Lima et al. 2009). In addition, HBHA which binds heparan sulphate-containing receptors through its C-terminal lysine-rich domain (Delogu & Brennan 1999, Pethe et al. 2000) has been shown to be required for extrapulmonary dissemination (Pethe et al. 2001, Mueller-Ortiz et al. 2002). Recently, HBHA was shown to trigger receptor-mediated transcytosis, suggesting that mycobacteria may disseminate via a direct passage through an epithelial barrier (Menozzi et al. 2006). Besides HBHA, the histone-like protein (Hlp) has also been implicated in the attachment of pathogenic mycobacteria to host cells. Mycobacterial Hlp, a positively-charged, surface-exposed molecule with roughly twice the size of other bacterial Hlps, is a highly conserved protein shared by all mycobacterial species (Lefrançois et al. 2011). This protein was initially described as a laminin-binding protein (LBP) involved in *M. leprae*-Schwann cell (SC) interaction (Shimoji et al. 1999, Marques et al. 2000). More recently LBP/Hlp has been shown to also play a major role in mediating the adhesion of mycobacteria to epithelial respiratory cells by interacting with proteoglycan-containing receptors such as heparan sulphate and hyaluronic acid (HA) (Aoki et al. 2004, Lefrançois et al. 2011).

Financial support: FIOCRUZ/PAPES III, INSERM, Institut Pasteur de Lille

+ Corresponding author: cpessola@ioc.fiocruz.br

Received 31 March 2012

Accepted 17 July 2012

Because collagenous proteins are the major constituents of the extracellular matrices of epithelial cells and may serve as receptors for bacterial adherence (Kreis & Vale 1993), we have conducted experiments to know whether mycobacteria may directly interact with collagen. In the present study, we show that *Mycobacterium bovis* BCG grown in the presence of exogenous collagen I forms clusters. In addition, cytoadherence assays have revealed that the interaction of *M. bovis* BCG with pneumocytes and macrophages is increased in the presence of exogenous collagen or following a pretreatment of the mycobacteria with collagen. These observations indicated that *M. bovis* BCG is able to recruit collagen, suggesting the presence of a surface-exposed collagen-binding receptor. This receptor has been purified by affinity chromatography and demonstrated to be the LBP/Hlp protein. Finally, we mapped the collagen-binding activity of LBP/Hlp within the C-terminal domain of the protein.

#### MATERIALS AND METHODS

**Mycobacterial strains and growth conditions** - *M. bovis* BCG (strain 1173P2, World Health Organization, Stockholm, Sweden) was grown at 37°C in tissue culture grade Roux flasks (Nunc) using Sauton medium supplemented or not with type 1 calf skin collagen (Collagen S, Roche, Mannheim, Germany) at the concentration of 25 µg/mL. *Mycobacterium smegmatis* wild-type (wt) mc<sup>2</sup>155 and the mutant for the *hlp* gene ( $\Delta hlp$ ) were kindly provided by Thomas Dick of Singapore University, Singapore. The mutant was generated as previously described by Lee et al. (1998). Both of the strains were grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 10% albumin, dextrose and NaCl (ADC) and 0.05% Tween-80 and 0.5% glycerol under agitation. Mycobacteria were acid-fast stained by the Kinyoun method and visualised under light microscope.

**Mycobacterial adherence assays** - Exponentially-growing *M. bovis* BCG (OD<sub>600</sub> of 0.4) were collected by low-speed centrifugation (6.500 g for 10 min at 4°C) and carefully resuspended in 50 mM Tris-HCl (pH 7.3) containing 150 mM NaCl [Tris buffered saline (TBS)]. The mycobacterial cytoadherence was then assayed as described previously (Menozzi et al. 1996) using A549 cells (human type II pneumocytes; ATCC, CCL 185) or U937 cells (human macrophages; ATCC, CCL 1593) grown in 24-well tissue culture trays. The adherence assays were performed at a multiplicity of infection of 10 in the absence or the presence of increasing concentrations of type 1 collagen. Following 2 h of incubation at 37°C, the cells were washed three times with TBS, lysed by adding 1 mL distilled water containing 0.05% (wt/vol) sodium deoxycholate and serial dilutions were plated onto 7H11 medium for colony forming units (CFUs) counting. Cytoadherence is expressed as the percentage of CFUs present in the inoculum that remain associated with target cells after the washing step. To investigate the effect of trypsin or collagen pretreatment on the *M. bovis* BCG cytoadherence, the bacteria were incubated for 30 min. at 37°C in TBS supplemented with porcine pancreas trypsin (Sigma) or collagen I, respectively. After three washes

with TBS, the bacilli were passed five times through a 28-gauge needle to unravel possible clumps and finally submitted to the adherence assay as described above.

**Affinity chromatography on collagen-Sepharose** - Collagen I was covalently linked to CNBr-activated Sepharose 4B (Amersham) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 5 mL of gel swollen in distilled water was washed with 20 mL 1 mM HCl followed by 200 mL phosphate buffered saline (PBS) (10 mM phosphate buffer pH 7.2, 0.15 M NaCl). The gel was then resuspended in 25 mL PBS containing collagen I at the concentration of 1 mg/mL and incubated overnight at 4°C under gentle agitation. The remaining active groups were blocked by washing the gel with 200 mL 100 mM Tris-HCl pH 8.0. The collagen coupling efficiency ranged between 95-99%. Fractions containing soluble extracts of *M. bovis* BCG were prepared as described previously (Menozzi et al. 1996) and chromatographed at a flow rate of 1.5 mL/min over 5 mL of collagen-Sepharose matrix packed in a glass column (1-cm diameter) and equilibrated with PBS. At the end of the sample loading step, the gel was washed with 100 mL PBS and the bound material was eluted by a 0-1 M NaCl linear gradient in 100 mL PBS. Fractions of 1 mL were collected and their protein concentrations were determined by using the bicinchoninic acid method (Pierce) and bovine serum albumin (BSA) as a standard.

**Protein identification** - The protein band corresponding to the *M. bovis* BCG collagen-binding protein was excised from the Coomassie-stained polyacrylamide gel, washed twice with 50% acetonitrile prepared in 20 mM ammonium hydrogenocarbonate and finally digested overnight within the gel fragment using 50 ng trypsin (Promega, Madison, WI, USA). The resulting peptides were eluted, desalted with a ZIPTIP C18 column (Millipore, Billerica, MA) and spotted on a Maldi plate with 0.5 µL of freshly dissolved  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid at 5 mg/mL in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid. After drying, the spots were washed with 3 µL of 20 mM diammonium citrate pH 4.5 and mass spectrometry analyses were performed by using a matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight Voyager-DE-STR (Applied Biosystems, Palo Alto, CA). Peptides were analyzed by using the following setting parameters: positive and reflector modes, acceleration voltage of 20 kV, grid voltage of 61%, 90 ns of delayed extraction time and low mass gate 500 Da. The spectra were calibrated externally by using the [M+H]<sup>+</sup> monoisotopic ions of peptides resulting from trypsin-digested lysozyme. Database search based on the peptide masses observed was performed against the NCBI database using the MS-FIT algorithm (Protein Prospector; 128.40.158.151/mshome3.4.htm) or the ProFound algorithm (prowl.rockefeller.edu/profound\_bin/WebProFound.exe).

**Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting analysis** - SDS-PAGE was performed using a 12-15% gel and proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (ICN) or silver (Sigma). Alternately, proteins were trans-

ferred onto nitrocellulose membranes (Protran BA85, Schleicher & Schuell) as described. Immobilized proteins were probed with the 5G9 anti-rLBP/Hlp monoclonal antibody (1:1000) (Marques et al. 2000). The membranes were then washed three times with TBS/T and incubated with a goat anti-mouse alkaline phosphatase-conjugated antibody. The substrates nitro blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate were used for colour development.

**Scanning electron microscopy (SEM) - *M. bovis* BCG** grown in Sauton medium to mid log phase in the absence or the presence of 25 µg/mL collagen I were resuspended in PBS (OD<sub>600</sub> of ~1.0). The bacteria were then fixed for 5 h at room temperature (RT) in a 1.25% (v/v) glutaraldehyde solution prepared in 100 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0). A similar fixation step was applied to a collagen I solution at 50 µg/mL prepared in PBS. Next, the samples were filtered through 25 mm diameter/0.2 µm porosity Anodisc (Whatman) and the filters were rinsed five times for 10 min in 25 mL cacodylate buffer. Post-fixation was performed for 3 h in 1% OsO<sub>4</sub> solution prepared in cacodylate buffer, followed by five washes in ultrapure water. The samples underwent progressive dehydration by successive soaking in 50%, 70%, 95% and 100% ethanol. Soaking in isopentyl acetate was performed before critical point drying in CO<sub>2</sub>, using an EMSDCOPE CPD 750 apparatus. The filters were then attached to large SEM stubs and coated with gold/palladium by cathodic spreading in a Polaron E5100 coater. Sample observation and microphotographs were done in a JEOL JSM35CF scanning electron microscope, operating at a voltage of 10 kV.

**Preparation of recombinant full-length LBP/Hlp and truncated forms** - The recombinant *M. bovis* BCG LBP/Hlp protein was obtained using the same procedure previously described for cloning and expression of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* LBP/Hlp-encoding gene (Lefrançois et al. 2011). The *M. bovis* LBP/Hlp-encoding gene (GenBank accession GQ259334) was amplified by polymerase chain reaction from chromosomal DNA of *M. bovis* BCG strain 1173P2 using the *Pfu* DNA polymerase (Promega) and two synthetic oligonucleotides (Sigma) with the following sequences: 5'TATACATATGCACCACCACCA CCACCACATGAACAAAGCAGAGCTCATTGACG -3' (BCG-LBP/Hlp S) and 5'-TATAGCGGCCGCCT-ATTTGCGACCCCGAGCGG-3' (BCG-LBP/Hlp AS), containing an *Nde*I and *Not*I sites, respectively. The oligonucleotide BCG-LBP/Hlp S sequence was designed to produce a hybrid protein carrying a His-tag at the N-terminal position used for affinity purification of the recombinant protein. Recombinant full-length *M. leprae* LBP/Hlp (rLBP/Hlp) and truncated forms of the protein corresponding to the N-terminal (residues 1-110; rLBP/Hlp-N) and the C-terminal (residues 111-200; rLBP/Hlp-C) were obtained as previously described (Marques et al. 2000, Lima et al. 2005).

**Binding assays in microplates of recombinant BCG LBP/Hlp to collagen I** - To investigate the capacity of *M. bovis* BCG rLBP/Hlp to bind to collagen, 1.0 µg/mL of

collagen I (Sigma, St. Louis, MO) in 50 µL 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) was used to coat the wells of a polystyrene microplate (Corning, New York, NY). The microtitre plate was incubated overnight at 4°C. The wells were then washed with PBS and blocked for 2 h with 200 µL PBS-3% BSA at RT. After washing with PBS/0.05% Tween 20 (PBS/T), 50 µL of increasing concentrations of *M. bovis* BCG rLBP/Hlp were added to the wells and incubated at 37°C for 2 h. The wells were then rinsed with PBS/T and incubated with the anti-LBP/Hlp monoclonal antibody 5G9 (1:500) for 1 h at 37°C. After washing with PBS/T, rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma; 1:1000) was added and incubated for an additional 50 min at 37°C. Peroxidase activity was revealed with hydrogen peroxide and *o*-phenylenediamine (OPD). The reaction was stopped with HCl and read at 490 nm with a TitertekPlus microplate reader (ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, CA). Control wells coated with BSA were included in all binding assays.

**Mapping the collagen-binding site of *M. leprae* LBP/Hlp** - To monitor the binding of different types of soluble collagens to *M. leprae* rLBP/Hlp or truncated forms, 5 µg/mL of each protein in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 (50 µL) were used to coat the wells of polystyrene microplates (Corning, New York, NY). Plates were incubated overnight at 4°C. The wells were then washed with PBS and blocked for 2 h at RT with 200 µL PBS containing 2% BSA. Upon washing with PBS/T, 50 µL of increasing concentrations of biotinylated collagens I, III, IV or VI (Sigma; 0-80 µg/mL) were added to the wells and incubation was performed at RT for 2 h. The wells were rinsed with PBS/T and incubated with streptavidin-peroxidase (Pierce, Rockford, IL) at 0.5 µg/mL. Peroxidase activity was revealed with hydrogen peroxide and OPD. The reaction was stopped with HCl and read at 490 nm in a TitertekPlus microplate reader. In control wells, collagen was omitted and specific collagen-binding activity was determined by subtracting the absorbency resulting from non-specific binding detected in the control wells.

## RESULTS

**Collagen-induced agglutination of *M. bovis* BCG** - To investigate the interaction of *M. bovis* BCG with collagen, we first cultivated the mycobacteria in Sauton medium in the absence or the presence of collagen I at the concentration of 25 µg/mL. In the control culture, the mycobacteria formed a thin layer that stuck loosely to the bottom of the Roux flask and the cells were easily resuspended by repeated shakings of the flask. When collagen I was added to the culture medium, the bacterial layer was more firmly bound to the flask surface and required the use of a cell scraper to completely detach the cells. In addition, once in suspension the mycobacteria were not evenly dispersed, but most of them remained agglutinated in small clumps. To examine the structure of these clumps, mycobacteria were observed by SEM. As shown in Fig. 1A and Supplementary data, *M. bovis* BCG cells grown in the absence of collagen failed to form aggregates and most of the bacteria appeared isolated on the filter membrane. In contrast, large bacterial aggregates were observed using *M. bovis* BCG from

cultures performed in the presence of collagen I (Fig. 1B, Supplementary data). An amorphous and fibrillar material in contact with the bacteria was also observed within these aggregates. Because this material could represent collagen fibres cross-linked by glutaraldehyde during the sample preparation, collagen I was fixed and observed in the same conditions. Collagen appeared as long and entangled filaments exhibiting various thicknesses (Supplementary data). Since this aspect was quite similar to that of the extracellular material detected within the mycobacterial clumps, it suggests that *M. bovis* BCG may interact directly with collagen fibres.

*Exogenous collagen I increases the cytoadherence of M. bovis BCG* - Because collagen is a predominant constituent of the extracellular matrices of epithelial cells (Kreis & Vale 1993), we assayed the cytoadherence of *M. bovis* BCG in the presence of increasing collagen I concentrations ranging from 0-100 µg/mL. These assays were performed using human type II A549 pneumocytes, but also U937 human macrophages since mycobacteria display a tropism for monocyte-derived phagocytic cells (Stokes et al. 1993, Ernst 1998). As shown in Fig. 2, a dose-dependent effect was observed for both cell lines. Compared with the control, a ca. three-fold increase in adherence was observed with the A549 pneumocytes in the presence of 40 µg/mL collagen I. The use of higher collagen concentrations did not further increase the mycobacterial adherence, indicating a saturable mechanism. The effect of collagen I on the interaction of *M. bovis* BCG with U937 macrophages was also shown

to be saturable, but it appeared more pronounced since a four-fold increase in adherence was observed in the presence of 20 µg/mL collagen I.

*Pretreatment of M. bovis BCG with collagen I increases its cytoadherence* - In order to investigate the molecular mechanism leading to the increased cytoadherence of *M. bovis* BCG in the presence of exogenous collagen I, the bacilli were incubated in TBS containing 50 µg/mL collagen I prior to the cytoadherence assay. At the end of 30 min incubation at 37°C, the mycobacteria were washed twice with TBS and then assayed for their capability to adhere to A549 pneumocytes and U937 macrophages. As shown in Fig. 3, such a collagen I pretreatment induced a ca. three-fold increase in the mycobacterial adherence onto both A549 pneumocytes and U937 macrophages. This observation suggests that *M. bovis* BCG may recruit exogenous collagen which may in turn favour the attachment of the bacilli to the eukaryotic cell surface. Such a recruitment was confirmed by the SDS-PAGE analysis of *M. bovis* BCG pretreated with collagen I followed by three washing steps with TBS. Indeed, the Coomassie blue staining of the gel revealed that collagen was present in the whole-cell lysate derived from mycobacteria pretreated with collagen (data not shown). This finding indicates that collagen I binds compounds probably associated with the *M. bovis* BCG surface. Therefore, these compounds could act as adhesins through their collagen-binding activity.

*A proteinaceous M. bovis BCG compound is required for the collagen-dependent adherence* - The recruitment of collagen by *M. bovis* BCG led us to characterize the mycobacterial surface compounds involved in this activ-

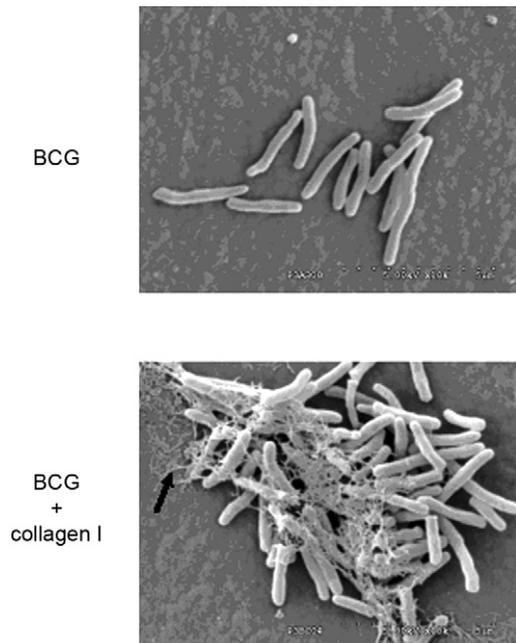


Fig. 1: *Mycobacterium bovis* BCG grown in the absence or the presence of collagen I. Bacilli grown in the absence (A) or the presence (B) of 25 µg/mL collagen I were fixed and observed by scanning electron microscopy. The arrow indicates collagen fibres that surround mycobacteria.

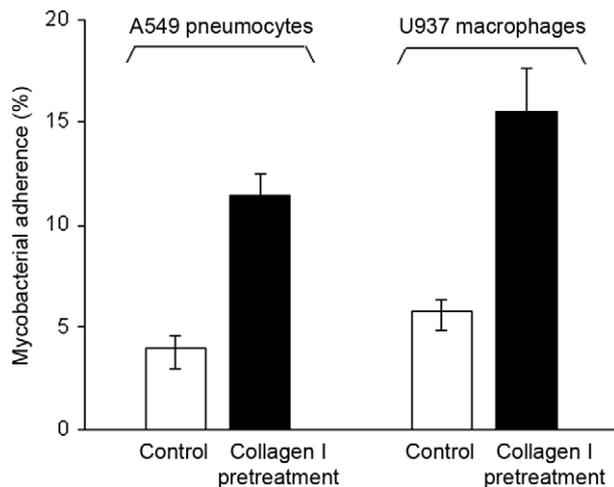


Fig. 2: effect of exogenous collagen I on the *Mycobacterium bovis* BCG interaction with pneumocytes and macrophages. Exponentially-growing bacilli were incubated for 2 h with A549 type II human pneumocytes or with human U937 macrophages using a multiplicity of infection of 10 in the presence of increasing concentrations of collagen I. After washing to remove unbound mycobacteria, colony forming units associated with both cell lines were counted by plating serial cell lysate dilutions onto 7H11 agar. The data represent averages for quadruplicate experiments and standard deviation bars are shown.

ity. We first assayed the cytoadherence of mycobacteria pretreated for 30 min with porcine pancreas trypsin at the concentrations of 0.1 or 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . These conditions were chosen because neither modified the viability of *M. bovis* BCG, as observed by CFUs determination following the trypsin pretreatment (data not shown). Pretreatment of the bacilli with trypsin at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  did not significantly modify the mycobacterial interaction with U937 macrophages, suggesting that this interaction does not mainly involve proteinaceous adhesins (Supplementary data). In contrast, such a trypsin pretreatment induced a ca. 60% reduction of the *M. bovis* BCG attachment to the A549 pneumocytes. This finding is in agreement with the fact that HBHA, which is the major epithelial adhesin produced by both *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*, exhibits a surface-exposed heparin-binding adhesive domain highly sensitive to proteolytic degradation (Pethe et al. 2002, Dupres et al. 2005). When bacilli pretreated with 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trypsin were used in the cytoadherence assay run in the presence of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  exogenous collagen I, the increase in myco-

bacterial adherence to both A549 pneumocytes and U937 macrophages was reduced by ca. 55% compared to untreated *M. bovis* BCG assayed in the presence of collagen (Supplementary data). This inhibitory effect of trypsin was confirmed by using *M. bovis* BCG pretreated with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trypsin, as shown by the complete abolition of the collagen-induced stimulation of adherence onto A549 pneumocytes and U937 macrophages. This observation suggests that *M. bovis* BCG surface proteins are involved in the collagen-dependent cytoadherence.

**LBP/Hlp binds immobilized collagen I** - In order to isolate the *M. bovis* BCG compounds that bind collagen I, exponentially-growing mycobacteria were lysed by sonication and centrifuged. Then, the centrifugation supernatant corresponding to the soluble material was collected and directly chromatographed onto a collagen I-Sepharose matrix equilibrated in PBS. Fractions corresponding to the eluted material were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting (Fig. 4A). Coomassie blue staining of the polyacrylamide gel revealed the presence of a protein exhibiting an apparent molecular weight of ca. 32 kDa. The gel band containing this protein was excised and submitted to trypsin digestion. Mass spectrometry analysis of the resulting peptides revealed peptide masses corresponding to the previously described mycobacterial LBP/Hlp. To confirm the collagen-binding capacity of BCG LBP/Hlp, the recombinant protein was successfully obtained (Supplementary data) and shown in microplate binding-assays to interact with collagen I (Fig. 4B). Finally, we cultivated *M. smegmatis* wt and  $\Delta\text{lbp/hlp}$  strains in 7H9 medium in the absence or presence of collagen I at the concentration of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . When cultures reached an  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 1.8, bacteria were fixed, acid-fast stained and visualised under light microscope. Fig. 4C shows that, as expected, the mutant strain was unable to form large clumps, in contrast to the wt strain, indicating a decrease capacity to interact with collagen fibres when compared with the wt strain. These results confirmed the direct interaction between the mycobacterial LBP/Hlp and collagen.

**Recombinant *M. leprae* LBP/Hlp binds collagen** - *M. leprae* LBP/Hlp shares 84% sequence identity with the BCG homologue and it has been characterized as an important adhesin mediating bacterial interaction with host cells (Shimoji et al. 1999, Marques et al. 2000, Lima et al. 2005, Portugal et al. 2008). Next, we then tested the capacity of recombinant *M. leprae* LBP/Hlp to bind collagen in a solid phase interaction assay. For this purpose, microplate wells were coated with *M. leprae* rLBP/Hlp and following a blocking step with BSA, increasing concentrations of biotinylated collagen I were added to the wells. The complexes were finally developed using a streptavidin-peroxidase conjugate. As shown in Fig. 5A, BSA displayed no significant collagen-binding activity for collagen I. In contrast, *M. leprae* rLBP/Hlp was demonstrated to bind collagen I in a dose-dependent and saturable manner.

**Recombinant LBP/Hlp binds different collagen types via its C-terminal domain** - The NaCl elution of *M. bovis* BCG LBP/Hlp from a chromatographic matrix bearing

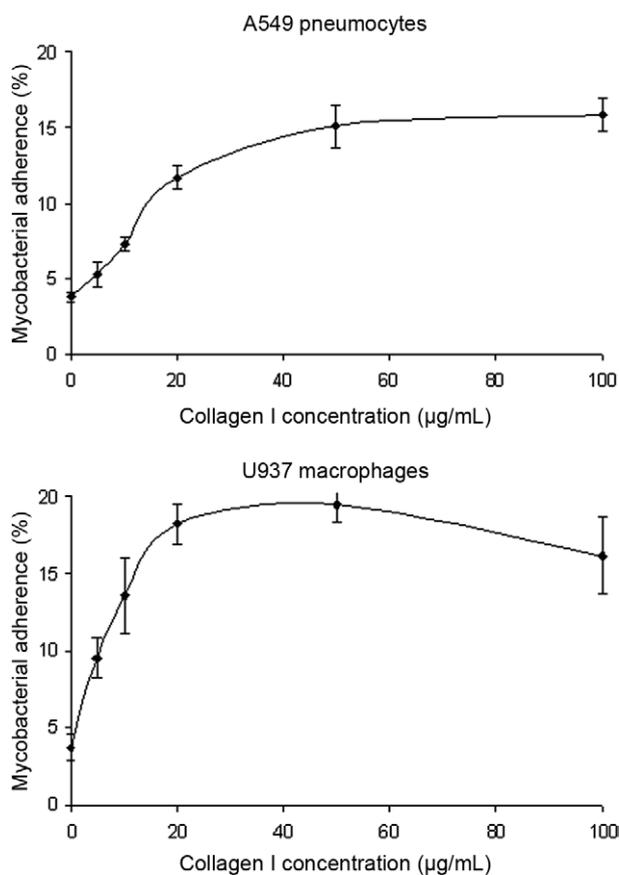


Fig. 3: effect of collagen pretreatment on the *Mycobacterium bovis* BCG cytoadherence. Exponentially-growing *M. bovis* BCG were pretreated or not with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  collagen I and then assayed for their interaction with A549 pneumocytes or U937 macrophages using a multiplicity of infection of 10. Colony forming units associated with target cells were counted by plating serial cell lysate dilutions on 7H11 agar. The data with standard deviations represent averages for quadruplicate experiments.

covalently immobilized collagen I suggested that ionic interactions were more likely involved in the adhesin interaction with collagen. The C-terminal half of LBP/Hlp is highly positively charged and exhibits homology with the eukaryotic class H1 histones (Lee et al. 1998, Prabhakar et al. 1998). In a recent investigation, we have used truncated recombinant *M. leprae* LBP/Hlp molecules corresponding to the N-terminal (residues 1-110, rLBP/Hlp-N) or the C-terminal (residues 111-200, rLBP/Hlp-C) domains and showed that the C-terminal half of the protein constitutes the major laminin and heparin-binding site of the adhesin (Lima et al. 2005, Portugal et al. 2008). We then tested if the C-terminal domain of LBP/Hlp was the collagen-interacting site of the protein. For this purpose,

we assayed the collagen-binding activity of the *M. leprae* LBP/Hlp truncated forms which were previously shown to coat microplate wells with identical efficiencies (Lima et al. 2005). Fig. 5A shows overlapping of the collagen I-binding curves obtained with rLBP/Hlp and rLBP/Hlp-C, while no collagen I-binding activity was observed using rLBP/Hlp-N. This finding indicates that the interaction of LBP/Hlp with collagen I is mediated by the C-terminal half of the adhesin. In contrast, rLBP/Hlp-N displayed very limited binding capacity to collagen I. Finally, we next tested the capacity of full-length rLBP/Hlp and truncated forms to bind to other collagen types. As shown in Fig. 5B, the rLBP/Hlp and rLBP/Hlp-C were also able to significantly bind collagens III, IV and VI. These results

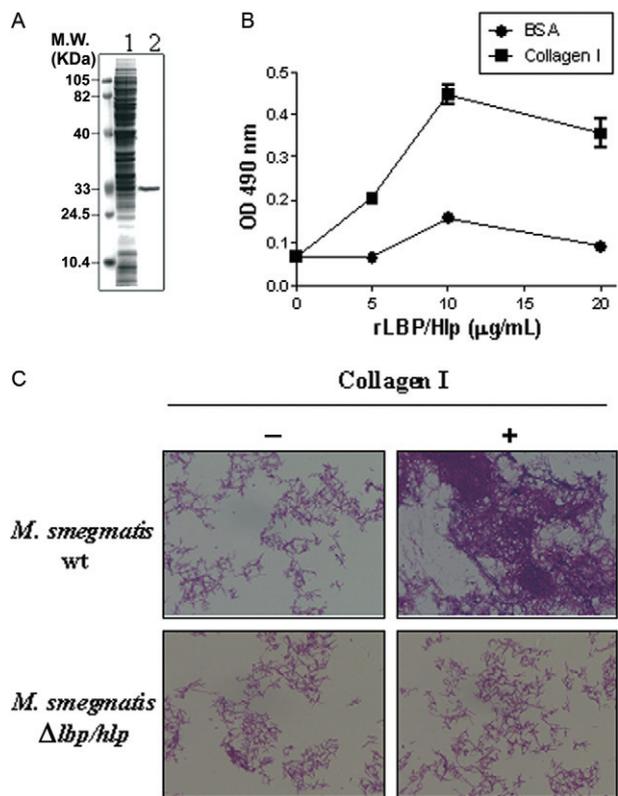


Fig. 4A: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analyses of *Mycobacterium bovis* BCG collagen-binding protein. The Coomassie-blue staining of a polyacrylamide gel containing a clarified lysate of *M. bovis* BCG prior application onto a collagen-Sepharose matrix (Lane 1) and the salt-eluted material (Lane 2); B: recombinant *M. bovis* BCG laminin-binding histone-like protein (LBP/Hlp) binds collagen. Microplate wells coated with 1 µg/mL of collagen I were incubated with increasing concentrations of *M. bovis* BCG recombinant-LBP/Hlp. The wells were then incubated with the anti-LBP/Hlp monoclonal antibody 5G9 and, finally, with a rabbit anti-mouse IgG peroxidase conjugate; C: the *Mycobacterium smegmatis* wild-type (wt), but not the  $\Delta hlp$  strain, was able to form large clumps in the presence of collagen I. *M. smegmatis* wt and the mutant for the *hlp* gene ( $\Delta hlp$ ) were grown in complete Middlebrook 7H9 broth supplemented or not with type 1 calf skin collagen at the concentration of 25 µg/mL. When cultures reached an OD<sub>600nm</sub> of 1.8, mycobacteria were acid-fast stained by Kynion and visualized under light microscope with 400X magnification; BSA: bovine serum albumin.

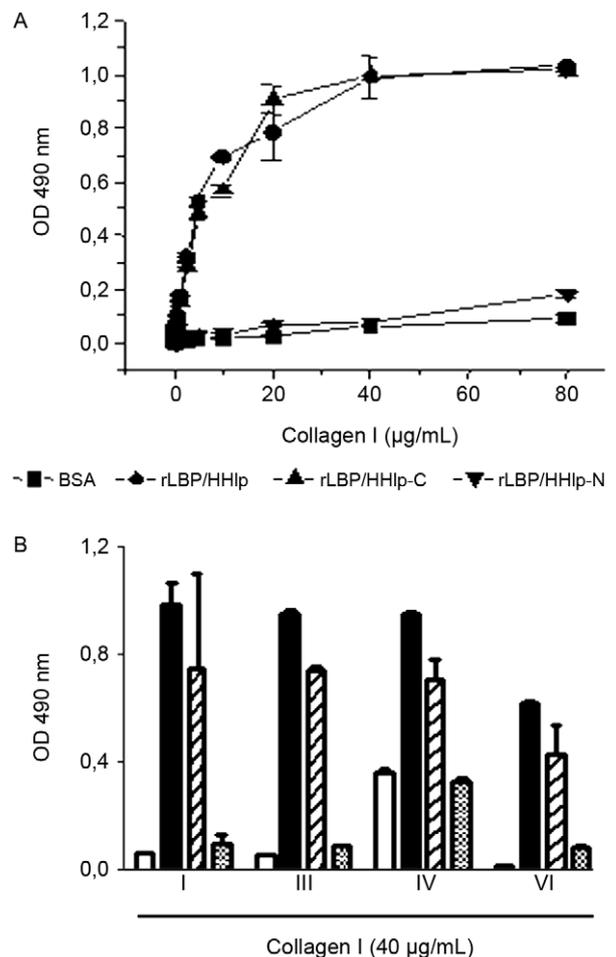


Fig. 5: *Mycobacterium leprae* laminin-binding histone-like protein (LBP/Hlp) binds to different collagen types by its C-terminal domain. Microplate wells coated with 5 µg/mL of full-length *M. leprae* recombinant-LBP/Hlp, truncated N-terminal (rLBP/Hlp-N) or C-terminal (rLBP/Hlp-C) domains were incubated with increasing concentrations of biotinylated collagen I (A) or 40 µg/mL of collagens I, III, IV or VI (B). Binding is expressed in absorbency units at 490 nm. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of a typical experiment done in duplicate. Five experiments were performed with similar results. BSA: bovine serum albumin.

suggest that, similarly to its interaction with heparin and laminin, LBP/Hlp binds collagen mainly through interactions involving the lysine-rich repeats present in the C-terminal domain of the adhesin.

### DISCUSSION

Because specific interactions with host cells represent a crucial and early step in any infectious process, pathogenic microorganisms have evolved adhesins capable to bind membrane receptors or compounds present in the eukaryotic extracellular matrices (Westerlund & Korhonen 1993). Pathogenic mycobacteria synthesize a wide panel of adhesins involved in the bacterial interaction with epithelial cells and/or monocyte-derived professional phagocytes (Hoppe et al. 1997, Sidobre et al. 2000, Diaz-Silvestre et al. 2005, Kinshikar et al. 2006, Ragas et al. 2007, Hickey et al. 2010). Several proteinaceous mycobacterial adhesins have been demonstrated to recognize mammalian extracellular matrix components. Such an adhesive activity has been demonstrated for the proteins belonging to the antigen 85 complex and the fibronectin attachment protein, which both bind fibronectin (Abou-Zeid et al. 1991, Peake et al. 1993, Zhao et al. 1999), the HBHA which interacts with heparan sulphate-containing proteoglycans (Delogu & Brennan 1999, Pethe et al. 2002) and the LBP/Hlp (also called MDP1) that binds laminin, heparan sulphate chains and HA (Shimoji et al. 1999, Aoki et al. 2004, Lima et al. 2005, Lefrançois et al. 2011).

Evidence strongly suggests that LBP/Hlp displays a bi-functional role in the biology of mycobacteria, acting both in nuclei acid metabolism (Prabhakar et al. 1998) and as an adhesin. In this regard, LBP/Hlp was initially characterized as a LBP, mediating the binding and invasion of SC by *M. leprae* (Shimoji et al. 1999, Marques et al. 2000). Recombinant LBP/Hlp was able to avidly bind laminin in solid phase assays and the exogenous addition of the protein significantly enhances bacterial binding to SC (Marques et al. 2000). These data, together with the recent finding indicating that *M. leprae* actively expresses LBP/Hlp during the human infection (Lima et al. 2005), have reinforced the involvement of LBP/Hlp in the successful invasion and colonization of the peripheral nerve system by *M. leprae*. More recently, LBP/Hlp was also shown to play an important role in mycobacteria-lung epithelial cell interaction. Both *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG were shown to bind and invade A549 human lung epithelial cells through the interaction of LBP/Hlp with HA presence on the cell surface (Aoki et al. 2004).

Collagenous proteins, which are predominant constituents of the mammalian extracellular matrix, can also function as receptors for the adhesion of microbial pathogens. The collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMMs) that are synthesized by both Gram-positive and Gram-negative bacteria constitute a large family of proteins involved in the bacterial attachment to host tissues (Patti et al. 1994). Therefore, it is not surprising that collagen-binding MSCRAMMs may represent important virulence factors such as the CNA, YadA, Cpa and Dr adhesins, which are produced by *Staphylococ-*

*cus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli*, respectively and which play a role in the establishment and progression and/or persistence of the infection (Gripenberg-Lerche et al. 1994, Selvarangan et al. 2004, Xu et al. 2004, Kreikemeyer et al. 2005). Besides adhesins that bind collagen, more recently bacterial collagen-like surface proteins have been characterized and shown to play a role in microbial pathogenesis by mediating attachment to host cell collagen receptors (Caswell et al. 2008). So far, no studies have reported the interaction of mycobacteria with collagen. Here, we show for the first time that mycobacteria may interact directly with collagen proteins via the surface-exposed LBP/Hlp adhesin.

Evidence that mycobacteria can interact with collagen was initially obtained from the observation that collagen I was able to induce aggregation of bacterial cells. Images generated by SEM also showed collagen fibres interacting with the surface of bacterial cell. This interaction was confirmed by the observation that exogenous collagen was able to increase mycobacterial adherence to human type II A549 pneumocytes and U937 human macrophages in a saturable and dose-dependent manner. An affinity chromatography performed on collagen I-Sepharose allowed the purification of a collagen-binding component from BCG cell lysate that was identified by mass spectrometry as the LBP/Hlp protein. Furthermore, when produced in the recombinant form, BCG LBP/Hlp protein was able to bind collagen in microplate solid phase assays confirming that LBP/Hlp is also a collagen-binding protein. LBP/Hlp is a highly conserved protein detected on the surface of all mycobacterial species so far investigated (Lefrançois et al. 2011). To show that LBP/Hlp is the major collagen-binding protein present on mycobacterial surface, we analyzed the interaction of collagen fibres with *M. smegmatis*  $\Delta hlp$ , the only *hlp* null mutant so far available in the context of mycobacterial species. This mutant has been characterized and used in several previous studies (Lee et al. 1998, Marques et al. 2000, Biet et al. 2007). In contrast to the wt strain, *M. smegmatis*  $\Delta hlp$  was unable to interact and form large clumps when grown in the presence of collagen I, suggesting that LBP/Hlp represents a major component on bacterial surface mediating microbial interaction with collagen.

Mycobacterial LBP/Hlp is about twice the size of other bacterial Hlps. The C-terminal half of mycobacterial Hlp is absent from most other bacteria and has an unusual amino acid composition owing to a high alanine, lysine and proline content, which resembles the C-terminal region of eukaryotic class H1 histones (Prabhakar et al. 1998). This highly positive domain was recently shown to mediate the interaction of LBP/Hlp with laminin and heparan sulphate and also with SC (Lima et al. 2005). To map the region of LBP/Hlp responsible for the collagen binding activity, truncated versions of the adhesin corresponding to the N-terminal and C-terminal half of the protein were generated and tested in a solid phase collagen binding assay. These experiments clearly demonstrated that the lysine-rich C-terminal region holds most if not all of the collagen-binding properties of the protein. Both full-length protein and the C-terminal domain were

able to bind very similarly to collagen type I, while interaction with collagen III, IV and VI was partially mediated by the C-terminal domain. These data reinforce the idea that LBP/Hlp C-terminal domain is responsible for most if not all of the adhesive property of this protein.

The definition of the molecules used by *M. tuberculosis* and *M. leprae* to gain access and colonize different tissues of the human body may provide clues for the development of new therapeutic and/or prophylactic strategies to better control tuberculosis and leprosy. The capacity of LBP/Hlp to bind different collagen types here demonstrated reinforces its potential role as a virulence factor of pathogenic mycobacteria. The binding properties of LBP/Hlp to multiple extracellular matrix components suggest that this protein may play an important role in distinct moments during the natural course of human infection. As previously suggested, early during infection, LBP/Hlp might play, in conjunction with HBHA, a key role on bacterial attachment to respiratory epithelial cells (Aoki et al. 2004). We can also speculate on the involvement of LBP/Hlp in bacterial dissemination inside the human body that occurs both in leprosy and tuberculosis (Pessolani et al. 2003). During this process, the bacilli might need to interact with distinct basal membranes, which are essentially composed of laminin and collagen IV (Kreis & Vale 1993). Finally, LBP/Hlp may also participate of the colonization of vulnerable tissues such as the peripheral nerve system by *M. leprae* through interaction mainly with laminin (Shimoji et al. 1999, Marques et al. 2000) and the bones and joints by *M. tuberculosis*, which are rich in collagen I (Kreis & Vale 1993).

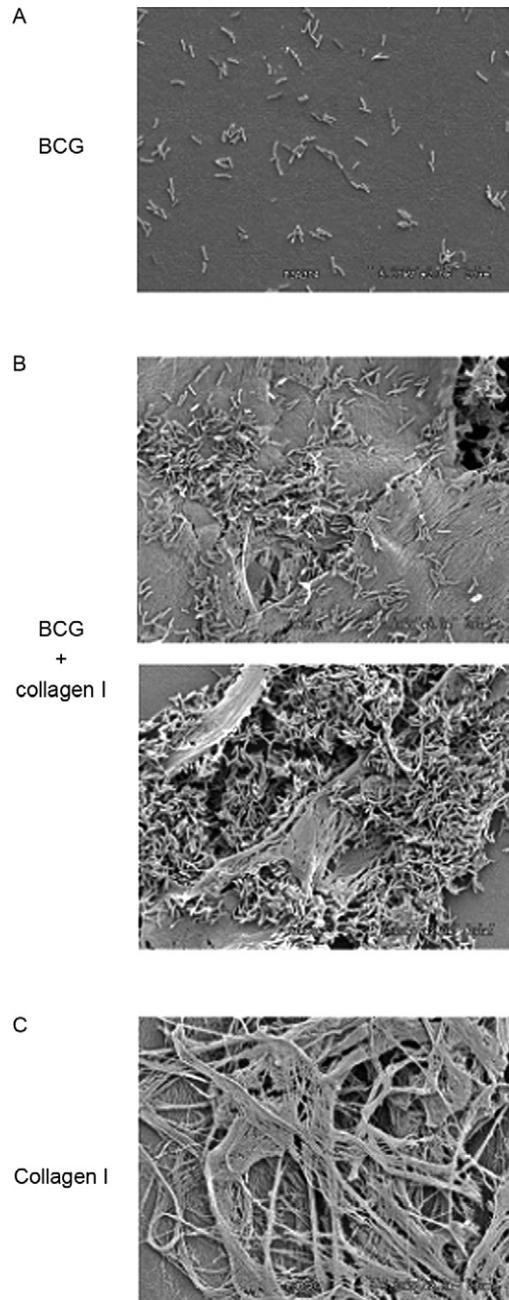
#### ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr John S Spencer, from the Colorado State University, for providing the 5G9 anti-rLBP/Hlp monoclonal antibody, to Elizabeth Pradel and Yves Dufrêne, for critical reading of the manuscript, to Jean-Pierre Tissier, for the technical assistance, and to the memory of Franco Dante Menozzi, who died in July 2005.

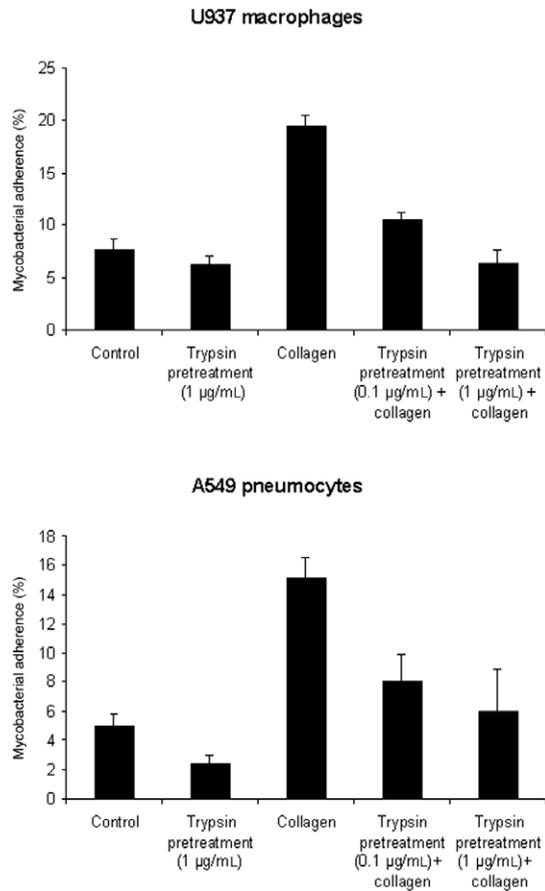
#### REFERENCES

- Abou-Zeid C, Garbe T, Lathigra R, Wiker HG, Harboe M, Rook GA, Young DB 1991. Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect Immun* 59: 2712-2718.
- Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domenech P, Umemori K, Yamamoto S, Minoda A, Matsumoto M, Kobayashi K 2004. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* 279: 39798-39806.
- Biet F, Marques MAM, Grayon M, Xavier da Silveira EK, Brennan PJ, Drobecq H, Raze D, Vidal Pessolani MC, Loch C, Menozzi FD 2007. *Mycobacterium smegmatis* produces an HBHA homologue which is not involved in epithelial adherence. *Microbes Infect* 9: 175-182.
- Caswell CC, Barczyk M, Keene DR, Lukomska E, Gullberg DE, Lukomski S 2008. Identification of the first prokaryotic collagen sequence motif that mediates binding to human collagen receptors, integrins alpha2beta1 and alpha11beta1. *J Biol Chem* 283: 36168-36175.
- Delogu G, Brennan MJ 1999. Functional domains present in the mycobacterial hemagglutinin, HBHA. *J Bacteriol* 181: 7464-7469.
- Diaz-Silvestre H, Espinosa-Cueto P, Sanchez-Gonzalez A, Esparza-Ceron MA, Pereira-Suarez AL, Bernal-Fernandez G, Espitia C, Mancilla R 2005. The 19-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a major adhesin that binds the mannose receptor of THP-1 monocytic cells and promotes phagocytosis of mycobacteria. *Microb Pathog* 39: 97-107.
- Dupres V, Menozzi FD, Loch C, Clare BH, Abbott NL, Cuenot S, Bompard C, Raze D, Dufrêne YF 2005. Nanoscale mapping and functional analysis of individual adhesins on living bacteria. *Nat Methods* 2: 515-520.
- Ernst JD 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66: 1277-1281.
- Gripenberg-Lerche C, Skurnik M, Zhang L, Söderström KO, Toivanen P 1994. Role of YadA in arthritogenicity of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8: experimental studies with rats. *Infect Immun* 62: 5568-5575.
- Hickey TB, Ziltener HJ, Speert DP, Stokes RW 2010. *Mycobacterium tuberculosis* employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface. *Cell Microbiol* 12: 1634-1647.
- Hoppe HC, de Wet BJ, Cywes C, Daffé M, Ehlers MR 1997. Identification of phosphatidylinositol mannoside as a mycobacterial adhesin mediating both direct and opsonic binding to nonphagocytic mammalian cells. *Infect Immun* 65: 3896-3905.
- Kinhikar AG, Vargas D, Li H, Mahaffey SB, Hinds L, Belisle JT, Laal S 2006. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Mol Microbiol* 60: 999-1013.
- Kreikemeyer B, Nakata M, Oehmcke S, Gschwendtner C, Normann J, Podbielski A 2005. *Streptococcus pyogenes* collagen type I-binding Cpa surface protein. Expression profile, binding characteristics, biological functions and potential clinical impact. *J Biol Chem* 280: 33228-33239.
- Kreis T, Vale R 1993. *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins*, Oxford University Press, Oxford, 176 pp.
- Lee BH, Murugasu-Oei B, Dick T 1998. Upregulation of a histone-like protein in dormant *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Genet* 260: 475-479.
- Lefrançois LH, Pujol C, Bodier CC, Teixeira-Gomez AP, Drobecq H, Rosso ML, Raze D, Dias AA, Hugot JP, Chacon O, Barletta RG, Loch C, Pessolani MCV, Biet F 2011. Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease. *Microbes Infect* 13: 585-594.
- Lima CS, Marques MA, Debie AS, Almeida EC, Silva CA, Brennan PJ, Sarno EN, Menozzi FD, Pessolani MC 2009. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 292: 162-169.
- Lima CS, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, Menozzi FD, Ottenhoff TH, Brennan PJ, Pessolani MC 2005. Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. *Microbes Infect* 7: 1097-1099.
- Marques MAM, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MCV 2000. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes Infect* 2: 1407-1417.
- Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, Raze D, Debie AS, Dehouck MP, Cecchelli R, Loch C 2006. *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microbes Infect* 8: 1-9.

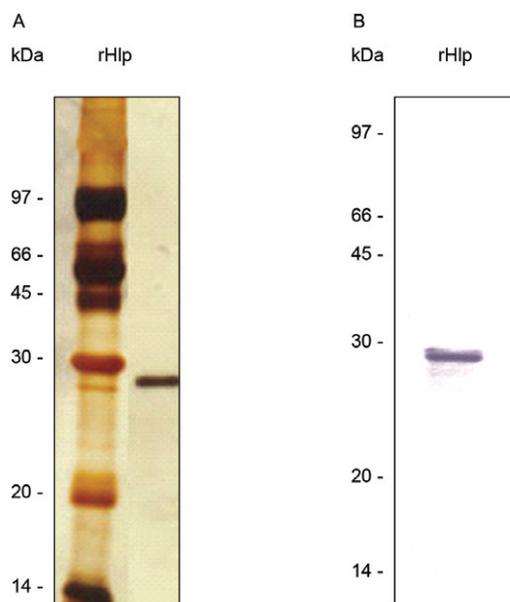
- Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Loch C 1996. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med* 184: 993-1001.
- Mueller-Ortiz SL, Sepulveda E, Olsen MR, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ 2002. Decreased infectivity despite unaltered C3 binding by a DeltahhA mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 70: 6751-3760.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585-617.
- Peake P, Gooley A, Britton WJ 1993. Mechanism of interaction of the 85B secreted protein of *Mycobacterium bovis* with fibronectin. *Infect Immun* 61: 4828-4834.
- Pessolani MCV, Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD 2003. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect* 5: 677-684.
- Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Loch C, Menozzi FD 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 412: 190-194.
- Pethe K, Aumercier M, Fort E, Gatot C, Loch C, Menozzi FD 2000. Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J Biol Chem* 275: 14273-14280.
- Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debrie AS, Loch C, Menozzi FD 2002. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10759-10764.
- Portugal MI, Todeschini AR, de Lima CS, Silva CA, Mohana-Borges R, Ottenhoff TH, Mendonça-Previato L, Previato JO, Pessolani MC 2008. Characterization of two heparin sulphate-binding sites in the mycobacterial adhesin Hlp. *BMC Microbiol* 8: 75.
- Prabhakar S, Annapurna PS, Jain NK, Dey AB, Tyagi JS, Prasad HK 1998. Identification of an immunogenic histone-like protein (HLP-Mt) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 79: 43-53.
- Ragas A, Roussel L, Puzo G, Rivière M 2007. The *Mycobacterium tuberculosis* cell-surface glycoprotein apa as a potential adhesin to colonize target cells via the innate immune system pulmonary C-type lectin surfactant protein A. *J Biol Chem* 282: 5133-5142.
- Selvarangan R, Goluszko P, Singhal J, Carnoy C, Moseley S, Hudson B, Nowicki S, Nowicki B 2004. Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. *Infect Immun* 72: 4827-4835.
- Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A 1999. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9857-9862.
- Sidobre S, Nigou J, Puzo G, Rivière M 2000. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem* 275: 2415-2422.
- Stokes RW, Haidl ID, Jefferies WA, Speert DP 1993. Mycobacteria-macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. *J Immunol* 151: 7067-7076.
- Westerlund B, Korhonen TK 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 9: 687-694.
- WHO - World Health Organization 2010a. Global leprosy situation 2010. *Wkly Epidemio Rec* 85: 337-334.
- WHO - World Health Organization 2010b. Global tuberculosis control 2010. *Wkly Epidemio Rec* 85: 69-80.
- Xu Y, Rivas JM, Brown EL, Liang X, Höök M 2004. Virulence potential of the staphylococcal adhesin CNA in experimental arthritis is determined by its affinity for collagen. *J Infect Dis* 189: 2323-2333.
- Zhao W, Schorey JS, Groger R, Allen PM, Brown EJ, Ratliff TL 1999. Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP. *J Biol Chem* 274: 4521-4526.



Scanning electron micrographs of *Mycobacterium bovis* BCG grown in the absence or the presence of collagen I. Mycobacteria grown in Sauton medium (Panel A) or in Sauton medium supplemented with 25 µg/mL collagen I (Panel B) were resuspended in phosphate buffered saline (PBS) and fixed for scanning electron microscopy (SEM) examination. A similar fixation step was applied to a collagen I solution prepared in PBS, followed by SEM observation (Panel C).



Effect of trypsin pretreatment on the *Mycobacterium bovis* BCG cytoadherence. Exponentially-growing mycobacteria were pretreated with 0.1 µg/mL or 1 µg/mL trypsin and then assayed for their interaction with A549 pneumocytes or U937 macrophages (multiplicity of infection of 10) in the absence or presence of 50 µg/mL exogenous collagen I. Colony forming units associated with target cells were counted by plating serial cell lysate dilutions on 7H11 agar. The data with standard deviations represent averages for quadruplicate experiments.



Purity and integrity of the BCG recombinant-laminin-binding histone-like protein (LBP/Hlp). Purified BCG rLBP/Hlp was subjected to 15% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. A: gel stained with silver; B: immunoblotting developed with anti-LBP/Hlp (5G9) monoclonal antibody. The molecular weight markers are indicated on the left.