

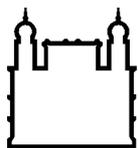
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

MECANISMOS DE REGULAÇÃO AUTOFÁGICA EM PACIENTES COM
HANSENÍASE E SEU PAPEL NA IMUNOPATOGENESE DA REAÇÃO
REVERSA EM PACIENTES MULTIBACILARES

BRUNO JORGE DE ANDRADE SILVA

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

BRUNO JORGE DE ANDRADE SILVA

Mecanismos de Regulação Autofágica em Pacientes com Hanseníase e seu Papel na Imunopatogênese da Reação Reversa em Pacientes Multibacilares

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

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2017

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

S586 Silva, Bruno Jorge de Andrade

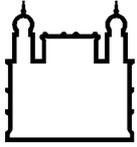
Mecanismos de regulação autofágica em pacientes com hanseníase e seu papel na imunopatogênese da reação reversa em pacientes multibacilares / Bruno Jorge de Andrade Silva. – Rio de Janeiro, 2017. xxii, 160f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Bibliografia: f. 113-146

1. Hanseníase. 2. Autofagia. 3. Interferon-gama. 4. Mycobacterium leprae. 5. Reação reversa. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

AUTOR: BRUNO JORGE DE ANDRADE SILVA

MECANISMOS DE REGULAÇÃO AUTOFÁGICA EM PACIENTES COM HANSENÍASE E SEU PAPEL NA IMUNOPATOGÊNESE DA REAÇÃO REVERSA EM PACIENTES MULTIBACILARES

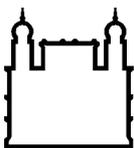
ORIENTADORA: Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Aprovada em: 07/02/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Flavio Alves Lara – **Presidente** (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Ruben Figueiredo Sadok Menna Barreto (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Leonardo Holanda Travassos Corrêa (IBCCF/UFRJ)
Prof. Dra. Andrea Henriques Pons (IOC/FIOCRUZ)
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (IBCCF/UFRJ)

Rio de Janeiro, 07 de abril de 2017



Ministério da Saúde

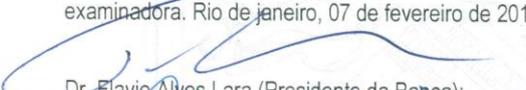
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

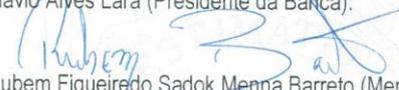


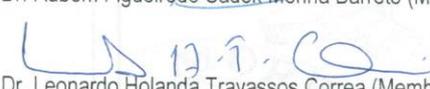
Ministério da Saúde

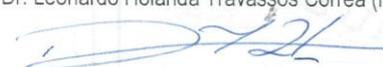
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Bruno Jorge de Andrade Silva**, sob orientação da Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro. Ao sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, realizou-se às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **"MECANISMOS DE REGULAÇÃO AUTOFÁGICA EM PACIENTES COM HANSENÍASE E SEU PAPEL NA IMUNOPATOGÊNESE DA REAÇÃO REVERSA EM PACIENTES MULTIBACILARES"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Flavio Alves Lara - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto - IOC/FIOCRUZ, Dr. Leonardo Holanda Travassos Correa - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Andrea Henriques Pons - IOC/FIOCRUZ e Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes – UFRJ/RJ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 07 de fevereiro de 2017.


Dr. Flavio Alves Lara (Presidente da Banca):


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


Dr. Leonardo Holanda Travassos Correa (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

“Aos animais utilizados nos experimentos de pesquisa, que olham questionando o que ocorre, que sentem medo e não compreendem, que não entendem a dor, a perda da liberdade e que lambem as mãos do algoz confundindo-o com um amigo.”

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Euzenir Nunes Sarno pela dedicação, incentivo, disponibilidade, orientação e preocupação para que este trabalho terminasse da melhor forma.

À Dra. Roberta Olmo Pinheiro pela orientação, encorajamento diante das adversidades, pela dedicação e carinho com esse trabalho e comigo. Pela oportunidade de crescer e aprimorar minha visão científica nas agradáveis conversas que tivemos ao longo desses anos.

À Dra. Thaís Porto Amadeu por ter me aberto as portas da FIOCRUZ e por toda ajuda.

À amiga e eterna professora mais querida, Dra. Elisabeth Martins da Silva Rocha por ter me mostrado o maravilhoso mundo da ciência e por me supervisionar no estágio de docência na UFF.

À tia Chris e ao tio Rogério por me hospedarem em sua casa durante meu estágio na UFF.

Ao Dr. José Augusto e todos que trabalham no Ambulatório Souza Araújo, pela ajuda com os pacientes.

Aos pacientes do ASA pela boa vontade na doação das amostras. Sem eles este trabalho nunca poderia ter sido realizado.

À Cristiane, Augusto, Andreia, Jean, e a todos da administração pela boa vontade e ajuda sempre que precisei.

À Solange e ao Paulo pela limpeza do material e por sempre me ajudarem.

À Coordenação de Pós-graduação em Biologia Parasitária e aos funcionários do departamento de ensino, em especial Rita, Giselia e Eduardo. Aos professores da Pós-graduação em Biologia Parasitária que através do conhecimento transmitido, enriqueceram a minha formação.

Aos amigos de BP, BCM e MT pela amizade e apoio.

Aos amigos do laboratório de hanseníase MayM, MayB, Eli, Mari, Carol, Luciana, Tamires, Jéssica, Rhaninha, Priscila, Jô, Serrote, Milk, Pet, Verônica, Mietto, pela amizade, ajuda nos experimentos e por tornar os meus dias mais agradáveis.

Às alunas de iniciação científica que passaram por esse projeto, Patricia e Camila. A todos os demais amigos do departamento pelo carinho e amizade.

Aos membros do Laboratório de Patologia da hanseníase por toda ajuda e pela amizade, em especial ao Dr. Sérgio Antunes por toda ajuda e ensinamentos.

À Dras. Alice Miranda e Patricia Pignataro pelos ensinamentos sobre histologia de hanseníase e pela companhia na sala 4.

Aos membros do LAMICEL pela amizade e ajuda.

Ao Dr. Flavio Lara por toda ajuda com microscopia de fluorescência.

À Dra. Patricia Sammarco e ao ILSL pelo fornecimento de *M. leprae* vivo.

À Dra. Suzana Côrte-Real Faria por todo suporte com a microscopia eletrônica. À Plataforma de ME por toda ajuda sempre que precisei.

Ao Dr. Mario Fabri por me receber amigavelmente em seu laboratório e fornecer alguns dos anticorpos utilizados neste estudo.

Ao Dr. John Stewart Spencer pela doação do anticorpo anti-LAM.

Ao CNPq, IOC, CAPES e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

À Alexandra Asanovna Elbakyan e Rosane Barbosa por me fornecerem todos os artigos que precisei durante o doutorado.

Aos amigos do CAD pelo apoio e amizade.

À minha mana Rachel por sempre estar do meu lado nos momentos alegres e tristes, e por cuidar do meu computador todas as vezes que ele não queria trabalhar durante a tese.

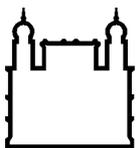
À minha mãe por todo amor, carinho, paciência e incentivo acadêmico. Sem seus exemplo, dedicação e esforço eu não teria conseguido.

Aos meus filhotes felinos pelo carinho e por serem minha fonte de inspiração; e a todos os outros bichanos que me deram o prazer de sua companhia nesta vida.

Muito obrigado!

“Um homem de ciência deve pensar no que se dirá dele nos séculos futuros e não nos insultos ou elogios que recebe em vida. O verdadeiro sábio tem um só dever e uma única tarefa: procurar aquilo que existe, sem se importar com os outros.”

Louis Pasteur



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

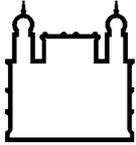
MECANISMOS DE REGULAÇÃO AUTOFÁGICA EM PACIENTES COM HANSENÍASE E SEU PAPEL NA IMUNOPATOGÊNESE DA REAÇÃO REVERSA EM PACIENTES MULTIBACILARES

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Bruno Jorge de Andrade Silva

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que pode apresentar diferentes formas clínicas de acordo com a resposta imune do hospedeiro. Pacientes paucibacilares tuberculoides (BT) apresentam níveis significativamente elevados de IFN γ em comparação aos pacientes lepromatosos multibacilares (LL). O IFN γ estimula os macrófagos para uma resposta pró-inflamatória e induz um mecanismo antimicrobiano chamado de autofagia. No entanto, o papel da autofagia na resposta imune contra *Mycobacterium leprae* permanece desconhecido. Neste trabalho, nós demonstramos por diferentes métodos que quando comparados aos pacientes LL, os pacientes BT apresentam uma maior formação de autofagossomos LC3-positivos nas lesões de pele e em macrófagos isolados das lesões. Nós observamos um acúmulo dos receptores autofágicos SQSTM1/p62 e NBR1, uma reduzida expressão dos peptídeos antimicrobianos lisossomais *CAMP* e *DEFB4*, e um bloqueio na formação de autolisossomos nas células de lesões de pele de pacientes LL, indicando que o fluxo autofágico foi inibido nesse grupo, o que pôde ser restaurado através do tratamento *in vitro* das células com IFN γ ou rapamicina. A análise da via de autofagia através de expressão gênica por qPCR revelou um aumento significativo dos níveis de mRNA de genes autofágicos (*BECN1*, *GPSM3*, *ATG14*, *APOL1* e *TPR*) em células de lesões de pele de pacientes BT, e a análise de enriquecimento gênico mostrou que as lesões de pacientes BT são predominantemente enriquecidas em termos de ontologia gênica associados à autofagia e interações autofágicas em comparação com as lesões de pacientes LL. Além disso, foi observada uma expressão aumentada de genes da via autofágica (*TPR*, *GFI1B* e *GNAI3*), assim como um aumento dos níveis de LC3 nas células de pacientes lepromatosos que desenvolveram episódios de reação reversa, uma condição clínica inflamatória aguda associada ao aumento dos níveis de IFN γ . Por fim, observamos um aumento na síntese de Bcl-2 em células de lesões de pele de pacientes LL, o que poderia ser responsável pelo bloqueio da autofagia mediada por Beclina-1 nesses indivíduos. Adicionalmente, experimentos *in vitro* demonstraram que a micobactéria morta, mas não a viva, pode induzir autofagia em monócitos humanos primários e da linhagem THP-1, e que *M. leprae* vivo pode reduzir a ativação autofágica desencadeada por *M. leprae* morto, sugerindo que *M. leprae* pode bloquear a maquinaria autofágica como um mecanismo de escape do sistema imune. Em conjunto, estes resultados indicam que a autofagia é um importante mecanismo inato associado ao controle de *M. leprae* em macrófagos de pele.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

AUTOPHAGIC REGULATION MECHANISMS IN LEPROSY PATIENTS AND ITS ROLE IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF THE REVERSAL REACTION EPISODES IN MULTIBACILLARY PATIENTS

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITOLOGY BIOLOGY

Bruno Jorge de Andrade Silva

Leprosy is a chronic infectious disease that present different clinical forms according to the host immune response. Levels of IFN- γ are significantly raised in paucibacillary tuberculoid (T-lep) when compared with multibacillary lepromatous (L-lep) patients. IFN- γ primes macrophages for inflammatory activation and induces the autophagy antimicrobial mechanism. The involvement of autophagy in the immune response against *Mycobacterium leprae* remains unexplored. Here, we demonstrated by different autophagic assays that LC3-positive autophagosomes were predominantly observed in T-lep when compared with L-lep lesions and skin-derived macrophages. Accumulation of the autophagic receptors SQSTM1/p62 and NBR1, expression of lysosomal antimicrobial peptides and colocalization analysis of autolysosomes revealed an impairment of the autophagic flux in L-lep cells, which was restored by IFN- γ or rapamycin treatment. PCR array targeting autophagy gene-expression revealed a significantly upregulation of autophagy genes (BECN1, GPSM3, ATG14, APOL1, and TPR) in T-lep cells, and an enrichment analysis showed that T-lep lesions were predominantly enriched for autophagy-associated gene ontology terms and interactions in comparison to L-lep lesions. Furthermore, an upregulation of autophagy genes (TPR, GF11B and GNAI3) as well as LC3 levels was observed in cells of L-lep patients that developed type 1 reaction (T1R) episodes, an acute inflammatory condition associated with increased IFN- γ levels. Finally, we observed increased BCL2 expression in L-lep cells that could be responsible for the blockage of BECN1-mediated autophagy. In addition, *in vitro* studies demonstrated that dead, but not live *M. leprae* induced autophagy in primary and lineage human monocytes, and that live mycobacteria reduced the autophagy activation triggered by dead mycobacteria, suggesting that *M. leprae* may hamper the autophagic machinery as an immune escape mechanism. Together, these results indicate that autophagy is an important innate mechanism associated with the *M. leprae* control in skin macrophages.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A Hanseníase	1
1.1.1 Características gerais.....	1
1.1.2 Agente etiológico.....	1
1.1.3 Epidemiologia.....	3
1.1.4 Aspectos clínicos e classificação.....	7
1.1.5 Resposta imunológica na hanseníase.....	11
1.1.6 Interações entre <i>M. leprae</i> e células do hospedeiro.....	14
1.1.7 Fagocitose de <i>M. leprae</i>	17
1.2 Os Interferons	19
1.2.1 Características gerais.....	19
1.2.2 Papel do IFN γ na hanseníase.....	22
1.3 Autofagia	25
1.3.1 Características gerais.....	25
1.3.2 Mecanismo de execução da autofagia.....	26
1.3.3 Papel não autofágico das proteínas Atg.....	33
1.3.4 Relação da autofagia com patologias humanas.....	35
1.3.5 Autofagia e processos infecciosos.....	35
1.3.6 Autofagia seletiva mediada por receptores autofágicos.....	37
1.3.7 Autofagia e infecção por micobactérias.....	43
1.4 Justificativa	54
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo Geral	55
2.2 Objetivos Específicos	55
3 MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1 Pacientes e amostras clínicas	56
3.2 Cultura de células THP-1	57
3.3 Cultura de monócitos primários	58

3.4	Isolamento de macrófagos de lesões de pele.....	58
3.5	Obtenção e utilização de ML.....	59
3.6	Indução de autofagia.....	60
3.7	Microscopia eletrônica de transmissão	60
3.8	Imunohistoquímica.....	61
3.9	Western blot.....	62
3.10	Imunofluorescência.....	64
3.11	ELISA intracelular.....	65
3.12	Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR.....	66
3.13	Análise da via autofágica.....	67
3.14	Análise de interação gênica e enriquecimento.....	68
3.15	Análise estatística.....	68
4	RESULTADOS	69
4.1	A autofagia é diferencialmente regulada entre os pacientes BT e LL	69
4.2	<i>M. leprae</i> inibe a geração de autofagossomos em macrófagos de lesões de pele de pacientes LL.....	73
4.3	O IFN γ restaura o fluxo autofágico inibido por <i>M. leprae</i> em macrófagos de lesões de pele de pacientes LL.....	81
4.4	Perfis de expressão gênica das lesões revelaram uma regulação diferenciada dos genes associados à autofagia entre pacientes BT e LL.....	86
4.5	A reação reversa altera o perfil autofágico dos pacientes LL.....	92
5	DISCUSSÃO	101
6	CONCLUSÕES	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8	APÊNDICES	147
	APÊNDICE A – Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes tuberculoides e lepromatosos	147
	APÊNDICE B – Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes lepromatosos com ou sem reação reversa	150
	APÊNDICE C – Artigos publicados, manuscritos aceitos ou submetidos para publicação durante o doutorado	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Fotomicrografia de lesão de pele de um paciente multibacilar.....	2
Figura 1.2: Taxas de incidência de hanseníase no mundo em 2015.....	4
Figura 1.3: Taxas de prevalência de hanseníase no mundo em 2015.....	4
Figura 1.4: Taxas de incidência de hanseníase no Brasil em 2015.....	5
Figura 1.5: Taxas de prevalência de hanseníase no Brasil em 2015.....	5
Figura 1.6: Taxas de incidência de hanseníase em menores de 15 anos no Brasil em 2015.....	6
Figura 1.7: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase...	10
Figura 1.8: Modelo de divergência dos macrófagos na polarização da hanseníase.....	19
Figura 1.9: A via de sinalização através do complexo entre IFN γ e seu receptor.....	21
Figura 1.10: Autofagossomos: estruturas de dupla membrana características da autofagia.....	26
Figura 1.11: Modelo esquemático simplificado da autofagia.....	30
Figura 1.12: Formação do autofagossomo pela via canônica em células de mamíferos.....	31
Figura 1.13: Modelo de fontes de origem da membrana autofagossomal.....	32
Figura 1.14: Ensaios de monitoramento da autofagia através de LC3.....	33
Figura 1.15: Recrutamento seletivo de fagóforos para os alvos, através da interação de receptores autofágicos com LC3-II em diferentes vias de autofagia seletiva.....	38
Figura 1.16: Características dos receptores TRIM e exemplos de autofagia de precisão mediada pelas proteínas TRIM.....	42
Figura 1.17: Autofagia mediada por IFN γ /IRGM no modelo de tuberculose.....	44
Figura 1.18: Microscopia eletrônica mostrando vacúolos de dupla membrana contendo <i>M. leprae</i>	50
Figura 1.19: IFN γ e a via autofágica antimicrobiana da vitamina D no modelo de tuberculose.....	51

Figura 4.1: Presença de autofagossomos em lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	70
Figura 4.2: Expressão de LC3 em células de lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	71
Figura 4.3: Expressão proteica de LC3-II em lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	72
Figura 4.4: Avaliação da redistribuição de LC3 em células de lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	73
Figura 4.5: Expressão de CD68 em macrófagos de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase.....	74
Figura 4.6: Análise da expressão de LC3-II em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	77
Figura 4.7: Análise da capacidade de indução de autofagia por <i>M. leprae</i> em macrófagos THP-1.....	78
Figura 4.8: Formação de autofagossomos em monócitos humanos primários estimulados e/ou infectados com <i>M. leprae</i>	80
Figura 4.9: Níveis de NBR1 e SQSTM1/p62 em células de lesão de pele de pacientes com hanseníase.....	82
Figura 4.10: Avaliação do fluxo autofágico em macrófagos de pele de pacientes BT.....	83
Figura 4.11: Avaliação do fluxo autofágico em macrófagos de lesão de pele de pacientes LL.....	84
Figura 4.12: Expressão de <i>CAMP</i> e <i>DEFB4A</i> em lesões de pele de pacientes LL e BT.....	85
Figura 4.13: Avaliação do fluxo autofágico em monócitos estimulados e/ou infectados com <i>M. leprae</i>	86
Figura 4.14: Perfis de expressão gênica autofágica das lesões de hanseníase.....	89
Figura 4.15: Expressão de <i>BECN1</i> e <i>BCL2</i> em células de lesões cutâneas de pacientes BT e LL.....	91
Figura 4.16: Expressão de <i>BCL2</i> e <i>BECN1</i> em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase.....	92
Figura 4.17: Perfis de expressão de genes da via de autofagia em células de lesões de pele de pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem RR.....	95

Figura 4.18: Perfis de expressão de genes da via de autofagia em células de lesões de pele de pacientes BT, LL e RR.....	97
Figura 4.19: Expressão de LC3 em células de lesões de pele de pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem RR.....	99
Figura 4.20: Expressão de LC3-II em macrófagos de lesões de pele de pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem reação.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes hansênicos incluídos no estudo..... 57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-MA - 3-metiladenina	BCG - <i>Mycobacterium bovis</i> Bacilo de Calmette-Guérin
4E-BP1 - Fator eucariótico de iniciação traducional 4E - proteína de ligação 1	Bcl-2 - Proteína recombinante linfoma de células B 2
ACTB - “Actin beta”	Bcl2-L-13 - “BCL2 like 13”
ADP - “Difosfato de adenosina”	BD - Bactérias degeneradas
AEC - 3-amino-9-etilcarbazol	BECN1- Beclina-1
AF - Autofagossomo	Bfl-1/A1 / BCL2A1 - Proteína A1 relacionada ao gene de Bcl-2
AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida	BH3 - “Bcl-2 homology 3 domain”
AIM2 - “Absent in melanoma 2”	BL - Forma “borderline” lepromatosa
Akt - Cepa Ak de camundongos, associada a um retrovírus “transformante”. Também pode ser chamada de Proteína cinase B	BSA - Albumina sérica bovina
Alfy / WDFY3 - “Autophagy-linked FYVE protein” / “WD repeat and FYVE domain containing 3”	BT - Forma “borderline” tuberculóide
AMBRA1 - Molécula ativadora na autofagia regulada por beclina-1	BUZ - “Binder of ubiquitin zinc finger domain”
AMP - Monofosfato de adenosina	CaMKK - Cinase dependente de Ca ²⁺ /calmodulina cinase
AMPK - Proteína cinase ativada por AMP	CAMP - “Cathelicidin antimicrobial peptide”
AP2A - “Adaptor related protein complex 2 alpha subunit”	c-CBL- Cbl proto-oncogene
AP2B1 - “Adaptor related protein complex 2 beta subunit”	CCD domain - “Coiled-coil domain”
APC - Células apresentadoras de antígenos	CD - Grupamento de diferenciação
APMA - Ativação Autofágica de Macrófagos	cDNA - DNA complementar
ATG - Genes (e proteínas) relacionados com a autofagia	CFP-10 - Antígeno de filtrado de cultura de 10 kDa
AU - Unidades arbitrárias	CFU - Unidades formadoras de colônias
B2M - “Beta-2-microglobulin”	cGAMP - “Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate”
BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente	cGAS / MB21D1 - “Cyclic GMP-AMP synthase” / “Mab-21 domain containing 1”
BAG3 - “BCL2 associated athanogene 3”	CLIR - LIR específico para interação com LC3C
BAK1 - “BCL2 antagonist/killer 1”	CO ₂ - Dióxido de carbono
BB - Forma “borderline borderline”	COPII - “Coat protein complex II”
	COX - Ciclooxygenase
	CR - Receptores de complemento
	CT - “Cycle threshold”

CUE - "Coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation domain"

CXCL10 - Quimiocina 10 contendo motivo C-X-C

CYP27b1- Citocromo P450, família 27, subfamília B, polipeptídeo 1

CYTO-ID / CAT - "Cationic amphiphilic tracer dye"

DAMP - Padrões moleculares associados à perigo

DAPI - 4,6 diamidino-2-fenilindol

DC-SIGN / CD209 - Molécula de adesão intercelular 3 específica de células dendríticas-não ligante de integrinas

DEFB4 - "Defensin beta 4A"

DFCP1 - Proteína 1 contendo duplo FYVE

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRAM - "DNA damage regulated autophagy modulator"

DTT - Ditioneitol

E2 - Enzima do sistema ubiquitina

eDNA - DNA extracelular

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

EGTA - Ácido etilenoglicoltetraacético

EIF - "Eukaryotic translation initiation factor"

EIF2AK4 / GCN2 - "EIF 2 alpha kinase 4"

Eis - Gene que "Reforça a sobrevivência intracelular" de Mtb

ELISA - Ensaio Imunoenzimático

ENH - Eritema nodoso hansênico ou reação tipo 2

ER/RE - Retículo endoplasmático

ERAD - Degradação associada ao ER

ERES - Sítios de saída do ER

ERGIC - Compartimento intermediário entre golgi e ER

Erk - Cinase regulada por sinal extra

ESAT-6 - Alvo antigênico de secreção inicial de 6 kDa

ESX-1 - Sistema de secreção do tipo VII ESAT-6

ETZ - Zona transparente eletrondensa

Exo84 - Subunidade de 84 kDa do complexo exocítico

Fam134B - "Family with sequence similarity 134 member B"

FasL - Ligante de Fas

FcR - Receptor para porção Fc

FDR - "False discovery rate"

FIP200 - Proteína de interação com ULK

FKBP12 - Proteína ligadora de FK506 ou Tacrolimus

FN3 - Repetições de fibronectina do tipo III

FOXO3 - "Forkhead box O3"

FUNDC1 - "FUN14 domain containing 1"

g - Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

GAPDH - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GAS - Sítio de ativação de IFN γ

GBP - Proteína de ligação à guanilato

GERL - Golgi-Retículo Endoplasmático-Lisossomos

GIR - Motivo de interação com galectina

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos

GO - Ontologia gênica

GTP - Trifosfato de guanosina

GTPase - Guanosina 5' trifosfatase induzida por IFN

GUSB - "Glucuronidase beta"

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HCl - Ácido clorídrico

HDAC6 - "Histone deacetylase 6"

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HLA-DR - Antígeno leucocitário humano de classe II, alelo DR

HPRT1 - "Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1"

HSV-1 - "Herpes simplex virus 1"

IB - Índice baciloscópico

ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1

IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN - Interferon

IFN γ R1 - Cadeia de ligação do ligante (ou cadeia α) do receptor de IFN γ

IFN γ R2 - Cadeia acessória (ou cadeia β) do receptor de IFN γ

IFNG - Gene de IFN γ

Ig - Imunoglobulina

IKK β - "Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta"

IL - Interleucina

IL-12p40 e p70 - Subunidades p40 e p70 da IL-12

IL-2R - Receptor de IL-2

IP-10 - Proteína 10-induzida por IFN γ

IRF - Fator regulador de IFN

IRGM - GTPase M relacionada à imunidade

ISGF - Complexo fator gênico estimulado por IFN

ISRE - Elemento de resposta estimulado por IFN

Jak - Cinasas da família Janus

JNK - Cinase c-jun NH₂-terminal

kDa - Quilodáton

KEGG - "Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes"

LAM - Lipoarabinomanana

LAMP-2 - Proteína de membrana-2 associada ao lisossomo

LAP - Fagocitose associada à LC3

LC3 / Atg8 - proteína 1 associada aos microtúbulos, cadeia leve 3

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

LIR - Motivo da região de interação com LC3

LKB1 - Cinase B1 do fígado

LL - Forma lepromatosa lepromatosa

LL - LL subpolar

LPS - Lipopolissacarídeo

LRG-47 - GTPase de 47 kDa induzida por IFN γ

M1 - Macrófagos inflamatórios

M2 - Macrófagos antiinflamatórios

MAM - Membrana do ER associada à mitocôndria

MB - Multibacilares

MCF-7 - Fundação de Câncer de Michigan 7, linhagem de câncer de mama

M-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos

MDC - "Monodansylcadaverine"

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

ML - *Mycobacterium leprae*

MLM - ML morto

MLV - ML vivo

mLST8 - mTORC subunidade LST8

MOI - Multiplicidade de infecção

Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*

mTOR - Alvo da rapamicina nos mamíferos

mTORC - Complexo mTOR

M Φ s - Macrófagos

N.E. - Não estimulado

nAChR - Receptor nicotínico de acetilcolina

NaCl - Cloreto de Sódio

NaF - Fluoreto de sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NBR1 - Proteína vizinha ao gene BRCA1
NCOA4- “Nuclear receptor coactivator 4”
NDP52 / CALCOCO - Proteína de antígeno nuclear de 52 kDa / “Calcium binding and coiled-coil domain”
NF- κ B - Fator nuclear κ B
NIX / BNIP3L - “BCL2 interacting protein 3 like”
NK - Células matadoras naturais
NLRP - Família de receptores do tipo NOD, contendo o domínio pirina
NO - Óxido nítrico
NOD - Domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeo
NOS2 / iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
NOX2 / CYBB - “NADPH oxidase 2” / “Cytochrome b-245 beta chain”
NP - Forma neural pura
Nramp1 - Proteínas de macrófagos associadas à resistência natural
NTM - Micobactérias não tuberculosas
OASL - “2'-5'-oligoadenylate synthetase like”
OPTN - Optineurina
OsO₄ - Tetróxido de ósmio
oxLDL - LDL oxidadas
p24 - Proteína de 24 kDa presente no capsídeo de HIV
p47 - Família de GTPases de 47 kDa relacionadas à imunidade
PA - Peptídeos antimicrobianos
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
PAS - Sítio de montagem do fagóforo ou estrutura pré-autofagossomal
PB - Paucibacilares
PB1 - Domínio 1 de ligação à proteína

PBMC - Células mononucleares de sangue periférico
PBS - Salina tampão fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PD-1/CD279 - “Programmed cell death protein 1”
PE - Fosfatidiletanolamina
PGE₂ - Prostaglandina E2
PGK1 - “Phosphoglycerate kinase 1”
PGL-1 - Glicolípido fenólico-1
phox (gp91) - Glicoproteína de 91 kDa que forma a NADPH oxidase flavocitocromo b558
PI - Fosfatidilinositol
PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase
PI3KC - Complexo PI3K de classe III
PI3P - Fosfatidilinositol-3-fosfato
PICALM - “Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein”
PIKK - Superfamília de cinases relacionadas à PI3K
PMA - Acetato-13 de forbol miristato-12
PML (TRIM19) / RAR α - “Promyelocytic leukemia protein” / “Retinoic acid receptor alpha”
PMN - Polimorfonucleares
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPIA - “Peptidylprolyl isomerase A”
PQT - Poliquimioterapia
PRK - Proteína cinase dependente de RNA
PTEN - Fosfatase e angiotensina homólogo
qPCR - PCR em tempo real
RalB - Proteína relacionada a Ras
Raptor - Proteína regulatória associada à mTOR
Rh - De macaco Rhesus
RHEB - Homólogo de Ras enriquecido em cérebro

rhulFN γ - IFN γ recombinante humano
 Rictor - Companheiro de mTOR não sensível à rapamicina
 RIG-I - Gene 1 induzido por retinóide
 RLR - Receptores do tipo RIG-I
 RNA - Ácido ribonucleico
 RNAm - RNA mensageiro
 RP - Rapamicina
 RPL13A - "Ribosomal protein L13a"
 RPMI - Meio do Instituto Memorial Roswell Park
 RR - Reação reversa ou reação tipo 1
 RT-qPCR- Reação da transcriptase reversa, seguida de qPCR
 Rubicon - Domínio RUN, rico em cisteína, contendo interação com BECN1
 S100A12 - "S100 calcium binding protein A12"
 S6K - Proteína ribossomal p70-cinase S6
 SARS - Síndrome respiratória aguda grave
 SDS - Dodecil sulfato de sódio
 SFB - Soro fetal bovino
 SLR - Receptores do tipo sequestosoma SQSTM1/p62
 SMURF1 - "SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1"
 SNAP29 - "Synaptosome associated protein 29"
 SNARE - "SNAP Soluble NSF Attachment REceptor"
 SNC - Soro normal de cabra
 SNP - Polimorfismo de base única
 SPRY - "SP1a and the RYanodine receptor domain"
 SQSTM1/p62 - Sequestosoma 1
 SR - Receptores "scavenger"
 Src - "Sarc"oma / Proto-oncogene proteína tirosina cinase

Stat - Transdutor de sinal e ativador da transcrição
 STBD1 - "Starch binding domain 1"
 STING / TMEM173 - "Stimulator of interferon genes" / "Transmembrane protein 173"
 STRING - "Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins"
 STX17 - "Syntaxin 17"
 TACO / CORO1A - Proteína triptofano-aspartato contendo capa protéica / Coronina-1A
 TAX1BP1 - "Tax1 binding protein 1"
 TBK1 - Cinase 1 de ligação a TANK
 TBS - Tampão tris salino
 TCR - Receptores de célula T
 Tecpr1 - "Tectonin beta-propeller repeat containing 1"
 TGF- β 1 - Fator de transformação do crescimento β 1
 Th - Célula T auxiliar
 THP-1 - Linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana
 TIM4 - "T-cell immunoglobulin mucin protein 4"
 Tir - Tirosina
 TLR - Receptores semelhantes ao Toll (de *Drosophila melanogaster*)
 TM - Domínio transmembrana
 TMB - 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina
 TNF - Fator de necrose tumoral
 TOLLIP - "Toll interacting protein"
 TRIM - "Tripartite motif containing"
 TSC - Complexo da esclerose tuberosa
 TT - Forma tuberculóide
 Tyk - Tirosina cinase
 U - Unidade internacional
 UBA - "Ubiquitin-associated protein domain"
 UBAN - "Ubiquitin binding in ABIN and NEMO domain"

UBD - Domínio de ligação à ubiquitina

UBL - “Ubiquitin-like domain”

Ubn - Ubiquitinadas

UBQLN - “Ubiquilin”

UBZ - “Ubiquitin-binding zinc finger domain”

ULK - Família similar a Unc-51

UVRAG / VPS38 - Gene associado à resistência à irradiação UV

VAMP8 - “Vesicle associated membrane protein 8”

VDR - Receptor de vitamina D

VLIG - Grandes GTPases induzíveis

VMP1 - Proteína de membrana de vacúolo 1

VPS - Proteína vacuolar associada à separação

WIPI - Domínio de repetição WD, interação a fosfoinosítídeo

Wtm - Wortmanina

1 INTRODUÇÃO

1.1 A hanseníase

1.1.1 *Características gerais*

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos (Lockwood 2004). A rota de transmissão da hanseníase ainda não está definitivamente comprovada, mas acredita-se que seja através das vias respiratórias, embora não seja descartada a possibilidade de infecção via lesões de pele (Bratschi et al. 2015, Mohanty et al. 2016). A doença apresenta um longo período de incubação e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois a dez anos após a infecção. *Mycobacterium leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas, no entanto, poucas adoecem. Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente à infecção por *M. leprae*, não apresentando sintomas clinicamente detectáveis (Godal et al. 1972).

1.1.2 *Agente etiológico*

M. leprae (Figura 1.1), agente causador da hanseníase, é um patógeno intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann (Bloom 1986). No indivíduo infectado por *M. leprae* os bacilos podem ser encontrados em uma variedade de tecidos e tipos celulares (Drutz et al. 1972). Possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado de 1,5 a 8,0 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se decora pela lavagem com álcool ácido, sendo então um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Rees 1984). É uma bactéria de crescimento lento, fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias (WHO 1987). Compartilha algumas características com outras micobactérias como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos e lipoarabinomanana (LAM) em sua parede celular. Mais externamente estão localizados glicolípídeos, como o glicolípídeo fenólico-1 (PGL-1), encontrado exclusivamente em *M. leprae*. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico (Hunter & Brennan 1981). Estudos anteriores mostraram que o PGL-1 pode ser encontrado em tecidos, sangue e urina de

pacientes multibacilares (MB), possibilitando sua utilização como ferramenta para o diagnóstico complementar da hanseníase (Cho et al. 1983). Além disso, ele também foi detectado em tatus infectados por *M. leprae* (Hunter et al. 1985). Este antígeno não apresenta reação cruzada com *Mycobacterium tuberculosis* ou outras microbactérias, e estimula uma potente resposta de anticorpos da classe IgM, que é proporcional à carga bacteriana nos pacientes (Cho et al. 1983).

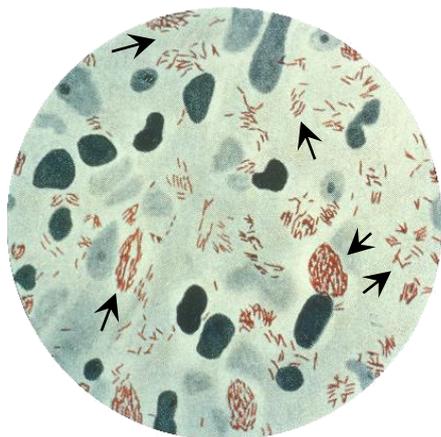


Figura 1.1: Fotomicrografia de lesão de pele de um paciente multibacilar. Bacilos corados em vermelho (setas) e células coradas em azul. Fonte: adaptado de Universidade de Stanford http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites_2005/Leprosy/bio.htm. Acesso em: 20 ago. 2016.

Desde sua descoberta em 1873 por Armauer Hansen, todas as tentativas para cultivar este microrganismo *in vitro* falharam (Hansen 1874). Entretanto, em 1962 foi demonstrado por Shepard que o coxim plantar de camundongos infectados com 10^3 a 10^4 bacilos promovia uma lesão localizada de hanseníase durante 9 a 12 meses (Shepard 1962). Outra fonte de *M. leprae* utilizada para estudos é o tatu nove bandas (*Dasypus novencinctus*). Ele permite o crescimento do bacilo de forma disseminada durante 18 a 24 meses, comprometendo pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Após a purificação, os bacilos podem ser usados vivos por até uma semana ou letalmente irradiados (Kirchheimer & Storrs 1971).

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

seu longo tempo de geração e sua incapacidade de multiplicação *in vitro* (Vissa & Brennan 2001).

1.1.3 Epidemiologia

A hanseníase é a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infecto-contagiosas. A maneira mais eficaz de prevenir as complicações decorrentes da hanseníase se dá através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, antes de ocorrerem lesões nervosas. A doença e as deformidades a ela associadas são responsáveis pelo estigma social e pela discriminação contra os pacientes e suas famílias em muitas sociedades. A erradicação da doença, porém, parece distante, pelo menos em alguns países. Durante o ano de 2015, a incidência mundial foi de 210.758 casos (Figura 1.2) e a prevalência global de hanseníase foi de 174.608 casos (Figura 1.3) (WHO 2016). No Brasil, em 2015, foram detectados 28.761 casos novos (Figura 1.4), a menor taxa de incidência dos últimos 10 anos, mostrando uma redução de quase 19.000 casos quando comparado ao ano de 2006, porém com um coeficiente geral de aproximadamente 14,07 por 100 mil habitantes, índice ainda maior do que a meta estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para erradicação da hanseníase, que é de até 10 casos a cada 100 mil habitantes (Brasil 2016, WHO 2016).

Índia, Brasil e Indonésia são os países mais endêmicos do globo, sendo responsáveis por 81% dos casos novos no mundo. O número total de casos com registro ativo no Brasil em 2015 foi de 20.702 (Figura 1.5), sendo o país responsável por 85,8% dos casos no continente americano e pelo segundo lugar mundial em número total de casos novos (atrás apenas da Índia); além disso, ocupa o primeiro lugar na classificação mundial de novos casos por 100 mil habitantes (Brasil 2016, WHO 2016). No Brasil, os estados das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte detêm o maior número de doentes. Mato Grosso, Tocantins e Maranhão são os estados com maior número de casos do país, sendo considerados hiperendêmicos em 2015, em função de apresentarem coeficiente de detecção superior a 40 casos por 100 mil habitantes (Brasil 2016).

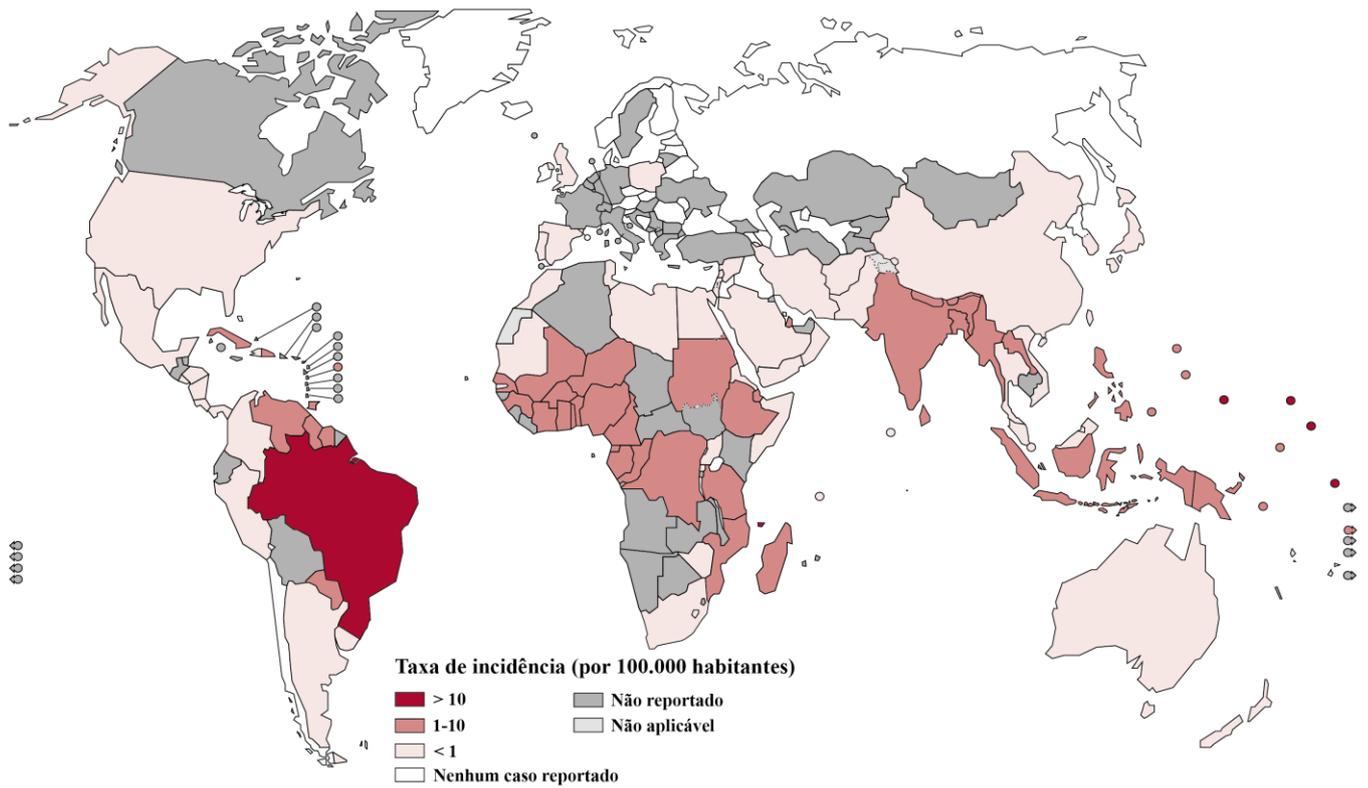


Figura 1.2: Taxas de incidência de hanseníase no mundo em 2015. Fonte: adaptado de WHO 2016.

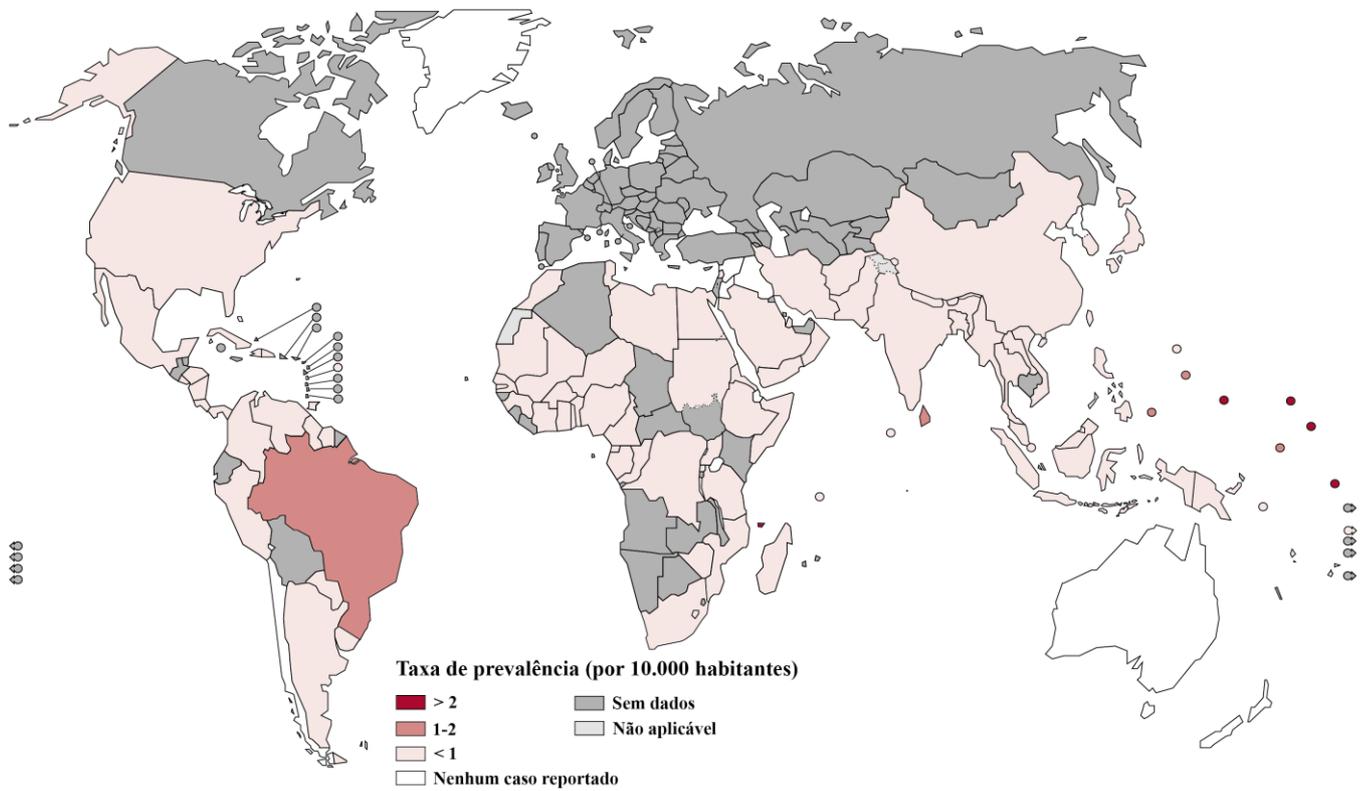


Figura 1.3: Taxas de prevalência de hanseníase no mundo em 2015. Fonte: adaptado de WHO 2016.

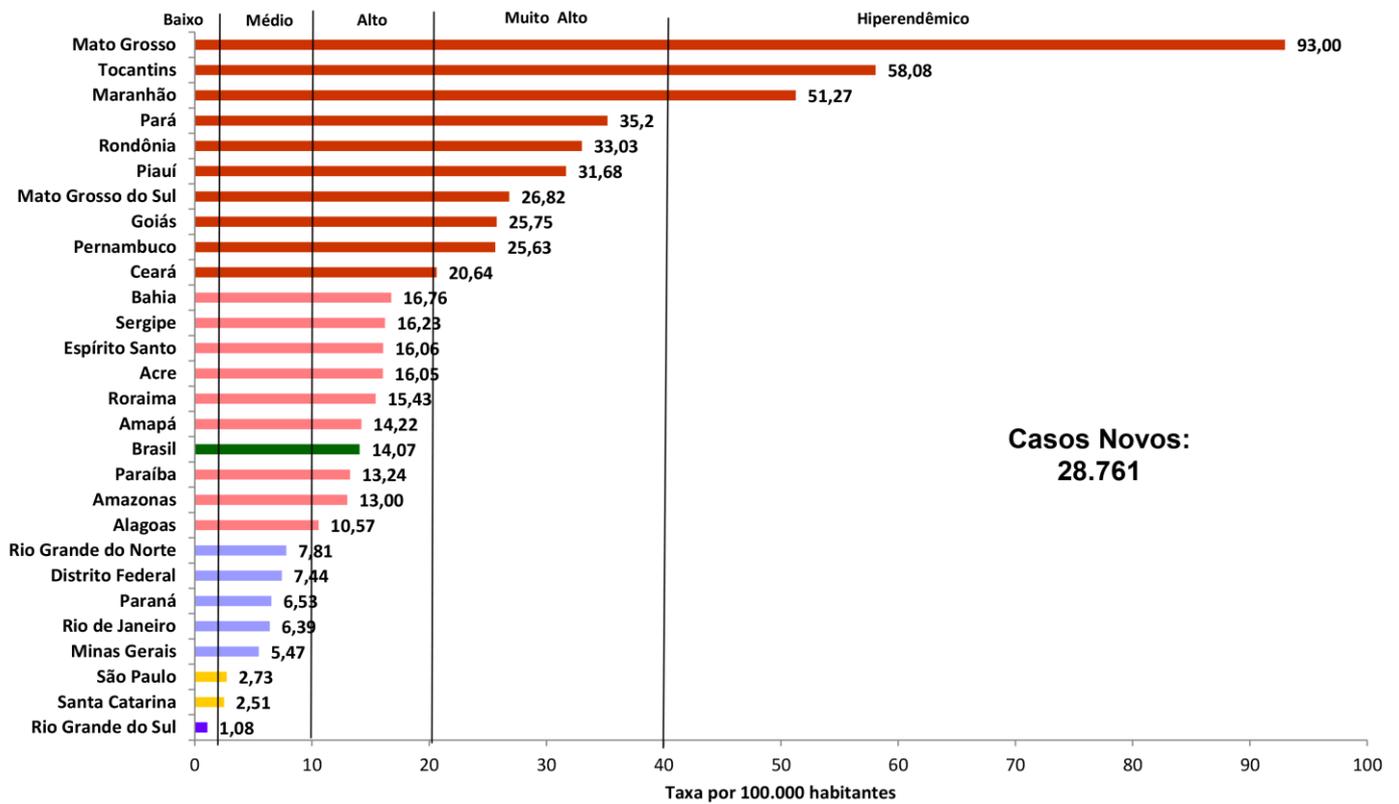


Figura 1.4: Taxas de incidência de hanseníase no Brasil em 2015. Fonte: adaptado de Brasil 2016.

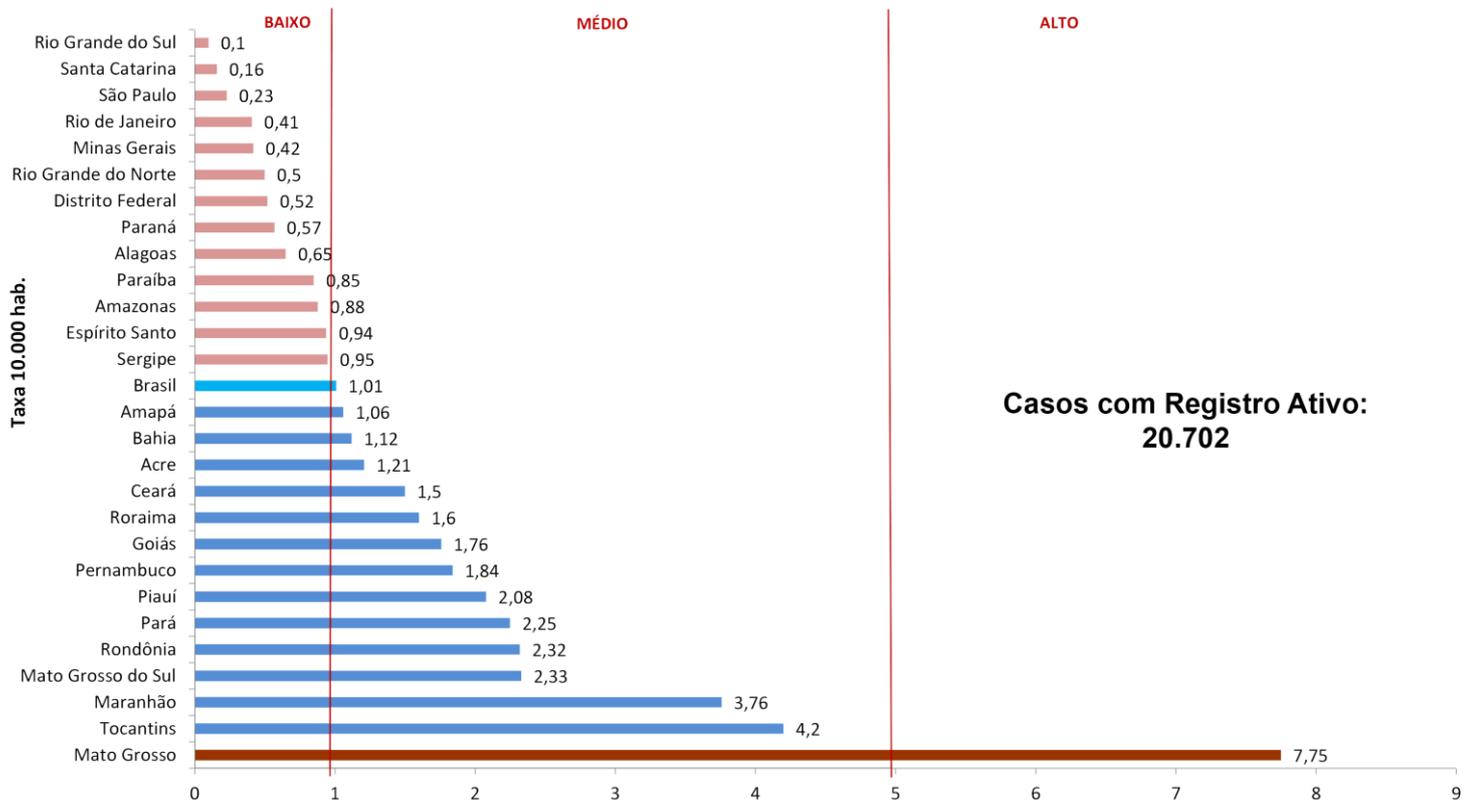


Figura 1.5: Taxas de prevalência de hanseníase no Brasil em 2015. Fonte: adaptado de Brasil 2016.

Outro relevante indicador de alta endemicidade e de transmissão recente da infecção é a proporção de crianças menores de quinze anos entre os novos casos detectados. No ano de 2015, foram detectados no Brasil, 2.113 casos novos em crianças (Figura 1.6). O país apresentou um coeficiente de detecção em menores de 15 anos de 4,46/100.000 habitantes, considerado alto segundo os parâmetros brasileiros. No estado do Rio de Janeiro, neste mesmo ano, este coeficiente foi de 1,39/100.000 habitantes, considerado médio segundo os parâmetros nacionais (Brasil 2016).

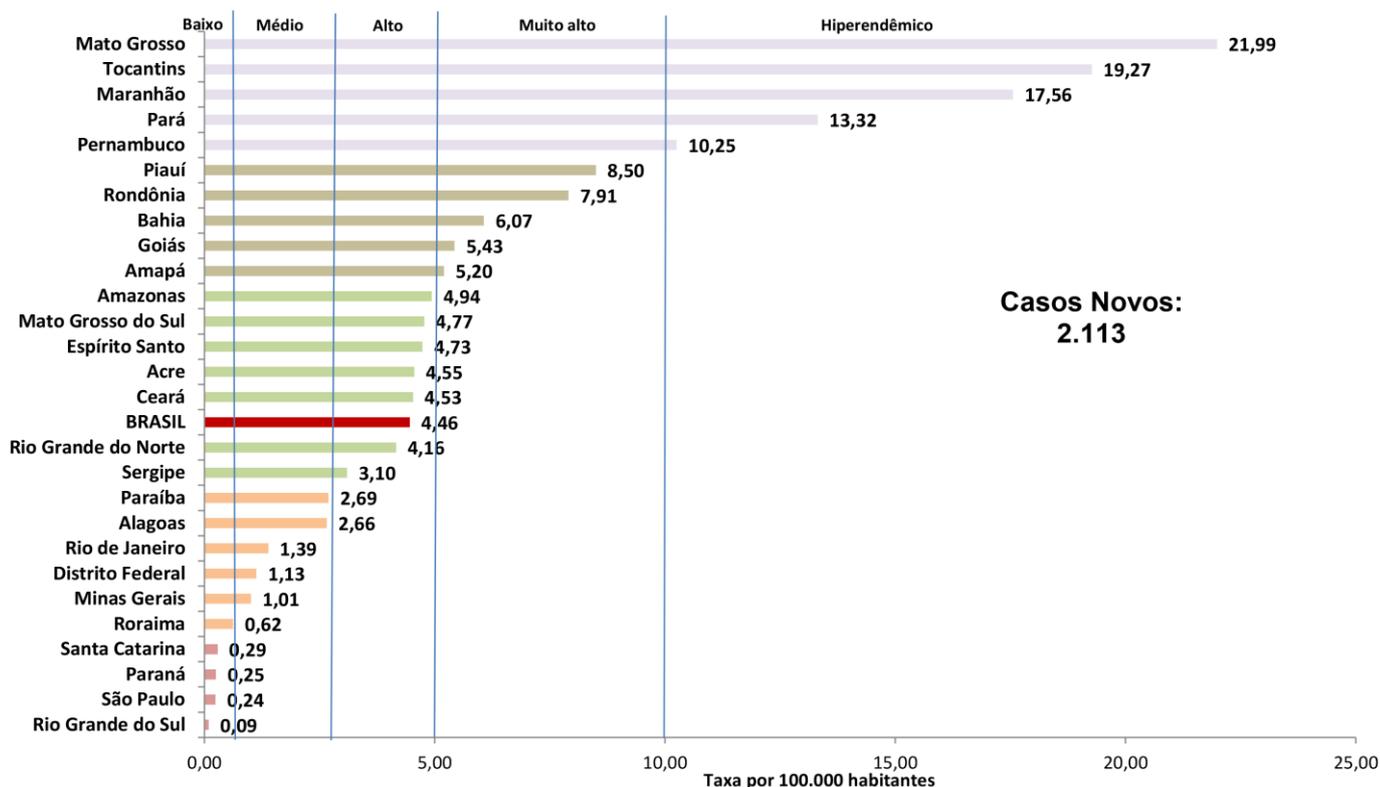


Figura 1.6: Taxas de incidência de hanseníase em menores de 15 anos no Brasil em 2015. Fonte: adaptado de Brasil 2016.

Desde 1982 quando a poliquimioterapia (PQT) foi introduzida, observou-se uma redução significativa da prevalência da hanseníase, com cerca de 85% de cura. Em conjunto, mais de 14,5 milhões de pacientes foram curados através da PQT e cerca de 2 milhões de pacientes não chegaram a desenvolver incapacidades físicas. No entanto, o número de casos globais ainda tem se mantido alto, e a OMS tem atribuído essa baixa redução a vários fatores, como os esforços na detecção de novos casos, a alta transmissão em certas áreas onde existem pacientes

assintomáticos, resistência aos antimicrobianos, ou ainda a reincidência de casos tratados (Rodrigues & Lockwood 2011).

1.1.4 Aspectos clínicos e classificação

A hanseníase se manifesta segundo um espectro de formas clínicas resultantes do grau de resposta imune celular desenvolvida por cada indivíduo contra *M. leprae*. Portanto, a classificação correta dos pacientes é de extrema importância para determinar o tratamento adequado da doença.

Existem dois sistemas principais utilizados para classificar os pacientes com hanseníase. De acordo com Ridley e Jopling (1966), os pacientes com hanseníase são classificados em cinco subgrupos de acordo com os critérios clínicos, bacteriológicos e, principalmente, imunológicos e histopatológicos. Em um pólo desse espectro clínico são encontrados os pacientes tuberculoides (TT), que na maioria das vezes desenvolvem apenas uma lesão com pequeno número de bactérias. Estes pacientes apresentam baixos níveis de anticorpos específicos, mas resposta imune celular pronunciada, que é responsável pela restrição do crescimento do patógeno. No outro pólo, os pacientes lepromatosos (LL) apresentam doença disseminada, com inúmeras lesões contendo um alto número de bactérias. Estes pacientes apresentam altos níveis de anticorpos e ausência de resposta imune celular detectável. Além das formas polares, existem formas intermediárias denominadas “borderline”: “borderline” tuberculoides (BT), “borderline borderline” (BB) e “borderline” lepromatosa (BL). Nestes casos, a resposta imune celular é maior de acordo com a proximidade ao pólo tuberculoides. Existe ainda, entre as formas BL e LL, uma forma intermediária chamada de LL subpolar (Ridley & Waters 1969). A medida padrão da imunidade mediada por células ao patógeno é a reação de Mitsuda, uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (tipo IV ou mediada por células), que é avaliada após uma injeção intradérmica de bacilos mortos aplicada nos pacientes, cuja duração é medida após 3 a 4 semanas (Narayan et al. 2001). O teste de Mitsuda é positivo quando se forma uma infiltração nodular maior que 5 mm de diâmetro ou quando o infiltrado ulcera, e é negativo quando há ausência de reação. A outra classificação bem mais simplificada, a de 1982 da OMS (WHO 1982), tem como base o índice baciloscópico (IB) ou o número

de lesões. São considerados pacientes paucibacilares (PB) aqueles com até cinco lesões ou IB=0 e MB aqueles com mais de 6 lesões ou IB>0. Na classificação de Ridley e Jopling, pacientes paucibacilares incluem pacientes TT e BT, enquanto pacientes multibacilares incluem pacientes BB, BL e LL (Figura 1.7) (WHO 1987).

Existe ainda outra classificação muito utilizada na prática clínica, a de Madrid, estabelecida durante o congresso internacional de leprologia de 1953 na Espanha. Esta também leva em conta as características clínicas da doença, acrescidas dos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo assim os grupos polares tuberculoide e virchoviano (ou lepromatoso), a forma indeterminada, e o grupo instável e intermediário chamado de forma dimorfa (CONGRESS 1953, 1954, Languillon & Carayon 1986).

A manifestação inicial da doença pode ser a forma clínica indeterminada, onde a resposta do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. Esta pode evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos clínicos da doença estabelecida dentro do espectro, dependendo da sua capacidade em montar uma resposta imune celular contra *M. leprae*. Pessoas com a forma clínica tuberculoide apresentam teste de Mitsuda positivo, enquanto as pessoas com a forma lepromatosa apresentam Mitsuda negativo. O tratamento dos pacientes com hanseníase é realizado com a PQT. Para pacientes multibacilares, cujo tratamento dura um ano, são utilizados rifampicina (600 mg, uma dose por mês), clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia) e dapsona (100 mg por dia). Para pacientes paucibacilares, somente rifampicina (600 mg, uma dose por mês) e dapsona (100 mg por dia) são empregados por um período de seis meses (Hastings 1998).

Outra característica marcante da hanseníase é o desenvolvimento de episódios reacionais. Estes episódios podem ser definidos como manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o agente infectante, *M. leprae*. Esses episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade das funções dos nervos periféricos. Os episódios reacionais podem se apresentar durante o curso natural da doença, durante o tratamento e até mesmo após a alta, quando o paciente é considerado curado (Naafs 1994). Dois tipos principais de reações são conhecidos: a reação reversa (RR) ou reação tipo 1, que ocorre mais comumente

nos pacientes “borderline”, mas também nos pacientes LL subpolares e polares (Ridley & Waters 1969, Hastings & Job 1978, Kar & Job 2005, Andrade et al. 2015a, b); e o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação tipo 2, que ocorre nos pacientes multibacilares lepromatosos (Figura 1.7) (Nery et al. 1998, Kamath et al. 2014). Além do ENH, existem outros tipos raros de reações tipo 2, são eles o eritema multiforme e o fenômeno de Lucio (também conhecido como eritema necrosante ou forma LL difusa). Esta última é mais comum no México e na região do Caribe, e tem sido recentemente associada com uma nova espécie de micobactéria, *Mycobacterium lepromatosis* (Lucio & Alvarado 1852, Han et al. 2008, Singh et al. 2015). Clinicamente, a RR se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele, nervo ou ambas, bem como pelo aparecimento de novas lesões. Além disso, edema nas mãos, pés e face também podem ser uma característica da reação, mas sintomas sistêmicos, como febre, são incomuns. O aumento do processo inflamatório nos nervos compromete a função nervosa e, se não for tratada rápida e adequadamente, leva à perda permanente dessa função, causando neuropatia periférica sensorial e motora (Jih et al. 2002, Andrade et al. 2015b). A RR é frequentemente recorrente e isso pode conduzir a um maior dano nervoso (van Brakel et al. 1994). Além disso, há um aumento do número de receptores de interleucina (IL)-2 (IL-2R) nas células imunocompetentes, assim como dos níveis de RNAm de IL-1 β , fator de necrose tumoral (TNF), IL-2 e interferon (IFN) γ . Entretanto, há um decréscimo dos níveis de outras citocinas, como IL-4, IL-5 e IL-10, dando suporte a hipótese de aumento de resposta imune mediada por células (Yamamura et al. 1991).

O ENH é uma complicação imunológica da hanseníase que acomete cerca de 50% dos pacientes lepromatosos e 10% dos pacientes “borderline” lepromatosos (Pocaterra et al. 2006). O risco de se desenvolver o ENH é diretamente proporcional ao IB e ao infiltrado inflamatório da lesão (Manandhar et al. 1999). As lesões cutâneas podem apresentar-se como eritematosas, pápulas ou nódulos que podem ser superficiais ou profundos. Clinicamente, o ENH é caracterizado por sintomas sistêmicos, como febre alta, mal-estar, edema da face, mãos e pés (Pfaltzgraff & Ramu 1994). A neurite também pode ser observada nesses pacientes, porém, é muito mais branda do que o observado na RR. Tem sido mostrado que durante o ENH há um aumento seletivo na expressão de RNAm de IL-6, IL-8 e IL-10 nas lesões, assim como aumento dos níveis de citocinas como TNF, IL-12p70 e IL-

12p40 nas lesões (Yamamura et al. 1991, Barnes et al. 1992, Singh et al. 1994). Entretanto, não há consenso sobre o envolvimento da imunidade celular neste tipo de reação, a despeito de terem sido demonstradas células imunocompetentes expressando IL-2R e antígeno leucocitário humano de classe II alelo DR (HLA-DR) nas lesões, um indicativo da presença de IFN γ (Modlin et al. 1988, Sampaio & Sarno 1998). A ocorrência dos episódios reacionais é considerada uma emergência clínica e o tratamento anti-inflamatório precisa ser prontamente iniciado. Pacientes com RR são tratados com esteróides (prednisona a 1,0 mg/kg), enquanto pacientes ENH são tratados preferencialmente com talidomida (300 mg/dia) ou pentoxifilina (400 mg de 8 em 8 horas), associada ou não a esteróides (Ustianowski & Lockwood 2003, Walker et al. 2007). Além da neurite reacional, existe ainda outra forma de comprometimento neurológico na hanseníase, a chamada forma Neural Pura, onde a neuropatia mediana isolada é o primeiro sinal da doença, podendo ou não haver o comprometimento dermatológico posterior (Figura 1.7) (Ridley & Jopling 1966, Pinheiro et al. 2011, Vital et al. 2013).

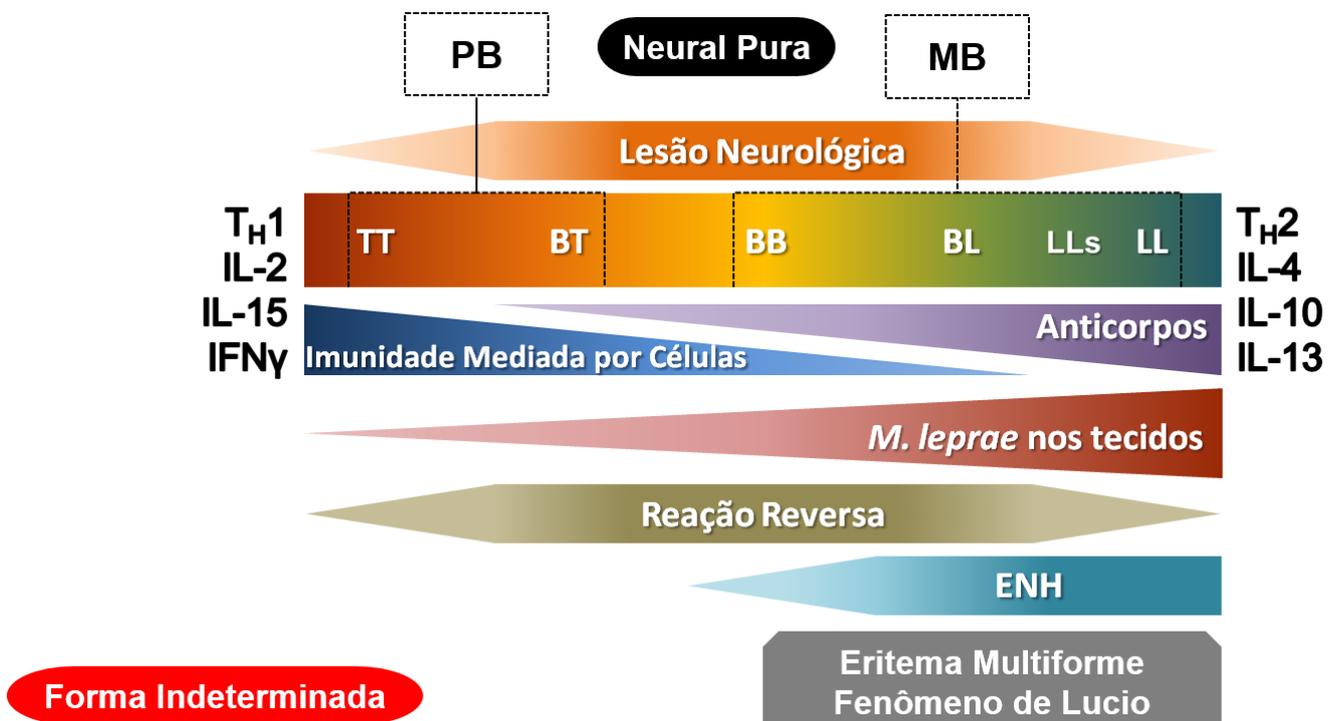


Figura 1.7: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase. Relação entre as formas clínicas, reposta imune, carga bacteriana, lesões de pele e episódios reacionais. TT – forma tuberculóide; BT – forma “borderline” tuberculóide; BB – forma “borderline borderline”; BL – forma “borderline” lepromatosa; LL – forma lepromatosa; LLs: forma LL subpolar; PB – formas paucibacilares; MB – formas

multibacilares; ENH – eritema nodoso hansênico. Este esquema não inclui a classificação de Madrid. Fonte: adaptado de Lockwood & Saunderson 2012.

1.1.5 Resposta imunológica na hanseníase

M. leprae entra no organismo provavelmente através das vias aéreas superiores e em seguida segue para a pele e nervos periféricos através da circulação. A resposta imune específica desencadeada pela infecção por *M. leprae* determina não só o curso da infecção, como as diversas formas clínicas da hanseníase. Embora a imunidade celular e a humoral estejam simultaneamente presentes na hanseníase, o componente celular assume maior importância na eliminação bacilar, pois *M. leprae* é um patógeno intracelular (Sehgal et al. 1989).

Nas formas multibacilares da doença (LL, BL e BB) os pacientes são caracterizados por uma reduzida imunidade celular antígeno-específica, levando a uma proliferação bacteriana descontrolada com várias lesões, podendo apresentar infiltrado extenso na pele e nervos. Altos títulos de anticorpos anti-PGL-1 e contra antígenos proteicos específicos de *M. leprae* são encontrados nesses pacientes. As lesões são caracterizadas por macrófagos com muitos vacúolos cheios de bacilos, relação CD4/CD8 invertida (1:2), ausência de organização e diferenciação dos macrófagos para formar granuloma e atrofia da epiderme (Van Voorhis et al. 1982, Cho et al. 2001). O aspecto quiescente das lesões lepromatosas sugere que o microambiente tissular impede a migração e o acúmulo de linfócitos, especialmente células T CD4⁺, visto que os linfócitos do sangue periférico nestes pacientes mantêm uma proporção de células T CD4:CD8 normal (2:1). Os mecanismos deletérios nestes pacientes envolvem tanto componentes da resposta imune celular, quanto da humoral (Van Voorhis et al. 1982, Yamamura et al. 1991, Triccas et al. 1996).

Nas formas paucibacilares da doença (TT e BT), as lesões são infiltradas predominantemente por linfócitos T CD4⁺ que secretam níveis altos de citocinas pró-inflamatórias, levando à formação de granulomas bem definidos, contendo células epitelióides e células gigantes multinucleadas do tipo Langerhans que invadem os ramos nervosos da derme (Yamamura et al. 1992, Jullien et al. 1997, Little et al. 2001). As células com fenótipo T CD8⁺ também estão presentes, mas mantendo uma relação CD4/CD8 normal (Modlin et al. 1986). Ocorre a expressão de antígenos HLA-DR em queratinócitos hiperplasiados e presença de linfócitos intraepiteliais

(Modlin & Rea 1988). Além disso, praticamente nenhum bacilo é encontrado nas lesões (Yamamura et al. 1992). A proliferação de células T e a produção de citocinas em resposta aos antígenos de *M. leprae* confirmam a forte imunidade celular desses pacientes. O teste cutâneo (Mitsuda) nesses pacientes é positivo (García et al. 1999, Kim et al. 2001).

O padrão de resposta imune Th1 x Th2 na hanseníase foi determinado através da detecção da expressão de RNAm de citocinas na lesão de pacientes tuberculoides e lepromatosos. Os pacientes lepromatosos apresentam um perfil predominante de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), havendo também produção dessas citocinas por células T do sangue periférico, sugerindo susceptibilidade à doença, já que estas citocinas levam à falha na ativação dos macrófagos e ineficácia da resposta imune protetora (Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991, Sieling & Modlin 1994a). A IL-10 tem sido detectada em altos níveis nesses pacientes, mostrando correlação positiva com o IB (Moubasher et al. 1998). A IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10, estimulam células B que inibem a ativação dos macrófagos resultando em infecção progressiva (Modlin 1994). Essa citocina (IL-4) também é capaz de reduzir a expressão de CD14 em monócitos, assim como a produção de IL-1 β e TNF, bloqueando assim a geração de óxido nítrico (NO), necessário para destruição de patógenos intracelulares (Salgame et al. 1991). Em adição à IL-4, a IL-13 tem sido incluída no mecanismo de supressão de células T na hanseníase, por seus efeitos sobre células B e macrófagos, similares aos da IL-4. Tem sido demonstrado que apenas clones de células T tipo 2 de lesões lepromatosas produzem IL-13, sugerindo que essa citocina possa ter um papel na imunossupressão encontrada nesses pacientes (Sieling & Modlin 1994a, b). Mais recentemente, foi demonstrado que a citocina imunoregulatória IL-27, que possui ambas as funções pró-inflamatória e anti-inflamatória, é fortemente expressa nas lesões de pacientes LL (Teles et al. 2015).

As lesões de pacientes tuberculoides apresentam predominantemente RNAm de citocinas do tipo Th1 (IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32, IFN γ e TNF) em comparação com as lesões de pacientes lepromatosos (Arnoldi et al. 1990, Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991, Sieling et al. 1994, García et al. 1999, Schenk et al. 2012). A IL-2 induz a expansão clonal de células T antígeno-específicas e aumenta a produção de IFN γ (Kasahara et al. 1983). O IFN γ por sua vez ativa os macrófagos, assim como aumenta a secreção de citocinas e a produção de reativos

intermediários do oxigênio e nitrogênio, estimulando-os a matar ou restringir a proliferação de micobactérias e outros patógenos intracelulares (Kaplan et al. 1986, Rook et al. 1986, Murray 1994, Raupach & Kaufmman 2001). Além disso, essa citocina também é responsável pelo aumento da expressão de HLA-DR e da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que facilitam a interação das células apresentadoras de antígenos (APC) com as células T (Dustin et al. 1988). A abundância de IL-2 e IFN γ nas lesões tuberculoides provavelmente contribui para uma maior resistência nesses pacientes, resultando em doença mais branda ou cura (Modlin 1994). Ao mesmo tempo, a produção de TNF pelos macrófagos em nível local favorece uma ação sinérgica autócrina para mantê-los ativados e formar o granuloma, o qual restringe a disseminação do patógeno (Silva & Foss 1989).

Dagur e colaboradores (2010) demonstraram que *M. leprae* interfere com eventos anteriores e posteriores da interação do TCR e CD28 com seus ligantes, resultando em redução na produção de IL-2 e inibição da proliferação de células T, o que pode estar associado à progressão da doença. O uso combinado de IL-2 e IL-12 recupera a resposta Th1 em linfócitos de pacientes BL e LL, o que sugere que o efeito inibitório é reversível (Sieling & Modlin 1994a, de Jong et al. 1997). Um redirecionamento similar da produção de citocinas de um perfil Th2 para Th1 foi verificado quando células dendríticas apresentam antígenos de *M. leprae* para células T de pacientes LL (Nath et al. 2000). Em adição, Lopez Roa e colaboradores (2008) demonstraram que em pacientes LL é possível reverter a baixa produção de IFN γ *in vitro* com a adição de IL-12/IL-18 exógenos, mas os mecanismos moleculares envolvidos, bem como a relevância disso no controle da infecção, não foram descritos.

Através da análise da resposta imune celular em lesões de pele na hanseníase, classes adicionais de células T recrutadas para o sítio de infecção foram identificadas, incluindo células T expressando receptores $\gamma\delta$ e um tipo de célula T $\alpha\beta$ duplo negativo (CD4- e CD8-) (Beckman et al. 1994, García et al. 1997, Porcelli & Modlin 1999). Estas células reconhecem antígenos não proteicos, incluindo o LAM e ácido micólico micobacterianos, os quais são apresentados por moléculas CD1 em APC, independente de MHC de classe I e II (Porcelli & Modlin 1999, Sieling et al. 2005, Torrelles et al. 2011). As proteínas CD1 são altamente expressas nas células dendríticas nos granulomas dérmicos de pacientes TT, mas o mesmo perfil não acontece em lesões de pacientes lepromatosos, o que sugere que

as células T restritas ao CD1 contribuem para o controle do patógeno (Sieling et al. 1995, 1999).

1.1.6 Interações entre *M. leprae* e células do hospedeiro

Os patógenos intracelulares sobrevivem ao escapar da resposta imune do hospedeiro e ao acessar suas vias metabólicas de modo a obterem um microambiente favorável para o seu crescimento. *M. leprae* parece ser uma das micobactérias mais dependentes das vias metabólicas do hospedeiro, incluindo lipídeos (Cruz et al. 2008). Foi demonstrado que *M. leprae* multiplica abundantemente em macrófagos ricos em colesterol (Kato 1979) e que os lipídeos de parede celular da micobactéria inibem as funções dos macrófagos, reduzindo o “burst” oxidativo e a fagocitose de macrófagos murinos. Além disso, os lipídeos de parede de *M. leprae* parecem apresentar atividade anti-inflamatória *in vivo* (Moura et al. 1997).

A infecção por *M. leprae* leva a alterações na membrana de macrófagos que se refletem na expressão de moléculas de superfície como os ácidos siálicos. Tais alterações de membrana podem afetar a capacidade microbicida de macrófagos (Agarwal et al. 1986). Um dos principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas são os receptores do tipo “Toll” (TLR) que estão presentes na superfície de monócitos, macrófagos, entre outros tipos celulares (Brightbill et al. 1999). Além disso, esses receptores também participam da ativação do fator nuclear (NF)- κ B que modula a transcrição de vários genes relacionados à resposta imune (Arbibe et al. 2000). No caso de *M. leprae*, o reconhecimento pelos TLR parece ocorrer principalmente através do heterodímero TLR2/1 para lipoproteínas triaciladas, levando à diferenciação de monócitos em macrófagos e células dendríticas (Krutzik et al. 2005) e pelo heterodímero TLR2/6 para lipoproteínas diaciladas, ativando uma resposta de citocinas inflamatórias (Montoya & Modlin 2010). A expressão de ambos TLR1 e TLR2 foi aumentada preferencialmente em lesões de pacientes BT quando comparados aos pacientes LL (Krutzik et al. 2003).

Estudos anteriores demonstraram que células T de pacientes LL em combinação com macrófagos de pacientes BT ou de contatos saudáveis, respondem

bem ao *M. leprae* após estímulo *in vitro*. Ao contrário, células T de pacientes BT ou contatos saudáveis em combinação com macrófagos de pacientes LL falham em responder, sugerindo que a ausência de resposta observada nos pacientes lepromatosos está associada à deficiente apresentação antigênica pelos macrófagos ou mesmo pela produção de mediadores capazes de negativamente regular o padrão da resposta imune celular resultante (Hirschberg 1978, Nath et al. 1980). A proliferação celular induzida por *M. leprae* pode ser inibida por fatores supressores presentes no lisado de macrófagos de pacientes LL. Tal evento não é observado em macrófagos de pacientes tuberculoides e controles saudáveis (Salgame et al. 1983). Machadevan e Antia (1980) demonstraram que macrófagos provenientes de pacientes LL apresentam reduzida síntese proteica, ao contrário do observado em pacientes BT e controles saudáveis. Os macrófagos de pacientes LL apresentam ainda níveis reduzidos de ácido siálico quando comparados aos pacientes BT e indivíduos saudáveis (Agarwal et al. 1986).

Cruz e colaboradores (2008) demonstraram o acúmulo de fosfolípidos oxidados derivados do hospedeiro em lesões de pacientes LL, sugerindo que a interface existente entre o metabolismo lipídico no hospedeiro e a imunidade inata contribui para a patogênese da infecção. Uma característica importante dos macrófagos de pacientes LL é a alta quantidade de lipídeos. Foi demonstrado que *M. leprae* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nas células de Schwann por um mecanismo dependente de TLR6, mas não de TLR2 (Mattos et al. 2011a, b). No entanto, ambos TLR2 e TLR6 parecem estar envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos por *M. leprae* em macrófagos (Mattos et al. 2010). Os corpúsculos lipídicos induzidos por *M. leprae* constituem sítios para a síntese de eicosanóides e podem ser reguladores críticos na subversão da resposta imune na hanseníase (Mattos et al. 2010).

de Souza Sales e colaboradores (2011) demonstraram que macrófagos de pacientes lepromatosos apresentam elevada expressão da enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) quando comparados aos macrófagos de pacientes tuberculoides, podendo a IDO ser induzida tanto por *M. leprae*, quanto via IFN γ . Esta enzima possui diversas funções biológicas e, nossos dados demonstraram que nos macrófagos lepromatosos a indução de IDO é mediada por IL-10, o que parece contribuir para a imunossupressão encontrada nos pacientes lepromatosos (Moura et al. 2012).

A presença do fator de transformação do crescimento (TGF)- β 1, um dos mais potentes fatores imunossupressores endógenos, foi revelada por imunohistoquímica em lesões de pacientes com hanseníase, com grande quantidade de macrófagos positivos para esta proteína no infiltrado lepromatoso e sua ausência no granuloma tuberculoide (Goulart et al. 1996, Goulart et al. 2000). O TGF- β 1 tem ação supressora sobre macrófagos, contrapondo os efeitos do IFN γ na ativação da atividade antimicrobiana mediada pelo NO e inibindo a produção de TNF, podendo assim contribuir para a perpetuação da infecção (Bermudez et al. 1993).

Além disso, já foi demonstrado que em lesões de pacientes lepromatosos a expressão de ciclooxigenase (COX)-2 está aumentada quando comparada às lesões de pacientes tuberculoide (Kiszewski et al. 2003). Esses dados corroboram estudos anteriores que observaram a liberação de mediadores como prostaglandina E2 (PGE2) e IL-10 por monócitos de pacientes lepromatosos, mas não de pacientes tuberculoide. Tais mediadores contribuíram para a inibição da linfoproliferação frente ao *M. leprae* em indivíduos sabidamente respondedores à bactéria. A PGE2 inibe a produção de IL-2 e também de IFN γ , citocinas em geral fracamente expressas nas lesões lepromatosas, mas importantes para gerar resposta imune específica (Misra et al. 1995).

Cree e colaboradores (1987) descreveram a presença de células apoptóticas no granuloma de lesões de pacientes lepromatosos e tuberculoide. Posteriormente foi observado que 56% das biópsias de pacientes paucibacilares e 20% das biópsias de pacientes multibacilares apresentavam células em apoptose. Em adição, nas lesões de paucibacilares as células em apoptose foram identificadas como linfócitos T (Walsh et al. 2004). Outro trabalho demonstrou que nas lesões de pacientes paucibacilares o número de células CD68⁺ (macrófagos) em apoptose é maior do que nas lesões de pacientes multibacilares (Cruz et al. 2008). Foi ainda demonstrado que células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hanseníase apresentam elevada apoptose *in vitro* em resposta ao *M. leprae*, quando comparadas aos controles (Gupta et al. 1999). Mediadores como FasL e os membros da família Bcl-2 (proteína recombinante linfoma de células B 2) podem estar envolvidos na indução e/ou manutenção do processo ativo de morte celular *in vitro*. Mustafa e colaboradores (2001) observaram que macrófagos de pacientes com hanseníase e tuberculose tinham uma alta expressão de FasL, indicando que infecções micobacterianas podem induzir a expressão desta molécula em uma

população de macrófagos infectados, fazendo com que eles possam se proteger dos ataques de linfócitos T citotóxicos.

1.1.7 Fagocitose de *M. leprae*

Estudos anteriores demonstraram que *M. leprae* é internalizado por projeções citoplasmáticas e incorporado em um fagossomo, no qual enzimas lisossomais foram subsequentemente liberadas (Chandi e Job 1978). A fagocitose de *M. leprae* parece envolver os receptores de complemento (CR)1, CR3 e CR4, conforme estudo realizado em macrófagos derivados de monócitos (Schlesinger & Horwitz 1991). Outro mecanismo envolvido na entrada da micobactéria na célula é a interação do LAM presente na parede celular de *M. leprae* com o receptor CD209 dos macrófagos, levando à fagocitose do patógeno. O CD209 é abundantemente expresso nos pacientes LL, mas não nos BT (Soilleux et al. 2006, Montoya & Modlin 2010). Em macrófagos de pacientes lepromatosos tratados com citocalasina B, um inibidor de fagocitose, foi observada uma redução na ingestão de *M. leprae* morto; no entanto, a ingestão de *M. leprae* viável pelos macrófagos de pacientes LL não foi afetada pela droga (Mistry et al. 1986).

O *M. leprae* é capaz de evadir a fusão lisossomo-fagossomo (Alves et al. 2004). No entanto, já foi demonstrado que os lisossomos rapidamente se fusionam com fagossomos contendo *M. leprae* em macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos, e que *M. leprae* é capaz de se translocar para citoplasma da célula, evitando assim a degradação fagolisossomal (van der Wel et al. 2007). *M. leprae* é protegido por uma zona transparente eletrondensa (ETZ) que parece ser composta por micosídeos (Ryter et al. 1984). Esta camada parece inibir a difusão de enzimas lisossomais nos fagossomos e não parece requerer a participação ativa da bactéria, uma vez que experimentos utilizando *M. leprae* morto demonstraram a formação de ETZ (Ryter et al. 1984). O acúmulo de colesterol induzido por *M. leprae* é outro fator que contribui para o escape da resposta imune e persistência intracelular da micobactéria (Lobato et al. 2014, Mattos et al. 2014).

Mycobacterium bovis BCG (BCG), *M. tuberculosis* e *M. leprae* são capazes de utilizar a proteína triptofano-aspartato contendo capa proteica (TACO ou Coronina-1A) do hospedeiro para inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, permitindo

sua sobrevivência nos macrófagos. Foi descrito que a TACO suprime a ativação mediada por TLR em macrófagos humanos e que a ativação mediada por TLR2 resulta em supressão da expressão de TACO. *M. leprae* é capaz de inibir a supressão da TACO mediada por TLR2. Uma vez que ambos TLR2 e TACO co-localizam na membrana fagossomal em lesões dérmicas de pacientes com a forma lepromatosa da doença, é possível que o balanço entre a sinalização via TLR2 e a expressão de TACO seja um ponto chave na determinação do destino de *M. leprae* após a infecção (Ferrari et al. 1999, Suzuki et al. 2006, Tanigawa et al. 2009).

Montoya e colaboradores (2009) descreveram que enquanto a IL-10 induz a via fagocítica em macrófagos, levando à expressão de CD209 e receptores “scavenger” e resultando na fagocitose da micobactéria e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade, a IL-15 induz uma via antimicrobiana dependente de vitamina D3. Neste trabalho os autores especularam que a programação para fagocitar e respostas antimicrobianas por macrófagos são distintas e diferencialmente reguladas, uma vez que a via mediada pela IL-10 foi observada predominantemente em pacientes multibacilares, enquanto que a via antimicrobiana mediada pela IL-15 foi observada preferencialmente em pacientes paucibacilares (Figura 1.8) (Montoya et al. 2009). Mattos e colaboradores (2011a) demonstraram que corpúsculos lipídicos são prontamente recrutados para os fagossomos contendo *M. leprae* nas células de Schwann e que este processo é dependente da reorganização do citoesqueleto e da sinalização via fosfatidilinositol (PI)3-cinase (PIK3), o qual pode representar um aspecto fundamental da patogênese bacteriana no nervo.

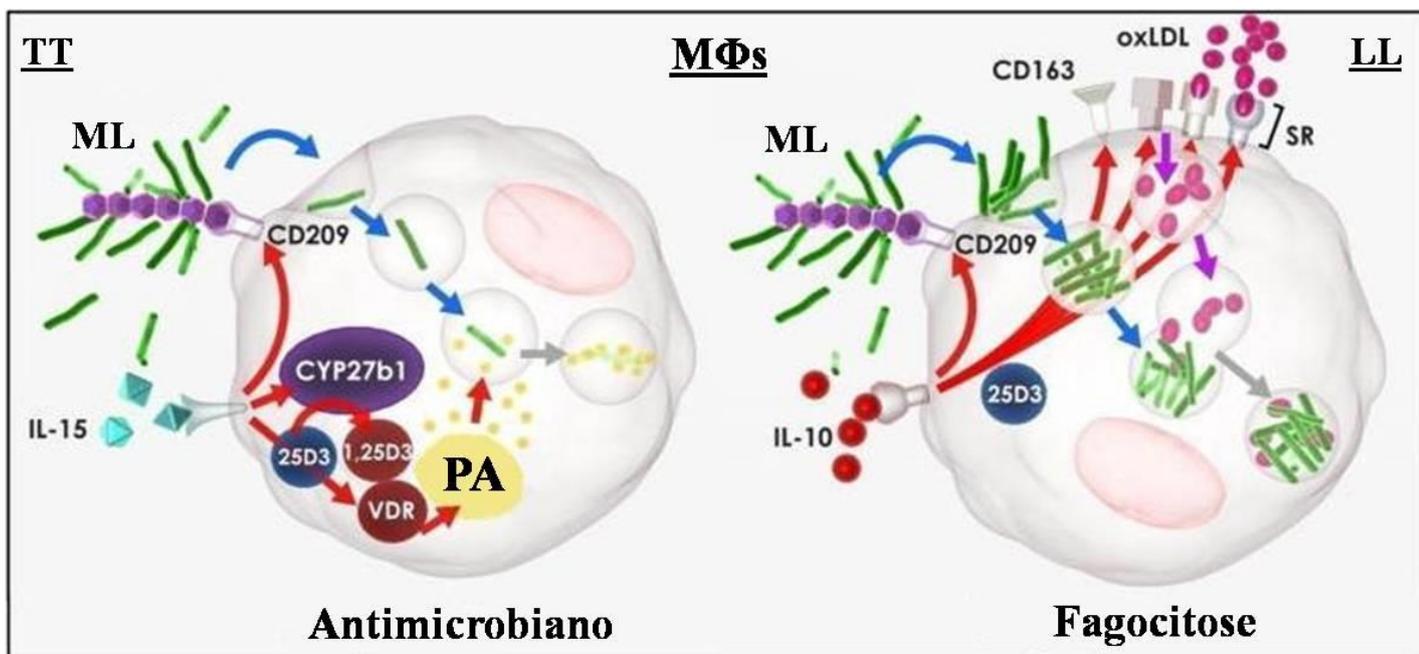


Figura 1.8: Modelo de divergência dos macrófagos na polarização da hanseníase. No pólo tuberculoide (TT), a IL-15 induz peptídeos antimicrobianos (PA) por uma via dependente de vitamina D3 (CYP27b1 converte a forma intracelular 25D3 para a forma ativa 1,25D3, que interage com seu receptor VDR) levando a morte de *M. leprae*, enquanto no pólo lepromatoso (LL) a IL-10 induz a expressão de CD163, CD209 e receptores “scavenger” (SR), resultando na fagocitose de *M. leprae* e de lipoproteínas oxidadas de baixa densidade (oxLDL), favorecendo assim a persistência da micobactéria nos macrófagos (MΦs). Fonte: adaptado de Montoya et al. 2009.

1.2 Os Interferons

1.2.1 Características gerais

Os interferons (IFNs) são membros de uma família multigênica, cujos produtos proteicos são potentes citocinas antivirais e imunorreguladoras que são produzidas pelas células do sistema imune, assim como por outros tipos celulares (Nguyen et al. 2000). Os IFNs são classificados como IFN do tipo I (IFN α/β) e IFN do tipo II (IFN γ), com base no complexo receptor utilizado para sinalização, assim como na homologia da sequência. O IFN do tipo II compreende apenas um membro da família, o IFN γ (inicialmente descrito como fator ativador de macrófagos). Os IFNs do tipo I são produtos de uma multifamília de genes, incluindo 14–20 genes de IFN α (dependendo da espécie animal), um gene de IFN β , e os menos extensivamente estudados IFN ϵ , IFN κ , IFN ω , IFN δ , IFN τ e IFN ζ (ou limitina, presente apenas em camundongos). Além dos IFNs dos tipos I e II, existe ainda uma recente família de

IFNs do tipo III, a IFN λ (representada por IL-28 A/B e IL-29), a qual é estruturalmente e funcionalmente relacionada com a família de IFNs do tipo I, mas que utiliza um diferente complexo receptor para sinalização. O IFN ζ e a família IFNs III são consideradas citocinas semelhantes ao IFN (Sen 2001, Malmgaard 2004, Pestka et al. 2004). Ao contrário dos IFNs do tipo I, que podem ser produzidos por quase todos os tipos de células nucleadas em cultura, mediante estímulo adequado, a produção de IFN do tipo II é restrita a um estreito grupo de células.

O IFN γ é produzido principalmente pelas células T (CD4+ e CD8+) ativadas durante a resposta imune adaptativa, enquanto as células NK e NK T parecem ser a principal fonte de IFN γ durante a resposta inata. No entanto, tem sido descrito que outros tipos celulares, tais como células dendríticas, células T $\gamma\delta$, macrófagos, entre outros, são capazes de produzir IFN γ em condições específicas (Nguyen et al. 2000, Malmgaard 2004).

Apesar do IFN γ também possuir funções antivirais, campo em que os IFN α/β desempenham o principal papel, sua principal função protetora é contra patógenos intracelulares que vivem em fagossomos como *M. leprae* e *M. tuberculosis*, ou em vacúolos como *Toxoplasma gondii*, e tem as células CD4 Th1 como principal fonte produtora. O IFN γ aumenta a capacidade microbicida dos macrófagos, os estimulando a matarem os patógenos localizados dentro dos fagossomos através da facilitação da fusão do fagossomo-lisossomo e da produção de radicais do oxigênio e NO; ele também é capaz de ativar as células T citotóxicas a matarem as células infectadas. Apesar de conferir defesa contra patógenos intracelulares, o IFN γ também pode estimular as células B a secretarem subclasses específicas de anticorpos IgG que podem revestir os patógenos extracelulares e ativar o sistema complemento (Alberts et al. 2002). Estima-se que o IFN γ regule a expressão de mais de 1.200 genes, enquanto os IFN α/β regulam pelo menos 100 a 300 genes. Vários mediadores imunes induzidos por IFN γ são conhecidos (Figura 1.9), tais como NOS2, Nramp1, phox, IDO, e os também induzidos por IFN α/β , PRK e as GTPases das famílias p47, GBP, VLIG (somente por γ) e Mx (somente por α , β e λ) (MacMicking 2004, Taylor et al. 2004, Martens & Howard 2006).

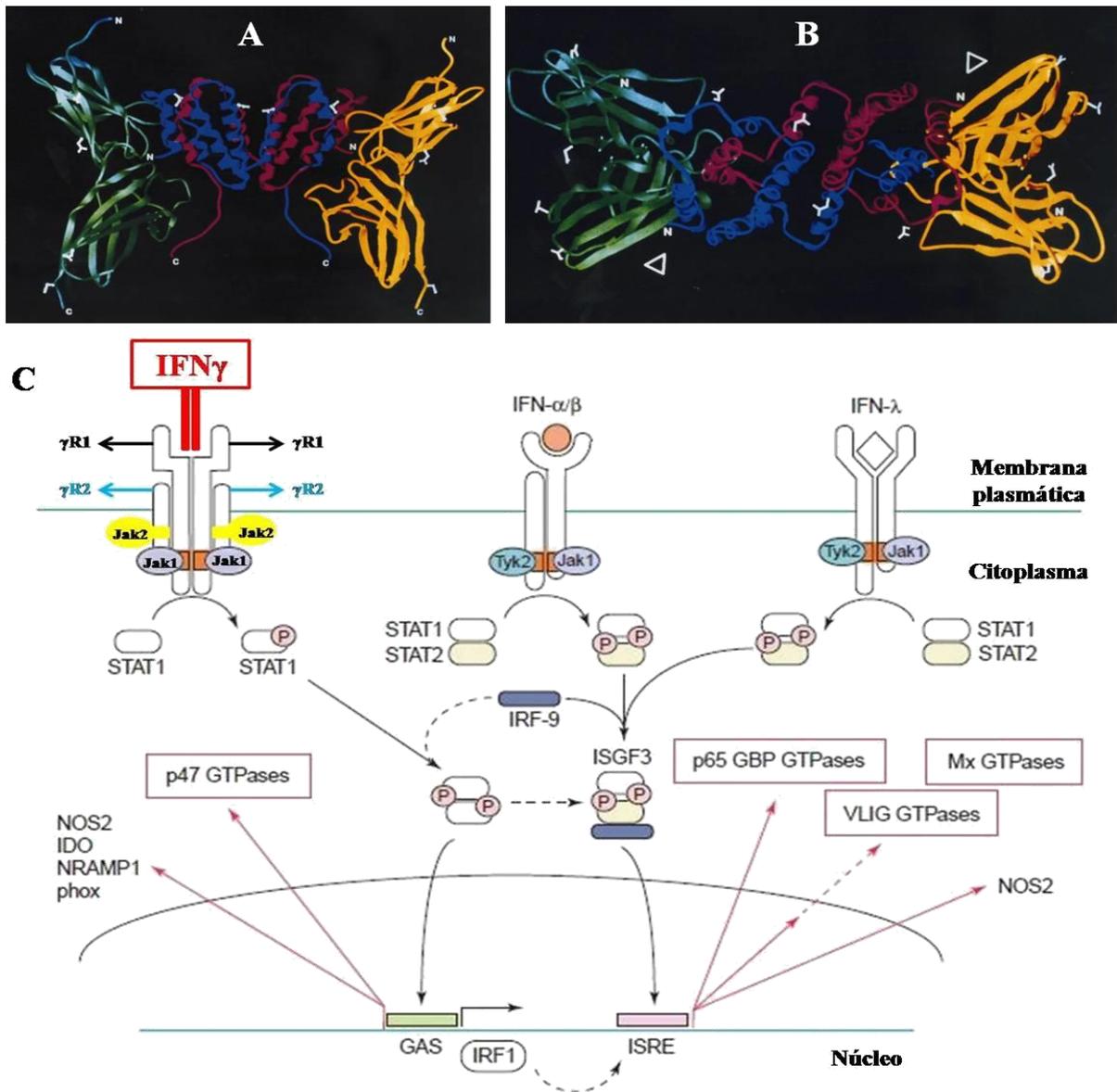


Figura 1.9: A via de sinalização através do complexo entre IFN γ e seu receptor. (A) Estrutura cristalográfica do complexo entre IFN γ e o domínio extracelular da cadeia R1 do receptor de IFN γ solúvel. As duas cadeias simples da forma ativa do homodímero de IFN γ são mostradas em azul e vermelho. Cada monômero de IFN γ se liga a um receptor solúvel, mostrados em verde e amarelo. A posição da membrana plasmática seria o final da figura. (B) Visão paralela do complexo em relação ao eixo de simetria, mostrando os sítios de ligação da cadeia R2 do receptor de IFN γ (cabeças de seta). C: carboxi-terminal, N: amino-terminal. (C) Após a formação complexo, a via de sinalização Jak/Stat é ativada, ocorrendo a fosforilação de Stat1 e translocação para núcleo, onde ele se liga ao sítio de ativação de IFN γ (GAS), ativando os genes induzidos por IFN γ . Para a produção de GBPs e VLIGs, é necessária a produção do fator regulador de IFN (IRF)-1, que se liga ao elemento de resposta estimulado por IFN (ISRE), induzindo a expressão. A produção de Mxs é induzida através de IFN α/β ou λ , e requer Jak1 ou a tirosina cinase (Tyk)2, em conjunto com Stat1/2 e IRF-9, para formar o complexo fator gênico estimulado por IFN (ISGF)3, que também se liga a ISRE, ativando a transcrição. Fonte: adaptados de Bach et al. 1997 (A-B) e MacMicking 2004 (C).

1.2.2 Papel do IFN γ na hanseníase

O IFN γ tem sido considerado como potencial tratamento para doenças causadas por patógenos virais e não virais, através da sua capacidade de aumentar a defesa antimicrobiana do hospedeiro. O tratamento humano com doses imunostimulantes de IFN γ é seguro, bem tolerado e estimula os mecanismos antimicrobianos de monócitos, neutrófilos circulantes e macrófagos teciduais, além de ativar os macrófagos alveolares, através da sua administração via aerossóis (Murray 1994, 1996). Os monócitos de pacientes com câncer, hanseníase e AIDS tratados com IFN γ respondem com alteração para um fenótipo ativado *in vitro* e a supressão da expressão de HLA-DR em monócitos de pacientes com trauma pode ser revertida pela terapia com IFN γ . Assim, ele parece ser eficaz como terapia adjuvante para pelo menos uma infecção intracelular disseminada, a leishmaniose visceral e, em conjunto com a terapia convencional, pode beneficiar pacientes com certas formas de leishmaniose cutânea, infecção disseminada pelo complexo *Mycobacterium avium* e hanseníase lepromatosa, além de ser aprovado para uso como profilaxia em pacientes com doença granulomatosa crônica (Murray 1994, 1996). A associação entre uma resposta imune celular intacta, produção de citocinas chave do tipo Th1 (como IFN γ) e a relativa restrição da infecção nos pacientes com hanseníase TT, sugerem que os pacientes LL poderiam ser imunomodulados pela administração direta de IFN γ . Assim, vários estudos descreveram a resposta benéfica da administração intradérmica de IFN γ recombinante humano (rhIFN γ) em pacientes com hanseníase LL (Nathan et al. 1986, Samuel et al. 1987, Kaplan et al. 1989, Nathan et al. 1990, Damasco et al. 1992, Sampaio et al. 1992, Bermudez & Kaplan 1995, Sampaio et al. 1996).

Nathan e colaboradores (1986) demonstraram, em um pequeno estudo piloto controlado, que três injeções intradérmicas de 10 μ g de rhIFN γ induziram uma evidente hipersensibilidade tardia local, uma reação tipicamente ausente nas lesões LL. Adicionalmente, a carga de *M. leprae* em amostras de biópsias de pele foi reduzida em mais de 10 vezes em vários pacientes. Estes efeitos locais, incluindo a formação de granuloma, foram confirmados em dois estudos maiores, um dos quais demonstrou que após 2 a 6 injeções de 10 μ g de rhIFN γ , havia uma redução superior a 10 vezes no IB de *M. leprae* na área de injeção, em 16 dos 24 pacientes tratados. Sem nenhum tratamento adicional, durante os 6 meses subsequentes,

ocorreu uma redução de mais de 10 vezes na carga bacilar na maioria dos pacientes em que amostras adicionais de fragmentos de pele foram obtidas (Samuel et al. 1987, Kaplan et al. 1989).

A injeção intradérmica de rhIFN γ por 6 dias em conjunto com PQT, resulta tanto numa redução do número de BAAR na pele, no local da injeção, quanto numa redução em locais distais, mostrando que o IFN γ pode acelerar a eliminação de *M. leprae* em comparação com a PQT sozinha e mudar o padrão histológico das lesões de pacientes LL para um padrão semelhante ao de pacientes BT (Sampaio et al. 1992, 1996). Outro estudo realizado com pacientes LL, sugeriu que os bacilos que persistem nos locais que receberam injeções intradérmicas de rhIFN γ também mostraram redução na viabilidade do patógeno (Damasco et al. 1992). Num estudo de hanseníase com pacientes LL, no qual a terapia sistêmica foi testada, os efeitos antimicrobianos não puderam ser medidos com precisão por causa dos baixos IBs iniciais. Porém, a injeção intramuscular de 10 ou 30 μ g/dia de rhIFN γ durante 10 dias, claramente induziu evidências histológicas de uma reposta imune mediada por células, de longa duração, em amostras de fragmentos de pele obtidas a partir de áreas distantes dos locais de injeção de rhIFN γ (Nathan et al. 1990).

Em conformidade com os ensaios clínicos, outros tipos de estudos também têm demonstrado a importância do IFN γ na hanseníase. A administração intradérmica de rhIFN γ em pacientes LL induz um rápido influxo local de monócitos e células T, similar a uma reação de hipersensibilidade tardia, excetuando-se a ausência de migração de células de Langerhans para a derme, e indução de uma grande expressão de MHC de classe II na superfície de queratinócitos epidérmicos (Kaplan et al. 1987a, b, c). Em resposta ao IFN γ , queratinócitos sintetizam a quimiocina IP-10 (ou CXCL10) *in vitro*, assim como a injeção de rhIFN γ em pacientes LL induz a expressão de IP-10 nas lesões de pele, o que naturalmente só é observado nas lesões de pacientes TT (Kaplan et al. 1987c). Em adição, macrófagos derivados de monócitos de pacientes LL respondem ao rhIFN γ com uma secreção aumentada de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), de forma semelhante às células obtidas de doadores normais, mostrando assim que esta citocina é capaz de ativar os macrófagos LL *in vitro* (Kaplan et al. 1986).

A estimulação *in vitro* de células aderentes CD14+ provenientes de pacientes LL, com IFN γ ou proteínas de membrana do *M. leprae*, leva a maiores níveis de

RNA_m de IFN γ R1 e IFN γ R2, quando comparadas às células de controles saudáveis sob os mesmos estímulos. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na expressão de IFN γ R1 na superfície das células aderentes de controles saudáveis e pacientes LL. No entanto, a análise da expressão proteica de IFN γ R2 revelou que as células de controles saudáveis expressam apenas a forma madura glicosilada de 61-67 kDa desse receptor, enquanto as células de pacientes LL mostram 3 padrões diferentes de expressão: (a) a forma imatura deglicosilada de 34.8 kDa, a forma madura glicosilada de 61-37 kDa, e (c) ambas as formas proteicas do IFN γ R2; independentemente da estimulação com IFN γ , sugerindo a existência de diferenças no processamento intracelular e na expressão proteica do receptor de IFN γ em células aderentes de pacientes LL (Guerrero-Velázquez et al. 2010). Cardoso e colaboradores (2010) demonstraram em um estudo de caso-controle que o polimorfismo de base única (SNP) no gene de IFN γ , *IFNG* +874 T>A, mais especificamente no alelo +874 T, é associado com um efeito protetor para a hanseníase entre os brasileiros. Adicionalmente, a liberação espontânea de IFN γ por células mononucleares sanguíneas foi maior entre os portadores do SNP +874 T (Cardoso et al. 2010).

Embora o tratamento de pacientes MB com rhIFN γ apresente efeitos benéficos, a administração prolongada dessa citocina pela via intradérmica foi associada com o desenvolvimento de ENH em 60% dos pacientes, contra 8-15% no tratamento apenas com a PQT (Sampaio et al. 1992). Essa indução de ENH pode ser atenuada através do tratamento desses pacientes com talidomida, que resulta na redução do infiltrado dérmico, dos sintomas tóxicos, dos altos níveis de TNF, e na eliminação das lesões do estado reacional, diminuindo assim o ENH (Sampaio et al. 1992, 1993, Bermudez & Kaplan 1995, Sampaio et al. 1996).

O IFN γ está associado ao controle da infecção pelo *M. tuberculosis* por um processo relacionado à autofagia (Gutierrez et al. 2004). Curiosamente, a via autofágica converge com a via vitamina D3-catelicidina, a qual é preferencialmente observada na forma paucibacilar da hanseníase (Krutzik et al. 2008, Montoya et al. 2009). A vitamina D3 induz autofagia via catelicidina e é requerida para a atividade antimicrobiana mediada pelo IFN γ (Yuk et al. 2009, Fabri et al. 2011).

1.3 Autofagia

1.3.1 Características gerais

O termo autofagia (do grego *auto* para próprio e *phagein*, significando comer) foi utilizado na década de 60 por Christian de Duve e se refere a uma série de processos intracelulares que levam à remoção de proteínas citosólicas ou organelas celulares pelos lisossomos (de Reuck & Cameron 1963, Klionsky 2008). A autofagia é um processo homeostático fundamental que ocorre em todos os sistemas eucarióticos, onde as células ingerem e digerem porções de seu próprio citoplasma para remoção ou renovação de estruturas (Mizushima et al. 2002, Levine & Klionsky 2004).

Existem várias formas descritas de autofagia, podendo ser seletivas ou não seletivas, diferindo principalmente no tipo de carga e no local celular onde a carga é sequestrada. Estas incluem: macroautofagia, microautofagia, autofagia mediada por chaperonas, micro e macropexofagia, microautofagia fragmentada do núcleo, a via citoplasma-para-vacúolo alvo (em leveduras), entre outras (Legakis & Klionsky 2006). A macroautofagia, aqui chamada de autofagia, é o foco corrente da atenção porque este é o processo que envolve o seqüestro e o transporte de regiões completas do citoplasma – incluindo proteínas solúveis e organelas inteiras – com vacúolos de dupla membrana para o sistema lisossomal com a finalidade de degradação (Xie & Klionsky 2007).

A autofagia é capaz de remover por sequestro e degradação (Mizushima et al. 2008), ou algumas vezes por secreção (Duran et al. 2010, Manjithaya et al. 2010) ou extrusão (Heynen et al. 1985, Schweers et al. 2007, Taylor et al. 2009), uma ampla gama de componentes intracelulares que varia de agregados proteicos a organelas, tais como mitocôndrias. Uma característica da autofagia é que alvos citoplasmáticos são capturados em organelas de dupla membrana de origem endomembranosa, denominadas autofagossomos, as quais subsequentemente maturam em autolisossomos onde a carga capturada é degradada ou eliminada (Figura 1.10). Entre as funções fisiológicas descritas para a autofagia, pode-se destacar: a provisão de energia e aminoácidos para a célula em estresse metabólico ou mesmo de privação de nutrientes; prevenção de morte celular ou senescência devido ao acúmulo de agregados macromoleculares ou organelas com mau funcionamento e,

por fim, o seu potencial de induzir morte celular (Gozuacik & Kimchi 2004, Kroemer & Levine 2008, McPhee et al. 2010).

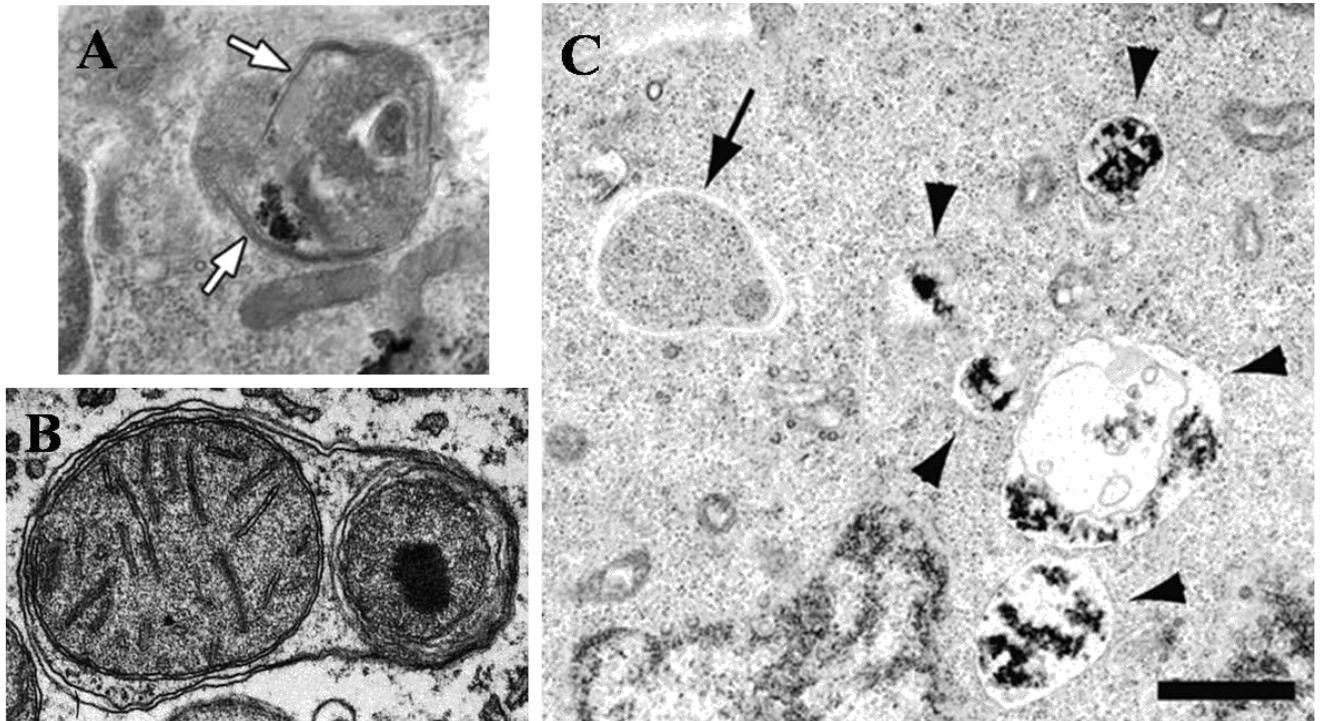


Figura 1.10: Autofagossomos: estruturas de dupla membrana características da autofagia. (A) A estrutura inicial, a membrana de isolamento (setas) circundando componentes citoplasmáticos. (B) Autofagossomo envolvendo uma mitocôndria e um peroxissomo. (C) Um autofagossomo (seta) e vários autolisossomos (cabeças de seta), as estruturas finais. Fonte: adaptados de Florez-McClure et al. 2004 (A), Friend 1994 (B) e Mizushima 2005 (C).

1.3.2 Mecanismo de execução da autofagia

Três estágios morfológicos são descritos na indução de autofagia: (1) iniciação (formação de membranas crescentes denominadas membranas de isolamento ou fagóforos), (2) alongamento e fechamento (aumento do tamanho da membrana de isolamento e sua transformação em um autofagossomo completo contendo a carga sequestrada), e (3) maturação, a conversão de autofagossomos em organelas degradativas denominadas autolisossomos pela fusão com organelas de endossomo (formando anfissomo) e depois com lisossomos. A via de sinalização do processo autofágico também pode ser mecanicamente dividida em diferentes etapas: (a) indução, (b) seleção de carga e empacotamento, (c) nucleação da

vesícula, (d) expansão e conclusão da vesícula, (e) recuperação, (f) alvo, ancoragem e fusão da vesícula com o lisossomo, e (g) quebra da membrana interna da vesícula e de seu conteúdo (Legakis & Klionsky 2006).

Um regulador chave da autofagia é o alvo da rapamicina nos mamíferos (mTOR), estando presente em 2 complexos (mTORC)1 e 2. Esta proteína é uma serina/treonina cinase pertencente à superfamília de cinases relacionadas à PIK3 (PIKK), que regula a proliferação celular e o metabolismo em resposta aos fatores de crescimento e demandas nutricionais e energéticas. A mTOR estimula processos anabólicos, enquanto a sua inibição aumenta os processos catabólicos, incluindo a autofagia. Por exemplo, mTOR se mantém ativada por fatores de crescimento via Akt (proteína cinase B), resultando na inibição da autofagia (Wullschleger et al. 2006). Ao contrário, o tratamento com rapamicina ou com privação de aminoácidos ou nutrientes leva à inibição de mTOR e a indução de autofagia.

A biogênese do autofagossomo é controlada por um sistema de conjugação composto de mais de 30 genes relacionados com a autofagia, designados *ATG*, identificados primeiramente em estudos genéticos em leveduras (Tsukada & Ohsumi 1993, Klionsky et al. 2003). Sob condições ricas de nutrientes, mTORC1 suprime o complexo ULK, que é ortólogo ao complexo Atg1 de leveduras, sendo composto por ULK1/2, Atg13, FIP200, Atg101. Quando a autofagia é induzida, inicia-se a etapa de nucleação e formação do autofagossomo através do complexo ULK, que é ativado e se transloca para um determinado domínio provavelmente do retículo endoplasmático (ER). Uma vez no ER, o complexo ULK recruta o complexo PIK3 de classe III (PIK3C3) (Beclina-1 [BECN1 ou Atg6], mAtg14, p150 [VPS15], hVPS34, AMBRA1, UVRAG [VPS38] e Rubicon) ou complexo I para o ER, sendo o recrutamento de BECN1 imprescindível para a ativação deste complexo. Esta proteína forma um complexo com BCL2, ficando inibida. A cinase JNK1 fosforila BCL2, liberando a BECN1 da ligação com BCL2 e permitindo que ela ative o complexo PIK3C3, sendo essa regulação é promovida por RalB e pelo complexo exocítico contendo Exo84. O PIK3C3 forma PI3-fosfato, que recruta moléculas efetoras como DFCP1 e WIPIs, promovendo a formação do omegassoma no ER, o local de onde o autofagossomo parece ser gerado e onde as outras Atg são montadas. As WIPIs são cruciais para a maturação/desenvolvimento do omegassoma em membranas de isolamento, assim como as proteínas VMP1 e Atg9 que também estão presentes na parte externa da membrana de isolamento e

parecem participar do estágio inicial de formação do autofagossomo. Começa então a etapa de alongamento e fechamento da vesícula, que requer o recrutamento de dois sistemas de conjugação, Atg5-Atg12-Atg16 e LC3-PE (fosfatidiletanolamina), para a membrana de isolamento, sendo estes sistemas semelhantes ao processo de ubiquitinação. Inicialmente, forma-se o conjugado Atg12-Atg5, produzido pelas enzimas Atg7 (que é semelhante à enzima ativadora E1 do sistema ubiquitina) e Atg10 (a qual é semelhante à enzima de conjugação E2 do sistema ubiquitina), e por sua vez, esse conjugado interage com Atg16L1, formando o complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 presente na parte externa da membrana de isolamento. O segundo sistema de conjugação inicia-se com Atg4, que faz uma clivagem e expõe a glicina localizada na posição 120 da sequência da pró-LC3 (proteína 1 associada aos microtúbulos, cadeia leve 3), fazendo a conversão para LC3-I no citoplasma, depois a enzima Atg7 ativa LC3-I, que é então conjugado ao lipídio PE pela enzima Atg3 (a qual é semelhante à enzima de conjugação E2 do sistema ubiquitina) com auxílio do complexo Atg12-Atg5-Atg16L1 (que funciona como uma enzima ligase E3 do sistema ubiquitina), formando sua forma lipidada LC3-PE (ou LC3-II), que se transloca do citoplasma principalmente para as pontas das partes interna e externa da membrana de isolamento, controlando então a expansão da membrana de isolamento e o tamanho do autofagossomo. Quando a formação do autofagossomo é completada, o LC3 presente na membrana externa é clivado do PE pela Atg4, sendo liberado para retornar ao citoplasma, juntamente com a maioria das outras proteínas Atg que também são dissociadas do autofagossomo. Ocorre então a fusão com o lisossomo por um processo dependente do complexo II (hVPS34, BECN1 e UVRAG), Atg14, TBK1, LAMP-2, Rab7 e das SNAREs STX17, SNAP29 e VAMP8, formando o autolisossomo, onde com o auxílio dos sistemas de conjugação, ocorre a quebra da membrana interna do autofagossomo e a degradação da carga através das hidrolases lisossomais (Figura 1.11 e 1.12). Antes da fusão dos autofagossomos com os lisossomos, pode haver uma etapa prévia de fusão entre autofagossomos e endossomos, formando um vacúolo chamado anfissomo, que posteriormente se fusionaria com os lisossomos. As macromoléculas resultantes são liberadas através de permeases e recicladas no citosol (Mizushima et al. 1998, Ichimura et al. 2000, Kabeya et al. 2000, Nakatogawa et al. 2007, He & Klionsky 2009, Deretic 2011, Levine et al. 2011, Mizushima & Komatsu 2011, Itakura et al. 2012, Pilli et al. 2012, Chandra et al. 2015, Diao et al. 2015, Tsuboyama et al. 2016). A autofagia também pode ocorrer por vias não canônicas, independentemente de mTOR (He & Klionsky

2009, Eng et al. 2010, Kumar & Rao 2011, Zullo & Lee 2012) e das proteínas Atg (Nishida et al. 2009, Tsuboyama et al. 2016).

Em leveduras, o sítio de biogênese dos autofagossomos é conhecido, sendo a membrana de isolamento proveniente da PAS (sítio de montagem do fagóforo ou estrutura pré-autofagossomal). No entanto, em células de mamíferos a origem exata da membrana de isolamento permanece desconhecida até hoje. Várias sugestões têm sido propostas para a origem da membrana autofagossomal e seu sítio de nucleação, existindo dois modelos principais, em que ela seria originada a partir de síntese *de novo* (modelo de montagem), ou que seria derivada de membranas celulares pré-existentes (modelo de maturação), como as do complexo de Golgi, mitocôndria, membrana plasmática, endossomos, corpúsculos lipídicos, GERL (golgi-ER-lisossomos), ERGIC (compartimento intermediário entre golgi e ER), ERES (sítios de saída do ER) e MAM (membrana do ER associada à mitocôndria) (Figura 1.13). O consenso atual é que a membrana autofagossomal se origina das membranas do ER (em um subdomínio rico em PI3P conhecido como omegassoma) que estão em íntimo contato com as mitocôndrias, de modo que vários compartimentos celulares, como os mencionados acima, contribuem para a expansão do autofagossomo nascente. Também se acredita que o processo de fechamento do autofagossomo é mediado por cisão e não fusão das extremidades da membrana de isolamento crescente (Juhász et al. 2006, Hayashi-Nishino et al. 2009, Hailey et al. 2010, Ravikumar et al. 2010, Bodemann et al. 2011, Ge et al. 2013, Graef et al. 2013, Hamasaki et al. 2013, Lamb et al. 2013, Puri et al. 2013, Dupont et al. 2014, Knorr et al. 2015, Shpilka et al. 2015).

A detecção e quantificação de autofagia por microscopia eletrônica é um método clássico e importante, sendo um dos mais usados, porém pode apresentar muitos artefatos e a classificação morfológica dos compartimentos pode ser problemática (Kirkegaard et al. 2004, Klionsky et al. 2008, 2016). Quando o LC3 (um dos 6 ortólogos humanos do Atg8 de leveduras) é analisado por microscopia de fluorescência, ele mostra dois padrões diferentes: o LC3-I apresenta uma fluorescência difusa no citoplasma, enquanto que LC3-II por sua vez apresenta um padrão puntiforme na membrana do autofagossomo, assim como na membrana de isolamento e em menor parte nos autolisossomos. A conversão de LC3-I para LC3-II também pode ser detectada por imunoblot, pois a LC3 acoplada à PE (LC3-II) migra mais rapidamente que a LC3 não lipídada (LC3-I) durante a eletroforese em géis de

poliacrilamida, sendo esta proteína considerada um bom marcador para monitorar a autofagia (Figura 1.14) (Deretic 2006, Mizushima & Yoshimori 2007, Klionsky et al. 2008, 2016). Nas células de mamíferos, a via pode ser inibida através da adição dos inibidores farmacológicos 3-metiladenina (3-MA) ou Wortmanina (Wtm) (Tanida et al. 1999, Kabeya et al. 2000, Kirkegaard et al. 2004).

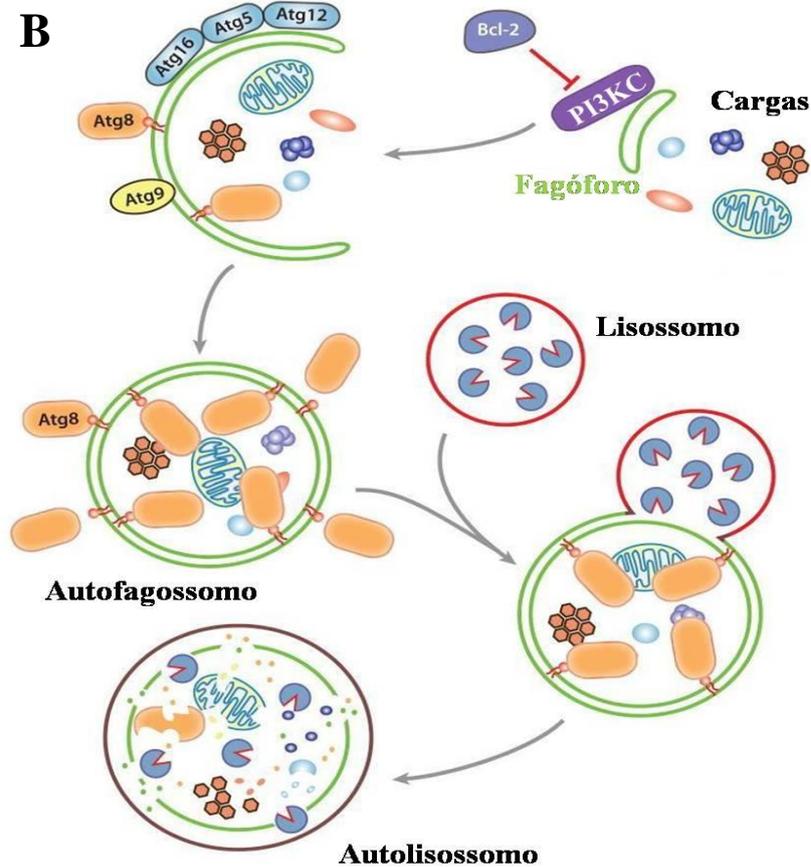
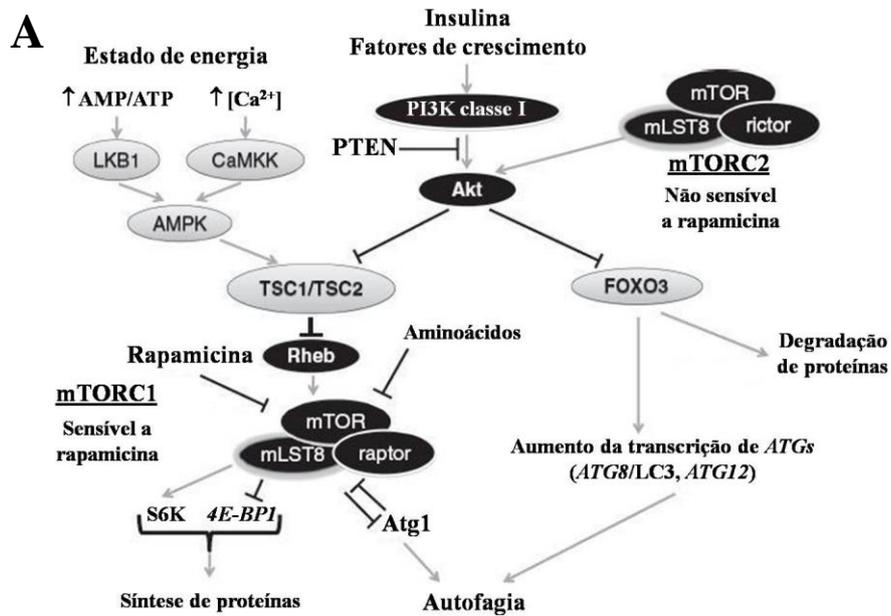


Figura 1.11: Modelo esquemático simplificado da autofagia. (A) Esquema de indução da autofagia através da sinalização via complexos mTOR. As moléculas ativadoras da autofagia são mostradas em cinza, enquanto as inibidoras são representadas em preto. As setas em cinza representam ativação, enquanto as barras em preto representam inibição. (B) Esquema do fluxo autofágico, mostrando a formação do autofagossomo, fusão com o lisossomo e a degradação das cargas no autolisossomo. Fonte: adaptados de Esclatine et al. 2009 (A) e He & Klionsky 2009 (B).

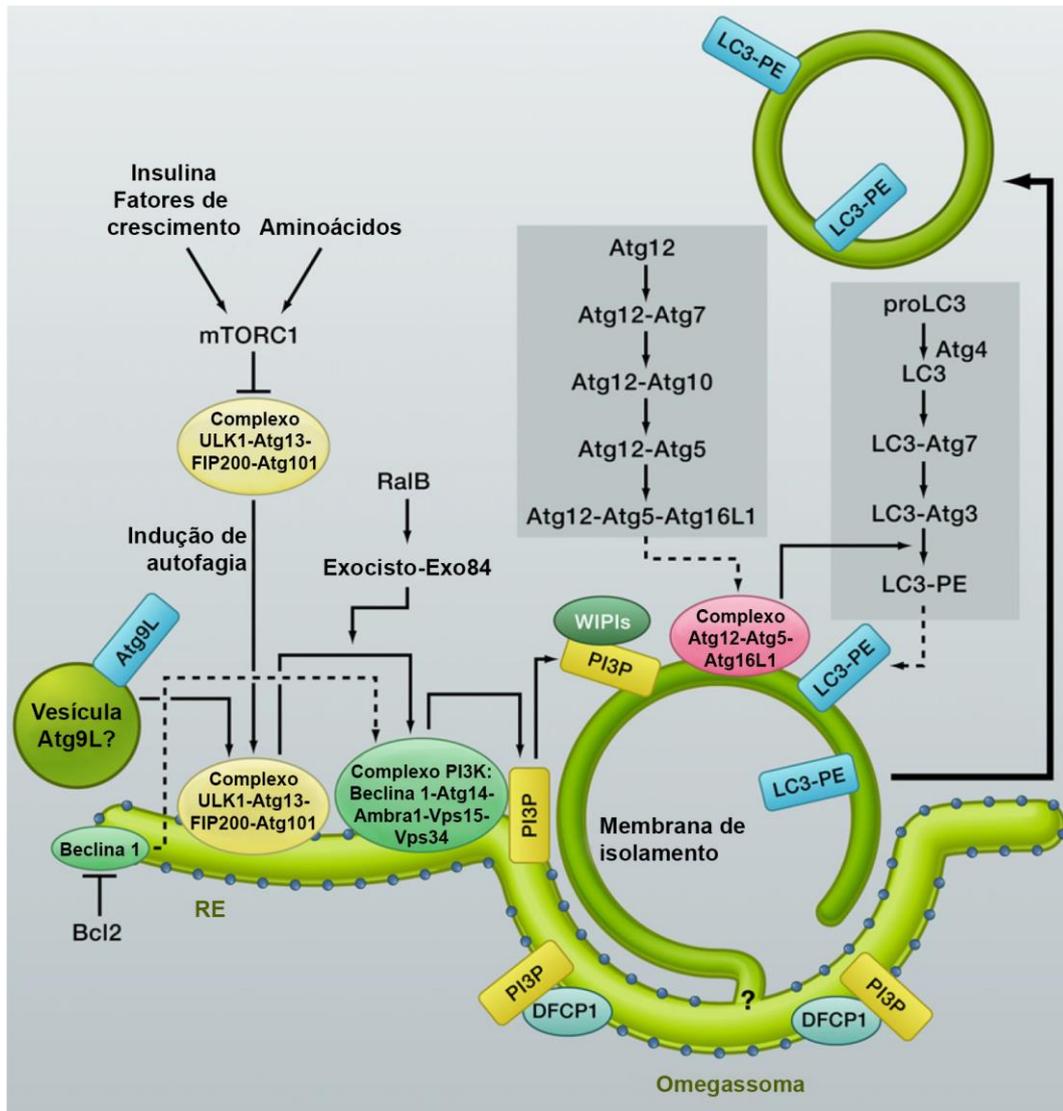


Figura 1.12: Formação do autofagossomo pela via canônica em células de mamíferos. mTORC1 suprime o complexo ULK1 em condições ricas em nutrientes. Após a inibição de mTORC1, ocorre a indução de autofagia e a ativação do complexo ULK1 (incluindo ULK1, Atg13, FIP200 e Atg 101), que se transloca para um certo domínio no retículo endoplasmático (RE). Uma vez no retículo endoplasmático, o complexo ULK1 regula o complexo fosfatidilinositol 3-quinase (PIK3) de classe III (incluindo Beclina-1, Atg14 (BARKOR), Vps15, Vps34 e Ambra1) e essa regulação é feita por RalB e pelo complexo exocítico contendo Exo84. Beclina-1 forma um complexo com a Bcl-2 em condições ricas em nutrientes e é liberada após a fosforilação de Bcl-2 pela JNK1. A Atg9L, uma proteína multimembrana, também está envolvida no estágio inicial da formação do

autofagossomo, sendo recrutada provavelmente em vesículas. A formação de PI3 fosfato (PI3P) recruta as proteínas DFCP1 e WIPIs, promovendo a formação do omegassoma, do qual os autofagossomos parecem ser gerados. Os sistemas de conjugação Atg12-Atg5-Atg16L1 e LC3 conjugado à fosfatidiletanolamina (PE) desempenham um importante papel no alongamento e fechamento da membrana de isolamento. Fonte: Adaptado de Mizushima & Komatsu, 2011.

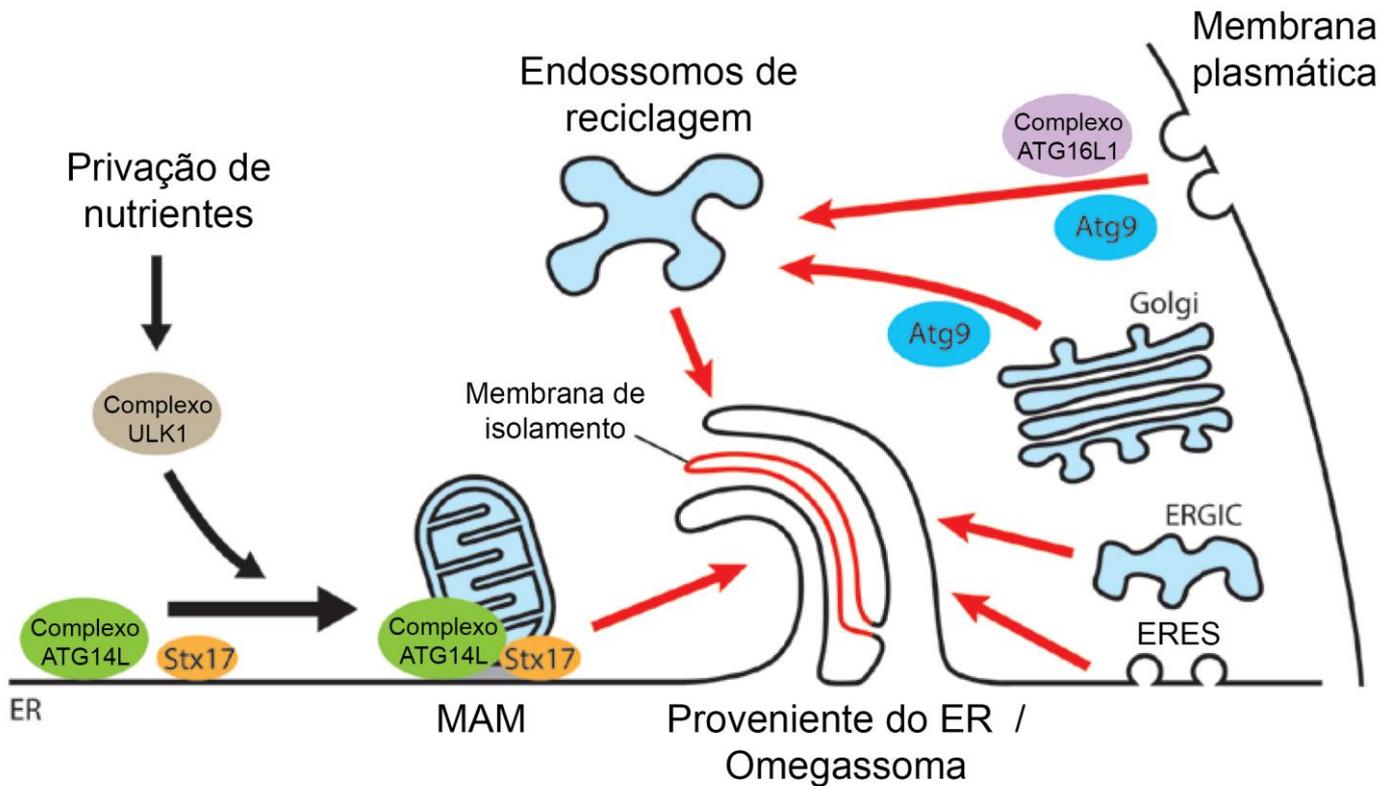


Figura 1.13: Modelo de fontes de origem da membrana autofagossomal. Após a privação de aminoácidos, STX17 facilita a acumulação de Atg14L em sítios de contato da membrana do retículo endoplasmático (ER) associados à mitocôndria (MAM), induzindo a formação de um berço no ER de onde a membrana de isolamento é proveniente, também chamado de omegassoma. Essas estruturas são positivas para DFCP1. Neste modelo, as outras fontes de membrana suportam o alongamento da membrana de isolamento em formação no berço / omegassoma do ER. ERGIC: compartimento intermediário entre golgi e ER; ERES: sítios de saída do ER. Fonte: adaptado de Shibutani & Yoshimori, 2014.

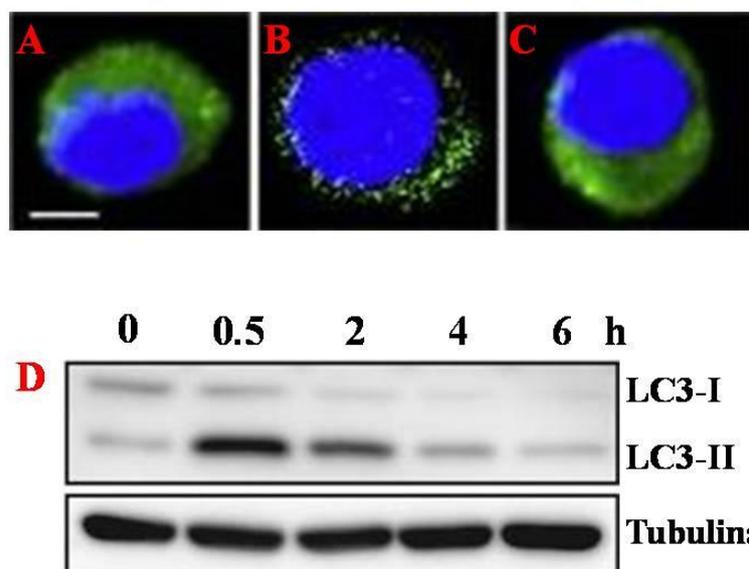


Figura 1.14: Ensaio de monitoramento da autofagia através de LC3. Fluorescência em monócitos mostrando LC3-I (A) e LC3-II (B). A autofagia pode ser bloqueada usando 3-MA (C). Quando a autofagia é induzida, a lipidação de LC3 também pode ser monitorada por imunoblot, os valores indicam os tempos de indução de autofagia (D). Fonte: adaptados de Yuk et al. 2009 (A-C) e Mizushima & Yoshimori 2007 (D).

1.3.3 Papel não autofágico das proteínas Atg

Este papel é baseado em um conjunto de atividades que refletem a participação não autofágica de um ou mais genes (e seus produtos) de autofagia. Zhao e colaboradores (2008) foram um dos primeiros a demonstrar este fenômeno. Estes autores demonstraram que a Atg5, mas sem participação da via canônica de autofagia, foi requerida *in vivo* para o controle da infecção por *Listeria monocytogenes* e *T. gondii* mediado por $IFN\gamma$ em macrófagos. Saitoh e colaboradores (2009) demonstraram que a Atg9a regula a translocação (ER→Golgi) do sensor de ácidos nucleicos de fita dupla STING e sua posterior montagem no citoplasma em conjunto com a cinase 1 de ligação a TANK (TBK1), ativando assim a resposta imune inata antiviral.

O papel não autofágico melhor caracterizado até agora é sobre um processo conhecido como fagocitose associada à LC3 (LAP), que envolve a fagocitose convencional e o recrutamento da proteína autofágica LC3 para os fagossomos, sendo este processo dependente de outras moléculas da via de autofagia como Atg5, Atg7 e BECN1, mas independente de ULK1. Este processo, ligado a

fagocitose, não envolve a formação de membranas duplas e não é afetado por rapamicina ou privação de nutrientes. A LAP é ativada após a fagocitose de partículas que se ligam a receptores de superfície como TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TIM4 e FcR, ou endossomais como TLR9, levando a uma rápida maturação dos fagossomos em autofagolisossomos e à degradação de células mortas, ou ainda de patógenos como *Salmonella Typhimurium*, *Burkholderia pseudomallei* e *Aspergillus fumigatus*, sendo capaz de modular a resposta imune (Huang et al. 2009, Florey et al. 2011, Gong et al. 2011, Martinez et al. 2011, Henault et al. 2012, Li et al. 2013, Klionsky et al. 2014, Martinez et al. 2015). Também foi demonstrado um importante papel para a LAP no desenvolvimento de doenças autoimunes, onde a deficiência em componentes especificamente requeridos para LAP (e não para a autofagia canônica) como Rubicon e NOX2, leva ao desenvolvimento de lúpus eritematoso sistêmico (Henault et al. 2012, Martinez et al. 2016).

No contexto de papéis não autofágicos das proteínas Atg, incluem-se ainda: a reabsorção óssea por osteoclastos, adaptação à degradação associada ao ER (ERAD), replicação viral (*Coronavirus* associado à SARS, vírus da hepatite murina – *Betacoronavirus* e vírus da arterite equina – *Arterivirus*), bloqueio da via de replicação de *Chlamydia trachomatis*, controle da infecção por *Brucella abortus* ou *Norovirus* murino, inibição da atividade antimicrobiana da autofagia durante a infecção pelo vírus vaccinia (*Orthopoxvirus*), divisão celular e bloqueio do ciclo celular, controle da homeostasia mitocondrial e morte celular, processos secretórios (exocitose, secreção regulada, polarizada, convencional e não convencional), manutenção do equilíbrio (propriocepção), controle da transcrição gênica, modulação do transporte e sinalização celular, remodelamento do citoesqueleto, orientação axonal, inibição da sinalização via TBK1, inibição da sinalização de receptores do tipo RIG-I (RLR) e produção de IFN do tipo I, adipogênese e formação de corpúsculos lipídicos (Shibata et al. 2009, 2010, Deretic 2011, Bestebroer et al. 2013, Jiang et al. 2013, Subramani & Malhotra 2013).

Tem sido descrito que a autofagia ou os fatores relacionados a ela não somente ajudam na indução e execução da resposta imune inata, mas também limitam essa resposta, assim como o processo inflamatório (Jounai et al. 2007, Saitoh et al. 2008, 2009). Assim, de um modo geral, a autofagia atua como um importante mecanismo homeostático (Deretic 2011). Ainda podem ser incluídas outras funções da via de autofagia e/ou suas proteínas nos mecanismos efetores

durante infecções, e nos mecanismos de resposta inata e adaptativa, tais como: remoção de corpos apoptóticos, regulação da produção de citocinas inflamatórias, regulação da produção de IFNs do tipo I, maturação do fagossomo, seleção negativa no timo, desenvolvimento de células B e T, maturação de células T, citoproteção contra fatores ou toxinas microbianas e recrutamento de moléculas efetoras imunes para membranas intracelulares (Pua et al. 2007, 2009, Motensen et al. 2010, Levine et al. 2011, Mizushima & Komatsu 2011).

1.3.4 Relação da autofagia com patologias humanas

A autofagia e os genes de autofagia estão relacionados a um amplo espectro de doenças humanas, incluindo doença de Alzheimer (Lee et al. 2010), doença de Huntington (Martinez-Vicente et al. 2010), doença de Parkinson, diabetes (Ebato et al. 2008, Jung et al. 2008, Meijer & Codogno 2008), atrofia muscular e miopatias (Mammucari et al. 2007, Cuervo 2008, Zhang & Cuervo 2008, Henriques-Pons & Nagaraju 2009, Vergne et al. 2009), fibrose cística, hipertrofia cardíaca, obesidade, doença de Paget, doenças de armazenamento lisossomal, pancreatite aguda, deficiência de α 1-antitripsina (Mizushima & Komatsu 2011), com papéis adicionais no fígado, em respostas antioxidantes, metabolismo lipídico e câncer (Hara et al. 2006, Komatsu et al. 2006, 2007, Levine 2007, Singh et al. 2009). A autofagia tem sido associada através de triagens genômicas com doenças inflamatórias como a doença de Crohn e através de análise genética populacional com susceptibilidade à tuberculose (Consortium 2007, Parkes et al. 2007, Intemann et al. 2009).

1.3.5 Autofagia e processos infecciosos

A autofagia participa de quase todos os aspectos da resposta imune, afetando mecanismos inatos e adaptativos (Deretic 2005, Levine & Deretic 2007, Schmid & Münz 2007, Deretic & Levine 2009, Münz 2009). Além do papel da autofagia na eliminação de agregados proteicos potencialmente tóxicos e na prevenção contra a neurodegeneração (Nixon 2006), a autofagia desempenha um importante papel na imunidade inata através do reconhecimento, captura e eliminação de patógenos intracelulares (Dupont et al. 2009, Thurston et al. 2009, Yoshikawa et al. 2009,

Zheng et al. 2009, Orvedahl et al. 2010), por um processo denominado xenofagia (Levine 2005), ou por liberação de produtos antimicrobianos para nichos intracelulares levando à morte de patógenos (Ponpuak et al. 2010). Estes processos contribuem para a ativação autofágica de macrófagos (APMA), o aumento do reconhecimento de produtos microbianos por receptores da imunidade inata, tais como os TLR, e o aumento da apresentação de antígenos endógenos ou não, via MHC (Lee et al. 2007, Deretic & Levine 2009, Münz 2009, Lee et al. 2010). Tem sido mostrado que a maquinaria autofágica pode liberar padrões moleculares associados à patógenos (PAMP) para TLR endossomais (Lee et al. 2007) e que diversos PAMP e outros ligantes de TLR podem induzir autofagia em macrófagos (Delgado et al. 2008). A autofagia é considerada um mecanismo efetor posterior à estimulação de receptores da imunidade inata, tais como TLR, RLR e receptores do tipo NOD, ou estimulação intracelular por padrões moleculares associados a perigo (DAMP) (Sanjuan et al. 2007, Yano et al. 2008, Cooney et al. 2010, Shi & Kehrl 2010, Tang et al. 2010, Travassos et al. 2010).

A autofagia é reconhecida como um sistema citoplasmático para a eliminação direta de bactérias intracelulares (Gutierrez et al. 2004, Nakagawa et al. 2004, Deretic 2005), um processo que aumenta a apresentação de antígenos via MHC II (Paludan et al. 2005) e um sistema antimicrobiano do hospedeiro o qual pode ser subvertido por adaptações bacterianas e virais (Ogawa et al. 2005, Orvedahl et al. 2007, Gannagé et al. 2009, Kyei et al. 2009). Estudos anteriores demonstraram a autofagia como um mecanismo importante na eliminação de *M. tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. Typhimurium*, *Rickettsia conorii*, exotoxina de *Vibrio cholerae*, *T. gondii*, *Alphavirus (Sindbis virus)*, *Respirovirus (Sendai virus)*, entre outros (Gutierrez et al. 2004, Nakagawa et al. 2004, Kirkegaard et al. 2004, Andrade et al. 2006, Birmingham et al. 2006, Ling et al. 2006, Lee et al. 2007, Hussey et al. 2009, Orvedahl et al. 2010). Esse processo também parece envolver fatores do hospedeiro, uma vez que no modelo experimental de infecção por *Leishmania amazonensis*, a indução de autofagia pode tanto controlar como amplificar a replicação parasitária em macrófagos, dependendo da cepa de camundongo (Pinheiro et al. 2009). Em adição, muitos patógenos regulam a via da xenofagia para sua sobrevivência, escapando da degradação ou utilizando como nicho de replicação, entre eles: *L. monocytogenes*, *B. abortus*, *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetti*, *Shigella flexneri*, *S. Typhimurium*, *B.*

pseudomallei, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Porphyromonas gingivalis*, *C. trachomatis*, *Leishmania mexicana*, *Herpes virus (HSV-1)*, *Lentivirus (HIV)*, *Rotavirus*, *Flavivirus (Dengue virus)*, entre outros (Kirkegaard et al. 2004, Orvedahl et al. 2007, Hussey et al. 2009, Münz 2009, Li et al. 2011, Ogawa et al. 2011, Tattoli et al. 2012).

1.3.6 Autofagia seletiva mediada por receptores autofágicos

O reconhecimento desses microrganismos intracelulares pela autofagia ocorre principalmente por um grupo de receptores da imunidade inata que funcionam como adaptadores autofágicos para a eliminação dos alvos pela via autofágica (autofagia seletiva), onde eles também agem como substratos e são degradados no mesmo processo, servindo como marcadores de degradação autolisossomal (Klionsky et al. 2016). Esses receptores são denominados receptores do tipo sequestrassoma 1 (SQSTM1/p62) (SLR; Deretic et al. 2013). Essa família inclui ainda os receptores NBR1 (receptor de carga autofágica NBR1), NDP52 (também conhecido como CALCOCO2), Optineurina, TAX1BP1 (também conhecido como CALCOCO3) e TOLLIP. Estes receptores de carga reconhecem os alvos marcados com ubiquitina via domínio de ligação à ubiquitina (UBD), que pode variar de acordo com o tipo de ubiquitina reconhecida por cada receptor (domínio UBA em p62 e NBR1, possui afinidade por monoubiquitina e cadeias de poliubiquitina-K63; UBZ em NDP52 e TAX1BP1 se liga à mono e poliubiquitina; UBAN em Optineurina, que possui especificidade para cadeias lineares de ubiquitina; e CUE em TOLLIP, que se liga à ambas mono e poliubiquitina), e através de uma curta sequência hidrofóbica denominada de motivo da região de interação com LC3 (LIR), interagem com a maquinaria autofágica via ligação com a proteína LC3 (Figura 1.15) (Johansen & Trond Lamark 2011, Deretic et al. 2013, Shaid et al. 2013, Kimura et al. 2016). O adaptador SQSTM1/p62 pode também polimerizar e se ligar ao NBR1 através do domínio 1 de ligação à proteína (PB1), que está presente exclusivamente nessas duas proteínas, fazendo assim uma cooperação entre receptores na autofagia seletiva de alvos ubiquitinados (Kirkin et al. 2009).

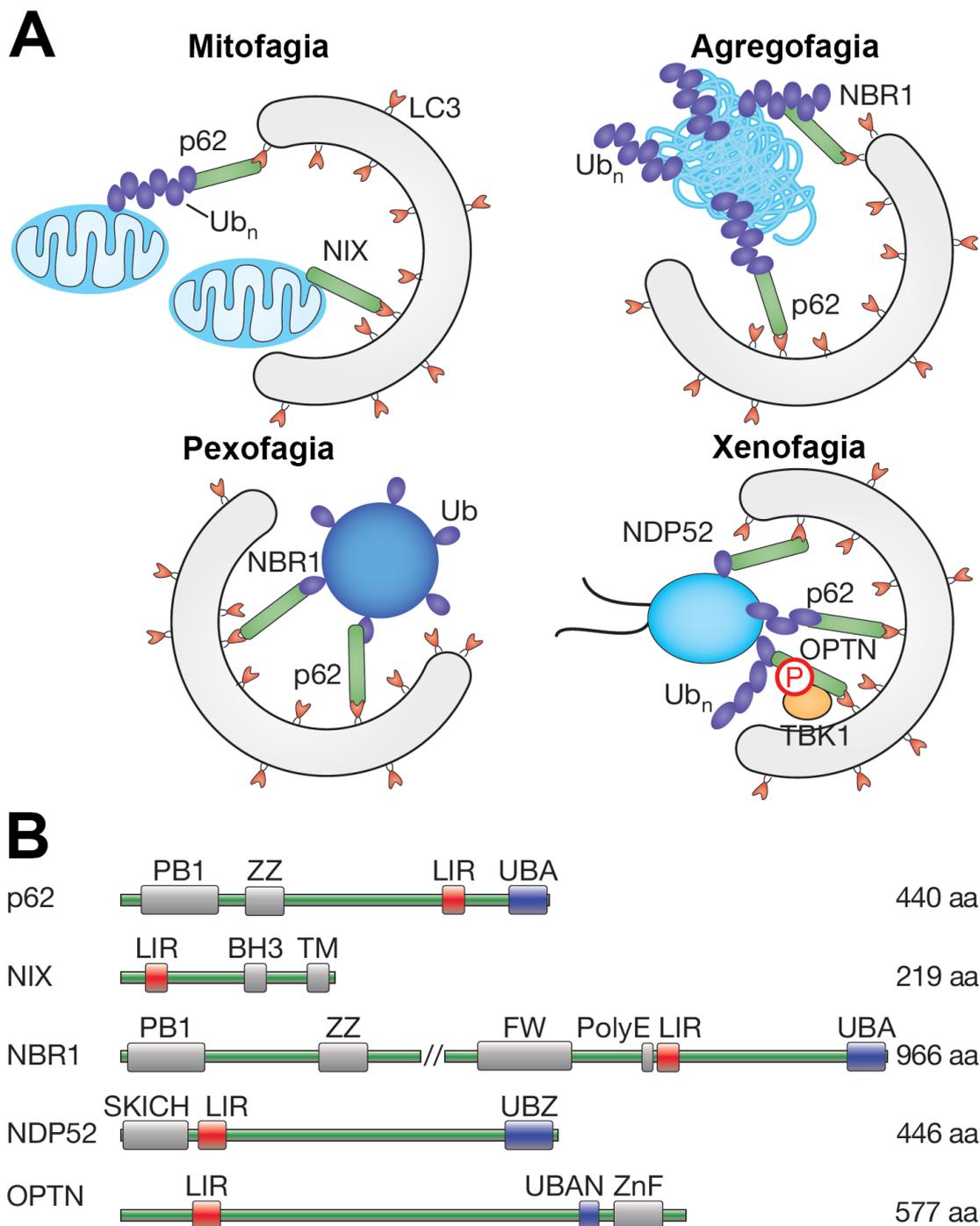


Figura 1.15: Recrutamento seletivo de fagóforos para os alvos, através da interação de receptores autofágicos com LC3-II em diferentes vias de autofagia seletiva. (A) Na mitofagia, SQSTM1/p62 reconhece as mitocôndrias poli-ubiquitinadas (Ub_n, roxo) destinadas à degradação autofagossomal. Alternativamente, as mitocôndrias também podem ser ligadas diretamente à LC3-II por NIX, sem necessitar de poli-ubiquitinação. Na agregofagia, os agregados proteicos poli-ubiquitinados são englobados pelo fagóforo via p62 e NBR1. Na xenofagia, as proteínas adaptadoras autofágicas NDP52, p62 e Optineurina (OPTN) reconhecem as bactérias poli-ubiquitinadas. Neste caso, a associação do motivo LIR com LC3-II pode ser aumentada pela fosforilação de OPTN dependente de TBK1. Por fim, para a pexofagia, p62 e NBR1 recrutam o fagóforo LC3-II-positivo para os peroxissomos mono-ubiquitinados. (B) Estrutura dos domínios dos receptores

autofágicos envolvidos nas vias de autofagia seletiva, contendo distintos domínios de ligação à ubiquitina (azul) e motivos de interação com LC3 (LIR, vermelho). Fonte: adaptados de Stolz et al. 2014.

Um fato interessante é que o motivo LIR do adaptador NDP52 é específico para interação com LC3C, sendo também chamado de CLIR (presente também no TAX1BP1). Além disso, esse receptor possui um exclusivo motivo de interação com galectina conhecido como GIR. Foi demonstrado que a galectina-8 reconhece glicanos de β -galactosídeos expostos na face citoplasmática de membranas de vacúolos danificados por patógenos e então se liga ao motivo GIR de NDP52 ativando a autofagia seletiva antibacteriana (Thurston et al. 2012). Os SLR, p62 (Pankiv et al. 2007), NBR1, e NDP52 desempenham um importante papel na autofagia envolvendo *Salmonella*, *Streptococcus* (Thurston et al. 2009, Zheng et al. 2009), *Shigella* (Dupont et al. 2009) e *Listeria* (Yoshikawa et al. 2009). Outra função dos SLR, demonstrada para o p62, é direcionar precursores citoplasmáticos para a conversão nos lisossomos em produtos antimicrobianos (Ponpuak et al. 2010). O p62 captura proteínas citoplasmáticas inócuas, como ubiquitina ou proteínas precursoras ribossomais e as direciona para os autofagossomos, onde são digeridas em peptídeos com novas atividades biológicas. A carga de peptídeos autolisossomais é direcionada para os fagossomos contendo o microrganismo, onde os fragmentos ribossomais e ubiquitinados gerados em organelas autofágicas finalmente encontram seus alvos e expressam as propriedades antimicrobianas que irão eliminar o patógeno, como descrito no modelo de *M. tuberculosis* (Ponpuak et al. 2010). Os SLR funcionam como um mecanismo autofágico adicional para eliminação de patógenos, como por exemplo, reconhecendo microrganismos citosólicos que escaparam da via fagocítica e os redirecionando para autofagia. No entanto, esse mecanismo pode ser subvertido durante certas infecções. Foi descrito um mecanismo de patogênese viral onde *Coxsackievirus* B3 (*Enterovirus*) altera os receptores autofágicos seletivos p62 e NBR1. Através de proteases, o vírus cliva ambas as proteínas adaptadoras autofágicas gerando fragmentos com efeitos negativos dominantes em relação às proteínas nativas, prejudicando assim a função de defesa dos SLR na autofagia seletiva e levando ao acúmulo de agregados de ubiquitina que contribuem para a patogênese viral (Shi et al. 2013, 2014).

Outros receptores também estão associados com a família de SLR e autofagia seletiva, porém não possuem a mesma estrutura molecular dos SLR. c-

CBL, que possui ambos os domínios UBD (do tipo UBA) e LIR, porém seu domínio UBD não está envolvido na degradação autofágica. BNIP3, NIX (também conhecido como BNIP3L), FUNDC1, Bcl2-L-13, Fam134B, STBD1 e AP2A1, apresentam apenas o motivo LIR. Possuindo apenas o domínio UBD, HDAC6 (apresenta domínio UBD do tipo BUZ, com afinidade para poliubiquitina) e UBQLN1 e 2 (que apresentam domínios dos tipos UBA e UBL). Alfy, BAG3, Tecpr1, SMURF1, Lamina B1, IRGM, AP2A2, AP2B1, PICALM e Cardiolipina, apresentam ausência de ambos os domínios UBD e LIR, mas possuem associações direta ou indireta com LC3 e/ou proteínas ubiquitinadas, que podem funcionar como uma ponte entre os alvos e os autofagossomos (N'Diaye et al. 2009, Rothenberg et al. 2010, Johansen & Trond Lamark 2011, Deretic et al. 2013, Shaid et al. 2013, Sakowski et al. 2015, Kimura et al. 2016). Através de análises de proteômica quantitativa e bioinformática, a proteína NCOA4 foi recentemente identificada como adaptadora autofágica, apesar de não apresentar ambos os domínios UBD e LIR. Foi demonstrado que a NCOA4 funciona como receptor de carga para a ferritina e se liga a LC3A/C e GABARAPs durante um novo tipo de autofagia seletiva que regula a biodisponibilidade e homeostasia do ferro, a ferritinofagia (Dowdle et al. 2014, Mancias et al. 2014).

Recentemente, um grupo de proteínas antivirais da família TRIM foi descrito como uma nova classe de adaptadores autofágicos. Além de regular a autofagia servindo como plataformas para a montagem e maturação dos autofagossomos, essas proteínas funcionam como receptores da autofagia seletiva, possuindo a maioria delas o motivo LIR (Figura 1.16). Uma caracterização funcional detalhada foi realizada para a TRIM5, sendo esta proteína capaz de diretamente reconhecer substratos com motivos peptídicos, não havendo a necessidade de marcação dos alvos com ubiquitina ou galectina para direcioná-los para degradação, gerando uma autofagia seletiva mais precisa. Através de seu domínio SPRY, TRIM5 de macacos Rhesus, mas não a de humanos, é capaz de se ligar especificamente à proteína p24 de HIV-1, mas não à p24 do vírus da imunodeficiência de macacos, direcionando o vírus para degradação autolisossomal (Mandell et al. 2014, Kimura et al. 2016). TRIM14 inibe a degradação autofágica do sensor citoplasmático de DNA cGAS, promovendo assim uma resposta antiviral mediada por IFN do tipo I (Chen et al. 2016). TRIM16 coopera com galectina-3 na autofagia seletiva para o reconhecimento e resposta a danos às endomembranas, protegendo as células contra danos lisossomais, ou ainda, contra danos fagossomais causados por

micobactérias, sendo também requerida para o direcionamento autofágico e controle intracelular de *M. tuberculosis* (Chauhan et al. 2016). Já TRIM17 possui um papel paradoxal na regulação da autofagia, seja promovendo a remoção autofágica seletiva de corpos medianos, que são remanescentes da maquinaria de divisão celular, ou inibindo a autofagia não seletiva (Mandell et al. 2016). TRIM19 (também conhecida como PML) forma a oncoproteína PML/RAR α e é degradada via autofagia (Isakson et al. 2010, Wang et al. 2011). A proteína TRIM20 reconhece componentes do inflamassoma (NLRP3, NLRP1 e pró-caspase 1) e os direciona para degradação autofágica, enquanto TRIM21 está envolvida na destruição da cinase IKK β e do fator de transcrição IRF3. Mutações no domínio SPRY de *TRIM20*, observadas em indivíduos com a febre familiar do mediterrâneo, afetam a degradação de NLRP3 mediada pela autofagia, contribuindo para o fenótipo inflamatório observado nesses pacientes (Niida et al. 2010, Kimura et al. 2015, 2016). A TRIM50 interage com HDAC6 e p62, levando ao recrutamento e a agregação de proteínas poliubiquitinadas em agregossomas, e em seguida promove à destruição desses agregossomas via autofagia, onde também é degradada (Fusco et al. 2012). Este processo de autofagia seletiva mediada pelos receptores TRIM foi denominado como “autofagia de precisão” (Kimura et al. 2016).

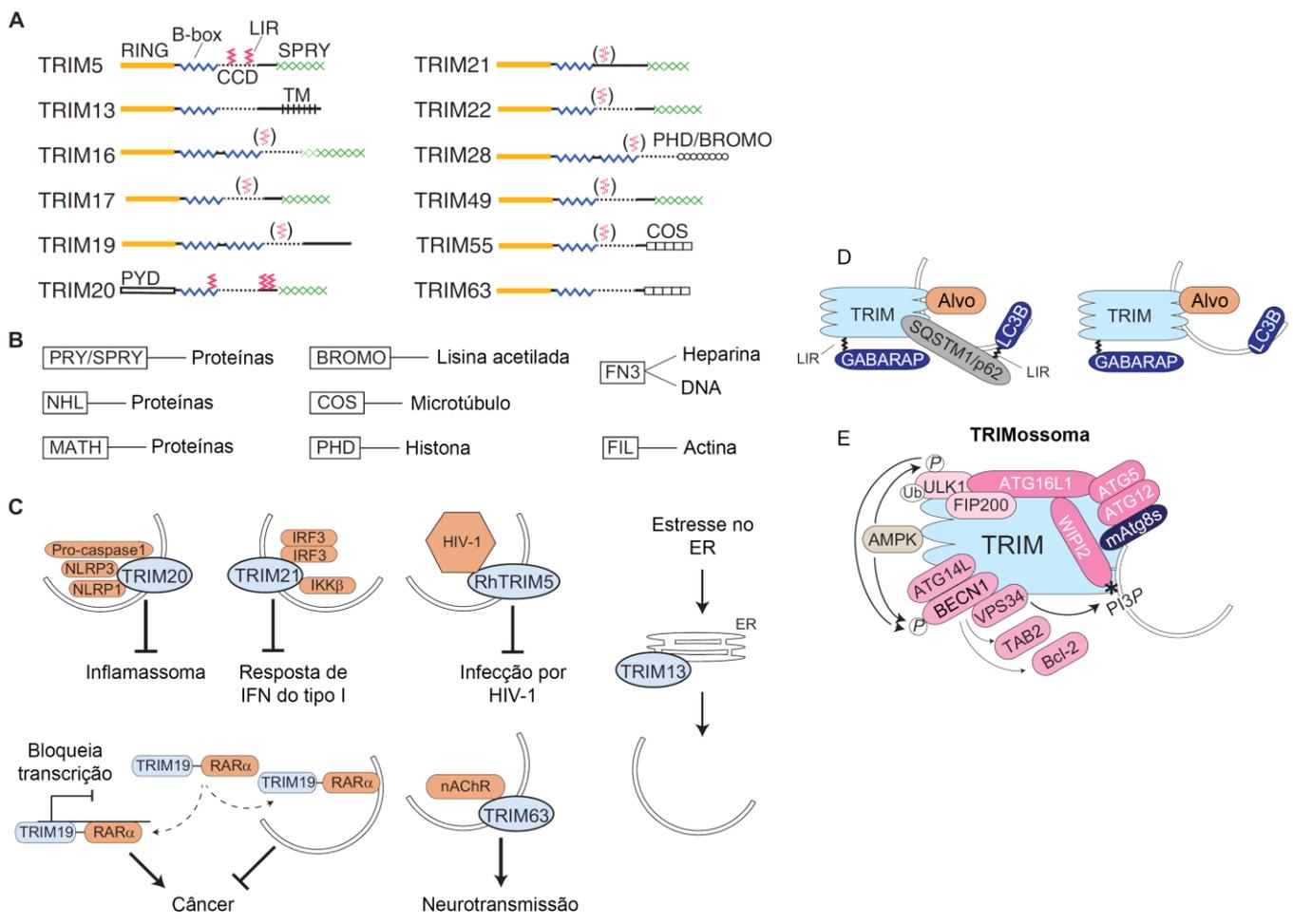


Figura 1.16: Características dos receptores TRIM e exemplos de autofagia de precisão mediada pelas proteínas TRIM. (A) Organização dos domínios dos receptores TRIM e a localização das regiões de interação com LC3 (LIR). (B) Domínios variáveis C-terminais das proteínas TRIM, e tipos de parceiros de ligação ou carga reconhecidos por esses domínios. (C) Exemplos de autofagia de precisão no direcionamento de alvos endógenos (componentes da sinalização da imunidade inata, mediado por TRIM20 e TRIM21) e exógenos (HIV-1, mediado por TRIM5 de Rhesus [RhTRIM5]). As consequências fisiológicas são indicadas. A proteína de fusão TRIM19-RAR α desempenha um papel no câncer. A TRIM63 promove a degradação autofágica do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR). TRIM13 controla a autofagia em resposta ao estresse no retículo endoplasmático (ER), mas os alvos não são conhecidos. (D) Interações entre receptores TRIM e SLR. As proteínas TRIM podem estar ligadas à LC3B diretamente (direita) ou indiretamente (esquerda) através do SLR SQSTM1/p62. TRIM interage com as proteínas Atg8 de mamíferos através do seu domínio LIR, mostrando uma preferência pelas GABARAPs *in vitro*. (E) TRIMossoma, o complexo proteico de TRIM envolvido na autofagia de precisão. Os membros do complexo e os eventos de ativação são mostrados. Fonte: adaptados de Kimura et al. 2016.

1.3.7 Autofagia e infecção por micobactérias

Estudos utilizando o modelo de *M. tuberculosis* demonstraram que esta micobactéria inibe a maturação do fagossomo ao inibir a fusão com os lisossomos, acidificação e exposição à hidrolases lisossomais, mas permite a fusão com endossomos iniciais contendo transferrina, o que mantém um meio ambiente favorável à sua sobrevivência (Russell 2001, Deretic et al. 2006). Quando tratados *in vitro* com IFN γ , os macrófagos são capazes de reverter o bloqueio da maturação do fagossomo (Schaible et al. 1998, Via et al. 1998). A identificação da autofagia como um importante fator na determinação da infecção micobacteriana está associada a observações anteriores. A autofagia representa uma via adicional para a eliminação de patógenos intracelulares e este processo é fundamental para determinar a sobrevivência de *M. tuberculosis* em macrófagos. Estudos anteriores demonstraram que tanto a indução farmacológica quanto a indução fisiológica da autofagia em macrófagos levam os fagossomos micobacterianos a maturarem em fagolisossomos, com a consequente degradação do patógeno (Gutierrez et al. 2004). A indução imunológica de autofagia com IFN γ em macrófagos induz o recrutamento de LC3-II para o fagossomo micobacteriano via molécula efetora IRGM/LRG-47 (Figura 1.17) (MacMicking et al. 2003, Gutierrez et al. 2004, Singh et al. 2006). A IRGM controla a autofagia através da interação com ULK1 e BECN1, governando assim a montagem do complexo de iniciação, e depois em conjunto com Atg16L1 e o receptor NOD2, forma um complexo molecular que promove a defesa antimicrobiana (Chauhan et al. 2015). Foi descrito que o polimorfismo -1208 A/G na região promotora IRGM está associado com a susceptibilidade ao *M. tuberculosis* e que essa GTPase age sobre a mitocôndria e confere proteção autofágica ou morte celular, explicando o papel da IRGM na defesa contra a tuberculose (Che et al. 2010, Singh et al. 2010). O IFN γ também pode induzir a xenofagia de *M. tuberculosis* através da UBQLN1 (Sakowski et al. 2015). Adicionalmente, os antibióticos isoniazida e pirazinamida, duas drogas do coquetel de primeira linha utilizado no tratamento da tuberculose, exercem sua atividade antimicobacteriana através da autofagia (Kim et al. 2012).

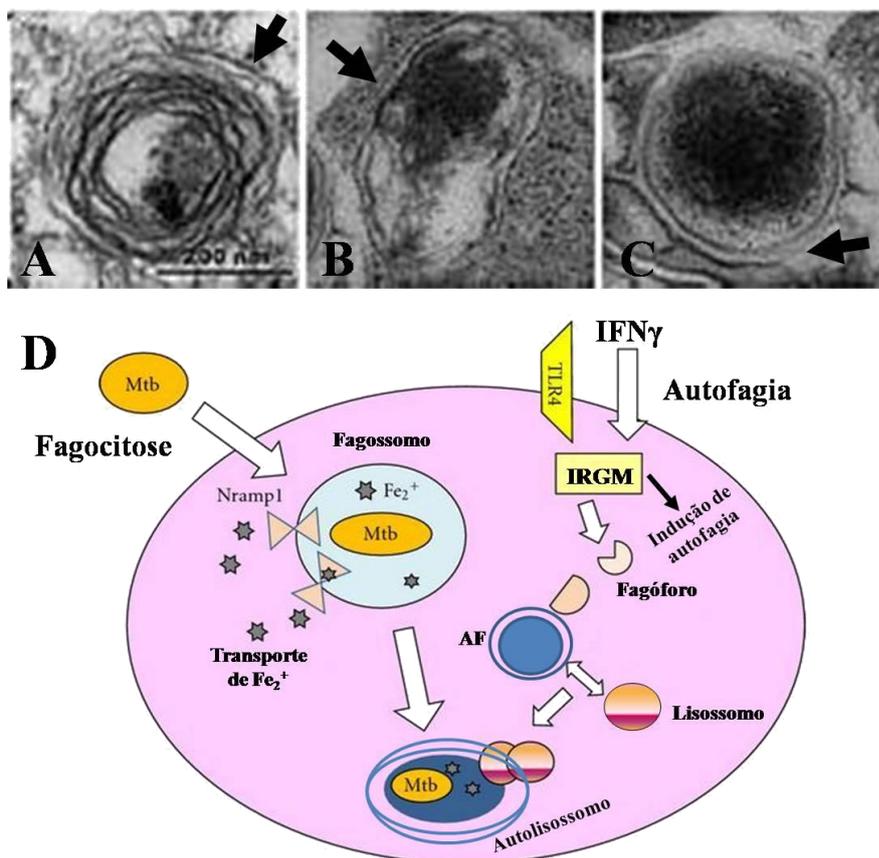


Figura 1.17: Autofagia mediada por IFN γ /IRGM no modelo de tuberculose. (A-C) Autofagossomos contendo *M. tuberculosis* (setas), podendo ser observada (A) uma estrutura semelhante a figuras de mielina (membranas concêntricas) típica da autofagia. (D) Modelo esquemático da indução de autofagia por IFN γ , que requer a molécula efetora IRGM, que por sua vez ativa a autofagia. Assim, o fagossomo contendo *M. tuberculosis* é englobado pelo autofagossomo (AF), que se funde com o lisossomo, degradando *M. tuberculosis*. O IFN γ também pode mediar a morte de *M. tuberculosis* através de Nramp1, que é expresso na membrana do fagossomo e é capaz de sequestrar o ferro (Fe $_2^+$), impedindo sua captação por *M. tuberculosis*. Fonte: adaptados de Yuk et al. 2009 (A-C) e Saiga et al. 2011 (D).

Foi demonstrado que pelo menos um dos mecanismos efetores das citocinas pró-inflamatórias ocorre por indução de autofagia, enquanto as citocinas anti-inflamatórias regulam negativamente esse efeito. Sendo assim, enquanto as citocinas pró-inflamatórias IFN γ e TNF promovem a eliminação de *M. tuberculosis*, as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e IL-13 facilitam a persistência da bactéria (Monack et al. 2004, Blaser & Kirschner 2007, Harris et al. 2007, 2009, Park et al. 2011). Estudos anteriores relataram deficiente internalização de *M. leprae* na presença de IFN γ (Schlesinger & Horwitz 1991). Além disso, a interação *M. leprae*-macrófagos leva ao aumento dos níveis de TNF (Hussain et al. 1999, Hernandez et al. 2003). O TNF é essencial para a formação e manutenção do granuloma

tubercular (Flynn & Chan 2001), sendo secretado em resposta ao *M. bovis* BCG e ao *M. tuberculosis*. Harris e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento de macrófagos infectados com bloqueadores de TNF (adalimumab, infliximab e etanercept), foi capaz de inibir a maturação do fagossomo micobacteriano induzida pelo IFN γ . Outros estudos também relataram a importância do TNF na modulação da autofagia. Na linhagem celular MCF-7, o TNF induziu autofagia por uma via dependente de Erk1/2 (Sivaprasad & Basu 2008). Esses dados sugerem que os efeitos do IFN γ sobre a maturação de fagossomos em macrófagos parecem ser dependentes da secreção autócrina de TNF.

A análise funcional de 44 genes do hospedeiro associados à regulação da autofagia demonstrou que mesmo após o estabelecimento da infecção, a persistência de *M. tuberculosis* na célula hospedeira está relacionada à sua capacidade de manter as vias de ativação de autofagia controladas. A descoberta de que a persistência de micobactérias virulentas em macrófagos infectados está correlacionada à capacidade das mesmas em inibir processos indutores de autofagia tem um grande impacto sobre a nossa compreensão global a respeito da infecção por *M. tuberculosis* (Kumar et al. 2010, Kumar & Rao 2011). A lipoarabinomanana de *M. tuberculosis*, mas não de *Mycobacterium smegmatis*, inibe o acúmulo de vacúolos autofágicos em macrófagos (Shui et al. 2011). Da mesma maneira, as proteínas ESAT-6 e CFP-10, que são importantes fatores de virulência de *M. tuberculosis*, bloqueiam a formação de autofagossomos durante a infecção pela micobactéria em macrófagos (Zhang et al. 2012). Através da tirosina cinase celular Src, uma molécula envolvida na regulação da autofagia durante infecções micobacterianas, *M. tuberculosis* bloqueia sua incorporação em autofagossomos (Karim et al. 2011) e usa um membro da família BCL2, a proteína Bfl-1/A1, para negativamente regular a autofagia por meio da inibição da maturação dos autofagossomos (Kathania et al. 2011). O microRNA-155 ativa a autofagia e promove a eliminação intracelular de *M. tuberculosis* (Wang et al. 2013). No entanto, *M. tuberculosis* pode utilizar os microRNAs-33 e -125a para inibir a via autofágica e promover a sua sobrevivência no interior dos macrófagos (Kim et al. 2015, Ouimet et al. 2016). Camundongos deficientes em PD-1, um receptor co-estimulatório presente em células T e B, exibem diminuída expressão de LC3 em macrófagos e são mais susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis*, ressaltando a importância da

cooperação entre as imunidades inata e adaptativa na defesa autofágica contra a micobactéria (Tousif et al. 2011).

Foi descrito que *M. tuberculosis* induz a supressão da autofagia, o que resulta em acúmulo de lipídeos (Neyrolles et al. 2006, Singh et al. 2009, Kumar & Rao 2011). Estudos demonstraram que em macrófagos espumosos, os fagossomos contendo as micobactérias migram na direção de corpúsculos lipídicos e que isso resulta no engolfamento do bacilo em partículas lipídicas (Peyron et al. 2008, de Chastellier 2009, Caire-Brändli et al. 2014). É possível que o encapsulamento do bacilo em um meio ambiente rico em lipídeos contribua para a manutenção do reservatório nutricional que permite a persistência do bacilo na célula hospedeira (Russell et al. 2009). Esse processo também protege o patógeno do estresse hipóxico e de outras respostas microbicidas do hospedeiro, incluindo aquelas que envolvem a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Peyron et al. 2008, de Chastellier 2009, Caire-Brändli et al. 2014). *M. leprae* também parece ser capaz de utilizar esse mecanismo, uma vez que foi demonstrado que os fagossomos micobacterianos colocalizam com o colesterol, um dos componentes dos corpúsculos lipídicos, e que os macrófagos infectados por essa micobactéria apresentam uma capacidade elevada para sintetizar colesterol e sequestrar o LDL-colesterol exógeno (Mattos et al. 2014). Foi demonstrado que em macrófagos, o gene *Eis* de *M. tuberculosis* modula negativamente a resposta inflamatória, a morte celular, e a autofagia, via inibição da geração de espécies reativas de oxigênio ou através da ativação de mTOR induzida por IL-10 (Shin et al. 2010a, Duan et al. 2016). A combinação de vitamina D3 com ácido retinóico aumenta os níveis de DC-SIGN e receptores de manose em células THP-1 diferenciadas em macrófagos, que aumentam a captura micobacteriana, inibindo o crescimento intracelular de *M. tuberculosis* através da indução de espécies reativas de oxigênio e autofagia (Estrella et al. 2011). A autofagia parece desempenhar um importante papel na mediação da reciclagem de triglicerídeos e ésteres de colesterol, os principais componentes dos corpúsculos lipídicos, regulando o efluxo do colesterol armazenado em corpúsculos lipídicos nos macrófagos (Ouimet et al. 2011). O excesso de corpúsculos lipídicos na célula tem um efeito atenuador sobre a autofagia, o que leva à hipótese da existência de uma ligação entre as vias reguladoras de autofagia e aquelas regulando a geração de corpúsculos lipídicos (Singh et al. 2009).

Uma relação direta entre autofagia e inflamação foi demonstrada por Kleinnijenhuis e colaboradores (2011). Foi observado que o bloqueio da autofagia em monócitos derivados de voluntários saudáveis, estimulados com *M. tuberculosis*, leva à redução dos níveis de TNF, com aumento de IL-1 β . Por outro lado, a indução de autofagia por privação de nutrientes ou IFN γ teve o efeito contrário. No entanto, os polimorfismos nos genes *ATG16L1* e *IRGM* não apresentaram maiores impactos na produção de citocinas induzida por *M. tuberculosis* em voluntários saudáveis. Foi observado apenas um moderado efeito na produção de IFN γ pelo polimorfismo em *ATG16L1* T300A (Kleinnijenhuis et al. 2011). Outros estudos identificaram que o bloqueio da via autofágica leva ao aumento de IL-1 β por um mecanismo que leva à ativação do inflamassoma NLRP3 mediada por espécies reativas do oxigênio produzidas por mitocôndrias danificadas (Nakahira et al. 2011, Zhou et al. 2011). De fato, a via autofágica é a responsável por controlar a produção de IL-1 β em macrófagos, seja pelo direcionamento da pró-IL-1 β ou de inflamassomas ubiquitinados para degradação autolisossomal (Harris et al. 2011, Shi et al. 2012), ou via secreção não convencional de IL-1 β mediada pela autofagia (Dupont et al. 2011, Jiang et al. 2013).

Watson e colaboradores (2012) descreveram o PAMP de *M. tuberculosis* responsável por direcionar a micobactéria para a autofagia. Foi mostrado que a permeabilização fagossomal mediada pelo sistema de secreção do tipo VII ESAT-6 (ESX-1), permite que o DNA presente na superfície externa de *M. tuberculosis* (DNA extracelular, eDNA) seja exposto ao citoplasma celular, levando ao reconhecimento do eDNA pelo sensor citoplasmático STING, que promove a ubiquitinação e posterior direcionamento de *M. tuberculosis* para degradação autolisossomal através da interação com p62, NDP52 e TBK1. Além de demonstrar a relação entre as vias autofágica e de reconhecimento de DNA, este estudo também demonstrou o papel da autofagia *in vivo*, mostrando que camundongos com monócitos deficientes na via de autofagia (Atg5 nocaute) são extremamente susceptíveis à infecção por *M. tuberculosis* (Watson et al. 2012). Castillo e colaboradores (2012) reforçaram a importância da autofagia no controle da infecção e da patologia causada por *M. tuberculosis in vivo*, observando que quando comparados aos camundongos com a via autofágica normal, os camundongos com granulócitos e macrófagos Atg5 nocaute apresentaram uma excessiva inflamação pulmonar neutrofílica associada a uma alta carga bacilar e altos níveis de IL-17 e IL-1 α .

Recentemente, três estudos independentes revelaram que o cGAS é o sensor citoplasmático para o DNA de *M. tuberculosis*, ativando mecanismos inatos como a autofagia e a produção de IFN do tipo I (Collins et al. 2015, Wassermann et al. 2015, Watson et al. 2015). Quando ligado ao DNA, cGAS é ativado e passa a produzir a partir de ATP e GTP um segundo mensageiro chamado cGAMP; cGAMP então se liga e ativa STING no ER e o eixo TBK1-IRF3 levando à produção de IFN β , ou ainda, TBK1-LC3-II promovendo a ativação da autofagia seletiva contra as bactérias ubiquitinadas (Collins et al. 2015, Wassermann et al. 2015, Watson et al. 2015). Também foi demonstrado que a infecção por *M. tuberculosis* induz a produção de IL-1 β independentemente de cGAS ou STING, mas dependente de sua detecção via inflamassoma AIM2, e na ausência deste, uma produção residual de IL-1 β mediada pelo inflamassoma NLRP3 foi também observada (Wassermann et al. 2015). É importante ressaltar que o mecanismo que determina a ativação de um eixo ou de outro não foi elucidado, fato que determinaria o curso da infecção, uma vez que a ativação da via de IFN do tipo I é um fator que favorece a infecção (Manzanillo et al. 2012, Stanley & Cox 2013), enquanto a ativação da via autofágica e do inflamassoma são fatores que favorecem a resolução (Pilli et al. 2012, Saiga et al. 2012, Watson et al. 2012, Manzanillo et al. 2013, Stanley & Cox 2013).

Outro PAMP de *M. tuberculosis* envolvido na ativação da autofagia foi descrito recentemente por Dey e colaboradores (2015). Estes autores observaram que o c-di-AMP, um segundo mensageiro bacteriano produzido por *M. tuberculosis* a partir de ATP ou ADP, ativa através de STING de maneira independente de cGAS a via de IFN do tipo I, levando à produção de altos níveis de IFN β , assim como desencadeia um aumento da autofagia em macrófagos. Neste caso, a ativação simultânea de ambas as vias foi associada com a resistência contra a tuberculose em camundongos (Dey et al. 2015). Assim como o cGAS, STING que pode funcionar tanto como sensor citoplasmático de DNA, quanto como proteína adaptadora na sinalização da via de IFN do tipo I, além de desempenhar um importante papel na imunidade contra micobactérias, uma vez que ele pode cooperar com a proteína lisossomal DRAM1 e o receptor p62 na autofagia seletiva de *Mycobacterium marinum* após o reconhecimento do patógeno pela via de TLR (van der Vaart et al. 2014).

Apesar do fundamental papel da autofagia no controle da infecção por *M. tuberculosis* em macrófagos humanos ter sido demonstrado *in vitro* e *in vivo* por diferentes grupos, a relevância da via autofágica no controle da tuberculose foi

questionada recentemente por Kimmey e colaboradores (2015). Foi sugerido que somente a ATG5, mas não a maquinaria autofágica, seria importante para o controle de *M. tuberculosis* no modelo murino. Isso se deve ao fato dela evitar um excessivo processo inflamatório mediado por células polimorfonucleares (PMN), que é uma característica de susceptibilidade aguda ao *M. tuberculosis*, levando a dano tecidual descontrolado e a progressão da doença (Behar & Baehrecke 2015, Kimmey et al. 2015). No entanto, esses resultados negativos em relação à autofagia levantam questões adicionais importantes: 1) os autores reportaram que o fenótipo das células PMN era independente da autofagia, contudo já é descrito que a excessiva ativação de IL-1 por macrófagos deficientes em autofagia leva à uma polarização de células Th17 que são grandes contribuidoras dos efeitos associados os PMN *in vivo* (Saitoh et al. 2008, Nakahira et al. 2011, Zhou et al. 2011, Castillo et al. 2012, Shi et al. 2012, Deretic 2016); 2) este estudo abordou apenas os estágios iniciais da infecção por *M. tuberculosis* em camundongos (80 dias), comumente é utilizado um período mais longo de observação, uma vez que os camundongos controlam a infecção mais facilmente que os humanos (Deretic 2016). Como exemplo, dois recentes estudos que avaliaram a susceptibilidade de animais nocautes para cGAS reportaram resultados negativos num período de observação curto (100 dias), mas quando o período foi estendido (250 dias) os resultados foram positivos (Collins et al. 2015, Watson et al. 2015); e 3) os estudos que caracterizaram a via autofágica como um importante mecanismo de controle da infecção por *M. tuberculosis* são baseados em autofagia induzida e não na autofagia basal, a qual foi avaliada por Kimmey e colaboradores (2015). A inabilidade da autofagia basal em restringir o crescimento de *M. tuberculosis* é justificada pela capacidade de supressão dos níveis inatos de autofagia pela micobactéria, fato descrito por diversos grupos (Kumar et al. 2010, Shin et al. 2010a, Shui et al. 2011, Petruccioli et al. 2012, Romagnoli et al. 2012, Zhang et al. 2012, Zullo & Lee 2012, Chandra et al. 2015, Kim et al. 2015, Deretic 2016, Duan et al. 2016, Ouimet et al. 2016). Os pontos abordados acima indicam que as conclusões que embasaram a idéia de que a via autofágica não seria importante para o controle de *M. tuberculosis* necessitam de mais investigações (Deretic 2016).

Na hanseníase, o papel da autofagia permanece desconhecido. No entanto, inúmeras evidências apontam para a participação da autofagia na resposta inata ao *M. leprae*. Estudos antigos de microscopia eletrônica observaram a presença de vacúolos com dupla membrana contendo *M. leprae* (Figura 1.18), porém este

processo não foi elucidado posteriormente (Evans & Levy 1972, Chandi & Job 1978). Evans & Levy (1972) observaram que durante a fase inicial de crescimento de *M. leprae*, ele está presente nos macrófagos em vacúolos de uma única membrana, com poucos lisossomos próximos, e as bactérias estão íntegras. No pico da fase de crescimento, o número de lisossomos aumenta e *M. leprae* é localizado em um grande número de vacúolos com dupla membrana. Durante a fase estacionária, os macrófagos apresentam uma aparência vacuolar e contém um significativo número de lisossomos, *M. leprae* está presente em vacúolos de dupla membrana, e a maioria dessas bactérias estão degeneradas. Esse processo foi associado com a ativação dos macrófagos. Chandi & Job (1978) descreveram a presença de fagossomos com dupla membrana em macrófagos, após 40 minutos de exposição ao *M. leprae*, e que posteriormente os lisossomos se fundiam com esses fagossomos.

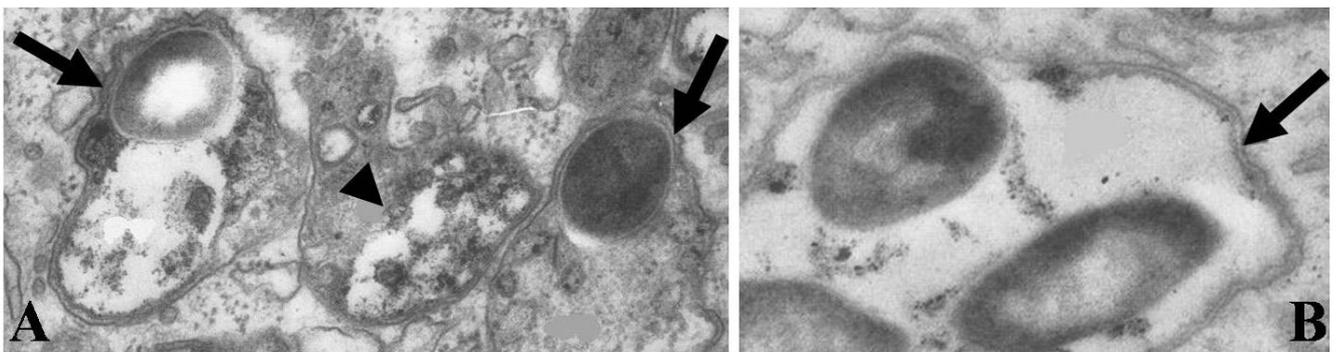


Figura 1.18: Microscopia eletrônica mostrando vacúolos de dupla membrana contendo *M. leprae*. (A e B) Autofagossomos contendo *M. leprae* (setas). Um lisossomo (cabeça de seta) pode ser observado entre dois desses vacúolos em (A). Fonte: adaptados de Evans & Levy 1972.

Yuk e colaboradores (2009) demonstraram que a vitamina D3 induz autofagia em monócitos e macrófagos humanos via proteína antimicrobiana catelicidina, promovendo assim a eliminação de *M. tuberculosis*. Por sua vez, a via antimicrobiana mediada pela vitamina D é preferencialmente observada em pacientes paucibacilares (Montoya et al. 2009). Foi demonstrada em estudos anteriores uma correlação direta entre o polimorfismo do receptor de vitamina D (VDR) e a forma LL da hanseníase, levando a evidência de que o VDR seja capaz de regular a susceptibilidade da doença em humanos (Roy et al. 1999). A vitamina D3 tem sido utilizada com sucesso no tratamento de pacientes com tuberculose

(Martineau et al. 2007a, b, Selvaraj 2011) e estudos iniciais de tratamento da hanseníase com vitamina D3 parecem ser consistentes com um possível efeito imunomodulador sobre a micobactéria (Herrera 1949). Liu e colaboradores (2012) sugeriram que a vitamina D3 poderia ser um dos componentes de um tratamento ideal para a hanseníase e outras doenças infecciosas crônicas em que a resposta imune celular é desregulada. Teles e colaboradores (2013) demonstraram que o IFN do tipo I (IFN β) pode suprimir a resposta antimicrobiana induzida por IFN do tipo II (IFN γ). Curiosamente, a via de IFN β que favorece a infecção por *M. tuberculosis* foi induzida por *M. leprae* em monócitos, favorecendo sua persistência, e foi preferencialmente expressa nas lesões de pele de pacientes LL, enquanto a via de IFN γ que está associada ao controle intracelular de *M. tuberculosis* mediado pela vitamina D/autofagia (Figura 1.19) promoveu a eliminação de *M. leprae* e foi predominantemente observada nas lesões de pacientes BT e RR (Gutierrez et al. 2004, Fabri et al. 2011, Berry et al. 2010, Manzanillo et al. 2012, Teles et al. 2013).

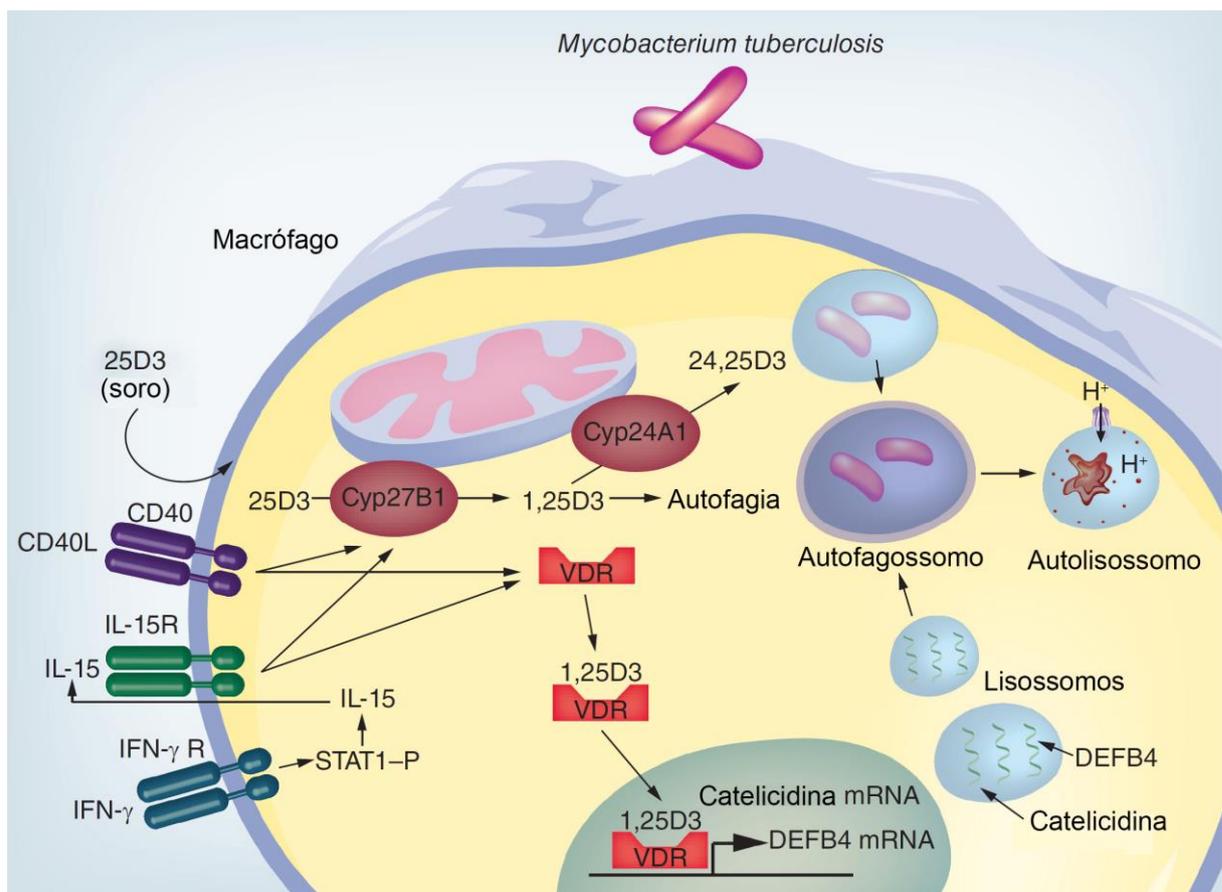


Figura 1.19: IFN γ e a via autofágica antimicrobiana da vitamina D no modelo de tuberculose. IFN γ induz IL-15 por uma via dependente de Stat1, levando à conversão da vitamina D3 para sua forma ativa, o que induz um aumento na expressão dos peptídeos lisossomais catelicidina e β -defensina 2 (DEFB4), e a

ativação de uma via antimicrobiana mediada pela autofagia, promovendo a fusão autofagolisossomal e a eliminação de *M. tuberculosis*. O ligante de CD40 também pode ativar a via autofágica antimicrobiana da vitamina D. Fonte: adaptado de Bruns & Stenger 2014.

O acúmulo de lipídeos é um conhecido fator que favorece a infecção por micobactérias como *M. avium*, *M. tuberculosis* e *M. leprae*, que utilizam o colesterol derivado do hospedeiro para sua sobrevivência (de Chastellier & Thilo 2006, Pandey & Sasseti 2008, Mattos et al. 2014). Foi demonstrado que o tratamento com estatinas, drogas inibidoras da síntese de colesterol, reduzem a carga bacilar de *M. tuberculosis* em macrófagos humanos e camundongos através do aumento de autofagia e da maturação de fagossomos (Parihar et al. 2014). Adicionalmente, as estatinas também apresentam efeito antimicrobiano contra *M. leprae*, e potencializam o efeito antimicobacteriano da rifampicina, um fármaco do coquetel de primeira linha utilizado no tratamento hanseníase. Este processo foi associado com a maturação fagolisossomal, via direcionamento da micobactéria para os endossomos tardios Rab7-positivos (Lobato et al. 2014). No entanto, além da restrição de carbono, é possível que este processo de morte de *M. leprae* induzido pelas estatinas seja mediado também pela autofagia, como descrito no modelo de *M. tuberculosis*, uma vez que a Rab7 está igualmente envolvida na formação dos autolisossomos (Chandra et al. 2015). Além disso, a depleção de colesterol induz autofagia (Cheng et al. 2006) e quando realizada durante a infecção por *M. avium*, reverte a inibição da maturação fagossomal induzida pela micobactéria e promove a incorporação de fagolisossomos contendo *M. avium* em autofagossomos (de Chastellier & Thilo 2006).

Um estudo de nosso laboratório utilizando macrófagos diferenciados *in vitro* com GM-CSF (perfil M1) e M-CSF (perfil M2), os quais simulam macrófagos de pacientes paucibacilares (BT) e multibacilares (LL) respectivamente, demonstraram aumento dos níveis de citocinas microbicidas em M1 quando estimulados com *M. leprae* (de Oliveira Fulco et al. 2014). Através de análise ultraestrutural, foi notada a presença de vacúolos com dupla membrana nos macrófagos M1, ou seja, com características autofágicas (de Oliveira Fulco et al. 2014), corroborando com observações prévias de autofagossomos contendo *M. leprae* (Evans & Levy 1972, Chandi & Job 1978). Tais vacúolos não foram observados nos macrófagos M2 (de Oliveira Fulco et al. 2014).

O polimorfismo no gene da parkina (*PARK2*), uma ubiquitina ligase que promove a xenofagia de *M. tuberculosis* e de outros patógenos intracelulares, está associado à susceptibilidade para hanseníase (Mira et al. 2004, Manzanillo et al. 2013). Posteriormente, foi sugerido que o polimorfismo no gene IRGM, que é ligado à susceptibilidade para doença de Crohn e tuberculose (Consortium 2007, Parkes et al. 2007, Intemann et al. 2009, King et al. 2011), está associado com um maior risco de desenvolver hanseníase, por afetar a produção de citocinas inflamatórias como o IFN γ (Yang et al. 2014a). Além disso, foi observado um aumento da expressão de IRGM em monócitos e macrófagos infectados com *M. leprae*. De modo a corroborar estes dados, monócitos de pacientes tuberculoides apresentaram uma alta expressão de IRGM em comparação com os de lepromatosos (Yang et al. 2014b). Mais recentemente, foi sugerida uma associação entre a morte de *M. leprae* e o direcionamento da micobactéria para a via autofágica em macrófagos humanos. Foi mostrado que o silenciamento genético da proteína antiviral OASL, a qual é produzida através da detecção de DNA de *M. leprae* mediada por STING, aumenta os níveis de autofagia e diminui a viabilidade da micobactéria, sendo este processo revertido pelo bloqueio da autofagia (de Toledo-Pinto et al. 2016). Ma e colaboradores (2016) sugeriram que embora a autofagia possa promover a eliminação de patógenos intracelulares, a indução da via autofágica por *M. leprae* seria um fator pró-persistência da micobactéria. Foi descrito que apesar de ocorrer a ativação da autofagia em resposta à infecção por *M. leprae* em macrófagos, ela também promove uma resposta anti-inflamatória mediada por células T produtoras de IL-10, que num ciclo de retroalimentação negativa inibe a autofagia e permite a sobrevivência de *M. leprae* em macrófagos (Ma et al. 2016). No entanto, este trabalho foi baseado apenas no uso do CYTO-ID/CAT, um corante ácido-trópico (do grupo da monodansilcadaverina, MDC) recentemente desenvolvido para monitorar a autofagia em células vivas (Chan et al. 2012), o que não é recomendado pelos especialistas em autofagia (Klionsky et al. 2016). Curiosamente, várias moléculas que ativam a autofagia, como por exemplo os receptores VDR, TLR2 e NOD2 (Yuk et al. 2009, Shin et al. 2010, Travassos et al. 2010, Fabri et al. 2011), são preferencialmente expressas nas lesões de pele de pacientes tuberculoides (Krutzik et al. 2003, Montoya et al. 2009, Schenk et al. 2012), enquanto os polimorfismos nesses genes estão associados com a susceptibilidade à forma lepromatosa da doença (Roy et al. 1999, Kang & Chae 2001, Zhang et al. 2009).

1.4 Justificativa

Entre as enfermidades infecciosas, a hanseníase é a única doença que apresenta um espectro de formas clínicas que parece ser determinado não apenas por mecanismos imunes adaptativos, mas principalmente por mecanismos inatos de resposta (Modlin 2010, Montoya & Modlin 2010, Pinheiro et al. 2011). A citocina IFN γ induz autofagia em macrófagos por um mecanismo ainda não completamente elucidado (Harris et al. 2009). Níveis séricos elevados de IFN γ têm sido observados em pacientes TT/BT em comparação a pacientes LL e, numerosos estudos têm demonstrado que a adição de IFN γ a macrófagos e células dendríticas antes da infecção aumenta a morte intracelular de micobactérias (Russell 2001, Hope et al. 2004). O quadro de RR, que consiste em um estágio de instabilidade imunológica onde há a progressão de um quadro imune hiporresponsivo para um cenário altamente reativo, havendo mudança no perfil de citocinas de Th2 para Th1 incluindo altos níveis de IFN γ (Yamamura et al. 1991), ainda é pouco compreendido. Nossa hipótese propõe que em pacientes LL, a alta carga bacilar seja resultado do bloqueio da via autofágica por *M. leprae*, um mecanismo de subversão da resposta do hospedeiro. Por outro lado, células de pacientes BT ou reacionais, que apresentam aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes, teriam aumentada capacidade de indução de autofagia, o que justifica a redução da carga bacilar nesses casos. Assim, existe a necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos autofágicos associados aos diferentes pólos e estados reacionais da doença, o que poderá levar ao estabelecimento de novos alvos e estratégias terapêuticas de controle da hanseníase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos de regulação autofágica na infecção por *M. leprae*, bem como o envolvimento da autofagia na imunopatogênese da reação reversa em pacientes multibacilares.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a ativação da autofagia e o fluxo autofágico em células de lesões de pele de pacientes com hanseníase;
- ❖ Testar a capacidade de indução de autofagia por *M. leprae* vivo e morto em monócitos e macrófagos humanos;
- ❖ Analisar a expressão de genes autofágicos/lisossomais em células de lesões de pele de pacientes com hanseníase;
- ❖ Analisar a expressão de genes autofágicos/lisossomais em células de lesões de pele de pacientes multibacilares com ou sem RR;
- ❖ Avaliar a via autofágica em células de lesões de pele de pacientes multibacilares com ou sem RR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e amostras clínicas

As amostras biológicas dos pacientes com hanseníase (fragmentos das lesões de pele obtidos por biópsias com “Punch” de 6 mm antes do início do tratamento) foram coletadas no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ, Rio de Janeiro) e classificadas de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966). Os pacientes lepromatosos incluídos neste estudo foram diagnosticados como BL ou LL, e todos os pacientes tuberculoides foram classificados como BT. Nas análises de PCR “array”, o grupo LL inclui as amostras de pacientes BL utilizadas neste estudo. As biópsias de pacientes RR foram coletadas de indivíduos diagnosticados originalmente como BL. A participação de cada indivíduo no estudo foi condicionada à assinatura de um termo de consentimento previamente aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FIOCRUZ (Parecer número 1.538.467). As capas leucoplaquetárias (“buffy-coats”) utilizadas neste trabalho foram obtidas de doadores saudáveis e cedidas pelo Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ), através de cooperação técnico-científica com a Dra. Carmen Nogueira. Os dados clínicos e demográficos de todos os pacientes recrutados para este estudo são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Características dos pacientes hansênicos incluídos no estudo.

	Tuberculoides	Lepromatosos	RR
Características			
Masculino/Feminino, n	14/12	22/6	7/4
Idade média (intervalo)	51 (20-69)	45,71 (21-73)	53 (26-70)
BI médio (intervalo)	0 (0-0)	4,33 (0,50-5,85)	1,45 (0-3,75)
LBI médio (intervalo)	0 (0-0)	5,23 (2,70-5,90)	2,35 (0-3,80)
Formas clínicas (Ridley – Jopling), n			
BT	26	-	-
BL	-	3	11
LL	-	25	-
Status de tratamento, n			
Pré-tratamento	26	28	2
Em tratamento	-	-	9

RR, reação reversa; BI, índice baciloscópico; LBI, índice baciloscópico logarítmico da lesão; BT, “borderline” tuberculoides; BL, “borderline” lepromatoso; LL, lepromatoso lepromatoso.

3.2 Cultura de células THP-1

Células THP-1 foram obtidas do “American Type Culture Collection” (ATCC; VA, EUA). As culturas celulares foram mantidas em garrafas de cultura de 25 ou 75 cm² (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) contendo meio RPMI1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina a 2 mM, penicilina a 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (meio completo; todos obtidos da Gibco, CA, EUA) e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂ (Shel Lab, OR, EUA). Para diferenciação *in vitro* do fenótipo de monócitos THP-1 para macrófagos, as células foram suspensas em meio completo com 2% de SFB e 200 nM de PMA (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), plaqueadas na concentração de 5x10⁵ células/mL em microplacas de 24 poços (Corning, NY, EUA) contendo lamínulas circulares estéreis de 15 mm (Glasscyto, Brasil) no fundo e mantidas por 24 horas a 37°C. Após esse período foi feita a retirada das células em suspensão no meio de cultura e foi realizada uma lavagem com PBS (Sigma-Aldrich) a 25°C para remover as células não aderentes, sendo o meio completo com 10% de SFB repostado para as células aderentes. Os antibióticos do meio completo foram substituídos por ampicilina 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) durante a infecção por *M. leprae* vivo.

3.3 Cultura de monócitos primários

Após a diluição de 1:1 das capas leucoplaquetárias em PBS, as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de densidade em Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Após centrifugação a 900 x g por 30 minutos (min) à temperatura ambiente, as PBMC foram lavadas três vezes com PBS (500 x g, 10 min, 4°C) e ressuspensas em meio completo sem SFB. As PBMC foram então plaqueadas em microplacas de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis de 15 mm no fundo e mantidas por 2 horas em estufa para obtenção dos monócitos por aderência (concentração final de 5x10⁵ monócitos/mL). Após esse período foi feita a retirada das células em suspensão no meio de cultura e foram realizadas 3 vigorosas lavagens com PBS fresco para remover as células não aderentes, sendo o meio completo repostado para os monócitos aderentes. Os antibióticos do meio completo foram substituídos por ampicilina 100 µg/mL durante a infecção por *M. leprae* vivo.

3.4 Isolamento de macrófagos de lesões de pele

Após o diagnóstico dos pacientes, amostras de lesões de pele foram coletadas em tubos cônicos de 15 mL (Corning) contendo RPMI 1640 e mantidas a 4°C para isolamento de macrófagos conforme descrito por Moura e colaboradores (2007). Posteriormente, a epiderme, derme e hipoderme foram separadas mecanicamente com o auxílio de um bisturi, sendo a derme fragmentada em porções menores para facilitar a ação enzimática e transferida para uma solução de RPMI 1640 contendo SFB 10%, dispase II a 4 mg/mL e colagenase tipo I a 0,5 mg/mL (ambas da Roche Applied Science, IN, EUA). Em seguida, a solução com os fragmentos da derme foi colocada em um tubo de perfluoroalcoóxido (Chemware, NC, EUA) e mantida em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 12 horas. Após a digestão, a suspensão celular foi passada através de um filtro de nylon de 70 µm (BD Falcon, NJ, EUA) e lavada com RPMI 1640 por três vezes a 500 x g durante 10 min a 4°C. As células foram então ressuspensas em meio completo (com troca dos antibióticos para ampicilina 100 µg/mL), plaqueadas na concentração de 1x10⁵ células/mL em microplacas de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis de 15 mm no fundo e mantidas em estufa por 7 dias a 37°C.

Após esse período, as células não aderentes foram removidas e os macrófagos foram imunofenotipados por microscopia de fluorescência e verificados para presença de *M. leprae* pela coloração de Ziehl-Neelsen. O número de células CD68⁺ foi quantificado através do plugin “Cell Counter” do software de análise de imagens ImageJ versão 1.50 g (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA), com cada experimento envolvendo a contagem de pelo menos 100 células por amostra.

3.5 Obtenção e utilização de *M. leprae*

Nos ensaios de interação entre patógeno e célula hospedeira foram utilizadas suspensões de *M. leprae* vivo, gentilmente doadas pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP). A cepa Thai-53 de *M. leprae* foi mantida por passagens seriadas nos coxins plantares de camundongos “nude” atímicos, e as micobactérias foram coletadas assepticamente e analisadas quanto a sua viabilidade através do kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, MA, EUA) (Trombone et al. 2014). Para obtenção de *M. leprae* morto as suspensões de micobactérias vivas foram expostas à 10⁶ rad de radiação gama provenientes de uma fonte de ⁶⁰Co (Adams et al. 2000). As bactérias mortas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Flavio Alves Lara (Fundação Oswaldo Cruz, RJ).

Para obtenção de *M. leprae* fluorescente foram utilizados os kits para marcação de membranas celulares PKH26 “red”, um fluorocromo vermelho com pico de excitação em 551 nm e emissão em 567 nm, e PKH67 “green”, um fluorocromo verde com pico de excitação em 490 nm e emissão em 502 nm, de acordo com as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich). Após a marcação, as culturas celulares foram infectadas com *M. leprae* vivo ou estimuladas com *M. leprae* morto de forma a se obter multiplicidade de infecção (MOI) igual a 2, 10 ou 50 organismos/célula e incubadas por 18 horas a 33°C ou 37°C, respectivamente. Durante a infecção mista em monócitos sanguíneos as células foram mantidas a 33°C. Antes da adição de *M. leprae* às células, as suspensões de micobactérias foram homogeneizadas 10 vezes em seringa de insulina ultrafina de 100 U com agulha 31G (Becton Dickinson, NJ, EUA) para desfazer as globias.

3.6 Indução de autofagia

A indução de autofagia em macrófagos de pele foi realizada através da adição de IFN γ recombinante humano (10 ng/mL; BD PharMingen, NJ, EUA) ou rapamicina (200 ng/mL; Enzo Life Sciences, NY, EUA) ao meio completo e incubação por 18 horas a 37°C (Pinheiro et al. 2009, Fabri et al. 2011). Alternativamente, a ativação da autofagia foi realizada por privação de aminoácidos e soro (“starvation”), através da incubação das células em PBS por 18 h a 37°C (Gutierrez et al. 2004, Pinheiro et al. 2009).

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Para investigar a presença de características autofágicas em lesões de pele de pacientes BT e LL, foi realizada uma análise ultraestrutural com ênfase na pesquisa de vacúolos de dupla membrana em células com fenótipo de macrófagos. Para isso, após a fixação dos fragmentos de pele com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,2 M pH 7,2 com 3,5% de sacarose por 24 horas a 4°C, foi realizado o emblocamento, e posteriormente foram feitos cortes semi finos através de um ultramicrotomo Reichert OMU3 (Leica, Wetzlar, Alemanha). Depois, os cortes foram corados com Azul de toluidina a 1% em solução aquosa de Bórax a 1%, colocados em placa aquecida à 50°C, lavados com água e secos na placa. Em seguida, foram montados com lamínula em Entellan e analisados por microscópio óptico de campo claro Nikon Eclipse E400 com uma objetiva plan apocromática de 40x/0.65 (Nikon Instruments, NY, EUA) para seleção dos campos de cortes para processamento de microscopia eletrônica de transmissão.

Em seguida, foram obtidos cortes ultrafinos de 70-80 nm em ultramicrotomo, e estes lavados no mesmo tampão anteriormente mencionado e pós-fixados com 2% de Tetróxido de Ósmio (OsO $_4$) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora a 4°C. Após estes procedimentos, foram lavados em tampão cacodilato, desidratados em série cetônica (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltrados com a mistura de acetona 100% e resina Epóxi (kit Poly/Bed 812; Polysciences, PA, EUA) e polimerizados a 60°C por 3 dias. Após a polimerização, os cortes ultrafinos foram recolhidos em grades de cobre de 300 mesh, contrastados com acetato de uranila a 5% e citrato de

chumbo 2% e observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 (JEOL, Tokyo, Japão; operando com a tensão do feixe a 60 kV) da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth (IOC/FIOCRUZ). Todos os reagentes foram comprados da empresa “Electron Microscopy Sciences” (PA, EUA), exceto quando indicado. As imagens foram capturadas digitalmente com auxílio de uma câmera CCD SC1000 ORIUS (Gatan, California, EUA) e do software Gatan Digital Micrograph 2.31.734.0 (Gatan).

3.8 Imunohistoquímica

Para verificar a expressão do marcador de autofagia LC3 em lesões de pele de pacientes BT, LL e RR, cortes de 4 µm de espessura foram obtidos em criostato LM3000 (Leica, Wetzlar, Alemanha) a partir de fragmentos de pele congelados. Os criocortes foram fixados em acetona, hidratados em PBS 0,01 M livre de Ca^{2+} / Mg^{2+} e incubados com peróxido de hidrogênio 0,3% (Vetec, Brasil) em PBS por 10 min para extinguir a atividade da peroxidase endógena. Foi feito então o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos com soro normal equino (VECTASTAIN Elite ABC Kit Mouse IgG, Vector Laboratories, CA, EUA) por 30 min à temperatura ambiente e a incubação com anticorpo primário IgG1 monoclonal de camundongo, anti-LC3 humano (MBL International, código M152-3, MA, EUA) na diluição de 1:50 em PBS com Triton X-100 0,25% (Sigma-Aldrich) por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS contendo 0,25% de Triton X-100 e incubados com anticorpo secundário biotilado de equino anti-IgG de camundongo (VECTASTAIN Elite ABC Kit) por 1 hora em temperatura ambiente. Depois de serem lavados, os cortes foram incubados por 40 min com uma peroxidase (HRP) biotilada complexada à avidina DH (VECTASTAIN Elite ABC Kit) para amplificação do sinal. A revelação foi feita utilizando uma solução de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC Peroxidase HRP Substrate Kit, Vector Laboratories) por 10 min em temperatura ambiente.

As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina de Mayer por 1 min, montadas com meio de montagem aquoso Faramount (Dako, CA, EUA) e analisadas através do microscópio Nikon Eclipse E400 com uma objetiva Plan apocromática de 40x/0.65. Controles negativos também foram realizados,

consistindo na utilização de isotipo correspondente, ou omissão do anticorpo primário. As imagens foram adquiridas utilizando a câmera INFINITYX-32C e o software Infinity Capture 6.1.0 (Lumenera Corporation, Ontario, Canadá). A área positiva para LC3 expressa nos gráficos como unidades arbitrárias (AU) foi calculada pela razão entre os valores da área de tecido marcada e total, obtidos após a seleção das áreas de interesse através da ferramenta “Count/Size” e da função “Statistics” no software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Rockville, EUA). Foi avaliado um mínimo de dez imagens aleatórias por amostra.

3.9 Western blot

Para verificar a expressão de proteínas autofágicas em lesões de pele de pacientes BT e LL, 30 cortes de 15 μm foram colocados em tampão de lise celular (Tris-HCl a 50 mM pH 7,5, EDTA a 5 mM, EGTA a 10 mM, NaF a 50 mM, β -glicerofosfato a 20 mM, NaCl a 250 mM, Triton X-100 a 0,1% e coquetel com inibidores protease e fosfatase; Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) e incubados por 30 min a 4°C. Ao término da incubação, os lisados celulares foram centrifugados a 18.300 x g por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido para posterior dosagem de proteínas pelo método de Bradford (“Bio-Rad Protein Assay”, CA, EUA).

Alternativamente, as proteínas foram extraídas por diálise da fase orgânica derivada de fragmentos de lesões cutâneas imersos em TRIzol (Life Technologies, CA, EUA), conforme descrito por Hummon e colaboradores (2007). A fase orgânica de cada biópsia foi coletada e colocada em um tubo de diálise montado utilizando “SnakeSkin Dialysis Tubing, 3.5K MWCO, 22 mm” (Thermo Scientific, MA, EUA) e “clamps” colocados nas partes inferior e superior da amostra de forma a não deixar bolhas para evitar a flutuação dos tubos. Os tubos de diálise contendo as fases orgânicas das amostras de lesão de pele foram imersos em uma solução de SDS 0,1% por 16 horas a 4°C sob agitação. Após esse período, a solução foi trocada mais duas vezes, deixando as amostras imersas em SDS 0,1% por períodos de 4 e 2 horas a 4°C sob agitação. Ao término da diálise, o “clamp” superior foi retirado e a fase proteica foi coletada e transferida para um tubo “eppendorf”. Os tubos foram centrifugados a 6000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi totalmente retirado, recuperando os “pellets” de proteína. Em seguida, os “pellets” foram solubilizados

em uma solução uréia 8 M e Tris-HCl 1 M pH 8,0, e dosados utilizando o “Bio-Rad Protein Assay” de acordo com as instruções do fabricante.

As proteínas presentes nos lisados celulares foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE). Para isso, 20 µg de proteínas foram acrescidas de tampão de amostra (Tris-HCl a 50 mM em pH 8,0, DTT a 100 mM, SDS a 2%, azul de bromofenol a 0,01% e glicerol a 10%) e desnaturados a 100°C por 5 min. Após corrida eletroforética a 100 V em tampão contendo Tris a 25 mM e glicina a 250 mM, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, NJ, EUA). A transferência foi feita em tampão de transferência (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM e metanol a 20%), a 100 V por 45 min em cuba semi-seca (Bio-Rad). Após transferência, as interações inespecíficas foram bloqueadas com tampão contendo Tris a 20 mM pH 7,4, NaCl a 137 mM e Tween a 0,1% (TBS-Tween) acrescido de leite desnatado 5% por 1 hora. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight” a 4°C com anticorpos primários para: LC3 (diluição 1:400; MBL International), BECN1 (1:1000; IgG policlonal de coelho, anti-humano, código 905-721-100, Enzo Life Sciences), BCL2 (1:200; IgG1 monoclonal de camundongo, anti-humano, código M088729, Dako) e GAPDH (1:500; IgG1 monoclonal de camundongo, anti-humano, código sc-47724, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA). Ao término da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween por 5 min e então incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com seus respectivos anticorpos secundários policlonais de cabra conjugados à peroxidase: anti-IgG de camundongo (1:2000; código P0447, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) ou anti-IgG de coelho (1:2000; código P0448, DakoCytomation). Finalmente, foram realizadas 3 lavagens de 5 min com TBS-Tween e a detecção das bandas foi feita por quimioluminescência utilizando o reagente western blot Luminol (Santa Cruz). Em seguida, as bandas foram reveladas usando filme médico radiográfico (Carestream X-OMAT LS; Kodak, NY, EUA) ou através do sistema de imagem “Carestream Image Station” 4000MM (Carestream Health, Connecticut, EUA). Todos os reagentes foram comprados da empresa “Sigma-Aldrich”, exceto quando indicado. A quantificação do western blot foi realizada através de análise densitométrica utilizando o programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated, EUA).

3.10 Imunofluorescência

Para verificar a redistribuição do marcador de autofagia LC3 em lesões de pele de pacientes BT e LL, cortes de 4 µm de espessura foram obtidos em criostato LM3000 (Leica) a partir de fragmentos de pele congelados, fixados em acetona e hidratados em PBS 0,01 M livre de $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$. Foi feito então o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos com soro normal caprino 10% (SNC; Sigma-Aldrich), leite desnatado 0,01% em PBS e 2 gotas de uma solução de bloqueio comercial (Protein Block Serum-Free Ready-To-Use, Dako) por 30 min à temperatura ambiente. Os criocortes foram então incubados com anticorpo primário anti-LC3 humano (MBL International) na diluição de 1:50 em PBS contendo Triton X-100 0,25% e SNC 2% por 1 hora e meia em temperatura ambiente, e após este período, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS contendo 0,25% de Triton X-100 e incubados com anticorpo secundário policlonal de cabra, anti-IgG de camundongo, conjugado ao fluorófilo Alexa Fluor 488 (1:1000; Molecular Probes, A11001) por 1 hora e meia em temperatura ambiente. Os núcleos foram corados com DAPI (1:10000; Molecular Probes) e as lâminas foram montadas em meio anti-“fading” VECTASHIELD (Vector Laboratories) e seladas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) nas bordas. Controles negativos também foram realizados, consistindo na utilização de isotipo correspondente, ou omissão do anticorpo primário.

Para as culturas celulares foi utilizado o fixador paraformaldeído 4% durante 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS acrescido de Triton X-100 0,01% (ou saponina 0,05%, Sigma-Aldrich, somente para marcação com LC3) e bloqueadas com uma solução de SFB 10%, SNC 10% e BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com os anticorpos primários de interesse: LC3 (diluição 1:50; MBL International), BECN1 (1:500; Enzo Life Sciences), BCL2 (1:100; Dako), LAM (1:50; IgG policlonal de coelho, anti-micobactéria, gentilmente doado pelo Dr. John Stewart Spencer da Colorado State University) e CD68/SR-D1 (1:100; IgG2b monoclonal de camundongo, anti-humano, código MAB20401, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de PBS/Triton X-100 0,01% e foi então realizada a incubação com os seguintes anticorpos secundários por 2 horas à temperatura ambiente: anti-IgG de coelho/Alexa Fluor 532 (1:500; policlonal feito em cabra, código A11009, Molecular Probes), anti-IgG2b de

camundongo/Alexa Fluor 546 (1:500; monoclonal feito em cabra, código A21143, Molecular Probes) e anti-IgG1 de camundongo/Alexa Fluor 633 (1:500; monoclonal feito em cabra, código A21126, Molecular Probes). Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com a solução de PBS/Triton X-100 0,01% e foi realizada incubação com DAPI por 5 min em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e as lâminas foram montadas em meio anti-“fading” Permafluor (Thermo Fisher Scientific) e seladas com esmalte nas bordas. Controles negativos também foram realizados, consistindo na utilização de isotipos correspondentes, ou omissão do anticorpo primário.

Os tecidos e as células foram fotografados utilizando o microscópio Axio Observer.Z1 equipado com os sistemas Colibri.2 e ApoTome.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) e as objetivas de óleo EC Plan-Neofluar de 40x/1.30, 63x/1.40 e 100x/1.30. As imagens foram capturadas com a câmera digital AxioCam HRm e auxílio do programa AxioVision Rel. 4.8.2.0 (Carl Zeiss). O número de marcações puntiformes para LC3 por campo foi determinado utilizando uma adaptação do macro GFP-LC3 (Dagda et al. 2008) e o “plugin” “Analyze Particles” no software de análise de imagens ImageJ versão 1.50 g (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Este número foi normalizado pelo número de núcleos corados com DAPI por campo. Para as análises de colocalização foi utilizada uma adaptação do macro “Green and Red puncta colocalization” (Pampliega et al. 2013) e os “plugins” “Colocalization” e “Analyze Particles” no mesmo software mencionado acima. Para ambas as análises, cada experimento envolveu a contagem de pelo menos 100 células por amostra, em ao menos 10 campos randômicos.

3.11 ELISA intracelular

Para mensurar os níveis intracelulares de SLRs nas células de lesões cutâneas de pacientes BT e LL, proteínas (10 µg) extraídas por diálise foram analisadas por kits comerciais de ELISA para SQSTM1/p62 e NBR1 (Enzo Life Sciences), conforme recomendado pelo fabricante. A solução de solubilização de proteínas foi acrescida de coquetel de inibidores de proteases, PMSF a 1 mM e 20 µg/mL de DNase (todos da empresa Sigma-Aldrich). Resumidamente, as reações de ELISA foram reveladas utilizando anticorpos para SQSTM1/p62 (policlonal de

coelho) e NBR1 (monoclonal) conjugados à peroxidase, e solução cromogênica de TMB como substrato. As absorbâncias foram mensuradas a 450 nm através do leitor de microplacas SpectraMax 190 (Molecular Devices, CA, EUA) e analisadas pelo programa SoftMax Pro v5.3 usando uma curva logística de quatro parâmetros (Molecular Devices).

3.12 Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR

O RNA total foi extraído de amostras de lesões de pele congeladas utilizando TRIzol (Life Technologies) conforme as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para evitar a contaminação com DNA genômico (Kit RTS DNase, MO BIO Laboratories, CA, EUA). O RNA foi então submetido à análise de pureza e quantificação em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) e integridade por eletroforese em gel de agarose 1,2% (UltraPure agarose, Life Technologies). 1 µg de RNA de cada amostra foi reversamente transcrito utilizando o kit “SuperScript III First-Strand Synthesis System” (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram conduzidas usando duplicatas técnicas de 10 ng de cDNA por alvo.

Para a avaliação da expressão de genes relacionados à autofagia por RT-qPCR, foi utilizado um kit de PCR “array” da via autofágica (Real Time Primers, HATPL-I), composto por 88 alvos e 8 genes de referência (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*, *PGK1*, *PPIA* e *RPL13A*). A lista completa de genes alvos está disponibilizada em <http://realtimeprimers.com/huauprli.html>, assim como nos apêndices A e B. A qPCR “array” foi realizada a 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, para ativação da DNA polimerase, 50 ciclos a 95°C por 10 segundos, para a desnaturação da fita, e a 58°C por 45 segundos, para o anelamento do primer e extensão da fita de cDNA, utilizando o “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, MA, EUA) em um “StepOnePlus qPCR System”, com o auxílio do software StepOne versão 2.3. A curva de “melting” foi feita de modo contínuo a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. O gene de referência foi eleito através da avaliação de constância da expressão (algoritmo “geNorm”) entre os grupos de amostras, realizada no programa ExpressionSuite versão 1.0 (Applied Biosystems).

Alternativamente, a expressão dos genes antimicrobianos *CAMP* (catelicidina; “primer” Hs00189038_m1, ThermoFisher Scientific) e *DEFB4A* (β -defensina 2; Hs00823638_m1, ThermoFisher Scientific), relacionados à via da autofagia mediada por IFN/Vitamina D, foi avaliada por RT-qPCR através do sistema “TaqMan” em um “StepOnePlus qPCR System”. A qPCR foi realizada a 95°C por 20 segundos, 40 ciclos a 95°C por 1 segundo, e a 60°C por 20 segundos, utilizando o “TaqMan Fast Universal PCR Master Mix [2x]” (Applied Biosystems).

A análise de expressão gênica foi realizada no software ExpressionSuite através do método do $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT é igual ao CT (“cycle threshold”) do gene de interesse subtraído do CT do gene de referência, utilizando como normalizadores os genes de referência *HPRT1* (Real Time Primers) ou *GAPDH* (Hs02758991_g1, ThermoFisher Scientific) para as PCRs “array” ou “TaqMan”, respectivamente. Todas as reações de PCR foram monitoradas para contaminações.

3.13 Análise da via autofágica

Os perfis de expressão gênica das lesões hansênicas foram derivados do RT-qPCR “array” de autofagia. As funções “Linear Model for Series of Arrays” (lmFit) e “Empirical Bayes Statistics for Differential Expression” (eBayes) do pacote “Limma (Bioconductor)” para o software “R” (versão 3.1.1) foram utilizadas para verificar as diferenças na expressão gênica. Os genes diferencialmente expressos nos grupos de pacientes com hanseníase foram identificados pelos valores de “Log2 fold-change” “ ≥ 1.5 -fold” e $P < 0,05$ pelo teste-t moderado (Montoya et al. 2009, Schenk et al. 2012).

Os genes relacionados ao processo de autofagia que apresentaram expressão diferenciada foram funcionalmente subcategorizados em quatro subgrupos (genes autofágicos, reguladores autofágicos, genes lisossomais, e reguladores lisossomais) de acordo com uma lista de genes humanos envolvidos nas vias autofágica e lisossomal, descrita por Jegga e colaboradores (2011). Os “Heat maps” foram gerados usando a função “Enhanced Heat Map” (heatmap.2) do pacote “gplots” para o programa “R” e apresentados em forma de uma escala de “scores-z”.

3.14 Análise de interação gênica e enriquecimento

Os genes autofágicos diferencialmente modulados nas lesões de pele foram submetidos à base de dados “Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins” (STRING; Szklarczyk et al. 2017) 10.0 (<http://string-db.org/>) para a análise de associações funcionais entre genes. As redes de interações entre genes nas lesões hansenicas foram obtidas através dos modos de exibição “action” e “confidence” da STRING. As análises de ontologia gênica (GO) e “KEGG pathways” foram geradas utilizando a ferramenta “Enrichment” da STRING, sendo as anotações específicas encontradas corrigidas para a “false discovery rate” (FDR) e pela correção de Bonferroni. O “threshold” para significância estatística foi estabelecido como $P < 0,05$.

3.15 Análise estatística

A significância estatística foi calculada através dos testes Mann-Whitney (bicaudal) ou Kruskal-Wallis (com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn) utilizando o programa GraphPad Prism 4.02 (GraphPad Software, CA, EUA). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 A autofagia é diferencialmente regulada entre os pacientes BT e LL

Em pacientes infectados por *M. leprae*, o patógeno pode ser encontrado em uma variedade de tecidos e tipos celulares. Para investigar a possível participação da autofagia na infecção por *M. leprae*, a presença de vacúolos de dupla membrana (característica de autofagossomos) foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão.

Foram analisados fragmentos de lesões de pele de pacientes com as formas clínicas LL e BT, avaliando células com morfologia similar a macrófagos do tecido conjuntivo. A análise ultraestrutural demonstrou a presença de bacilos em vacúolos com membrana simples (não mostrado) ou dupla (Figura 4.1). Foi observada a presença de autofagossomos em células de lesões de pele tanto de pacientes BT (Figura 4.1A-D) como LL (Figura 4.1E-F).

A análise do material de lesão revelou a presença de bacilos degenerados (Figura 4.1C) e figuras mielínicas sem bactérias (não mostrado) no tecido de pacientes BT, mas não no de pacientes LL. Foi observado um maior número de autofagossomos em células de lesões de pacientes BT quando comparadas as células de pacientes LL (não mostrado).

No intuito de verificarmos se os vacúolos com dupla membrana observados em células presentes na lesão de pacientes com hanseníase eram autofagossomos, a expressão de LC3, uma proteína expressa no autofagossomo maduro e que é utilizada como marcador de autofagia (Kabeya et al. 2000, Mizushima & Yoshimori 2007) foi avaliada por imunohistoquímica.

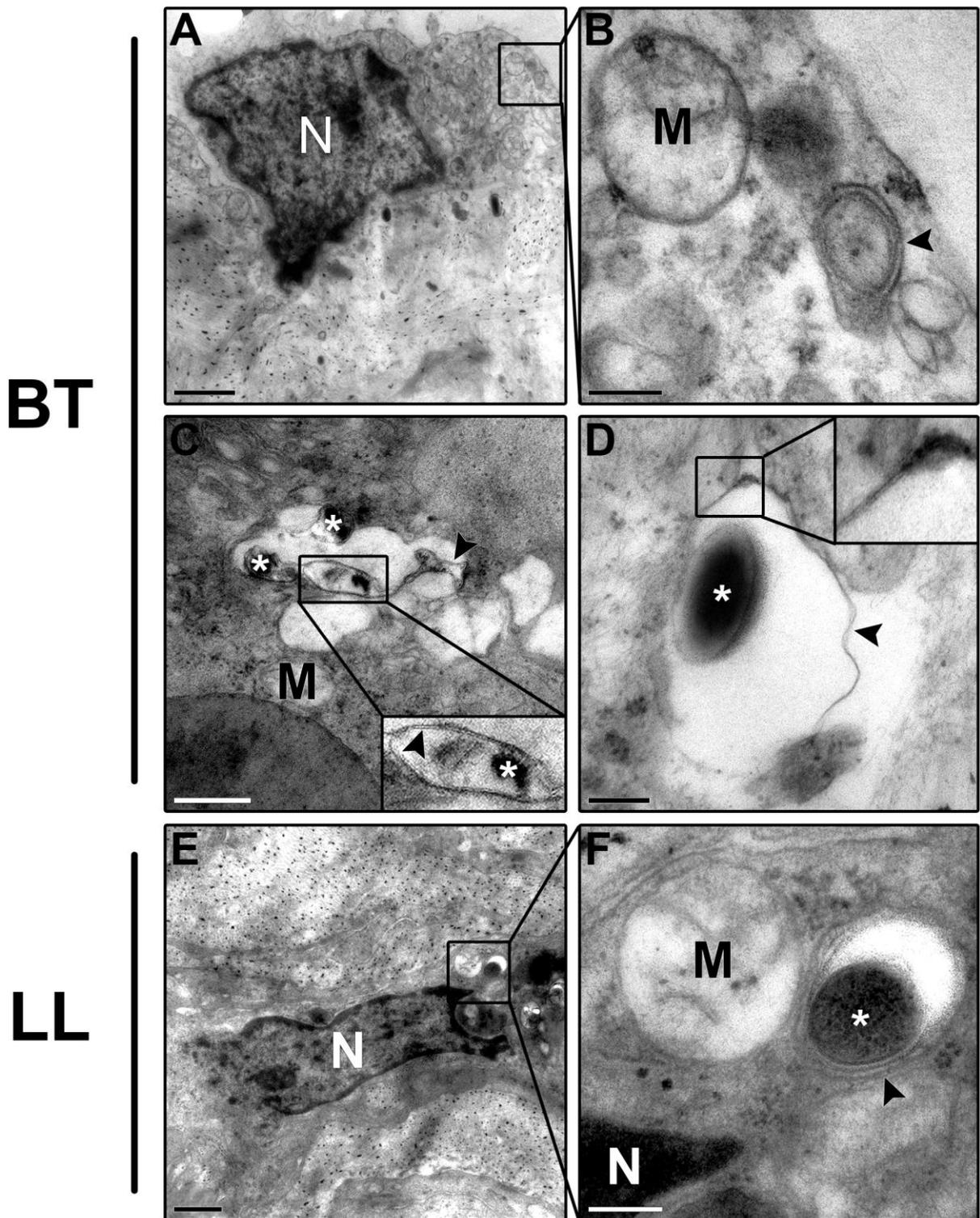


Figura 4.1: Presença de autofagossomos em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Fragmentos de lesões de pele foram obtidos de pacientes com as formas clínicas BT (A-D) e LL (E-F), e processadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão. A-B: Macrófago de paciente BT apresentando autofagossomo sem bactérias (inserto em B, cabeça de seta). C-D: *M. leprae* no interior de autofagossomos no tecido de paciente BT (cabeças de seta), sendo possível a observação de bactérias com aspecto degenerado (inserto em C, asterisco). E-F: *M. leprae* no interior de um autofagossomo (inserto em F, cabeça de seta) em macrófago de paciente LL. As imagens são representativas de três amostras de cada grupo de pacientes. BT: “borderline” tuberculóide; LL: lepromatoso

lepromatoso. N: núcleo. M: mitocôndria. Asteriscos: indicam *M. leprae*. Cabeças de seta: indicam autofagossomos. Escalas: 1 μm (A), 0,2 μm (B), 0,5 μm (C), 0,2 μm (D), 1,0 μm (E) e 0,2 μm (F).

A análise da expressão de LC3 por imunohistoquímica em biópsias de lesões de pele das formas clínicas BT e LL, revelou um maior número de células, incluindo macrófagos, expressando este marcador nos pacientes BT, quando comparados aos pacientes LL (Figura 4.2).

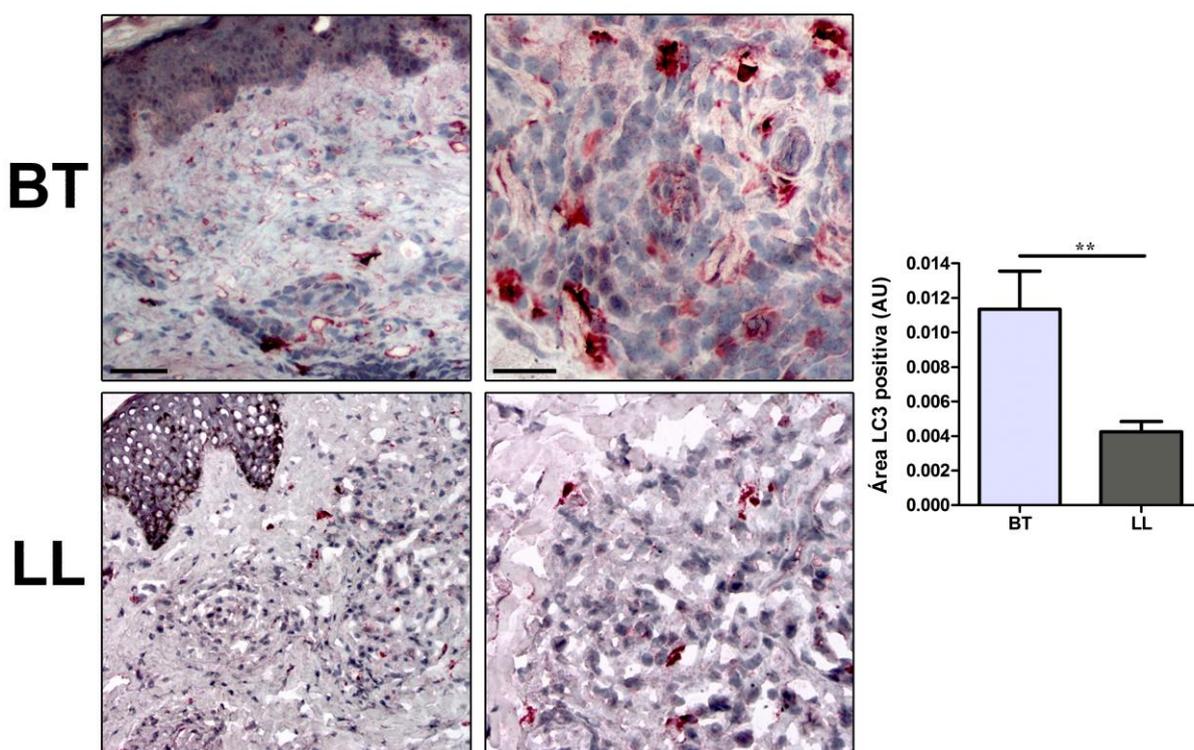


Figura 4.2: Expressão de LC3 em células de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Fragmentos de lesões de pele foram obtidos de pacientes com as formas clínicas BT e LL e a expressão de LC3 foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica contrastada com hematoxilina, utilizando um anticorpo anti-LC3. A quantificação das células LC3⁺ foi feita através da razão entre as áreas de tecido marcada e total, em ao menos 10 campos randômicos por cada amostra, utilizando o programa Image-Pro Plus e os resultados são apresentados como média \pm SEM. ** $P < 0,01$ pelo teste de Mann-Whitney. As imagens são representativas de três (BT) e quatro (LL) amostras de pacientes. BT: “borderline” tuberculoides; LL: lepromatoso lepromatoso. AU: unidades arbitrárias. Escalas: 50 μm (esquerda) e 25 μm (direita).

Quando a autofagia é induzida, o LC3 é convertido de sua forma citoplasmática (LC3-I), para a sua forma conjugada à PE (LC3-II), que se deposita

em ambas as membranas externa e interna do autofagossomo (Mizushima & Yoshimori 2007). O LC3-II é o único marcador proteico associado a autofagossomos completos em eucariotos superiores. Assim, visando confirmar se em células de lesão de pacientes BT há aumento de LC3-II, extratos de biópsias de lesão de pele foram submetidos a uma corrida eletroforética e a análise por western blot confirmou a maior expressão da proteína LC3-II nos pacientes BT, quando comparados aos pacientes LL, sendo a densitometria do gel realizada através da razão LC3-II/GAPDH (Figura 4.3). A análise da redistribuição da LC3 endógena por imunofluorescência mostrou que a LC3-I citoplasmática difusa foi predominante nas lesões de pacientes LL, enquanto a LC3-II puntiforme de membrana foi proeminente nas lesões de pacientes BT (Figura 4.4). Estes resultados indicam que a autofagia está envolvida na resposta da pele contra a infecção por *M. leprae* em ambos os pólos de hanseníase. No entanto, embora ela tenha ocorrido em níveis basais nos pacientes LL, ela ocorreu de maneira diferencial nas lesões de pacientes BT.

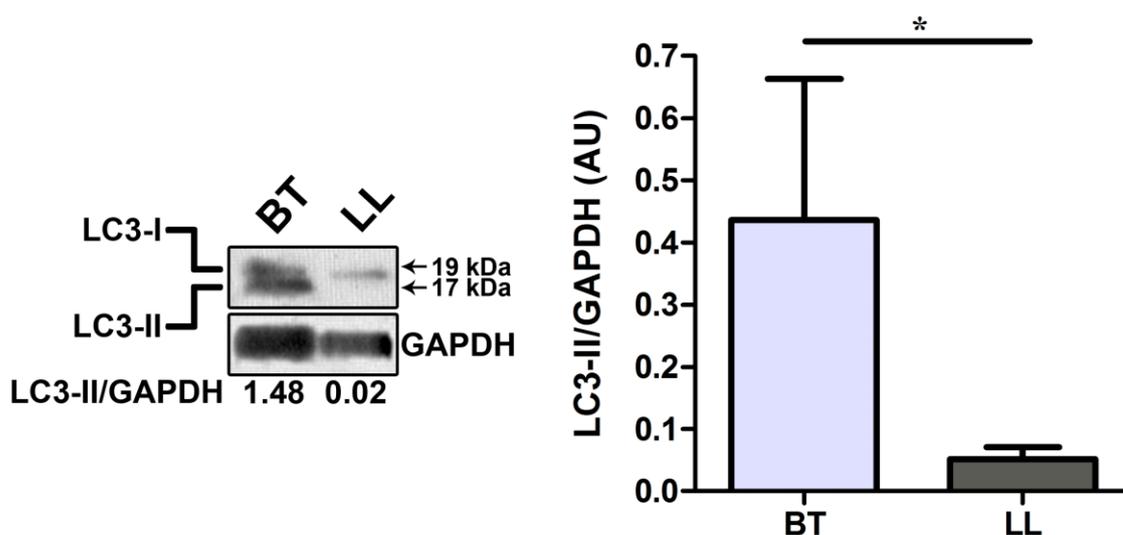


Figura 4.3: Expressão proteica de LC3-II em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Fragmentos de lesões de pele foram obtidos de pacientes com as formas clínicas BT ou LL e a expressão de LC3 foi avaliada por western blot utilizando um anticorpo anti-LC3. Um anticorpo anti-GAPDH foi utilizado como controle de carregamento proteico. A quantificação foi realizada através da razão LC3-II/GAPDH em cada amostra usando o programa Adobe Photoshop CS6 e os resultados são apresentados como média \pm SEM. * $P < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. Os resultados são representativos de seis (BT) e três (LL) extratos proteicos provenientes de lesões de pele de pacientes. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso. AU: unidades arbitrárias.

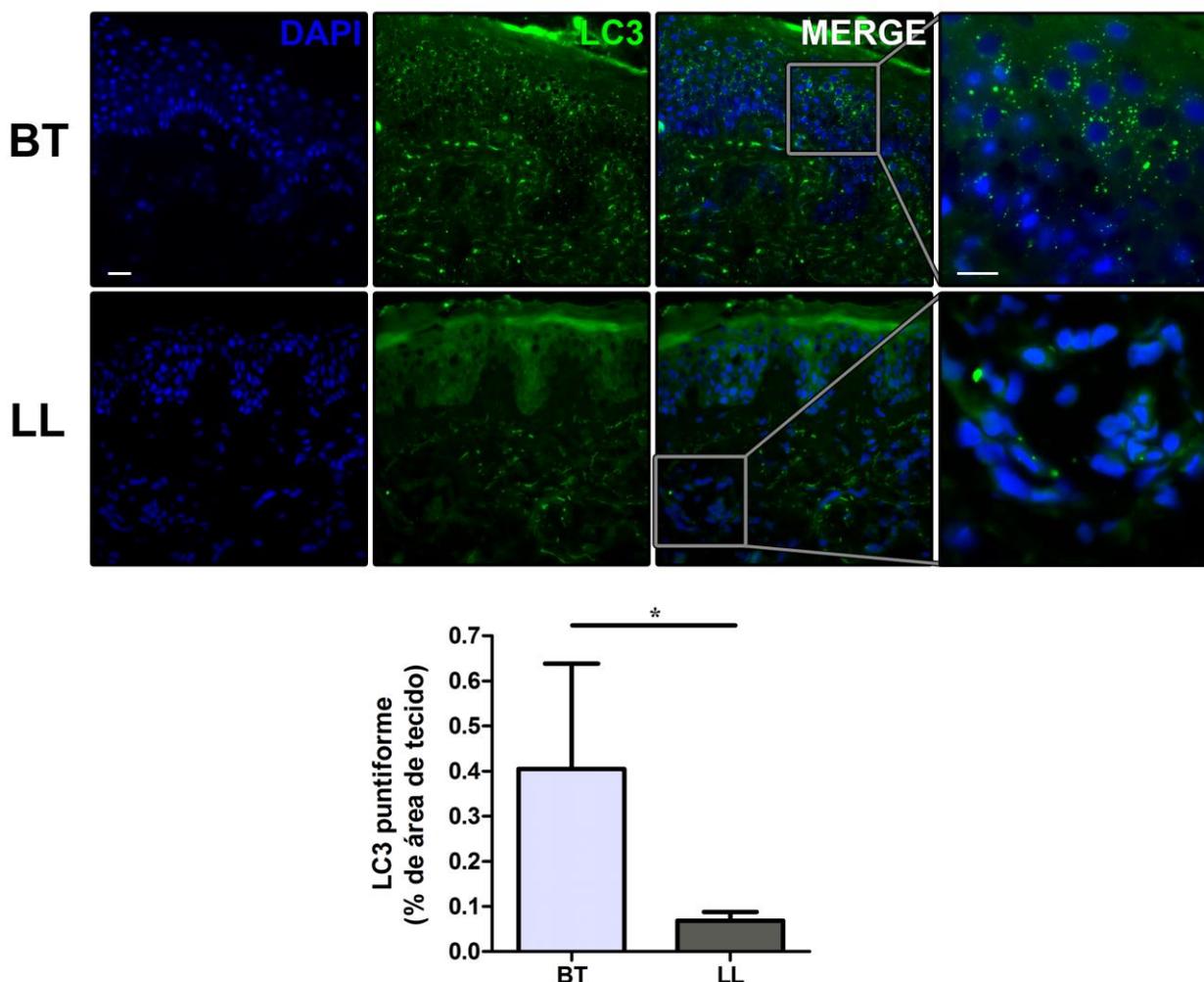


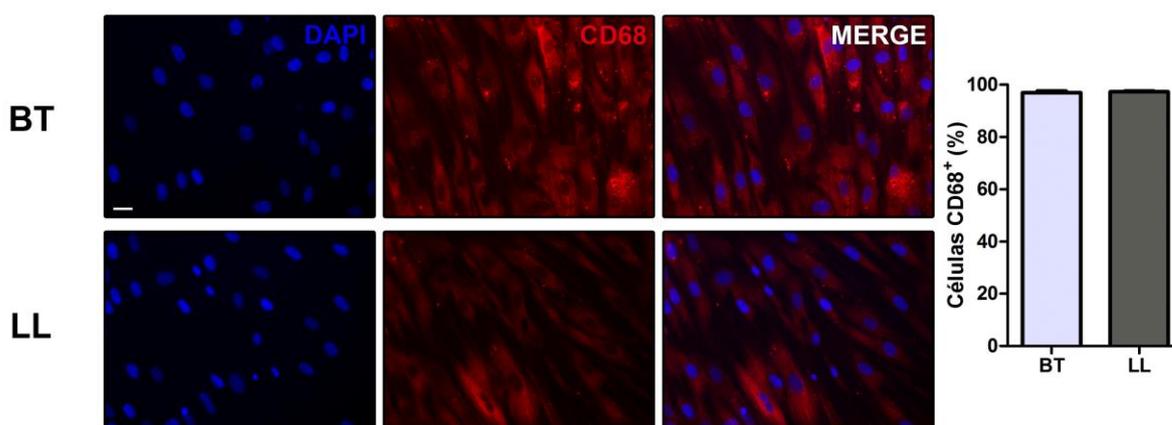
Figura 4.4: Avaliação da redistribuição de LC3 em células de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Cortes de tecido (pele) de pacientes hanseníase foram marcados com anticorpo anti-LC3 (verde), corados com DAPI para visualizar os núcleos (azul) e analisados por microscopia de imunofluorescência. O número de LC3 puntiforme fluorescente foi quantificado em ao menos 10 campos randômicos por cada amostra e expresso como a porcentagem da área de tecido ocupada. Os dados são apresentados como média \pm SEM. * $P < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. As imagens são representativas de três amostras de cada grupo de pacientes. BT: “borderline” tuberculóide; LL: lepromatosa lepromatosa. Escalas: 20 μ m (menores aumentos) e 10 μ m (insertos).

4.2 *M. leprae* inibe a geração de autofagossomos em macrófagos de lesões de pele de pacientes LL

Nossos dados utilizando fragmentos de lesões de pele de pacientes com hanseníase indicaram a ativação da autofagia. Porém, quando analisadas tanto por microscopia eletrônica quanto por imunoperoxidase, os tipos celulares com essas características não foram definidos, embora muitas células apresentassem

características morfológicas compatíveis com macrófagos. Para confirmar que os macrófagos são capazes de ativar a autofagia em resposta à micobactéria, fragmentos de lesões de pele foram digeridos com dispase e collagenase, conforme protocolo previamente descrito por Moura e colaboradores (2007). Após o isolamento, as células foram cultivadas para a análise do fenótipo celular através da marcação para CD68, um conhecido marcador de macrófagos humanos (Falini et al. 1993). Observamos que após 7 dias de cultura mais de 95% das células eram positivas para o CD68 nas imunofluorescências, não sendo observadas diferenças significativas quanto ao percentual de células CD68⁺ nas culturas de pacientes BT e LL (Figura 4.5A), e que as células isoladas expressam ambos CD68 e LC3 (Figura 4.5B).

A



B

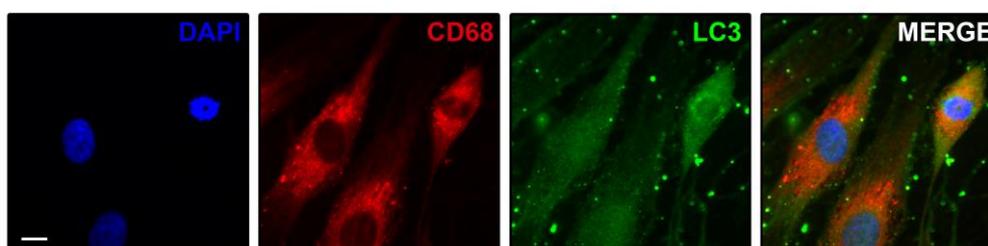


Figura 4.5: Expressão de CD68 em macrófagos de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase. (A e B) Macrófagos foram isolados de lesões cutâneas de pacientes BT e LL, e cultivados durante 7 dias em meio completo. As células foram fixadas e coradas como indicado. O DAPI foi utilizado para visualizar os núcleos (azul). As porcentagens de células CD68⁺ na imunofluorescência são mostradas. Os dados são apresentados como média ± SEM (BT, n = 3; LL, n = 3).

Escala: 25 μm . (B) Coexpressão de CD68 (vermelho) e LC3 (verde) em macrófagos de lesão cutânea de paciente com hanseníase. A imagem representativa é derivada de um paciente BT. BT: “borderline” tuberculóide; LL: lepromatoso lepromatoso. Escalas: 10 μm .

As células não estimuladas derivadas dos pacientes BT apresentaram um maior número de LC3 puntiforme em relação às células dos pacientes LL (Figura 4.6), através da análise por microscopia fluorescência. Para testar a hipótese de que as diferenças nos níveis de autofagia observadas entre os pacientes hansenícos são devido aos níveis de IFN γ nas lesões de pele, os macrófagos foram estimulados com IFN γ . A estimulação dos macrófagos de pacientes BT com o IFN γ induziu um aumento no número de células com LC3 puntiforme, quando comparados às células não estimuladas (Figura 4.6). Através da avaliação da marcação de LC3 puntiforme, foi possível observar que os macrófagos isolados dos pacientes BT foram mais sensíveis ao estímulo com IFN γ , quando comparados aos macrófagos oriundos de pacientes LL (Figura 4.6). A rapamicina foi utilizada como controle positivo (Figura 4.6). A análise do número de LC3 puntiforme nos macrófagos de lesões de pele revelou uma maior expressão deste marcador de autofagia nos pacientes BT em relação aos pacientes LL, na ausência ou presença de IFN γ ou rapamicina (Figura 4.6).

Em seguida, um modelo *in vitro* com macrófagos derivados de monócitos da linhagem humana THP-1 e monócitos de indivíduos saudáveis foi utilizado para estudar a interação *M. leprae*-célula. Devido ao direcionamento de *M. tuberculosis* para autofagia e as contramedidas bacterianas serem processos dependentes de micobactérias ativas, nós infectamos ou estimulamos monócitos primários humanos e macrófagos derivados de THP-1 com *M. leprae* vivo ou morto marcados com PKH, respectivamente.

M. leprae morto desencadeou um aumento do sinal pontual de LC3 em células THP-1 (Figura 4.7) e monócitos primários (Figura 4.8A e C), mas não em uma maneira dependente da multiplicidade de infecção (MOI). Com cargas bacterianas mais baixas (MOIs = 2 e 10), observou-se *M. leprae* morto em estreita associação com autofagossomos decorados com LC3-II em macrófagos THP-1 e monócitos derivados de sangue (Figuras 4.7 e 4.8A e C). Em alta concentração micobacteriana (MOI = 50), esta colocalização também foi detectada, mas sem diferenças significativas em relação as MOIs inferiores (Figuras 4.7 e 4.8A e C).

Em contraste, não observamos alterações na localização de LC3 quando células THP-1 e monócitos primários foram infectados com *M. leprae* (Figuras 4.7 e 4.8A e C). Além disso, a colocalização entre *M. leprae* vivo e LC3-II foi menos observada em ambos os tipos de células e diminuiu de modo dependente da MOI utilizada (Figuras 4.7 e 4.8A e C). De fato, *M. leprae* viável induziu menos vesículas LC3-positivas do que as micobactérias mortas (Figuras 4.7 e 4.8A e C).

Perguntamos a seguir se as micobactérias vivas poderiam inibir a ativação da autofagia desencadeada por *M. leprae* morto. Para este fim, infectamos os monócitos sanguíneos com micobactérias vivas e mortas marcadas com PKH simultaneamente (Figura 4.8B). Descobrimos que durante a infecção mista, *M. leprae* viável reduziu a marcação pontuada de LC3 de forma semelhante aos níveis observados para infecção com micobactérias vivas isoladas (Figura 4.8B-C).

Adicionalmente, em células infectadas com ambos os tipos de bactérias (viáveis e mortas) a colocalização entre *M. leprae* e LC3-II foi diminuída em comparação com as células que continham apenas bactérias mortas, e foi mais proeminente com *M. leprae* morto, quando comparada a micobactérias vivas (Figuras 4.8B-C). O indutor de autofagia rapamicina foi utilizado como um controle positivo, levando a um acúmulo de LC3 puntiforme em ambos os tipos de células (Figuras 4.7 e 4.8A-C). Em conjunto, estes resultados sugerem que os níveis reduzidos de autofagia em macrófagos derivados de lesões de pacientes LL são um resultado da inibição pela infecção por *M. leprae* e que o IFN γ pode reverter este efeito.

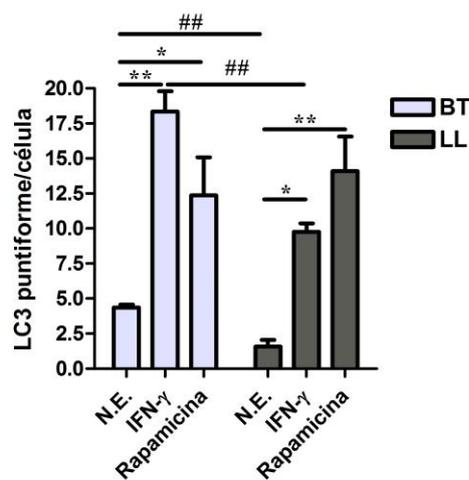
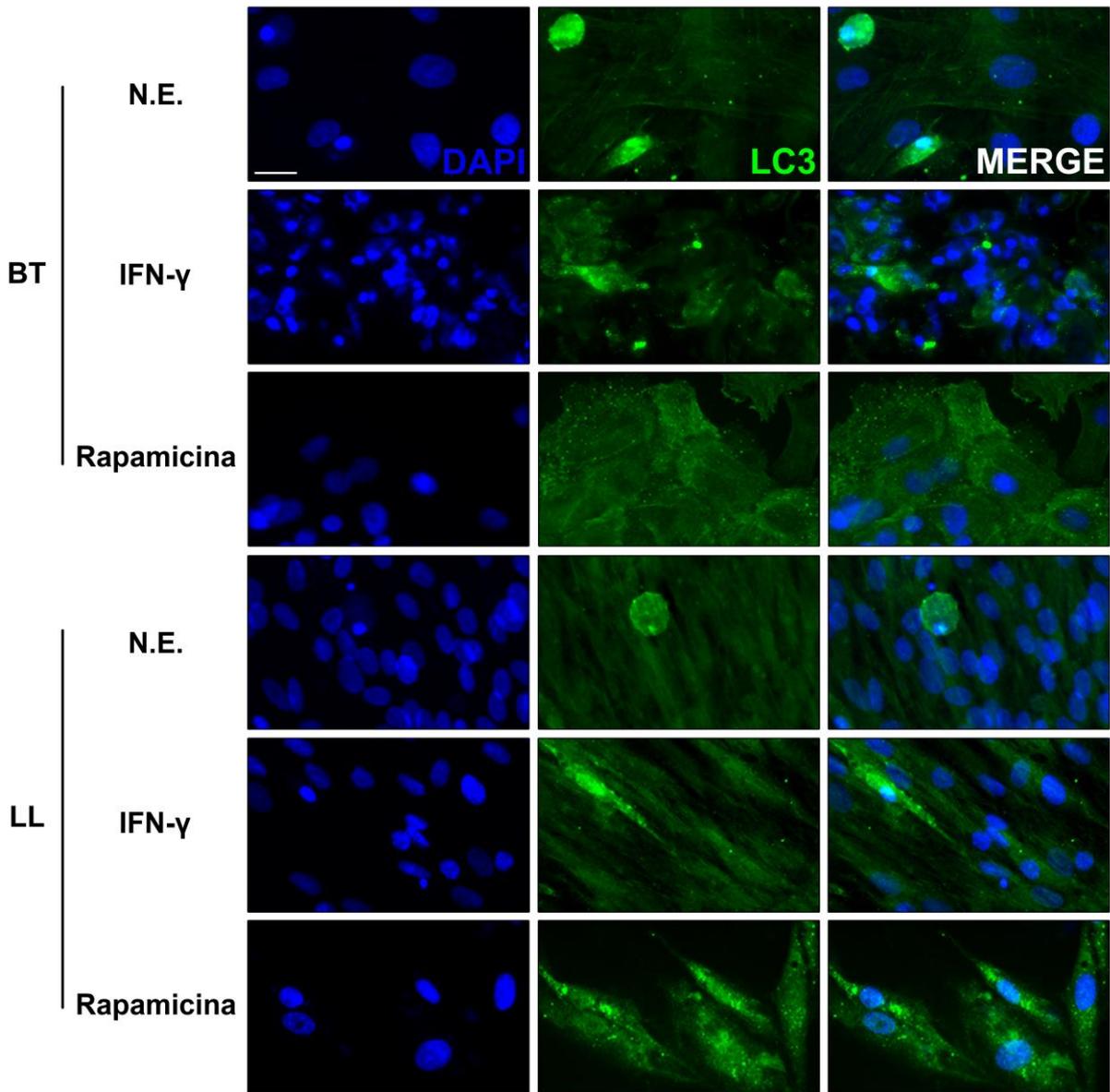


Figura 4.6: Análise da expressão de LC3-II em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Macrófagos de lesões de pele foram isolados de pacientes BT e LL e estimulados ou não (N.E.) com 10 ng de IFN γ ou 200 ng de rapamicina por 18 horas. A expressão de LC3 foi avaliada por microscopia de

imunofluorescência utilizando anticorpo para LC3 (verde), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). As imagens de imunofluorescência foram quantificadas e as barras representam os valores médios do número de LC3 puntiforme por célula \pm SEM (BT, $n = 3$; LL, $n = 3$). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, pelo teste de Kruskal-Wallis; ### $P < 0,01$, pelo teste de Mann-Whitney. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso. Escala: 25 μ m.

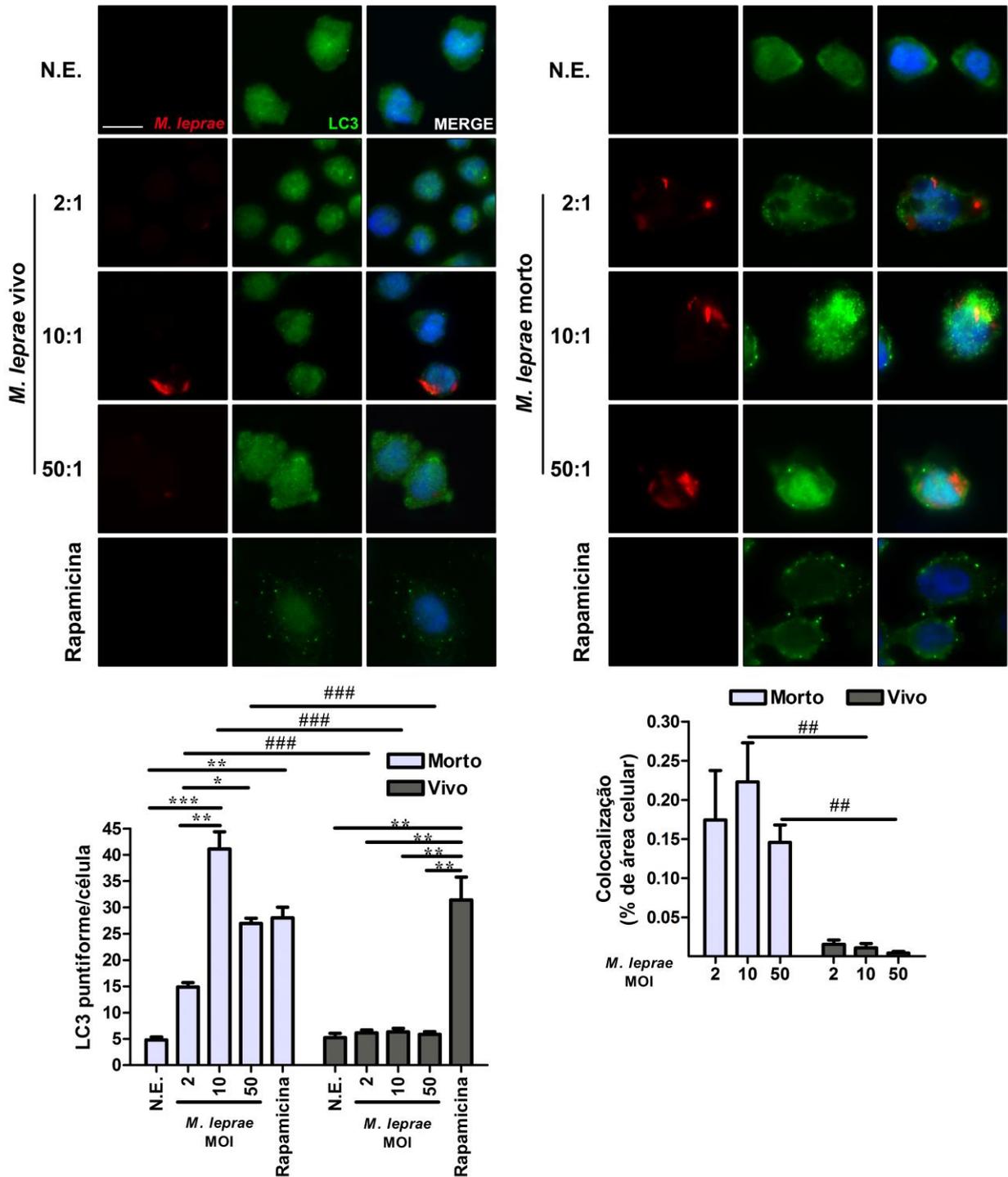
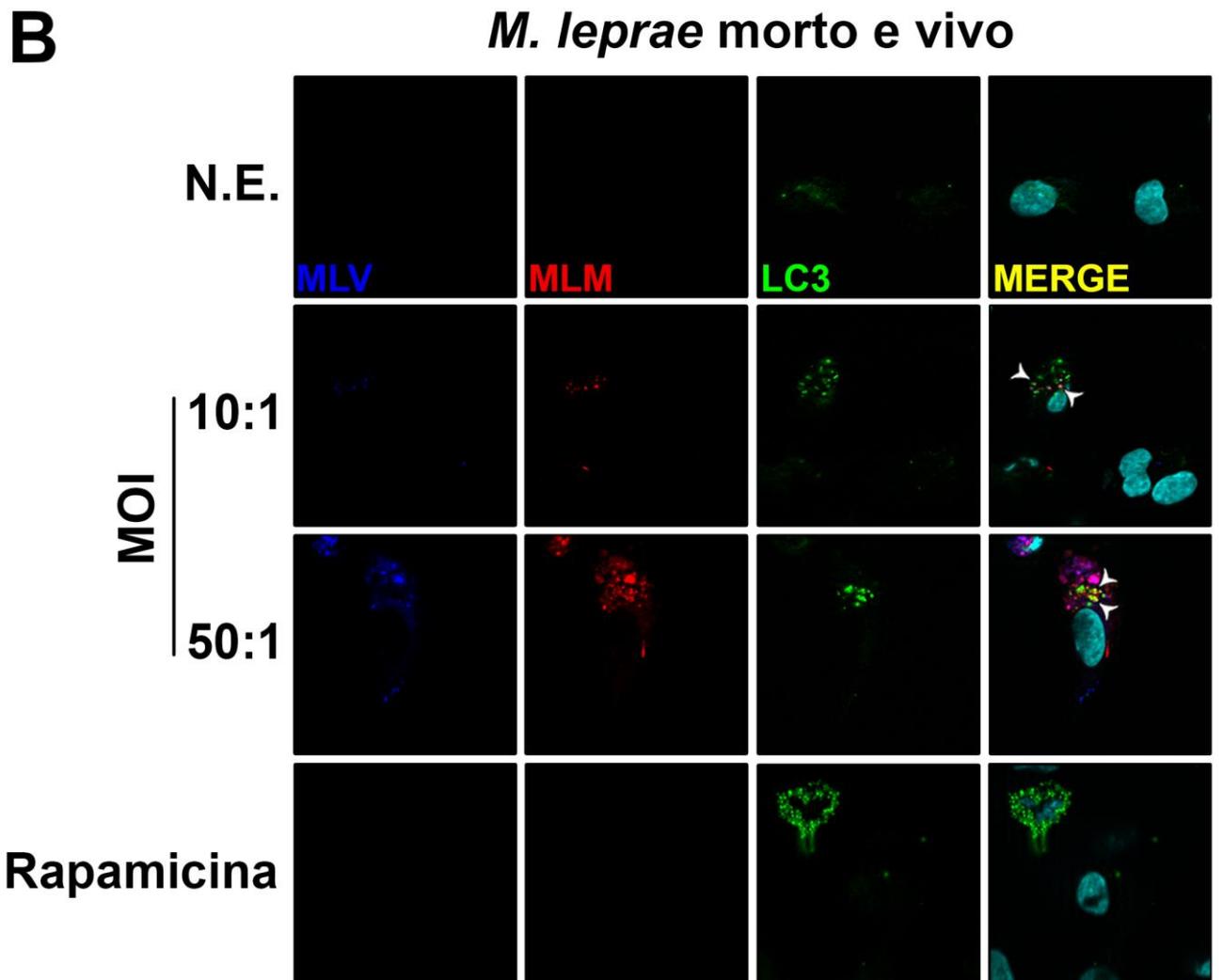
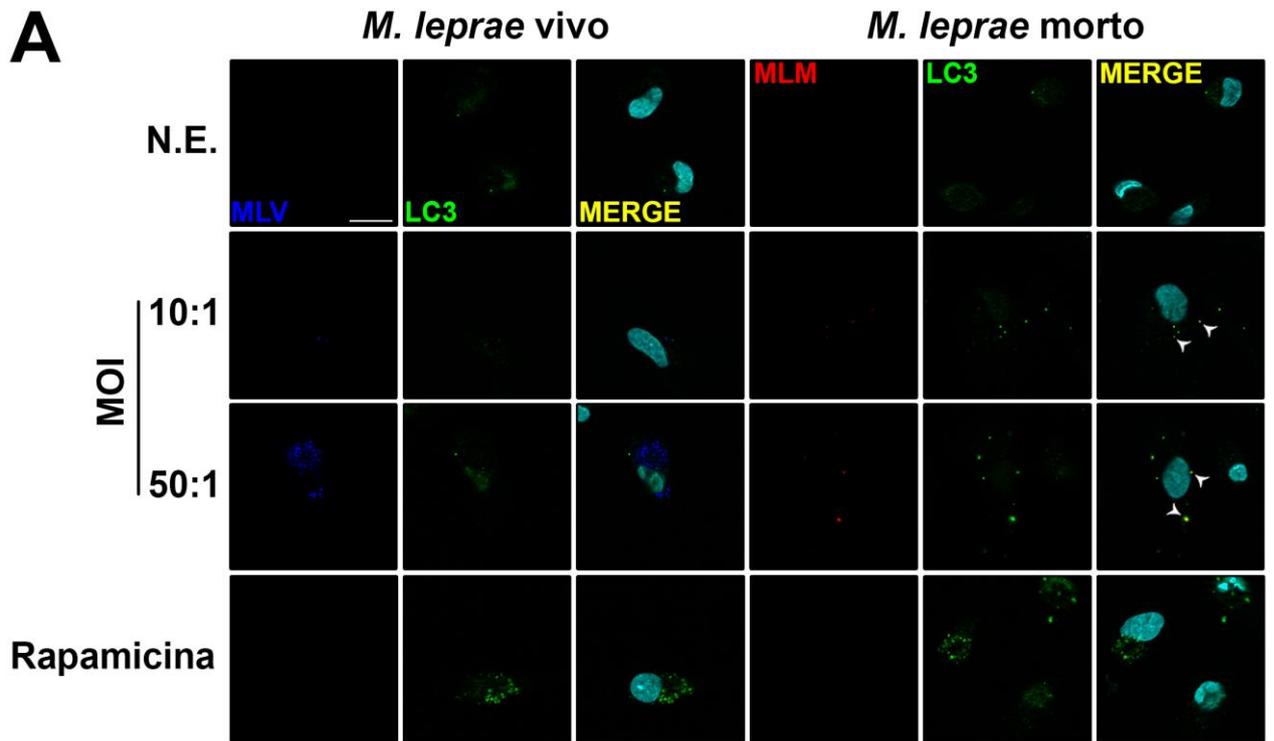


Figura 4.7: Análise da capacidade de indução de autofagia por *M. leprae* em macrófagos THP-1. Os macrófagos THP-1 derivados de monócitos foram infectados ou estimulados com *M. leprae* vivo ou morto marcado com PKH26 (vermelho), respectivamente, em multiplicidade de infecção (MOI) de 2, 10 ou 50

micobactérias por célula durante 18 h. As células foram fixadas e foi realizada imunofluorescência para LC3 (verde) e DAPI (azul). O tratamento com rapamicina (200 ng/mL) foi utilizado como controle positivo. Calculou-se o número de LC3 puntiforme por célula. Os perfis de colocalização entre *M. leprae* e LC3 foram quantificados e expressos como porcentagem de área celular. Os resultados representam a média \pm SEM de quatro experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, pelo teste de Kruskal-Wallis; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, pelo teste de Mann-Whitney. N.E.: células não estimuladas. Escala: 10 μ m.



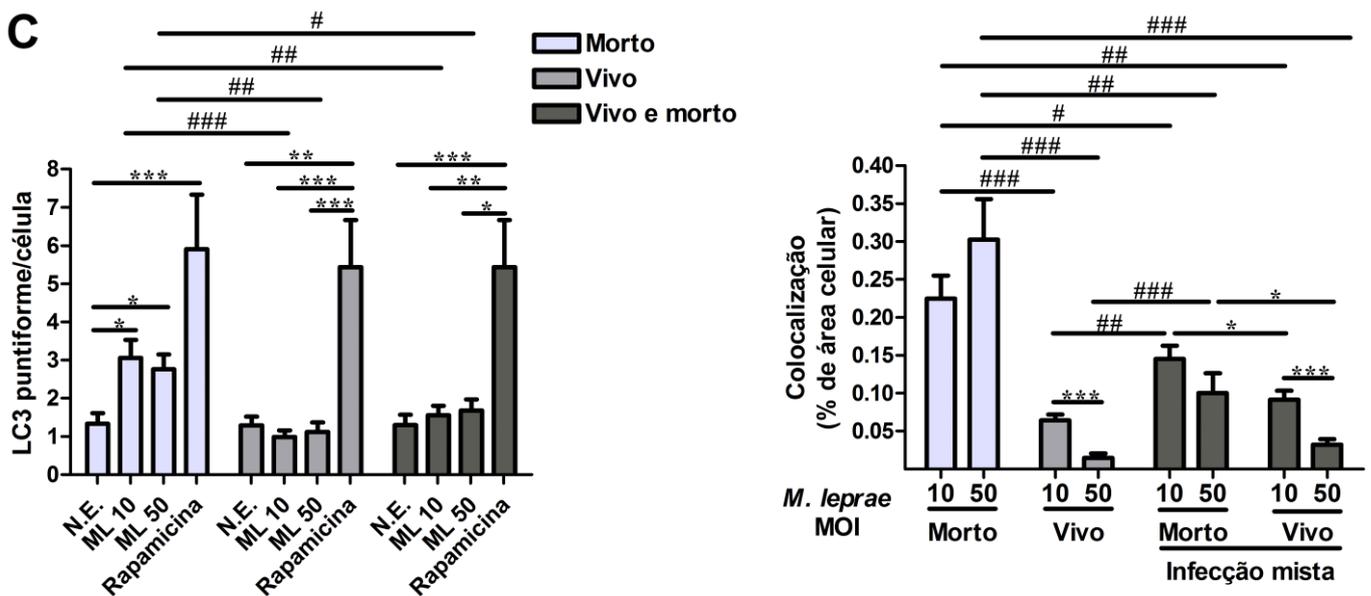


Figura 4.8: Formação de autofagossomos em monócitos humanos primários estimulados e/ou infectados com *M. leprae*. (A) Monócitos derivados de sangue de doadores saudáveis foram cultivados na presença ou ausência de *M. leprae* vivo (MLV) marcado com PKH (azul) ou morto (MLM, marcado em vermelho); ou vivo e morto (B), em multiplicidade de infecção (MOI) de 10 ou 50 micobactérias por célula durante 18 h. As células foram fixadas e a imunofluorescência para LC3 (verde) e DAPI (ciano) foi realizada através de seccionamento óptico utilizando iluminação estruturada. O tratamento com rapamicina (200 ng/mL) foi utilizado como controle positivo. N.E.: células não estimuladas. (C) Calculou-se o número de LC3 puntiforme por célula. Os perfis de colocalização entre *M. leprae* e LC3 foram quantificados e expressos em porcentagem de área celular. Os resultados representam a média ± SEM de três experimentos independentes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, pelo teste de Kruskal-Wallis; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, pelo teste de Mann-Whitney. Escala: 20 μ m.

4.3 O IFN γ restaura o fluxo autofágico inibido por *M. leprae* em macrófagos de lesões de pele de pacientes LL

Conforme demonstrado anteriormente, o acúmulo de LC3-II foi predominante em células de lesões de pele de pacientes BT. No entanto, este acúmulo pode ser devido a uma geração aumentada de autofagossomos ou a uma degradação reduzida da carga autofágica nos autolisossomos. Para distinguir estes passos uns dos outros, monitoramos o fluxo autofágico em células de lesão cutânea através da mensuração dos níveis intracelulares de receptores SLR. As proteínas dialisadas de fragmentos de pele de hanseníase foram avaliadas por ensaios comerciais de ELISA para SQSTM1/p62 e NBR1. A análise dos níveis intracelulares de SLR revelou um acúmulo significativo tanto de SQSTM1/p62 como de NBR1 em células de lesões de

pele de pacientes LL quando comparadas às amostras de pacientes BT, indicando uma alteração no fluxo autofágico em pacientes LL (Figura 4.9).

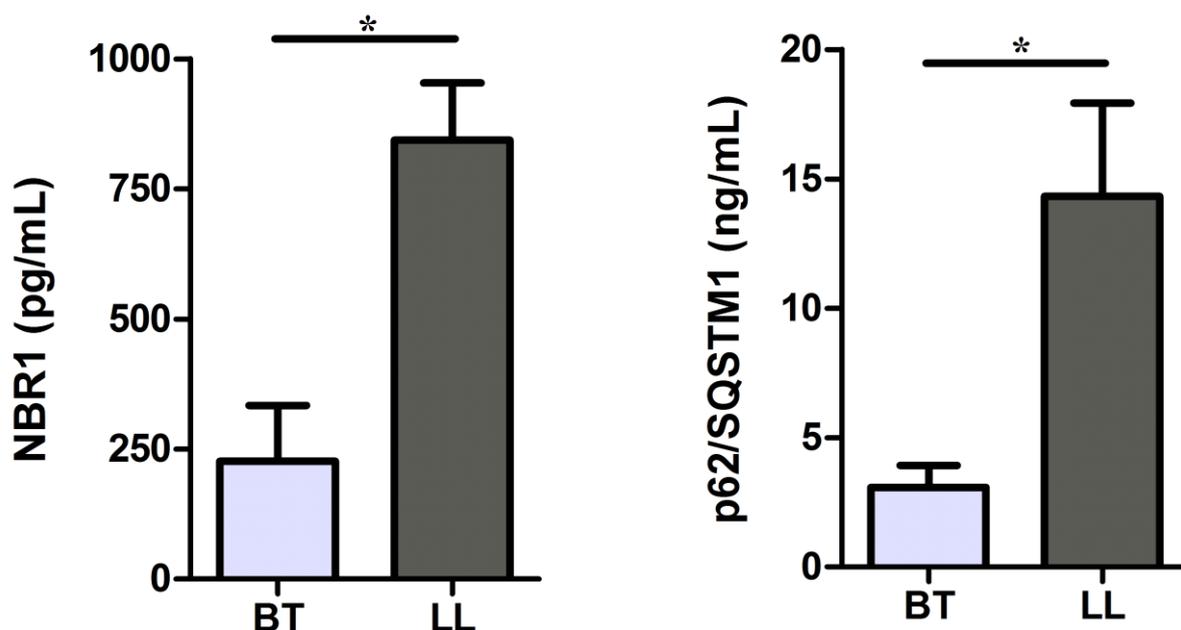


Figura 4.9: Níveis de NBR1 e SQSTM1/p62 em células de lesão de pele de pacientes com hanseníase. Fragmentos de lesões de pele foram obtidos de pacientes com as formas clínicas BT ou LL e após a extração de proteínas, os níveis intracelulares de NBR1 e SQSTM1/p62 foram avaliados usando kits comerciais de ELISA. As barras representam os valores médios \pm SEM dos níveis SQSTM1/p62 (BT, n = 5; LL, n = 4) e NBR1 (BT, n = 6; LL, n = 4). * $P < 0,05$ pelo teste de Mann-Whitney. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso.

O comprometimento da maturação autofagossomal acima mencionado foi ainda investigado em macrófagos de lesões de pele por microscopia de fluorescência. Para este fim, macrófagos derivados de pele de pacientes com hanseníase foram submetidos a indução autofágica e incubados com o corante acidotrópico LysoTracker para corar os lisossomos acidificados e marcados com anticorpos para *M. leprae* e autofagossomos. Como mostrado na Figura 4.10, nos macrófagos não tratados de pacientes BT foram observados numerosos pontos de LC3, alguns dos quais em justaposição com lisossomos corados por LysoTracker e com o antígeno LAM da parede celular de *M. leprae*. Em contraste, apenas alguns LC3 puntiformes foram detectados em macrófagos não estimulados de pacientes LL, e a colocalização entre LC3, LysoTracker e LAM foi menos observada (Figura 4.11). De forma interessante, em ambos macrófagos de pele de pacientes BT e LL, a

indução de autofagia com $\text{IFN}\gamma$ foi capaz de promover a colocalização de autofagossomos decorados por LC3-II com lisossomos LysoTracker positivos e LAM de *M. leprae* (Figuras 4.10 e 4.11). Foi demonstrado também que em macrófagos derivados das lesões de pele de pacientes LL, a indução fisiológica ou farmacológica de autofagia levou a uma estreita aposição do corante LysoTracker com autofagossomos LC3 positivos contendo *M. leprae* (Figura 4.11).

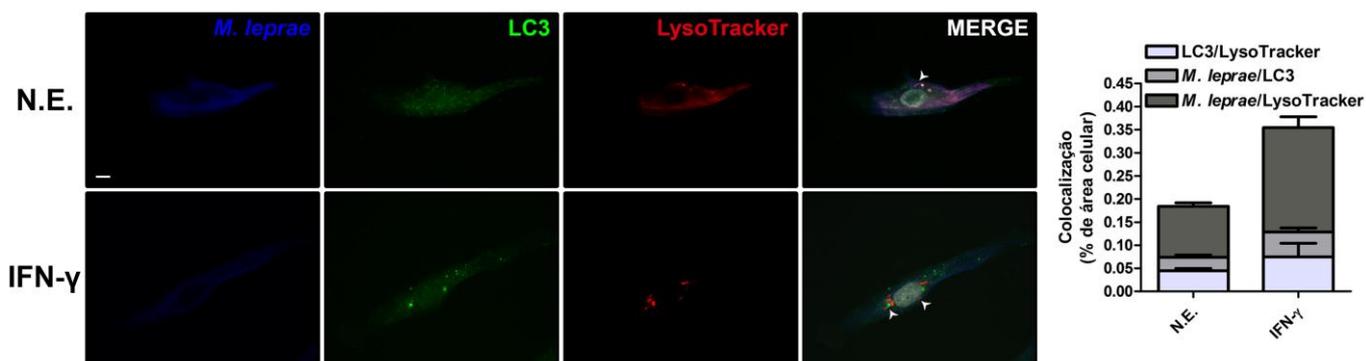


Figura 4.10: Avaliação do fluxo autofágico em macrófagos de pele de pacientes BT. Os macrófagos foram isolados de lesões cutâneas de pacientes BT e incubados em meio completo com $\text{IFN}\gamma$ (10 ng/mL). Dezoito horas após a incubação, as células foram incubadas com LysoTracker (500 nM, vermelho) durante 30 min e depois fixadas e marcadas para LC3 (verde), *M. leprae* LAM (azul) e DAPI (branco). Cabeças de seta indicam perfis de colocalização de três canais. A análise de colocalização das imagens de imunofluorescência foi realizada como indicado e expressa como porcentagem da área celular ocupada. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. BT: “borderline” tuberculose. N.E.: células não estimuladas. Escala: 20 μm .

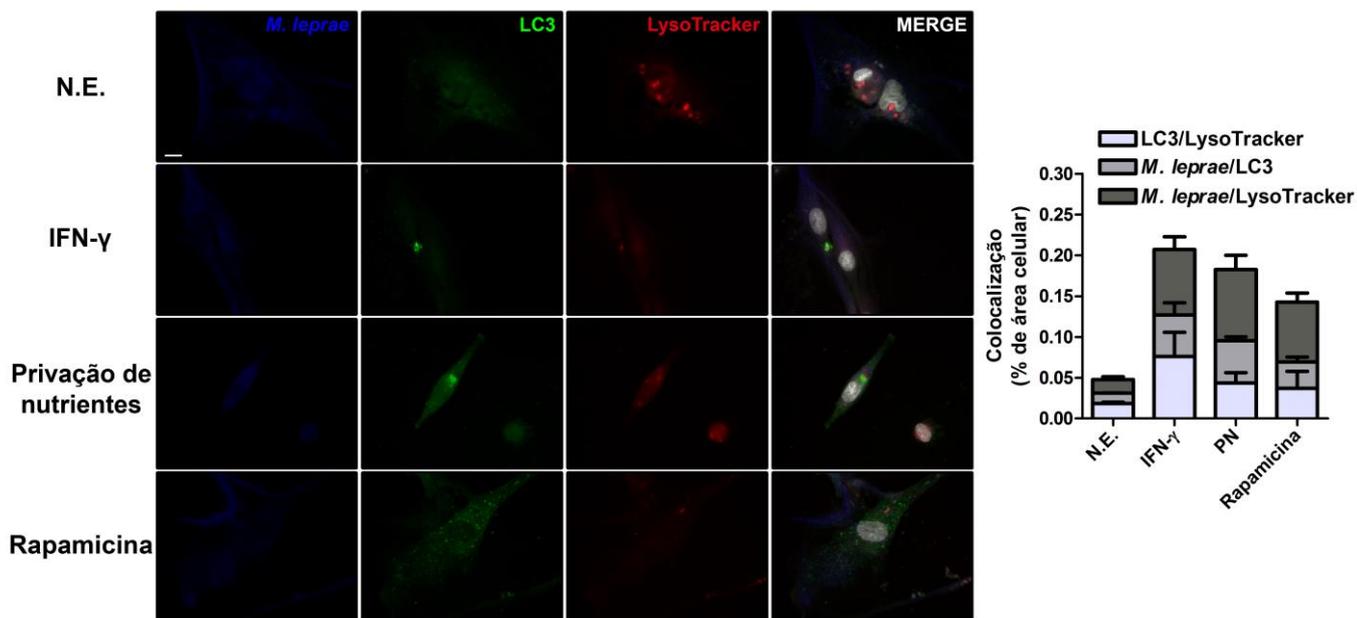


Figura 4.11: Avaliação do fluxo autofágico em macrófagos de lesão de pele de pacientes LL. Os macrófagos foram isolados de lesões cutâneas de pacientes LL e incubados em meio completo com IFN γ (10 ng/mL) ou rapamicina (200 ng/mL), ou em PBS (privação de nutrientes). Dezoito horas após a incubação, as células foram incubadas com LysoTracker (500 nM, vermelho) durante 30 min e depois fixadas e marcadas para LC3 (verde), *M. leprae* LAM (azul) e DAPI (branco). Cabeças de seta indicam perfis de colocalização de três canais. A análise de colocalização das imagens de imunofluorescência foi realizada como indicado e expressa como porcentagem da área celular ocupada. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. LL: lepromatoso lepromatoso. N.E.: células não estimuladas. PN: privação de nutrientes. Escala: 20 μ m.

Em seguida, nós analisamos a expressão de dois peptídeos antimicrobianos lisossomais da via de autofagia mediada por IFN γ /vitamina D, que se translocam para os autolisossomos durante o processo autofágico.

A análise por RT-qPCR demonstrou que as células de lesões de pele de pacientes BT, em comparação com as de pacientes LL, apresentaram um aumento na expressão do RNAm de *CAMP* e *DEFB4A* (Figura 4.12).

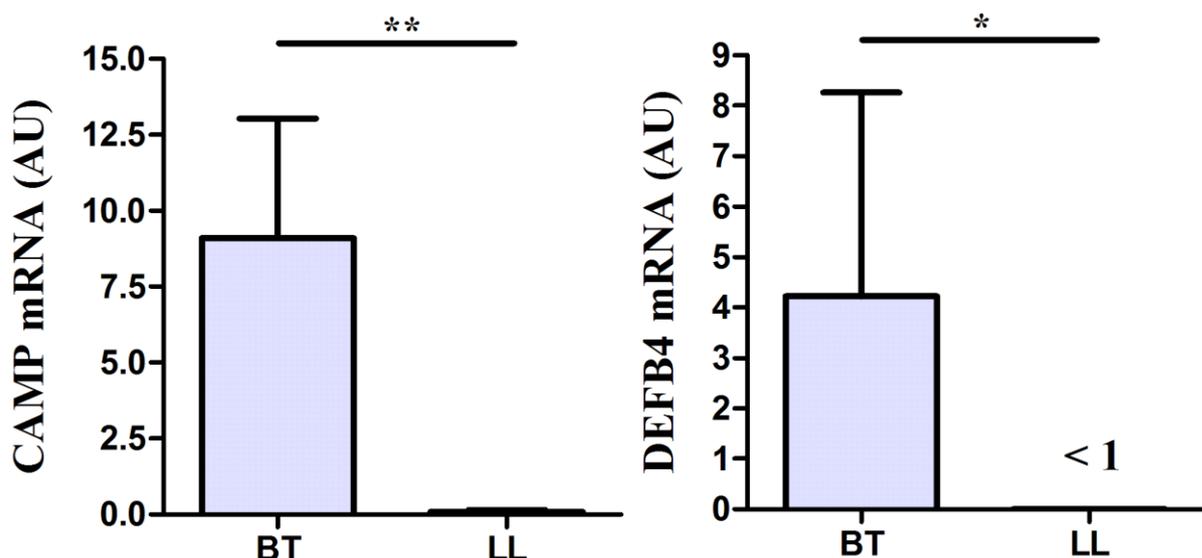


Figura 4.12: Expressão de *CAMP* e *DEFBA4* em lesões de pele de pacientes LL e BT. Os RNAsm purificados de lesões cutâneas de pacientes BT e LL foram analisados quanto à expressão de catelicidina (*CAMP*) e β -defensina 2 (*DEFBA4*) por RT-qPCR. Os dados de expressão gênica foram normalizados com GAPDH e os níveis de RNAm são expressos como unidades arbitrárias (AU). As barras representam os valores médios \pm SEM de seis amostras independentes de cada grupo de pacientes. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, pelo teste de Mann-Whitney. BT: “borderline” tuberculóide; LL: lepromatoso lepromatoso.

Anteriormente, a infecção com *M. leprae* vivo, mas não com o morto, interfere na geração de autofagossomos, assim como as micobactérias vivas inibem o fluxo autofágico. Assim, nós investigamos se a viabilidade micobacteriana é necessária para este bloqueio da maturação autofagossomal. Nós observamos uma diminuição da formação de autolisossomos em monócitos sanguíneos infectados com *M. leprae* vivo, bem como uma redução do direcionamento das micobactérias para os autofagossomos e lisossomos (Figura 4.13). Em contraste, *M. leprae* morto foi altamente direcionado para autofagossomos e lisossomos em monócitos primários, e o desenvolvimento de autolisossomos foi aumentado significativamente na presença de micobactérias mortas (Figura 4.13). Além disso, em células infectadas com ambos os tipos de bactérias, o fluxo autofágico foi reduzido em comparação com a infecção por bactérias mortas e o direcionamento micobacteriano para a via autofágica foi mais notável com as micobactérias mortas, quando comparadas com as vivas (Figura 4.13). Juntos, os presentes resultados demonstraram que os autofagossomos acumulados em grande número nos macrófagos de pele de pacientes BT, maturam em autolisossomos. Nos macrófagos de pele de pacientes

LL, no entanto, enquanto o fluxo autofágico é inibido por *M. leprae*, ele pode ser restaurado por tratamento com IFN γ , ou com outros indutores de autofagia.

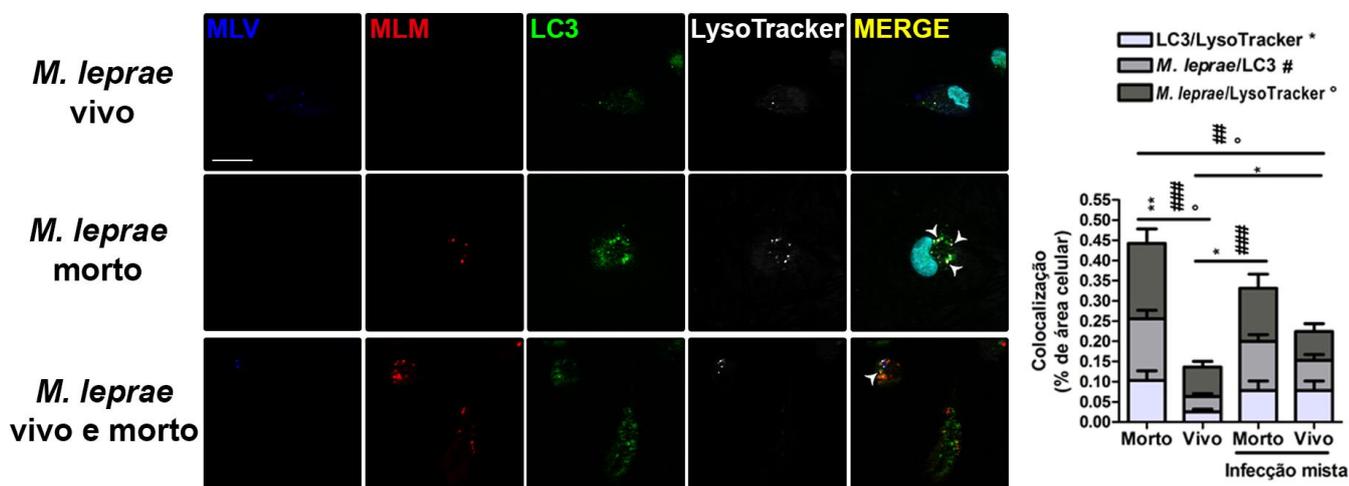


Figura 4.13: Avaliação do fluxo autofágico em monócitos estimulados e/ou infectados com *M. leprae*. Monócitos derivados do sangue de doadores saudáveis foram cultivados na presença ou ausência de *M. leprae* vivo (MLV) marcado com PKH (azul), morto (MLM, marcado em vermelho), ou vivo e morto, em multiplicidade de infecção de 50 micobactérias por célula. Dezoito horas após a incubação, as células foram incubadas com LysoTracker (500 nM, branco) durante 30 min e depois fixadas, marcadas para LC3 (verde) e DAPI (ciano), e imageadas através de seccionamento óptico utilizando iluminação estruturada. Cabeças de seta indicam perfis de colocalização de três canais. A análise de colocalização das imagens de imunofluorescência foi realizada como indicado e expressa como porcentagem da área celular ocupada. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes. *, #, °, indicam perfis de colocalização entre LC3 e LysoTracker, *M. leprae* e LC3, e *M. leprae* e LysoTracker, respectivamente. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$; ° $P < 0,05$, pelo teste de Mann-Whitney. Escala: 20 μ m.

4.4 Perfis de expressão gênica das lesões revelaram uma regulação diferenciada dos genes associados à autofagia entre pacientes BT e LL

Os resultados descritos acima indicaram que a resposta autofágica foi maior nas células de lesões cutâneas, incluindo os macrófagos, dentro do grupo da forma auto-limitada de BT versus a forma disseminada LL. Para identificar os componentes da maquinaria autofágica envolvida na resposta celular à infecção por *M. leprae*, nós examinamos a regulação transcricional dos genes ATG, o que pode fornecer dados correlativos relacionados à indução da autofagia. Para esta finalidade, RNAs isolados de lesões de pele com hanseníase foram analisados por RT-qPCR para

obter os perfis de expressão gênica utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia.

Como mostrado na Figura 4.14 e no Apêndice A, os perfis de expressão de células de lesões cutâneas revelaram uma forte regulação positiva de vários genes relacionados com o processo de autofagia em pacientes BT (76% dos genes) versus pacientes LL (14%) pela análise de “fold-change”. Estes genes estão envolvidos na formação de autofagossomos (33% dos genes em pacientes BT versus 5% dos genes em pacientes LL), regulação da autofagia (40% dos genes em pacientes BT versus 9% dos genes em pacientes LL), função ou vias lisossomais (2% dos genes em pacientes BT versus 0% dos genes em pacientes LL) e regulação lisossomal (2% dos genes em pacientes BT versus 1% dos genes em pacientes LL) (Figura 4.14A e Apêndice A) por meio de uma classificação funcional da via autolisossomal previamente descrita por Jegga e colaboradores (2011).

Em adição, além do aumento pelo “fold-change”, as lesões de pacientes BT apresentaram uma expressão significativamente aumentada de cinco genes em comparação com as lesões de pacientes LL (Figura 4.14A e Apêndice A). Verificou-se que as lesões de pacientes BT têm uma expressão significativa de: *BECN1* e *ATG14* (também conhecido como *BARKOR*), dois membros do complexo PIK3C3, o qual está envolvido na nucleação e montagem da membrana de isolamento, assim como na maturação autofagossomal (Patingre et al. 2005, Liang et al. 2008, Sun et al. 2008, Diao et al. 2015); *GPSM3*, que está envolvido na ativação da via autofágica mediada pela proteína G (Blumer & Lanier 2014); *APOL1*, um componente da família gênica que possui um único domínio BH3 e que está associado à indução autofágica (Wan et al. 2008); e *TPR*, um regulador nuclear da ativação da autofagia (Funasaka et al. 2012) (Figura 4.14A e B e Apêndice A). Além disso, também encontramos uma expressão aumentada de vários outros genes que fazem parte da maquinaria autofágica central em amostras de pacientes BT, tais como: os membros do complexo ATG1 / ULK (*ULK1 / 3* e *4*), o primeiro complexo que regula a montagem dos autofagossomos; sistema de ciclagem de ATG9 (*ATG2A / B*, *ATG9A* e *WIPI1*), que tem um papel no fornecimento de membranas para a expansão dos fagóforos; complexo PIK3 (*PIK3C3* e *PIK3R4*), que participa do estágio de nucleação da vesícula e promove o recrutamento de proteínas de ligação à PI3P para o sítio de biogênese do fagóforo; sistemas de conjugação ATG8 (*ATG3*, *ATG4A / B / C / D*, *ATG7*, *GABARAP*, *GABARAPL2*, *MAP1LC3A / B* e *C*) e ATG12 (*ATG5*, *ATG7*, *ATG10*, *ATG12*, *ATG16L1* e *L2*), que estão envolvidos na expansão da vesícula; e

os componentes lisossomais (*LAMP1 / 2 e 3*), que são necessários para a etapa de fusão autofagossomo-lisossomo (Figura 4.14B e Apêndice A) (He & Klionsky 2009, Feng et al. 2014).

Por outro lado, nas lesões de pacientes LL, a análise de “fold-change” revelou uma expressão mais elevada de um conjunto de genes envolvidos principalmente na supressão de autofagia tais como *FRS2*, que codifica para uma proteína adaptadora ancorada à membrana, a qual suprime a autofagia através da ativação de mTOR mediada por PI3K / Akt1 (Lin et al. 2011), *EIF4EBP2* e *GBL* (também conhecido como *MSLT8*), dois constituintes do complexo mTOR que em conjunto contribuem para a inibição da autofagia (Weichhart et al. 2015), e o gene anti-apoptótico *BCL2*, que inibe a autofagia dependente de BECN1 (Patingre et al. 2005). Além de outros genes como *ULK2*, um membro do complexo Atg1 / ULK (Feng et al. 2014), *SH3GLB2*, um componente do complexo de curvatura da membrana de isolamento (Behrends et al. 2010), *GABARAPL1*, um membro do sistema de conjugação ATG8 (Feng et al. 2014), *DRAM* (também conhecido como *DRAM1*), que codifica para uma proteína lisossomal de membrana, que é necessária para a autofagia induzida por p53 (Crichton et al. 2006), *WIPI2* e *WDR45L* (também conhecido como *WDR45B* ou *WIPI3*), dois componentes do sistema de ciclagem de ATG9 (Deretic et al. 2013, Feng et al. 2014), e *SEC16B* e *SEC23A*, dois componentes do sistema de transporte de vesículas mediado por COPII, que são necessários para o tráfego de membranas durante a formação dos autofagossomos em leveduras e em células de mamíferos (Figura 4.14B e Apêndice A) (He & Klionsky 2009, Graef et al. 2013).

Além disso, os genes diferencialmente modulados nas lesões de pele de hanseníase foram submetidos à análise de interações gene-gene usando a base de dados STRING. Os mapas da rede de genes aumentados em lesões de hanseníase revelaram um maior número de interações entre genes associados à autofagia em pacientes BT do que entre pacientes de LL (Figura 4.14C).

As análises de enriquecimento de vias canônicas por ontologia gênica e ortologia, mostraram que as lesões de pacientes BT foram predominantemente enriquecidas para termos de GO associados à autofagia e para anotações de vias autofágicas na base de genes KEGG, como exemplo macroautofagia, montagem de autofagossomos, regulação de autofagia, etc, quando comparadas com as lesões de pacientes LL (não mostrado).

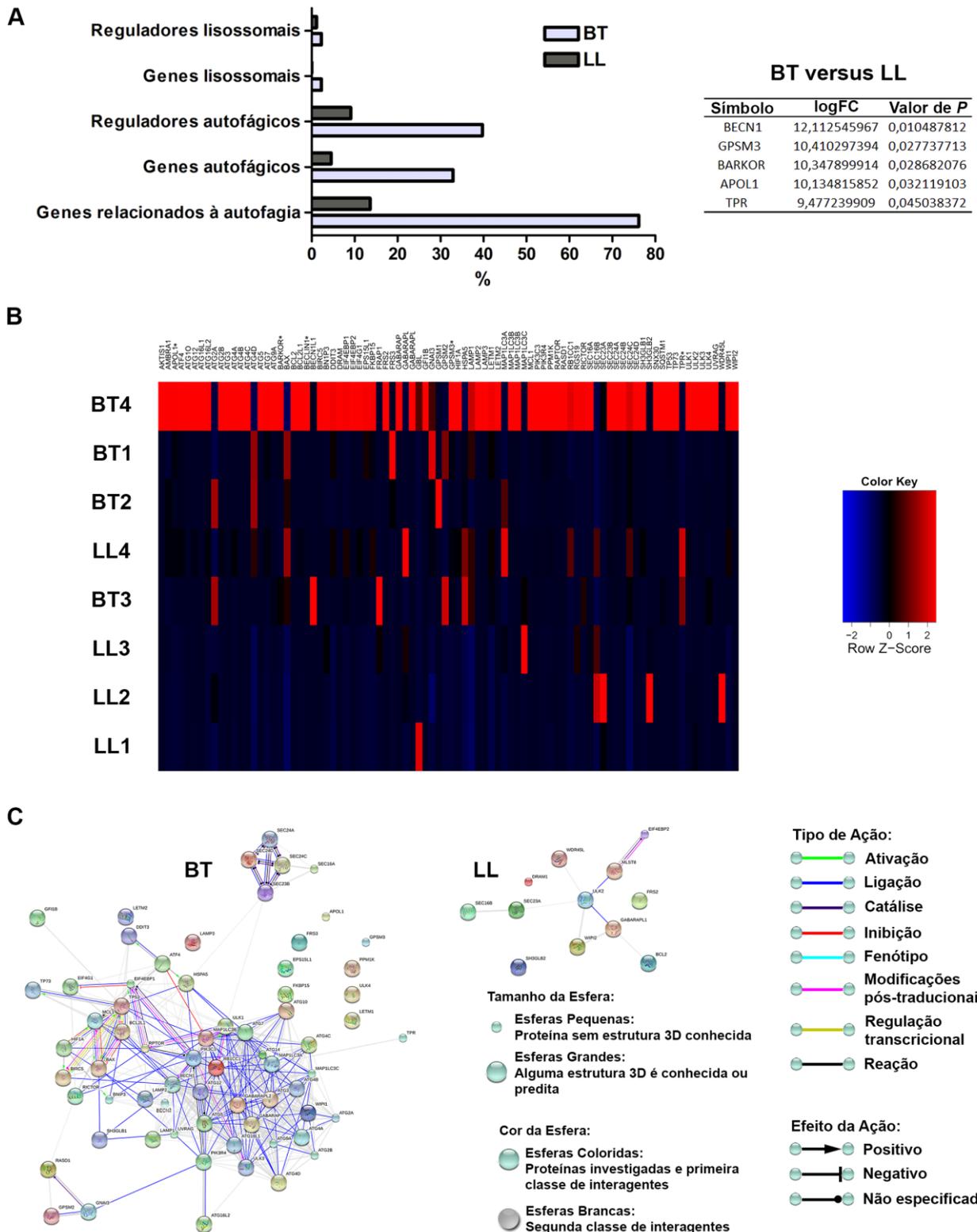


Figura 4.14: Perfis de expressão gênica autofágica das lesões de hanseníase. (A e B) Os RNAsm purificados de lesões cutâneas de pacientes BT e LL foram analisados por RT-qPCR utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia. (A) Os genes relacionados à autofagia diferencialmente expressos entre os grupos de hanseníase foram subcategorizados. Os valores de “fold” e de *P* dos genes com expressão aumentada nas lesões de pacientes BT foram tabulados (dados completos no Apêndice A). O limiar de significância estatística foi estabelecido em $P < 0,05$. (B) “Heat map” mostrando a análise de expressão de genes relacionados à

autofagia em pacientes com hanseníase. Cada linha representa um doador. A distância entre os indivíduos indica o grau de separação entre os pacientes. Os asteriscos indicam genes com expressão diferencial. Os dados são representativos de quatro amostras de pacientes BT e sete amostras de pacientes LL. (C) Rede de interação gênica de autofagia em lesões de pele de pacientes BT e LL. Genes com expressão diferencial nas lesões de hanseníase pela análise de PCR “array” foram visualizados por STRING. A exibição da rede foi feita no modo de ação. Nesta visão, linhas coloridas e estilos de seta entre os genes indicam os vários tipos de interações. Nódulos representam genes. As ligações representam associações gene-gene. Os mapas de interação são representativos de quatro amostras de pacientes BT e sete amostras de pacientes LL. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso.

Como mostrado acima, a análise por PCR “array” revelou que os genes pró-autofágicos estavam expressos de forma proeminente nas lesões de pacientes BT. Em contraste, a expressão de genes anti-autofágicos predominou nas células de lesões de pacientes LL. Curiosamente, o gene mais aumentado nas células de lesões de pacientes BT foi *BECN1*, um iniciador primordial da autofagia em mamíferos. Enquanto nas células de lesões de pacientes LL, foi determinada uma expressão mais elevada de *BCL2*, que inibe a autofagia por ligação e sequestro de *BECN1* do complexo PIK3 de classe III. Nós hipotetizamos que a relação *BECN1* / *BCL2* pode estar alterada durante a infecção por *M. leprae*. Para investigar este processo, os níveis das proteínas BECN1 e BCL2 foram avaliados nas lesões cutâneas de hanseníase por western blot. Inesperadamente, ao contrário dos níveis de RNAm, a expressão de BECN1 foi altamente variável nas lesões de hanseníase, sem diferenças significativas entre os pacientes com as formas clínicas BT e LL (Figura 4.15). Em contraste, os níveis de BCL2 foram significativamente aumentados nas lesões de pacientes LL versus pacientes BT (Figura 4.15).

A interação BECN1 / BCL2 foi ainda investigada em macrófagos de lesões de pele por microscopia de imunofluorescência. A localização da proteína BCL2 tem sido relatada em vários compartimentos celulares, incluindo o envelope nuclear, ER e membranas mitocondriais, mas apenas a BCL2 do ER é capaz de inibir autofagia. Em macrófagos derivados da pele de pacientes BT, observamos a expressão de BCL2 principalmente nos núcleos, sem associação com a marcação citoplasmática de BECN1 (Figura 4.16). No entanto, além da marcação nuclear de BCL2 nos macrófagos de pacientes LL, foram observados pontos citosólicos de BCL2 em colocalização com expressão de BECN1, o que pode representar a BCL2 do ER (Figura 4.16). Coletivamente, esses resultados fornecem evidências de que o

aumento de BCL2 prejudica a autofagia dependente de BECN1 nos macrófagos de lesões de pele de pacientes LL, contribuindo para o aumento da carga bacilar.

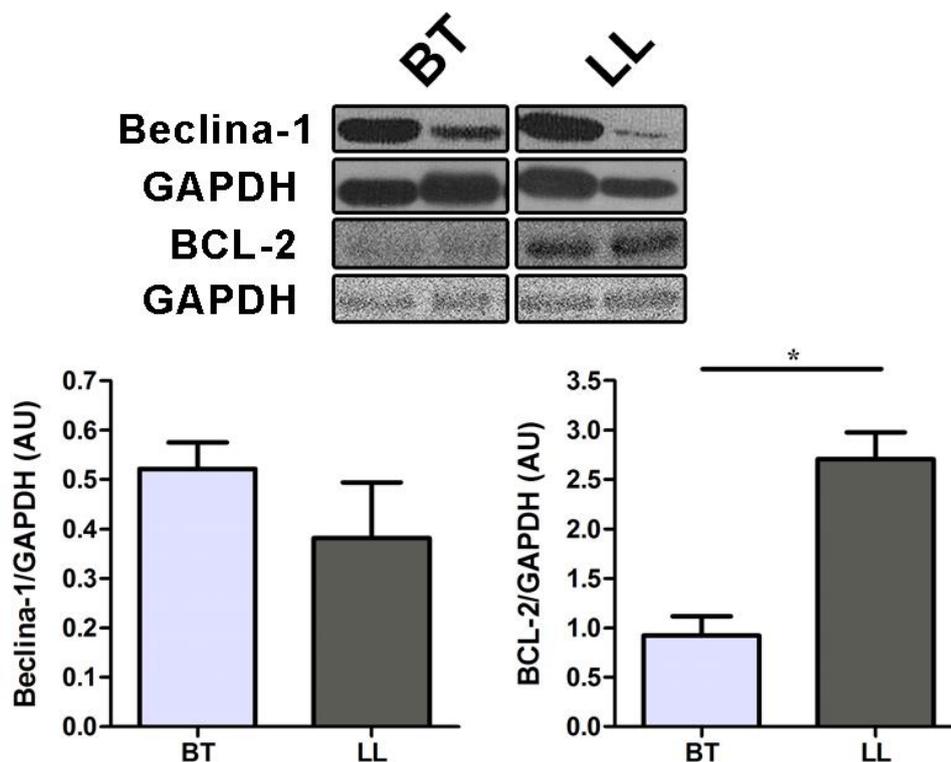


Figura 4.15: Expressão de BECN1 e BCL2 em células de lesões cutâneas de pacientes BT e LL. Proteínas foram obtidas de lesões de pele de pacientes com as formas clínicas BT ou LL e analisadas por western blot com anticorpos anti-BECN1 e anti-BCL2. Um anticorpo anti-GAPDH foi utilizado como controle de carregamento proteico. A análise densitométrica foi realizada e as razões BECN1 / GAPDH (BT, n = 6; LL, n = 5) e BCL2 / GAPDH (BT, n = 4; LL, = 4) foram expressas como unidades arbitrárias (AU). As barras representam os valores médios \pm SEM. * $P < 0, 05$, pelo teste de Mann-Whitney. BT: “borderline” tuberculoid; LL: lepromatoso lepromatoso.

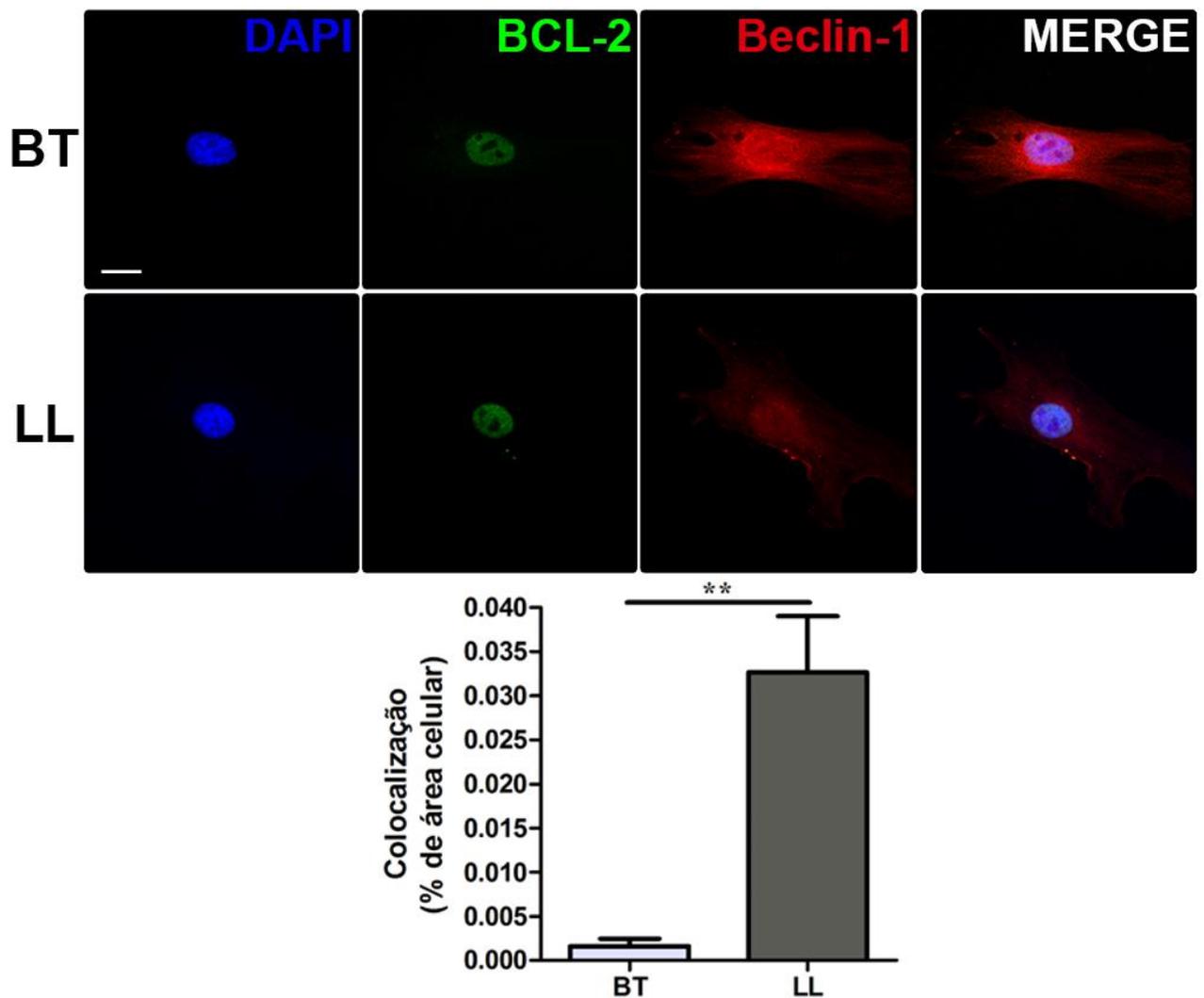


Figura 4.16: Expressão de BCL2 e BECN1 em macrófagos de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Os macrófagos foram isolados de lesões cutâneas de pacientes BT e LL e cultivados durante 7 dias em meio completo. As células foram fixadas e marcadas para BECN1 (vermelho), BCL2 (verde) e DAPI (azul). Os perfis de colocalização entre os pontos de BCL2 citosólicos e BECN1 foram quantificados e expressos como porcentagem da área celular ocupada. A expressão de BCL2 associada ao compartimento nuclear foi excluída das análises. Os resultados representam a média \pm SEM de três experimentos de imunofluorescência. ** $P < 0,01$, pelo teste de Mann-Whitney. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso. Escala: 10 μ m.

4.5 A reação reversa altera o perfil autofágico dos pacientes LL

Os pacientes lepromatosos com lesões RR exibem modificações no seu estado imunológico, deslocando-se do perfil Th2 anterior para um perfil Th1 em conjunção com uma forte resposta mediada por células contra *M. leprae*, formação de granuloma, produção de $IFN\gamma$ e redução da carga bacilar, fazendo que se

assemelhem a lesões de BT ou RR em paucibacilares (Pinheiro et al. 2011, Andrade et al. 2015).

Foi então considerado se a ativação da autofagia poderia desempenhar um papel nesta eliminação de micobactérias conduzida por citocinas durante a RR multibacilar. Para analisar a autofagia neste processo, avaliou-se a regulação transcricional dos genes ATG por RT-qPCR “array” em pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem episódios de RR. Conforme ilustrado na Figura 4.17 e no apêndice B, os perfis de expressão gênica de células de lesões cutâneas de pacientes LL e RR revelaram uma modulação equilibrada dos genes relacionados ao processo autofágico, mostrando uma expressão aumentada de 40% e 32% dos genes, respectivamente, pela análise de “fold-change”. Estes genes aumentados estão envolvidos na formação de autofagossomos (18% dos genes em pacientes LL versus 7% dos genes em pacientes RR), regulação da autofagia (20% dos genes em pacientes LL versus 25% dos genes em pacientes RR), função ou vias lisossomais (1% dos genes em pacientes LL versus 0% dos genes em pacientes RR), e regulação lisossomal (1% dos genes em pacientes LL versus 0% dos genes em pacientes RR) (Figura 4.17A e Apêndice B) (Jegga et al. 2011).

Adicionalmente à análise por “fold-change”, as células de lesões de pacientes RR mostraram uma expressão significativa de três reguladores da autofagia, em comparação com as de pacientes LL: *TPR*, que regula a ativação da autofagia (Funasaka et al. 2012); *GFI1B*, que codifica para um regulador transcricional que interage com BECN1 e suprime a transcrição de BCL2L1 (Bcl-xL), provavelmente induzindo autofagia (Lim et al. 2006, Kuo & Chang 2007); e *GNAI3*, uma GTPase que fica ancorada na membrana dos autofagossomos, modulando positiva- ou negativamente a autofagia, e é um requisito para a autofagia induzida por TNF (Figura 4.17A e B e Apêndice B) (Wu et al. 2014). Curiosamente, os cinco genes significativamente “up”-regulados nas lesões de pacientes BT (*BECN1*, *GPSM3*, *ATG14*, *APOL1* e *TPR*) também estão aumentados nas lesões de pacientes RR (Figura 4.18), de acordo com a análise de “fold-change”. Da mesma forma, os três genes significativamente aumentados em pacientes RR (*TPR*, *GFI1B* e *GNAI3*) também foram “up”-regulados em pacientes BT (Figura 4.18). A árvore hierárquica resultante da análise dos genes “up”-regulados nas lesões de pacientes BT, LL e RR, revelou uma maior proximidade entre os perfis de expressão gênica autofágica dos pacientes BT e RR (Figura 4.18). Conforme mostrado na Figura 4.17B e no

Apêndice B, *BCL2L1* (também conhecido como *Bcl-xL*) foi o gene mais aumentado nas lesões de pacientes LL. Como ocorre com seu parceiro de família, *BCL2*, também “up”-regulado nas lesões de pacientes LL, *BCL2L1* inibe a autofagia mediada por BECN1 bloqueando a ruptura de sua ligação à BECN1 (Pattingre et al. 2005, Maiuri et al. 2007). Além disso, a análise por “fold-change” revelou uma expressão elevada de outros genes, tais como: *ULK2*, um membro do complexo Atg1 / ULK (Feng et al. 2014); *EIF4G1*, um dos componentes do complexo de tradução EIF4 que bloqueia a autofagia (Ramírez-Valle et al. 2008); e *WIPI2*, um componente do sistema de ciclagem de ATG9 (Figura 4.17B e Apêndice B) (Feng et al. 2014).

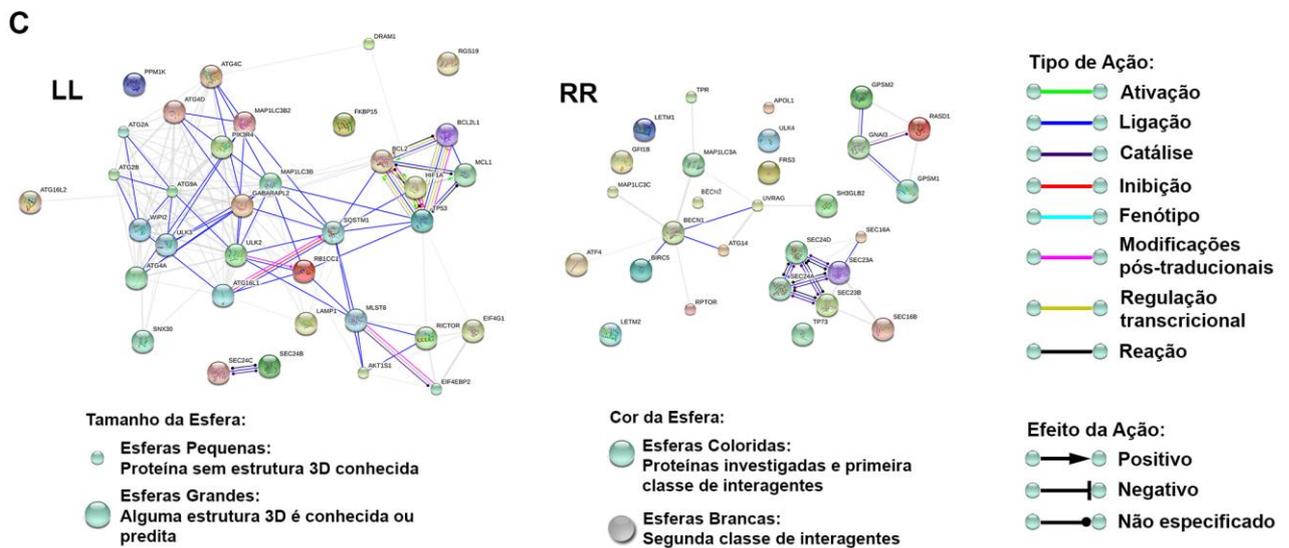
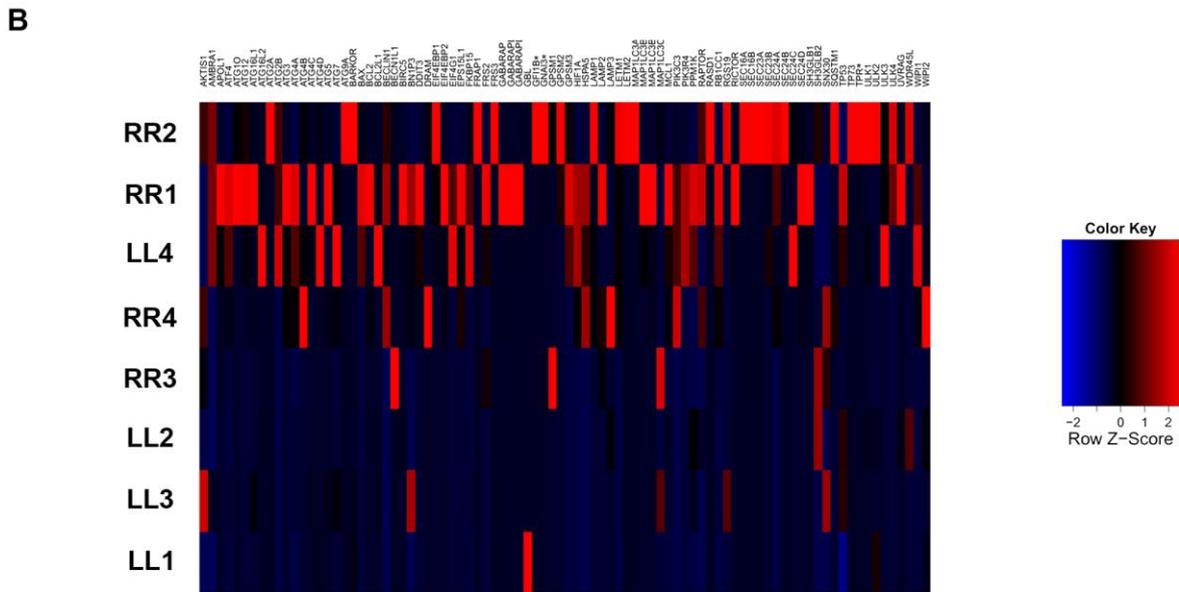
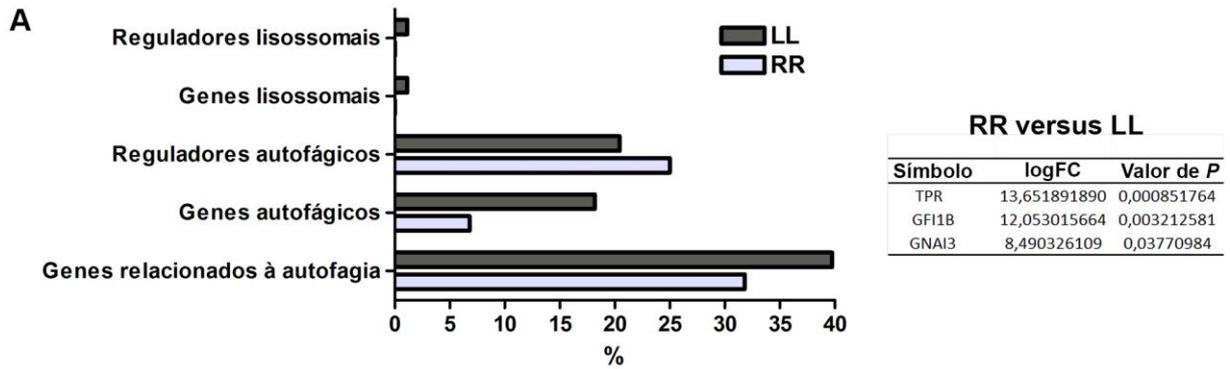


Figura 4.17: Perfis de expressão de genes da via de autofagia em células de lesões de pele de pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem RR. (A e B) Os RNAsm purificados de lesões cutâneas de pacientes LL e RR foram analisados por RT-qPCR utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia. (A) Os genes relacionados à autofagia diferencialmente expressos entre os grupos de Hanseníase foram subcategorizados. Os valores de “fold” e *P* dos genes com expressão aumentada nas lesões de pacientes RR foram tabulados (dados completos no Apêndice B). O limiar de significância estatística foi estabelecido em *P*

< 0,05. (B) "Heat map" mostrando a análise de expressão de genes relacionados à autofagia em pacientes com hanseníase. Cada linha representa um doador. A distância entre os indivíduos indica o grau de separação entre os pacientes. Os asteriscos indicam genes com expressão diferencial. Os dados são representativos de sete amostras de cada grupo de pacientes. (C) Rede de interação gênica de autofagia em lesões de pele de pacientes LL e RR. Genes com expressão diferencial nas lesões de hanseníase pela análise de PCR "array" foram visualizados por STRING. A exibição da rede foi feita no modo de ação. Nesta visão, linhas coloridas e estilos de seta entre os genes indicam os vários tipos de interações. Nódulos representam genes. As ligações representam associações gene-gene. Os mapas de interação são representativos de sete amostras de cada grupo de pacientes. LL: lepromatoso lepromatoso; RR: reação reversa.

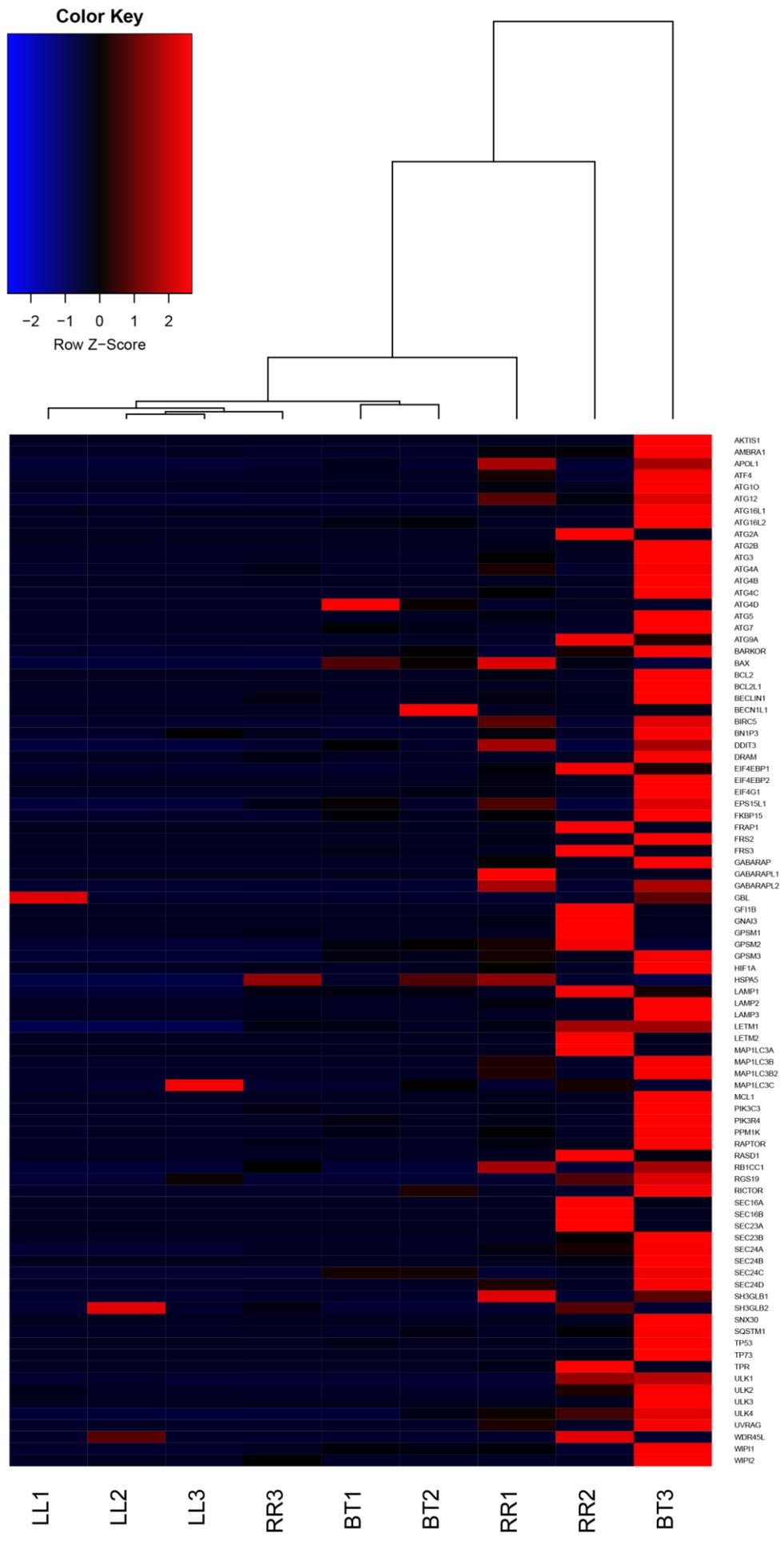


Figura 4.18: Perfis de expressão de genes da via de autofagia em células de lesões de pele de pacientes BT, LL e RR. (A e B) Os RNAsm purificados de lesões cutâneas de pacientes BT, LL e RR foram analisados por RT-qPCR utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia. “Heat map” mostrando a análise de expressão de genes relacionados à autofagia em pacientes com hanseníase. O “Heat map” mostra dendrogramas (árvore hierárquica) para os pacientes utilizados em um eixo, e os genes avaliados no segundo eixo. O comprimento vertical dos ramos do dendrograma representa o grau de separação entre os indivíduos. Cada coluna representa um doador. Os dados são representativos de quatro (BT) e sete (LL e RR) amostras de pacientes. BT: “borderline” tuberculoide; LL: lepromatoso lepromatoso; RR: reação reversa.

Como mencionado acima, os genes autofágicos foram modulados de forma semelhante em pacientes LL e RR, revelando uma regulação positiva de moléculas chave da autofagia em ambos os grupos de hanseníase. As lesões de pacientes LL apresentaram uma expressão elevada de *MAP1LC3B / B2*, *ATG4A / C / D*, *ATG16L1 / L2*, *ATG9A*, *GABARAPL2*, *ULK3*, *LAMP1*, *SQSTM1*, *ATG2A* e *B*, que em sua maioria, são genes da maquinaria central autofágica (Feng et al. 2014). Por outro lado, *BECN1L1* (*BECN2*), um homólogo específico de *BECN1* que é encontrado em mamíferos, e que interage com *BCL2* e os componentes do complexo *PIK3C3*, promovendo a ativação da autofagia (He et al. 2013), *UVRAG*, um membro do subcomplexo *PIK3C3* que se associa com *BECN1*, e é necessário para formação e maturação dos autofagossomos (Liang et al. 2008), e *MAP1LC3A / C* e *ULK4*, que são componentes da maquinaria central autofágica (Feng et al. 2014), aumentaram em lesões de pacientes RR (Figura 4.17B e Apêndice B). Embora essas interações também tenham sido observadas em pacientes acometidos pela RR, quando analisadas para conexões gene-gene através de *STRING*, as lesões de pacientes LL mostraram mais interações entre os genes de autofagia. No entanto, associações entre genes anti-apoptóticos foram observadas exclusivamente em amostras de pacientes LL (Figura 4.17C). De fato, a pesquisa por anotações de GO ou ortologia para a via de autofagia, no conjunto de genes aumentados nas lesões cutâneas de hanseníase, revelou um predomínio de enriquecimento de termos de GO associados à autofagia e anotações de vias autofágicas (KEGG) nas amostras de pacientes LL, em comparação com as amostras dos pacientes RR (não mostrado).

Como mostrado acima, não ficou claro se a análise de dados por PCR forneceu resultados correlativos sobre a ativação da autofagia majoritariamente em

pacientes acometidos pela RR ao invés de pacientes diagnosticados com a forma LL, em oposição ao que foi observado entre as lesões de pacientes BT versus pacientes LL (Figura 4.14, Figura 4.17 e Apêndices A e B). Assim, para confirmar que a resposta autofágica aumenta durante a ocorrência de episódios de RR em pacientes com hanseníase multibacilar, nós determinamos a expressão da proteína autofágica LC3 nas lesões de pacientes RR e LL. A análise por imunohistoquímica revelou que a detecção da LC3 endógena foi proeminente em pacientes LL que desenvolveram RR, quando comparados com pacientes não-reacionais (Figura 4.19).

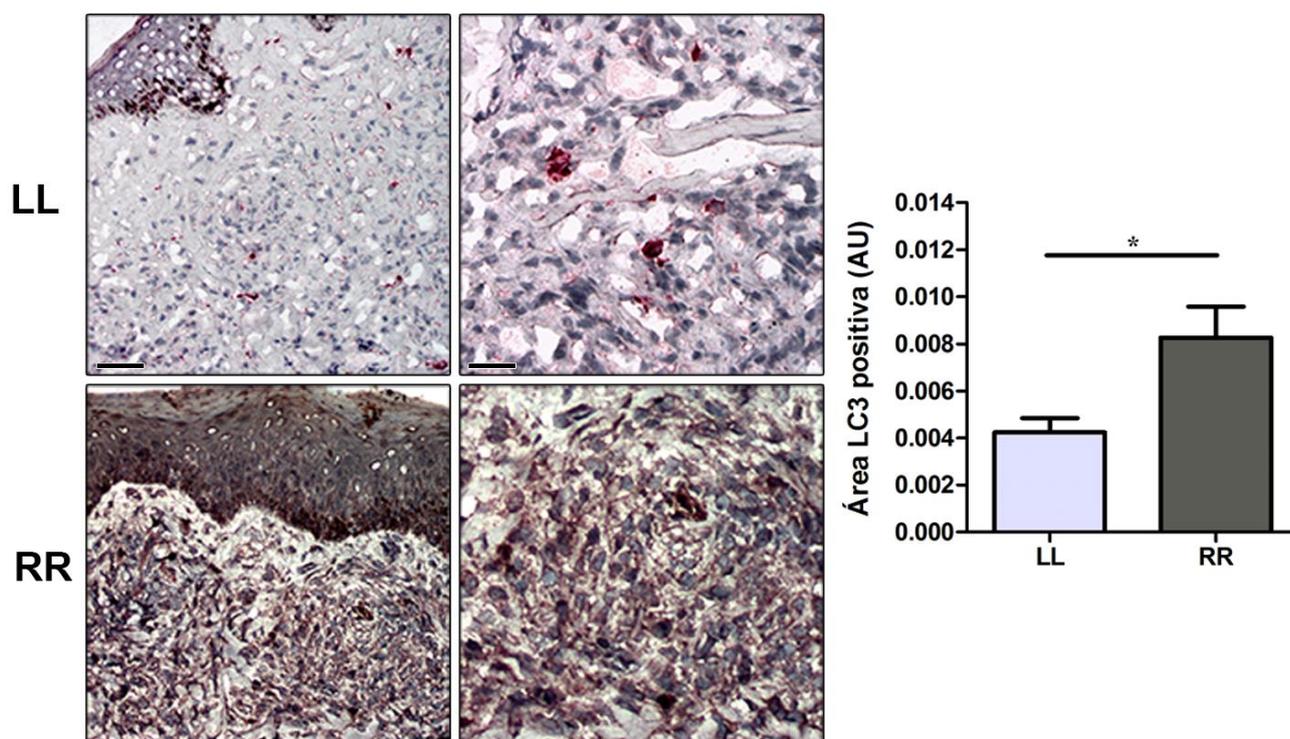


Figura 4.19: Expressão de LC3 em células de lesões de pele de pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem RR. Fragmentos de lesões de pele foram obtidos de pacientes com as formas clínicas LL e RR e a expressão de LC3 foi avaliada pela técnica de imunohistoquímica contrastada com hematoxilina, utilizando um anticorpo anti-LC3. A quantificação das células LC3⁺ foi feita através da razão entre as áreas de tecido marcadas e total, em ao menos 10 campos randômicos por cada amostra, utilizando o programa Image-Pro Plus e os resultados são apresentados como média ± SEM. **P* < 0,05 pelo teste de Mann-Whitney. As imagens são representativas de três (RR) e quatro (LL) amostras de pacientes. RR: reação reversa; LL: lepromatoso lepromatoso. AU: unidades arbitrárias. Escalas: 50 μm (esquerda) e 25 (direita) μm.

Além disso, a marcação por imunofluorescência mostrou maior formação de LC3 puntiforme em macrófagos de lesões de pele de pacientes RR, quando comparados aos macrófagos de pacientes LL (Figura 4.20). Após a estimulação com IFN γ , nós observamos um forte acúmulo de grandes pontos de LC3 em macrófagos de pacientes RR. Nos macrófagos derivados das lesões de pacientes LL, a formação de vesículas LC3-positivas aumentou após o tratamento com IFN γ , porém em menor extensão quando comparados aos macrófagos de pacientes RR (Figura 4.20). Em conjunto, nossos resultados indicam que de forma semelhante às lesões paucibacilares, a autofagia é “up”-regulada durante a ocorrência da RR.

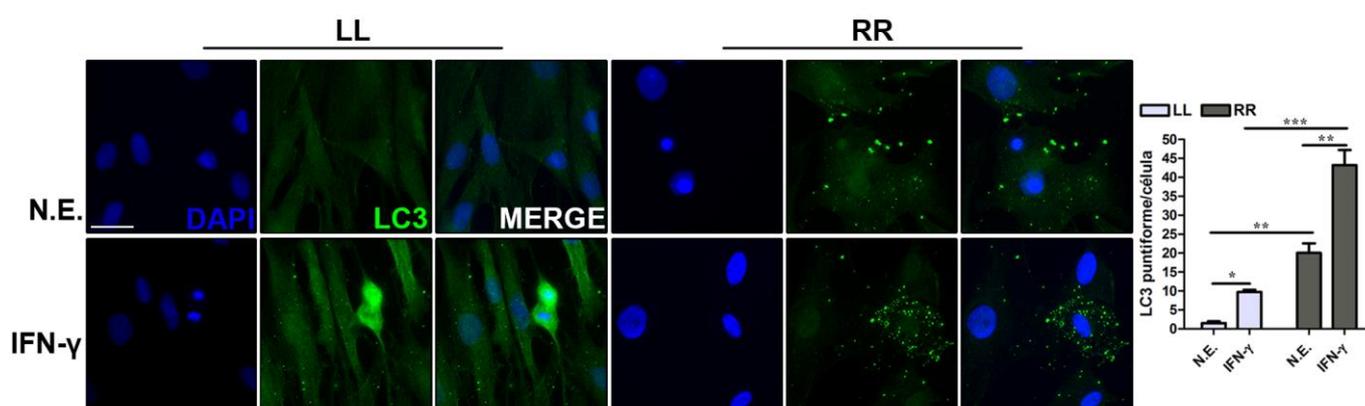


Figura 4.20: Expressão de LC3-II em macrófagos de lesões de pele de pacientes multibacilares lepromatosos com ou sem reação. Os macrófagos de lesões de pele foram isolados de pacientes LL e RR e estimulados ou não (N.E.) com 10 ng de IFN γ por 18 horas. A expressão de LC3 foi avaliada por microscopia de imunofluorescência utilizando anticorpo para LC3 (verde), sendo o núcleo corado com DAPI (azul). As imagens de imunofluorescência foram quantificadas e as barras representam os valores médios do número LC3 puntiforme por célula \pm SEM (LL, n = 3; RR, n = 3). * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, pelo teste de Mann-Whitney. RR: reação reversa; LL: lepromatoso lepromatoso. Escala: 50 μ m.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo detalha o envolvimento da autofagia na imunopatogênese da hanseníase. Nós demonstramos que na forma multibacilar da doença o comprometimento da via autofágica pode contribuir significativamente para a sobrevivência dos bacilos dentro das células hospedeiras, e esse efeito foi revertido durante os episódios de reação reversa.

A hanseníase é um modelo único para estudar respostas imunes polarizadas em seres humanos. No início dos anos 90, os imunologistas acreditavam que a dicotomia Th1-Th2 seria suficiente para explicar as duas formas polares da doença em pacientes com hanseníase. Apesar do predomínio de resposta Th1 em pacientes paucibacilares e Th2 nos multibacilares, os estudos mais recentes demonstraram que a imunidade inata contribui significativamente para o desfecho clínico em pacientes com hanseníase. A análise das vias funcionais relacionadas com a resposta de macrófagos na hanseníase indica que a via de fagocitose é proeminente na forma clinicamente progressiva LL, enquanto que a via antimicrobiana dependente da vitamina D predomina na forma autolimitada BT e nos pacientes que desenvolveram RR. A vitamina D tem sido implicada na indução de autofagia, que, por sua vez, está associada ao controle intracelular de *M. tuberculosis* (Gutierrez et al. 2004, Singh et al. 2006, Harris et al. 2007, Shin et al. 2010, Fabri et al. 2011, Castillo et al. 2012, Watson et al. 2012). Além disso, IFN γ e TNF, duas citocinas que estão em níveis elevados nos pacientes BT, são capazes de induzir autofagia. Por outro lado, a IL-10 que é predominante na forma clínica LL, apresenta efeito inibitório sobre a autofagia (Yamamura et al. 1991, Sieling & Modlin 1994, Gutierrez et al. 2004, Djavaheri-Mergny et al. 2006, Singh et al. 2006, Harris et al. 2007, Montoya et al. 2009, Fabri et al. 2011, Park et al. 2011).

Há inúmeras evidências do envolvimento da autofagia na imunopatogênese da hanseníase, no entanto, desde a descoberta de *M. leprae* em 1863 por Armauer Hansen (Hansen 1874) e da primeira descrição da autofagia em 1957 por Sam L. Clark (Clark 1957), uma relação direta entre a hanseníase e a autofagia ainda não havia sido demonstrada. Parte disso se deve ao fato de *M. leprae* não ser cultivável em meios de cultura artificiais como as outras micobactérias e possuir um prolongado ciclo de crescimento, dificultando sua obtenção e a realização de ensaios de viabilidade como o CFU (Vissa & Brennan 2001). Os modelos animais de

propagação de *M. leprae*, como a infecção de tatus ou camundongos, fornecem recursos básicos para estudos genéticos, metabólicos e antigênicos do bacilo, assim como permitem a realização de testes de sensibilidade aos medicamentos antimicrobianos. No entanto, a viabilidade de *M. leprae* obtido de diferentes fontes é muito variável e práticas laboratoriais padrão, tais como a incubação a 37°C, rapidamente reduzem a viabilidade desta micobactéria, que possui preferência por temperaturas mais baixas (Scollard et al. 2006).

No presente trabalho, avaliamos se a autofagia poderia ser diferencialmente regulada nas formas polares da doença e observamos um aumento da expressão de LC3-II em células de lesões cutâneas de pacientes BT, demonstrando que nestes pacientes a autofagia pode ser a responsável pela baixa carga bacilar. Em contraste, em pacientes LL a expressão de LC3-II foi reduzida. A análise da ultraestrutura de células presentes em lesões de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase demonstrou uma maior quantidade de autofagossomos com bactérias no interior em amostras de pacientes BT em comparação com as lesões de pele de pacientes LL. Nesta, observamos uma maior quantidade de bactérias em fagossomos de uma única membrana e raras bactérias em autofagossomos. Nas amostras dos pacientes BT, foi possível a visualização de debris celulares no interior de autofagossomos, que eram sugestivos de bactérias degradadas. Apesar da análise por microscopia eletrônica ser uma metodologia amplamente utilizada para monitorar a autofagia, algumas desvantagens técnicas limitam o seu uso, como a presença de artefatos. Além disso, dependendo da etapa autofágica, nem sempre é possível a observação de vacúolos de dupla membrana, como no estágio de anfissomo. Por vezes, a dupla membrana presente nos autofagossomos é degradada por fosfolipases e outras enzimas secretadas durante a infecção com microrganismos patogênicos (Birmingham et al. 2007, Klionsky et al. 2008). Uma vez que a redução da autofagia observada nas células dos pacientes LL contribui para o aumento da carga bacteriana, nós testamos se esse aumento poderia ser resultante do padrão de citocinas encontrado no microambiente tissular. Uma vez que existem níveis mais baixos de IFN γ em lesões de pele de pacientes LL, estas células foram estimuladas com IFN γ recombinante humano. Verificamos que as células de pacientes LL foram menos sensíveis à indução de autofagia por IFN γ do que as células de pacientes BT, embora elas respondessem normalmente tanto à estimulação com IFN γ ou rapamicina.

O IFN γ desempenha um importante papel na defesa contra patógenos intracelulares, ativando os macrófagos e os estimulando a matarem os patógenos localizados no interior dos fagossomos, através da facilitação da fusão do fagossomo-lisossomo (Alberts et al. 2002). Ele é capaz de induzir vários mediadores imunes com função microbicida, tais como NOS2, Nramp1, phox, IDO e GTPases (Taylor et al. 2004, Martens & Howard 2006), além de ser capaz de reduzir a fagocitose (Schlesinger & Horwitz 1991, Backman & Guyre, 1994, Konopski et al. 1994) e de induzir a autofagia (Gutierrez et al. 2004, Harris et al. 2007, 2009, Fabri et al. 2011, Li et al. 2011). A grande importância da autofagia induzida pelo IFN γ é que ela representa uma via adicional para a eliminação de micobactérias. Após *M. tuberculosis* escapar da fusão fagossomo-lisossomo, o IFN γ pode promover a incorporação de *M. tuberculosis* em autofagossomos via molécula efetora IRGM/LRG-47 e realizar a entrega aos lisossomos, com a consequente degradação do patógeno (MacMicking et al. 2003, Gutierrez et al. 2004, Singh et al. 2006). O IFN γ também é capaz de aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-15 (Murray 1994, Musso et al. 1999, Raupach & Kaufman 2001) e a indução de autofagia é um dos mecanismos efetores das citocinas pró-inflamatórias (Harris et al. 2007, 2009). Fabri e colaboradores (2011) descreveram que o IFN γ induz IL-15 por uma via dependente de Stat1, levando à conversão da vitamina D3 e ativação de uma via antimicrobiana mediada pela autofagia, promovendo a fusão autolisossomal e a eliminação de *M. tuberculosis*. Em adição, a vitamina D3 pode suprimir a expressão da TACO (Anand & Kaul 2003, Anand et al. 2008). Um trabalho recente demonstrou que a citocina imunorreguladora IL-27 foi fortemente expressa em lesões cutâneas de pacientes LL (Teles et al. 2015), e estudos com a cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis* demonstraram que a IL-27 inibiu a autofagia induzida por IFN γ e privação de nutrientes, resultando no bloqueio da maturação do fagossomo e consequentemente na promoção da sobrevivência das micobactérias intracelulares. Além disso, estes resultados ligaram a IL-27 com a produção de IL-10 em macrófagos tratados com *M. leprae* (Teles et al. 2015). Uma vez que a IL-10 é um bloqueador autofágico conhecido e é “up”-regulada em lesões de pacientes LL, é possível gerar a hipótese de que o aumento da produção de IL-10 induzido por IL-27 em células de pacientes LL pode levar à reduzida sensibilidade destas células à autofagia induzida por IFN γ (Yamamura et al. 1991, Sieling & Modlin 1994, Park et al. 2011, Sharma et al. 2014, Teles et al. 2015).

Apesar da PQT ser efetiva no controle da hanseníase, a resistência às drogas utilizadas no tratamento é um dos fatores que contribuem para a ocorrência de recidivas e a persistência da doença (Lockwood 2011, Sekar et al. 2011). Diante da importância deste fator no controle da doença, a OMS criou em 2009 a rede sentinela de vigilância da resistência medicamentosa em hanseníase, estando presente em 9 países, incluindo o Brasil (WHO 2011). Um outro aspecto de destaque no que concerne à PQT é o fato de que muitos pacientes apresentam cura clínica, sem apresentarem redução significativa no índice baciloscópico, o que pode contribuir para a ocorrência de episódios reacionais pós-tratamento e mesmo recidivas. Assim, a compreensão da relação entre a autofagia e a hanseníase é extremamente importante, pois pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e/ou imunomoduladoras que auxiliem no controle da doença. Apesar de vários estudos terem descrito a resposta benéfica da administração intradérmica de IFN γ recombinante humano em pacientes com a forma LL da hanseníase (Samuel et al. 1987, Kaplan et al. 1989, Damasco et al. 1992, Bermudez & Kaplan 1995, Murray 1996, Sampaio et al. 1996), a administração prolongada dessa citocina pela via intradérmica foi associada com o desenvolvimento de ENH nesses pacientes (Sampaio et al. 1992, 1993, Bermudez & Kaplan 1995, Sampaio et al. 1996). No presente estudo, a rapamicina, uma clássica indutora de autofagia, produziu efeitos similares ao do IFN γ , no que se refere à indução de autofagia em macrófagos de pele contendo *M. leprae*. A rapamicina é um antibiótico lipofílico do grupo das lactonas macrocíclicas, que se liga à proteína FKBP12 formando um complexo droga-receptor que interage com o mTORC1 promovendo sua inibição, sendo muito utilizada em receptores de transplante renal e hepático (Loewith et al. 2002, Reichen et al. 2011). O tratamento com rapamicina também mostrou ser capaz de melhorar os sintomas da doença de Crohn (Massey et al. 2008). A doença de Crohn é uma doença inflamatória intestinal crônica intimamente ligada à autofagia, tendo como fatores de risco polimorfismos em genes que regulam a via autofágica, tais como *NOD2*, *ATG16L1* e *IRGM*. As células de pacientes com doença de Crohn associada às variantes *NOD2* e *ATG16L1* são defeituosas na indução de autofagia, na apresentação de antígenos e na eliminação de bactérias (Ramjeet et al. 2010, Travassos et al. 2010, Fritz et al. 2011, Kleinnijenhuis et al. 2011). Esses efeitos negativos apresentados pelos pacientes com Doença de Crohn poderiam ser modulados através do tratamento com rapamicina (Massey et al. 2008). A rapamicina também é capaz de reduzir a

toxicidade da doença neurodegenerativa de Huntington, e de aumentar a destruição do BCG e de *M. marinum in vitro* (Floto et al. 2007, Sarkar et al. 2007, Lerena & Colombo 2011), assim como de inibir o crescimento de micobactérias isoladas de pacientes com doença de Crohn (Greenstein et al. 2008). Apesar da validade terapêutica do IFN γ ser bem estabelecida para várias doenças, como a doença granulomatosa crônica, onde ele restabelece a capacidade dos leucócitos de eliminarem os patógenos (Naderi Beni et al. 2012), na hanseníase o tratamento com IFN γ desencadeia uma complicação imunológica sistêmica emergencial, o ENH, contrabalanceando seus efeitos benéficos para os pacientes. A rapamicina pode ser uma droga para potencial utilização na hanseníase, no entanto necessitaria de uma avaliação cautelosa, pois devido às suas propriedades imunossupressoras e antiproliferativas, o tratamento com rapamicina (Sirolimus) tem sido associado com a reativação da tuberculose, assim como o tratamento com seus derivados Everolimus e Temsirolimus (Coriat et al. 2011, Fijałkowska-Morawska et al. 2011, Ngo et al. 2011). A nossa hipótese atual é que a rapamicina pode funcionar como um protótipo para o desenvolvimento de fármacos análogos que alternativamente propiciem efeitos benéficos para os pacientes com hanseníase através da indução de autofagia, com conseqüente potencialização da via antimicrobiana mediada pela IL-15 e eliminação das micobactérias, porém sem os efeitos adversos indesejáveis.

Embora reduzida em comparação com os pacientes BT, a autofagia não é completamente anulada nas células de pacientes LL, provavelmente porque no polo multibacilar da doença os mediadores inflamatórios liberados pelas células hospedeiras contribuem para o equilíbrio bacteriano de cerca de 50% de bactérias mortas e 50% de bactérias vivas nas lesões cutâneas (dados não mostrados). Pode-se supor que as bactérias mortas induzem diretamente a autofagia nessas células. Nosso grupo previamente demonstrou que a IL-10 é responsável pela indução de IDO1 em células de pacientes lepromatosos (Moura et al. 2012). Mais recentemente, o eixo IDO1-EIF2AK4/GCN2 foi associado à indução de autofagia em células renais, promovendo um papel benéfico no controle da inflamação fatal em camundongos (Chaudhary et al. 2015). Um de nossos objetivos futuros será investigar o eixo IDO1-EIF2AK4/GCN2 na hanseníase lepromatosa e os componentes imunorregulatórios associados à indução ou bloqueio da autofagia.

As micobactérias são capazes de utilizar diversos mecanismos para evadir da resposta imune, sendo clássicas inibidoras da degradação lisossomal após a

fagocitose, de mecanismos microbicidas diretos dos macrófagos e do processamento e apresentação de antígenos (Schaible et al. 1998, Via et al. 1998, Russell 2001, Alves et al. 2004, Deretic et al. 2006, van der Wel et al. 2007, Kumar et al. 2010, Kumar & Rao 2011, Shui et al. 2011). A autofagia tem papel fundamental na resposta do hospedeiro à infecção com micobactérias, pois é capaz de reverter o bloqueio da maturação do fagossomo, inibindo a sobrevivência intracelular do patógeno (Deretic et al. 2006). Ela é importante na defesa contra as micobactérias *Mycobacterium abscessus*, *M. marinum*, *M. avium* e *M. tuberculosis* (Early et al. 2011, Fabri et al. 2011, Lerena & Colombo 2011, Renna et al. 2011). O presente estudo demonstrou que *M. leprae* morto, mas não o viável, induziu autofagia em monócitos sanguíneos e macrófagos THP-1. Assim, é possível que *M. leprae* possa bloquear a via de autofagia como um mecanismo de escape imune. Trabalhos anteriores reportaram que macrófagos ativados utilizam frequentemente a autofagia para eliminar *M. tuberculosis*, *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *F. tularensis*, *L. amazonensis* e outros patógenos, e que o bloqueio da autofagia pode contribuir para o crescimento desses patógenos nas células hospedeiras (Gutierrez et al. 2004, Kyei et al. 2009, Pinheiro et al. 2009, Kumar et al. 2010, Travassos et al. 2010, Chong et al. 2012). Embora vários estudos tenham associado a autofagia com a morte de *M. tuberculosis*, estudos prévios analisando micobactérias patogênicas e não patogênicas descobriram que a indução micobacteriana de autofagia varia de acordo com a espécie de bactéria e ocorre independentemente da inibição de mTOR (Zullo & Lee 2012, Li et al. 2016).

Como os SLR acumulam quando a autofagia é inibida, e níveis reduzidos são observados quando ela é induzida, os SLR podem ser usados como marcadores para estudar o fluxo autofágico (Johansen & Lamark 2011, Klionsky et al. 2016). A análise desses receptores revelou um acúmulo de ambos SQSTM1/p62 e NBR1 em células de lesões de pele de pacientes LL. De fato, a maturação de autofagossomos sem estimulação autofágica raramente foi vista nos macrófagos derivados das lesões desses pacientes. No entanto, apesar da observação de que *M. leprae* pode inibir a biogênese dos autofagossomos, um pequeno número de micobactérias pode ser incorporado neles. Portanto, nós acreditamos que assim como *M. leprae* é capaz de utilizar vários mecanismos para escapar da degradação fagolisossomal após a fagocitose (Alves et al. 2004, Suzuki et al. 2006, van der Wel et al. 2007, Tanigawa et al. 2009), ele também poderia bloquear ambas as etapas de iniciação e

maturação da autofagia, o que está de acordo com os nossos resultados de microscopia de fluorescência, onde *M. leprae* vivo inibiu o fluxo autofágico em monócitos primários. Além disso, também observamos que durante a infecção mista, as micobactérias vivas podem reduzir a resposta autofágica induzida pelas micobactérias mortas, e que *M. leprae* morto é preferencialmente direcionado para os autolisossomos. Este achado corrobora com um estudo recente que mostrou uma resistência seletiva à etapa de maturação da autofagia em autofagossomos que continham uma cepa virulenta de *M. tuberculosis*, mas não a avirulenta (Chandra et al. 2015). Zullo e Lee (2012) também mostraram que micobactérias avirulentas como *M. smegmatis* induzem mais autofagia do que as virulentas como *M. tuberculosis*, e que *M. tuberculosis* ou BCG podem reduzir a autofagia em resposta ao *M. smegmatis*. No entanto, o modo preciso pelo qual *M. leprae* inibe autofagia e como os macrófagos tornam *M. leprae* uma carga para destino autofágico permanecem obscuros. Esperamos elucidar ambas as questões num futuro próximo, através da análise da autofagia seletiva dependente de ubiquitinação.

O estímulo com *M. leprae* é capaz de induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 (Murray et al. 2007), IL-10 (Fulco et al. 2007, Sinsimer et al. 2010) e IL-13 (Sieling & Modlin 1994a, b), assim como de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias (Murray et al. 2007, Dagur et al. 2010, Sinsimer et al. 2010) e essas citocinas anti-inflamatórias estão associadas à forma LL da hanseníase (Salgame et al. 1991, Yamamura et al. 1991). Foi descrito que após a indução de autofagia, essas citocinas anti-inflamatórias são capazes de inibir o processo, bloqueando também a maturação dos fagossomos micobacterianos em compartimentos degradativos autolisossomais, inibindo assim a habilidade dos macrófagos de controlarem a infecção por *M. tuberculosis* (Harris et al. 2007, Park et al. 2011). Assim, após a incorporação de um pequeno grupo de *M. leprae* nos autofagossomos, as citocinas anti-inflamatórias induzidas por ele poderiam exercer um efeito inibitório no fluxo autofágico, bloqueando a etapa de fusão dos autofagossomos/anfissomos com os lisossomos. *M. leprae* é capaz de utilizar a proteína TACO do hospedeiro para inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo, permitindo sua sobrevivência nos macrófagos. A proteína TACO, por sua vez, fica retida na membrana fagossomal de macrófagos de lesões dérmicas de pacientes com a forma LL da hanseníase (Suzuki et al. 2006, Tanigawa et al. 2009). Foi descrito que a TACO inibe a formação do autofagossomo ao redor do fagossomo

contendo *M. tuberculosis* e inibe a colocalização dos fagossomos LC3 positivos com os lisossomos, permitindo a sobrevivência da micobactéria nos macrófagos (Seto et al. 2012). Deste modo, após a indução de autofagia, *M. leprae* poderia utilizar a TACO para impedir a fusão dos autofagossomos/anfissomos com os lisossomos, persistindo assim no nicho intracelular.

Os macrófagos de lesões de pele de pacientes LL apresentam grandes quantidades de lipídeos e bactérias, estas células são conhecidas como macrófagos espumosos de Virchow, não sendo observadas nas lesões de pacientes TT/BT (Virchow 1863). Esse aspecto espumoso dos macrófagos de pacientes LL é devido pelo menos em parte ao acúmulo de corpúsculos lipídicos, induzidos durante a infecção por *M. leprae*. Foi demonstrado que *M. leprae* induz a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos e células de Schwann. Esses corpúsculos lipídicos induzidos por *M. leprae* constituem sítios para a síntese de eicosanóides e podem ser reguladores críticos na subversão da resposta imune na hanseníase (Mattos et al. 2010, Mattos et al. 2011a, b). Singh e colaboradores (2009) demonstraram pela primeira vez a associação entre o metabolismo lipídico e a autofagia, onde o excesso de corpúsculos lipídicos na célula tem um efeito atenuador sobre a autofagia. Adicionalmente, além das membranas autofagossomais, o LC3 também se localiza na membrana dos corpúsculos lipídicos e o sistema de conjugação da proteína autofágica LC3 está envolvido na formação de corpúsculos lipídicos (Shibata et al. 2009, 2010). Assim, uma possível hipótese seria de que *M. leprae* poderia utilizar de forma não-autofágica o sistema de conjugação da proteína LC3 (Deretic 2006, 2011, Bestebroer et al. 2013, Subramani & Malhotra 2013) para indução da formação de corpúsculos lipídicos. Por sua vez, esses corpúsculos lipídicos teriam um efeito atenuador na função imune efetora da autofagia, propiciando a sobrevivência de *M. leprae* nos macrófagos espumosos de pacientes LL. Portanto, nós pretendemos avaliar essa relação entre corpúsculos lipídicos e autofagia em nossos estudos seguintes.

A análise através do “array” de autofagia foi um fator que contribuiu para decifrar as vias que poderiam ser diferencialmente moduladas em células de pacientes BT e LL. Nas lesões de pacientes BT, observamos um aumento da expressão de genes associados à formação e maturação autofagossomal, bem como à regulação da autofagia e apoptose. Nas lesões de pacientes BT, existe uma predominância de citocinas pró-inflamatórias que podem contribuir tanto para a

indução autofágica como para a apoptose. A regulação destas duas vias determina o curso da infecção. Nossos dados sugerem que a autofagia induzida por estas citocinas pró-inflamatórias em lesões de pacientes BT pode contribuir para a morte de micobactérias. Em contraste, a apoptose contribui para a persistência da infecção. Nesse sentido, nós demonstramos previamente que embora o fenótipo de macrófagos do tipo 1 fosse predominante nas lesões de pacientes BT, a eferocitose contribui para a manutenção de um mínimo de células do tipo 2, que são essenciais para a manutenção da infecção nas lesões cutâneas de hanseníase (de Oliveira Fulco et al. 2014).

BECN1 foi o gene com maior expressão nas análises das lesões de pacientes BT e LL. *BECN1* é essencial para a formação de autofagossomos funcionais (Patingre et al. 2005, Liang et al. 2008). Curiosamente, a expressão de *BECN1* pode ser induzida por IFN γ para ativar autofagia (Tu et al. 2011). A expressão de *ATG14* (*BARKOR*) também foi significativamente maior nas lesões de pacientes BT. Estudos prévios demonstraram que o *ATG14* é importante no direcionamento de *BECN1* para os autofagossomos, e juntamente com *BECN1*, formam um pré-requisito para a formação dos autolisossomos (Sun et al. 2008, Diao et al. 2015). *APOL1*, que codifica para uma proteína de ligação à lipídeos e também é associado à indução autofágica, foi outro gene significativamente superexpresso, e é induzido por IFN γ e TNF, duas citocinas aumentadas em lesões de pacientes BT (Yamamura et al. 1991, Wan et al. 2008). De forma interessante, foi descrito recentemente que assim como o gene antimicrobiano *S100A12*, *APOL1* é um constituinte da rede macrofágica de defesa do hospedeiro contra *M. leprae*, que é indutível por IFN γ (Realegeno et al. 2016). Além destes, *GPSM3*, um ativador da família de genes que sinalizam via proteína G e que estão envolvidos na indução de autofagia (Blumer & Lanier 2014), e *TPR*, uma nucleoporina componente do complexo do póro nuclear e que regula a ativação da autofagia (Funasaka et al. 2012), foram genes “up”-regulados nas lesões de pele de pacientes BT. A estimulação de monócitos com *M. leprae* induz a secreção de TNF (Hussain et al. 1999, Hernandez et al. 2003, Fulco et al. 2007, Hernandez et al. 2011), uma citocina pró-inflamatória associada com a patogênese do ENH nos pacientes multibacilares (Sampaio et al. 1991, Sarno et al. 1991, Sarno & Sampaio 1996). Em adição, o TNF é capaz de induzir autofagia (Sivaprasad & Basu 2008). O mecanismo preciso pelo qual *M. leprae* morto induz a

autofagia não foi elucidado, mas é possível que a síntese de TNF desempenhe um importante papel na indução de autofagia mediada por *M. leprae*.

Nas lesões de pacientes LL, *BCL2* foi “up”-regulado, assim como descrito anteriormente (Brito de Souza et al. 2010). Estudos com o patógeno intracelular *Coxiella burnetti* demonstraram que esta bactéria pode modular as vias de autofagia e apoptose através da modificação da interação entre BECN1-BCL2, utilizando BECN1 para regular a atividade anti-apoptótica de BCL2, e gerando assim uma infecção bacteriana persistente nas células hospedeiras através da inibição da apoptose (Gutierrez et al. 2005, Vázquez & Colombo 2010). Foi descrito também que as células que expressam BCL2 de forma estável podem inibir a autofagia induzida por privação de nutrientes através da interrupção do complexo BECN1/PIK3 de classe III ou antagonismos de outras atividades de BECN1 que seriam necessárias para a autofagia (Patingre et al. 2005, Vázquez & Colombo 2010). Recentemente foi proposto que a inibição da autofagia mediada por membros anti-apoptóticos da família BCL2 requer a ligação com BECN1 e ocorre independentemente dos membros pró-apoptóticos da família BCL2, BAX e BAK1 (Pedro et al. 2015). Assim, nossos dados sugerem que BECN1 medeia a autofagia em células de pacientes BT, e que BCL2 pode inibir este efeito em células de pacientes LL.

Nas lesões de pacientes BT foi observada uma expressão aumentada de genes de estresse mitocondrial, tais como *SH3GLB1*, *ATG4D* e *BNIP3*. No entanto, nossa análise ultraestrutural não revelou quantidades significativas de mitocôndrias danificadas ou sinais de mitofagia. A mitofagia dependente de parkina é antagonizada por membros pró-sobrevivência da família BCL2, *BCL2L1* e *MCL1* (Hollville et al. 2014). Ambos *BCL2L1* e *MCL1* foram “up”-regulados em células de pele de pacientes BT, o que pode explicar a ausência de mitofagia nessas lesões.

Os pacientes com as formas lepromatosas “borderline”, subpolar e polar anérgicas podem desenvolver RR durante ou após a PQT. A RR é um problema desafiador, pois é a causa mais importante de lesões nervosas na hanseníase, levando às temidas deficiências e deformidades associadas com a doença (Pinheiro et al. 2011, Andrade et al. 2015b). Acredita-se que na forma clínica RR as células imunológicas da pele, como os macrófagos, se tornam espontaneamente ativadas, iniciando assim uma resposta imune inata local contra os componentes de *M. leprae*

existentes e revertendo o estado imunossupressor predominante. Vários estudos demonstraram que os genes induzidos pelo IFN γ desempenham um papel importante no desenvolvimento da RR (Geluk et al. 2014, Khadge et al. 2015, Realegeno et al. 2016).

Por fim, nós iniciamos a avaliação da autofagia nos pacientes MB em RR, no intuito de verificar se a autofagia teria algum papel no controle da carga micobacteriana durante os episódios de RR. Uma vez que o IFN γ foi capaz de restaurar a ativação da autofagia nas células da pele de pacientes lepromatosos, nossa hipótese é de que níveis mais elevados de IFN γ podem contribuir para a indução autofágica, levando à morte micobacteriana por macrófagos e ao estado inflamatório concomitante observado nas lesões cutâneas de pacientes RR. Nas células de lesões de pacientes RR três reguladores autofágicos foram significativamente “up”-regulados em comparação com as lesões de pacientes LL sem RR. Além disso, todos os genes significativamente aumentados em pacientes BT também aumentaram nos pacientes RR. Estes genes aumentados em ambos os pacientes BT e RR foram associados com diferentes vias, incluindo a autofagia mediada por BECN1 e TNF. Em conjunto nossos dados indicam que existem diferenças na regulação da autofagia nas células de pacientes das diferentes formas clínicas da hanseníase, incluindo a RR, o que se relaciona com a capacidade de combater a infecção, uma vez que a autofagia possui uma função antimicrobiana.

Em síntese, nosso estudo demonstrou pela primeira vez o real envolvimento da autofagia na polarização da hanseníase, assim como estabeleceu um papel para esta via durante os episódios reacionais hanseníase. Além disso, nossos resultados demonstraram que *M. leprae* prejudica a autofagia da célula hospedeira como um mecanismo de escape imunológico, o que, no entanto, foi neutralizado pela estimulação com IFN γ (Silva et al. 2017; Apêndice C). As citocinas pró-inflamatórias podem induzir autofagia em lesões de pacientes BT por um processo dependente de BECN1 e APOL1. Em células de pacientes LL, os membros da família BCL2 dificultam a indução de autofagia mediada por BECN1. Finalmente, as células de pacientes LL que desenvolveram RR foram caracterizadas por um resgate autofágico. A identificação dos alvos que modulam as vias lisossomais/autofágicas no curso da polarização da doença, ou das moléculas envolvidas durante os episódios reacionais do tipo 1, poderão levar ao estabelecimento de novos alvos e estratégias terapêuticas de controle da hanseníase e da RR.

6 CONCLUSÕES

- Pacientes BT apresentaram uma maior formação de autofagossomos e expressão tecidual de LC3-II em relação aos pacientes LL, indicando que a autofagia foi diferencialmente regulada entre as duas formas clínicas;
- Na presença ou ausência de IFN γ , um maior número de macrófagos de lesões de pele expressando LC3 puntiforme foi observado nos pacientes BT, comparado aos pacientes LL;
- *M. leprae* morto, mas não o viável, é capaz de diretamente induzir autofagia em monócitos;
- *M. leprae* vivo inibe a maturação dos autofagossomos (fluxo autofágico) em monócitos e macrófagos;
- Na presença de *M. leprae*, o IFN γ aumenta a formação de autofagossomos e os fagossomos micobacterianos colocalizam com os autofagossomos LC3 positivos;
- BCL2, que está superexpressa em células de lesões de pele de pacientes LL, inibe a autofagia dependente de BECN1, fator que pode estar relacionado com o aumento da carga bacilar nestes pacientes;
- A reação de tipo 1 alterou as características autofágicas dos pacientes LL para um perfil similar ao dos pacientes BT, o que pode indicar um melhor controle da infecção durante a RR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams LB, Soileau NA, Battista JR, Krahenbuhl JL. Inhibition of metabolism and growth of *Mycobacterium leprae* by gamma irradiation. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000 Mar;68(1):1–10.
- Agarwal S, Vemuri N, Mahadevan PR. Macrophage membrane alterations in leprosy as determined by change in sialic acid level. *J Clin Lab Immunol*. 1986 Mar;19(3):119–22.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed., New York, Garland Science, 2002; Cap. 24-25.
- Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, et al. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol. Lett*. 2004 Sep 15;238(2):429–37.
- Anand PK, Kaul D, Sharma M. Synergistic action of vitamin D and retinoic acid restricts invasion of macrophages by pathogenic mycobacteria. *J Microbiol Immunol Infect*. 2008 fev;41(1):17–25.
- Anand PK, Kaul D. Vitamin D3-dependent pathway regulates TACO gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003 out 24;310(3):876–7.
- Andrade PR, Amadeu TP, Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN. CD123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type 1 reaction. *Br J Dermatol*. 2015a Jan;172(1):268–71.
- Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MG de M, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015b Mar;11(3):391–407.
- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels M-J, Striepen B, Subauste CS. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest*. 2006 Sep;116(9):2366–77.
- Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, et al. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol*. 2000 Dec;1(6):533–40.
- Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am. J. Pathol*. 1990 out;137(4):749–53.
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol*. 1997;15:563–91.
- Backman KA, Guyre PM. Gamma-interferon inhibits Fc receptor II-mediated phagocytosis of tumor cells by human macrophages. *Cancer Res*. 1994 maio 1;54(9):2456–61.

- Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect. Immun.* 1992 Apr;60(4):1441–6.
- Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature.* 1994 dez 15;372(6507):691–4.
- Behar SM, Baehrecke EH. Tuberculosis: Autophagy is not the answer. *Nature.* 2015 Dec 24;528(7583):482–3.
- Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature.* 2010 Jul 1;466(7302):68–76.
- Bermudez LE, Covaro G, Remington J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect. Immun.* 1993 out;61(10):4126–30.
- Bermudez LE, Kaplan G. Recombinant cytokines for controlling mycobacterial infections. *Trends Microbiol.* 1995 Jan;3(1):22–7.
- Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature.* 2010 Aug 19;466(7309):973–7.
- Bestebroer J, V'kovski P, Mauthe M, Reggiori F. Hidden behind autophagy: the unconventional roles of ATG proteins. *Traffic.* 2013 Oct;14(10):1029–41.
- Birmingham CL, Canadien V, Gouin E, Troy EB, Yoshimori T, Cossart P, et al. *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy.* 2007 out;3(5):442–51.
- Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* 2006 Apr 21;281(16):11374–83.
- Blaser MJ, Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature.* 2007 out 18;449(7164):843–9.
- Bloom BR. Learning from leprosy: a perspective on immunology and the Third World. *J. Immunol.* 1986 Jul 1;137(1):i-x.
- Blumer JB, Lanier SM. Activators of G protein signaling exhibit broad functionality and define a distinct core signaling triad. *Mol Pharmacol.* 2014 Mar;85(3):388–96.
- Bodemann BO, Orvedahl A, Cheng T, Ram RR, Ou Y-H, Formstecher E, et al. RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell.* 2011 Jan 21;144(2):253–67.
- Brasil. Sinan-SVS-MS. Situação Epidemiológica - Dados [Internet]. 2016 [acesso em: 20 de agosto de 2016]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniose/11298-situacao-epidemiologica-dados>.

- Bratschi MW, Steinmann P, Wickenden A, Gillis TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Lepr Rev.* 2015 Jun;86(2):142–55.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 1999 Jul 30;285(5428):732–6.
- Brito de Souza VN, Nogueira MES, Belone A de FF, Soares CT. Analysis of apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Dec;60(3):270–4.
- Bruns H, Stenger S. New insights into the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and human macrophages. *Future Microbiol.* 2014;9(3):327–41.
- Bührer-Sekula S, Cunha MG, Ferreira WA, Klatser PR. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1998 Jul;21(3):197–201.
- Caire-Brändli I, Papadopoulos A, Malaga W, Marais D, Canaan S, Thilo L, et al. Reversible lipid accumulation and associated division arrest of *Mycobacterium avium* in lipoprotein-induced foamy macrophages may resemble key events during latency and reactivation of tuberculosis. *Infect Immun.* 2014 Feb;82(2):476–90.
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, et al. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum. Genet.* 2010 Nov;128(5):481–90.
- Castillo EF, Dekonenko A, Arko-Mensah J, Mandell MA, Dupont N, Jiang S, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012 Nov 13;109(46):E3168-3176.
- Chan LL-Y, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, et al. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy.* 2012 Sep;8(9):1371–82.
- Chandi SM, Job CK. The early cellular response to *M. leprae*. An ultrastructural study. *Lepr India.* 1978 Jul;50(3):345–57.
- Chandra P, Ghanwat S, Matta SK, Yadav SS, Mehta M, Siddiqui Z, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Inhibits RAB7 Recruitment to Selectively Modulate Autophagy Flux in Macrophages. *Sci Rep.* 2015 Nov 6;5:16320.
- Chaudhary K, Shinde R, Liu H, Gnana-Prakasam JP, Veeranan-Karmegam R, Huang L, et al. Amino acid metabolism inhibits antibody-driven kidney injury by inducing autophagy. *J Immunol.* 2015 Jun 15;194(12):5713–24.
- Chauhan S, Kumar S, Jain A, Ponpuak M, Mudd MH, Kimura T, et al. TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Dev Cell.* 2016 Oct 10;39(1):13–27.
- Chauhan S, Mandell MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell.* 2015 May 7;58(3):507–21.
- Che N, Li S, Gao T, Zhang Z, Han Y, Zhang X, et al. Identification of a novel IRGM

promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin. Chim. Acta.* 2010 nov 11;411(21-22):1645–9.

Chen M, Meng Q, Qin Y, Liang P, Tan P, He L, et al. TRIM14 Inhibits cGAS Degradation Mediated by Selective Autophagy Receptor p62 to Promote Innate Immune Responses. *Mol Cell.* 2016 Oct 6;64(1):105–19.

Cheng J, Ohsaki Y, Tauchi-Sato K, Fujita A, Fujimoto T. Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Dec 8;351(1):246–52.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Balagon MV, Abalos RM, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001 jan;8(1):138–42.

Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.* 1983 Sep;41(3):1077–83.

Chong A, Wehrly TD, Child R, Hansen B, Hwang S, Virgin HW, et al. Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway. *Autophagy.* 2012 Sep;8(9):1342–56.

Clark SL Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol.* 1957 maio 25;3(3):349–62.

Cole ST, Supply P, Honoré N. Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. *Lepr Rev.* 2001 Dec;72(4):449–61.

Collins AC, Cai H, Li T, Franco LH, Li X-D, Nair VR, et al. Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Host Microbe.* 2015 Jun 10;17(6):820–8.

CONGRESS, MADRID. Classification. Technical Resolutions, VIth Congr. Internac. Leprol. Madrid, 1953. *Internat. J. Leprosy* 21 (1953) 504-516.

CONGRESS, MADRID. Technical Resolutions. Classification of leprosy. Mem. VI Congr. Internac. Leprol., Madrid 1953; Madrid 1954, pp. 75-86.

Consortium, Wellcome Trust Case Control. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007 jun 7;447(7145):661–78.

Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 2010 Jan;16(1):90–7.

Coriat R, Mir O, Ropert S, Loulergue P, Billefont B, Goldwasser F. Reactivation of tuberculosis during temsirolimus therapy. *Invest New Drugs.* 2011 dez;29(6):1494–6.

Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Beck JS. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 1987 nov;40(11):1314–9.

Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, et al. DRAM, a

- p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*. 2006 Jul 14;126(1):121–34.
- Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa M-T, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J. Clin. Invest.* 2008 ago;118(8):2917–28.
- Cuervo AM. Autophagy and aging: keeping that old broom working. *Trends Genet.* 2008 dez;24(12):604–12.
- Dagda RK, Zhu J, Kulich SM, Chu CT. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy and autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease. *Autophagy*. 2008 Aug;4(6):770–82.
- Dagur PK, Sharma B, Kumar G, Khan NA, Katoch VM, Sengupta U, et al. Mycobacterial antigen(s) induce anergy by altering TCR- and TCR/CD28-induced signalling events: insights into T-cell unresponsiveness in leprosy. *Mol. Immunol.* 2010 fev;47(5):943–52.
- Damasco MH, Sarno EN, Lobão AS, Alvarenga FB, Porto JA, Rosankaimer F, et al. Effect of cutaneous cell-mediated immune response to rIFN gamma on *Mycobacterium leprae* viability in the lesions of lepromatous leprosy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1992;25(5):457–65.
- de Chastellier C, Thilo L. Cholesterol depletion in *Mycobacterium avium*-infected macrophages overcomes the block in phagosome maturation and leads to the reversible sequestration of viable mycobacteria in phagolysosome-derived autophagic vacuoles. *Cell Microbiol.* 2006 Feb;8(2):242–56.
- de Chastellier C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. *Immunobiology*. 2009 jul;214(7):526–42.
- de Jong R, Janson AA, Faber WR, Naafs B, Ottenhoff TH. IL-2 and IL-12 act in synergy to overcome antigen-specific T cell unresponsiveness in mycobacterial disease. *J. Immunol.* 1997 jul 15;159(2):786–93.
- de Oliveira Fulco T, Andrade PR, de Mattos Barbosa MG, Pinto TGT, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infect Immun.* 2014 Sep;82(9):3968–78.
- de Reuck AVS, Cameron MP. *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes*. London: J.A. Churchill Ltd, 1963.
- de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 2011 Aug;165(2):251–63.
- de Toledo-Pinto TG, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ de A, et al. STING-Dependent 2'-5' Oligoadenylate Synthetase-Like Production Is Required for Intracellular *Mycobacterium leprae* Survival. *J Infect Dis.* 2016 Jul 15;214(2):311–20.
- Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 2008 Apr 9;27(7):1110–21.
- Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host*

- Microbe. 2009 Jun 18;5(6):527–49.
- Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):722–37.
- Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell. Microbiol*. 2006 May;8(5):719–27.
- Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol*. 2006 Aug;18(4):375–82.
- Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol. Rev*. 2011 Mar;240(1):92–104.
- Deretic V. Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2005 Oct;26(10):523–8.
- Deretic V. Autophagy in leukocytes and other cells: mechanisms, subsystem organization, selectivity, and links to innate immunity. *J Leukoc Biol*. 2016 Nov;100(5):969–78.
- Dey B, Dey RJ, Cheung LS, Pokkali S, Guo H, Lee J-H, et al. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis. *Nat Med*. 2015 Apr;21(4):401–6.
- Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, et al. ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature*. 2015 Apr 23;520(7548):563–6.
- Djavaheri-Mergny M, Amelotti M, Mathieu J, Besançon F, Bauvy C, Souquère S, et al. NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J Biol Chem*. 2006 Oct 13;281(41):30373–82.
- Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, Elling RA, Liu S, Triantafellow E, et al. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol*. 2014 Nov;16(11):1069–79.
- Drutz DJ, Chen TS, Lu WH. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med*. 1972 Jul 27;287(4):159–64.
- Duan L, Yi M, Chen J, Li S, Chen W. Mycobacterium tuberculosis EIS gene inhibits macrophage autophagy through up-regulation of IL-10 by increasing the acetylation of histone H3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 May 13;473(4):1229–34.
- Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, Castillo EF, Masedunskas A, Weigert R, et al. Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis. *Curr Biol*. 2014 Mar 17;24(6):609–20.
- Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J*. 2011 Nov 8;30(23):4701–11.
- Dupont N, Lacas-Gervais S, Bertout J, Paz I, Freche B, Van Nhieu GT, et al. Shigella

phagocytic vacuolar membrane remnants participate in the cellular response to pathogen invasion and are regulated by autophagy. *Cell Host Microbe*. 2009 Aug 20;6(2):137–49.

Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J. Cell Biol.* 2010 fev 22;188(4):527–36.

Early J, Fischer K, Bermudez LE. Mycobacterium avium uses apoptotic macrophages as tools for spreading. *Microb. Pathog.* 2011 fev;50(2):132–9.

Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2008 out;8(4):325–32.

Eng CH, Yu K, Lucas J, White E, Abraham RT. Ammonia derived from glutaminolysis is a diffusible regulator of autophagy. *Sci Signal.* 2010 Apr 27;3(119):ra31.

Estrella JL, Kan-Sutton C, Gong X, Rajagopalan M, Lewis DE, Hunter RL, et al. A Novel in vitro Human Macrophage Model to Study the Persistence of Mycobacterium tuberculosis Using Vitamin D(3) and Retinoic Acid Activated THP-1 Macrophages. *Front Microbiol.* 2011;2:67.

Evans MJ, Levy L. Ultrastructural changes in cells of the mouse footpad infected with Mycobacterium leprae. *Infect. Immun.* 1972 fev;5(2):238–47.

Fabri M, Stenger S, Shin D-M, Yuk J-M, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med.* 2011 out 12;3(104):104ra102.

Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, et al. PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol.* 1993 May;142(5):1359–72.

Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 2014 Jan;24(1):24–41.

Ferrari G, Langen H, Naito M, Pieters J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 1999 maio 14;97(4):435–47.

Fijałkowska-Morawska JB, Jagodzińska M, Nowicki M. Pulmonary embolism and reactivation of tuberculosis during everolimus therapy in a kidney transplant recipient. *Ann. Transplant.* 2011 dez 30;16(4):107–10.

Florey O, Kim SE, Sandoval CP, Haynes CM, Overholtzer M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat Cell Biol.* 2011 Oct 16;13(11):1335–43.

Florez-McClure M. *leprae*, Linseman DA, Chu CT, Barker PA, Bouchard RJ, Le SS, et al. The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* 2004 maio 12;24(19):4498–509.

Floto RA, Sarkar S, Perlstein EO, Kampmann B, Schreiber SL, Rubinsztein DC. Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages. *Autophagy.* 2007 dez;3(6):620–2.

- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 2001;19:93–129.
- Friend DS. In Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. 12. ed., New York, Chapman & Hall, 1994; 988 pp.
- Fritz T, Niederreiter L, Adolph T, Blumberg RS, Kaser A. Crohn's disease: NOD2, autophagy and ER stress converge. *Gut*. 2011 nov;60(11):1580–8.
- Fulco TO, Lopes UG, Sarno EN, Sampaio EP, Saliba AM. The proteasome function is required for Mycobacterium leprae-induced apoptosis and cytokine secretion. *Immunol. Lett.* 2007 maio 15;110(1):82–5.
- Funasaka T, Tsuka E, Wong RW. Regulation of autophagy by nucleoporin Tpr. *Sci Rep.* 2012;2:878.
- Fusco C, Micale L, Egorov M, Monti M, D'Addetta EV, Augello B, et al. The E3-ubiquitin ligase TRIM50 interacts with HDAC6 and p62, and promotes the sequestration and clearance of ubiquitinated proteins into the aggresome. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40440.
- Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*. 2009 out 22;6(4):367–80.
- García VE, Sieling PA, Gong J, Barnes PF, Uyemura K, Tanaka Y, et al. Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J. Immunol.* 1997 ago 1;159(3):1328–35.
- García VE, Uyemura K, Sieling PA, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, et al. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J. Immunol.* 1999 maio 15;162(10):6114–21.
- Ge L, Melville D, Zhang M, Schekman R. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife*. 2013 Aug 6;2:e00947.
- Geluk A, van Meijgaarden KE, Wilson L, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, van den Eeden SJF, et al. Longitudinal immune responses and gene expression profiles in type 1 leprosy reactions. *J Clin Immunol.* 2014 Feb;34(2):245–55.
- Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to M. leprae of healthy leprosy contacts. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1972 Sep;40(3):243–50.
- Gong L, Cullinane M, Treerat P, Ramm G, Prescott M, Adler B, et al. The Burkholderia pseudomallei type III secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis. *PLoS ONE*. 2011 Mar 11;6(3):e17852.
- Goulart IM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* 1996 mar;148(3):911–7.
- Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of

- leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 2000 dez;122(3):330–4.
- Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2891–906.
- Graef M, Friedman JR, Graham C, Babu M, Nunnari J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol Biol Cell.* 2013 Sep;24(18):2918–31.
- Greenstein RJ, Su L, Juste RA, Brown ST. On the action of cyclosporine A, rapamycin and tacrolimus on *M. avium* including subspecies paratuberculosis. *PLoS ONE.* 2008;3(6):e2496.
- Guerrero-Velázquez C, Lopez-Roa RI, Delgado-Rizo V, Guillen-Vargas CM, Montoya-Buelna M, Fafutis-Morris M. Abnormalities in intracellular processing and expression of interferon-gamma receptor in adherent cells from lepromatous leprosy patients. *J. Interferon Cytokine Res.* 2010 Feb;30(2):99–105.
- Gupta A, Sharma VK, Vohra H, Ganguly NK. Spontaneous apoptosis in peripheral blood mononuclear cells of leprosy patients: role of cytokines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999 maio;24(1):49–55.
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell.* 2004 Dec 17;119(6):753–66.
- Gutierrez MG, Vázquez CL, Munafó DB, Zoppino FCM, Berón W, Rabinovitch M, et al. Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell Microbiol.* 2005 Jul;7(7):981–93.
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell.* 2010 May 14;141(4):656–67.
- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 2013 Mar 21;495(7441):389–93.
- Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 2008 Dec;130(6):856–64.
- Hansen, GA. Undwersogelser angaende spedalskhedens arsager. *Norsk. Mag. Laegevid.* 1874; 4:1–88.
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006 jun 15;441(7095):885–9.
- Harris J, De Haro SA, Master SS, Keane J, Roberts EA, Delgado M, et al. T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity.* 2007 set;27(3):505–17.
- Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O’Shea A, Sharp FA, et al. Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol*

Chem. 2011 Mar 18;286(11):9587–97.

- Harris J, Hope JC, Keane J. Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 2008 Dec 15;198(12):1842–50.
- Harris J, Master SS, De Haro SA, Delgado M, Roberts EA, Hope JC, et al. Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009 Mar 15;128(1-3):37–43.
- Hastings RC, Job CK. Reversal reactions in lepromatous leprosy following transfer factor therapy. *Am J Trop Med Hyg.* 1978 Sep;27(5):995–1004.
- Hastings RC. MDT and transmission. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1998 Jun;66(2):224.
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 2009 Dec;11(12):1433–7.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 2009;43:67–93.
- He C, Wei Y, Sun K, Li B, Dong X, Zou Z, et al. Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. *Cell.* 2013 Aug 29;154(5):1085–99.
- Henault J, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity.* 2012 Dec 14;37(6):986–97.
- Henriques-Pons A, Nagaraju K. Nonimmune mechanisms of muscle damage in myositis: role of the endoplasmic reticulum stress response and autophagy in the disease pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009 nov;21(6):581–7.
- Hernandez M de O, Fulco T de O, Pinheiro RO, Pereira R de MS, Redner P, Sarno EN, et al. Thalidomide modulates *Mycobacterium leprae*-induced NF- κ B pathway and lower cytokine response. *Eur. J. Pharmacol.* 2011 nov 16;670(1):272–9.
- Hernandez MO, Neves I, Sales JS, Carvalho DS, Sarno EN, Sampaio EP. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor- α . *Immunology.* 2003 May;109(1):156–64.
- Herrera G. Vitamin D in massive doses as an adjuvant to the sulfones in the treatment of tuberculoid leprosy. *Int J Lepr.* 1949 jun;17(1-2):35–42.
- Heynen MJ, Tricot G, Verwilghen RL. Autophagy of mitochondria in rat bone marrow erythroid cells. Relation to nuclear extrusion. *Cell Tissue Res.* 1985;239(1):235–9.
- Hirschberg H. The role of macrophages in the lymphoproliferative response to *Mycobacterium leprae* in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 1978 out;34(1):46–51.
- Hollville E, Carroll RG, Cullen SP, Martin SJ. Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy.

Mol Cell. 2014 Aug 7;55(3):451–66.

- Hope JC, Thom M. *leprae*, McCormick PA, Howard CJ. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004 ago;100(3-4):187–95.
- Huang J, Canadien V, Lam GY, Steinberg BE, Dinauer MC, Magalhaes MAO, et al. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Apr 14;106(15):6226–31.
- Hummon AB, Lim SR, Difilippantonio MJ, Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *BioTechniques.* 2007 Apr;42(4):467–70, 472.
- Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 1981 set;147(3):728–35.
- Hussain R, Kifayet A, Dojki M, Dockrell HM. Selective correlation of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with immunoglobulin G1 and immunoglobulin G3 subclass antibody in leprosy. *Immunology.* 1999 Oct;98(2):238–43.
- Hussey S, Travassos LH, Jones NL. Autophagy as an emerging dimension to adaptive and innate immunity. *Semin. Immunol.* 2009 ago;21(4):233–41.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* 2000 Nov 23;408(6811):488–92.
- Intemann CD, Thye T, Niemann S, Browne ENL, Amanua Chinbuah M, Enimil A, et al. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog.* 2009 set;5(9):e1000577.
- Isakson P, Bjørås M, Bøe SO, Simonsen A. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood.* 2010 Sep 30;116(13):2324–31.
- Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell.* 2012 Dec 7;151(6):1256–69.
- Jegga AG, Schneider L, Ouyang X, Zhang J. Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway. *Autophagy.* 2011 May;7(5):477–89.
- Jiang S, Dupont N, Castillo EF, Deretic V. Secretory versus degradative autophagy: unconventional secretion of inflammatory mediators. *J Innate Immun.* 2013;5(5):471–9.
- Jih MH, Kimyai-Asadi A, Levis WR. Reversal reaction to Hansen's disease. *J Drugs Dermatol.* 2002 Jul;1(1):70–1.
- Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011 Mar;7(3):279–96.

- Jopling WH. Clinical aspects of leprosy. *Tubercle*. 1982 Dec;63(4):295–305.
- Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin K-Q, et al. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Aug 28;104(35):14050–5.
- Juhasz G, Neufeld TP. Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol.* 2006 Feb;4(2):e36.
- Jullien D, Sieling PA, Uyemura K, Mar ND, Rea TH, Modlin RL. IL-15, an immunomodulator of T cell responses in intracellular infection. *J. Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):800–6.
- Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, et al. Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab.* 2008 Oct;8(4):318–24.
- Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5720–8.
- Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol.* 2014 Oct;71(4):795–803.
- Kang TJ, Chae GT. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2001 Jul;31(1):53–8.
- Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 1987c Oct 1;166(4):1098–108.
- Kaplan G, Mathur NK, Job CK, Nath I, Cohn ZA. Effect of multiple interferon gamma injections on the disposal of *Mycobacterium leprae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989 Oct;86(20):8073–7.
- Kaplan G, Nathan CF, Gandhi R, Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA. Effect of recombinant interferon-gamma on hydrogen peroxide-releasing capacity of monocyte-derived macrophages from patients with lepromatous leprosy. *J. Immunol.* 1986 Aug 1;137(3):983–7.
- Kaplan G, Nusrat A, Sarno EN, Job CK, McElrath J, Porto JA, et al. Cellular responses to the intradermal injection of recombinant human gamma-interferon in lepromatous leprosy patients. *Am. J. Pathol.* 1987a Aug;128(2):345–53.
- Kaplan G, Nusrat A, Witmer MD, Nath I, Cohn ZA. Distribution and turnover of Langerhans cells during delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.* 1987b Mar 1;165(3):763–76.
- Kar BR, Job CK. Reversal reaction and Mitsuda conversion in polar lepromatous leprosy: a case report. *Lepr Rev.* 2005 Sep;76(3):258–62.
- Karim AF, Chandra P, Chopra A, Siddiqui Z, Bhaskar A, Singh A, et al. Express path analysis identifies a tyrosine kinase Src-centric network regulating divergent host responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Biol. Chem.* 2011

nov 18;286(46):40307–19.

- Kasahara T, Hooks JJ, Dougherty SF, Oppenheim JJ. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J. Immunol.* 1983 abr;130(4):1784–9.
- Kathania M, Raje CI, Raje M, Dutta RK, Majumdar S. Bfl-1/A1 acts as a negative regulator of autophagy in mycobacteria infected macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011 abr;43(4):573–85.
- Kato L. Cholesterol dynamics in macrophages implication for the bacteriology and pathology of leprosy. *Acta Leprol.* 1979 Jun;(75):35–47.
- Khadge S, Banu S, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Goulart IM, Thapa P, et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis.* 2015 Oct 28;15:477.
- Kim B-H, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN- γ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science.* 2011 maio 6;332(6030):717–21.
- Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, Legaspi AJ, Rea TH, Shuai K, et al. A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J. Immunol.* 2001 jul 15;167(2):779–86.
- Kim J-J, Lee H-M, Shin D-M, Kim W, Yuk J-M, Jin HS, et al. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. *Cell Host Microbe.* 2012 May 17;11(5):457–68.
- Kim JK, Yuk J-M, Kim SY, Kim TS, Jin HS, Yang C-S, et al. MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. *J Immunol.* 2015 Jun 1;194(11):5355–65.
- Kimmey JM, Huynh JP, Weiss LA, Park S, Kambal A, Debnath J, et al. Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during *M. tuberculosis* infection. *Nature.* 2015 Dec 24;528(7583):565–9.
- Kimura T, Jain A, Choi SW, Mandell MA, Schroder K, Johansen T, et al. TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J Cell Biol.* 2015 Sep 14;210(6):973–89.
- Kimura T, Mandell M, Deretic V. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *J Cell Sci.* 2016 Mar 1;129(5):881–91.
- King KY, Lew JD, Ha NP, Lin JS, Ma X, Graviss EA, et al. Polymorphic allele of human IRGM1 is associated with susceptibility to tuberculosis in African Americans. *PLoS ONE.* 2011 Jan 21;6(1):e16317.
- Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1971 Sep;39(3):693–702.
- Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT. Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 Apr;2(4):301–14.

- Kirkin V, Lamark T, Johansen T, Dikic I. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy*. 2009 Jul;5(5):732–3.
- Kiszewski AEC, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br. J. Dermatol.* 2003 abr;148(4):795–8.
- Kleinnijenhuis J, Oosting M, Plantinga TS, van der Meer JWM, Joosten LAB, Crevel RV, et al. Autophagy modulates the Mycobacterium tuberculosis-induced cytokine response. *Immunology*. 2011 nov;134(3):341–8.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1–222.
- Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 2008 fev;4(2):151–75.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell*. 2003 Oct;5(4):539–45.
- Klionsky DJ, Eskelinen E-L, Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. *Autophagy*. 2014 Apr;10(4):549–51.
- Klionsky DJ. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008 Aug;4(6):740–3.
- Knorr RL, Lipowsky R, Dimova R. Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy*. 2015 Nov 2;11(11):2134–7.
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006 jun 15;441(7095):880–4.
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y-S, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 2007 dez 14;131(6):1149–63.
- Konopski Z, Seljelid R, Eskeland T. IFN-gamma inhibits internalization of soluble aminated beta-1,3-D-glucan by macrophages and thereby down-regulates the glucan induced release of TNF-alpha and IL-1 beta. *Scand. J. Immunol.* 1994 jul;40(1):57–63.
- Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008 Dec;9(12):1004–10.
- Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J. Immunol.* 2008 nov 15;181(10):7115–20.
- Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat. Med.* 2003 May;9(5):525–32.

- Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 2005 jun;11(6):653–60.
- Kumar D, Nath L, Kamal MA, Varshney A, Jain A, Singh S, et al. Genome-wide analysis of the host intracellular network that regulates survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 2010 mar 5;140(5):731–43.
- Kumar D, Rao KVS. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances. *Microbes Infect.* 2011 Feb;13(2):121–33.
- Kuo Y-Y, Chang Z-F. GATA-1 and Gfi-1B interplay to regulate Bcl-xL transcription. *Mol Cell Biol.* 2007 Jun;27(12):4261–72.
- Kyei GB, Dinkins C, Davis AS, Roberts E, Singh SB, Dong C, et al. Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* 2009 Jul 27;186(2):255–68.
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Dec;14(12):759–74.
- Languillon J, Carayon A. Lésions cutanées. In Masson, Précis de léprologie. 2. ed., Paris, 1986; 62-101.
- Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science.* 2007 Mar 9;315(5817):1398–401.
- Lee J-H, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell.* 2010 jun 25;141(7):1146–58.
- Legakis JE, Klionsky DJ. Part I. Introduction to Autophagy: Overview of Autophagy. In Deretic, V. Ed. *Autophagy in Immunity and Infection: A Novel Immune Effector*. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006; p. 3-17.
- Lerena MC, Colombo MI. *Mycobacterium marinum* induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell. Microbiol.* 2011 jun;13(6):814–35.
- Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2007 Oct;7(10):767–77.
- Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 2004 Apr;6(4):463–77.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature.* 2011 Jan 20;469(7330):323–35.
- Levine B. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature.* 2007 abr 12;446(7137):745–7.
- Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell.* 2005 Jan 28;120(2):159–62.
- Li F, Gao B, Xu W, Chen L, Xiong S. The Defect in Autophagy Induction by Clinical

Isolates of *Mycobacterium Tuberculosis* Is Correlated with Poor Tuberculosis Outcomes. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147810.

Li JCB, Au K, Fang J, Yim HCH, Chow K, Ho P, et al. HIV-1 trans-activator protein dysregulates IFN- γ signaling and contributes to the suppression of autophagy induction. *AIDS*. 2011 Jan 2;25(1):15–25.

Li X, Prescott M, Adler B, Boyce JD, Devenish RJ. Beclin 1 is required for starvation-enhanced, but not rapamycin-enhanced, LC3-associated phagocytosis of *Burkholderia pseudomallei* in RAW 264.7 cells. *Infect Immun*. 2013 Jan;81(1):271–7.

Liang C, Lee J, Inn K, Gack MU, Li Q, Roberts EA, et al. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol*. 2008 Jul;10(7):776–87.

Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabó G, Rual J-F, et al. A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell*. 2006 May 19;125(4):801–14.

Lin X, Zhang Y, Liu L, McKeehan WL, Shen Y, Song S, et al. FRS2 α is essential for the fibroblast growth factor to regulate the mTOR pathway and autophagy in mouse embryonic fibroblasts. *Int J Biol Sci*. 2011;7(8):1114–21.

Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJP, et al. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J. Exp. Med*. 2006 Sep 4;203(9):2063–71.

Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect. Immun*. 2001 maio;69(5):3413–7.

Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat. Med*. 2012;18(2):267–73.

Lobato LS, Rosa PS, Ferreira J da S, Neumann A da S, da Silva MG, do Nascimento DC, et al. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct;58(10):5766–74.

Lockwood D. Leprosy. *Clin Evid*. 2004 Dec;(12):1103–14.

Lockwood DN, Saunderson PR. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. *Int Health*. 2012 Jun;4(2):77–85.

Lockwood DNJ. The different aspects of leprosy chemotherapy. *Lepr Rev*. 2011 mar;82(1):1–2.

Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell*. 2002 set;10(3):457–68.

Lopez Roa RI, Guerrero Velásquez C, Alvarado Navarro A, Montoya Buelna M,

- Garcia Niebla C, Fafutis Morris M. Recovery of IFN-gamma levels in PBMCs from lepromatous leprosy patients through the synergistic actions of the cytokines IL-12 and IL-18. *Int. Immunopharmacol.* 2008 dez 20;8(13-14):1715–20.
- Lucio, R.; Alvarado, I.: Opúsculo sobre el mal de San Lázaro o elefanciásis de los Griegos. 1852. Reproducido en González Urueña, I.L.A.: *Lepra en México*. Edif. El Ateneo; Buenos Aires; 1941; pág. 199-234.
- Ma Y, Zhang L, Lu J, Shui T, Chen J, Yang J, et al. A Negative Feedback Loop Between Autophagy and Immune Responses in Mycobacterium leprae Infection. *DNA Cell Biol.* 2016 Nov 17.
- MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science.* 2003 out 24;302(5645):654–9.
- MacMicking JD. IFN-inducible GTPases and immunity to intracellular pathogens. *Trends Immunol.* 2004 Nov;25(11):601–9.
- Mahadevan PR, Antia NH. Biochemical alteration in cells following phagocytosis of M. leprae--the consequence--a basic concept. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1980 jun;48(2):167–71.
- Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 2007 May 16;26(10):2527–39.
- Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interferon Cytokine Res.* 2004 Aug;24(8):439–54.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* 2007 dez;6(6):458–71.
- Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1999 Sep;67(3):270–8.
- Mancias JD, Wang X, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature.* 2014 May 1;509(7498):105–9.
- Mandell MA, Jain A, Arko-Mensah J, Chauhan S, Kimura T, Dinkins C, et al. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell.* 2014 Aug 25;30(4):394–409.
- Mandell MA, Jain A, Kumar S, Castleman MJ, Anwar T, Eskelinen E-L, et al. TRIM17 contributes to autophagy of midbodies while actively sparing other targets from degradation. *J Cell Sci.* 2016 Oct 1;129(19):3562–73.
- Manjithaya R, Anjard C, Loomis WF, Subramani S. Unconventional secretion of Pichia pastoris Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 2010 fev 22;188(4):537–46.
- Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature.* 2013 Sep 26;501(7468):512–6.

- Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. *Cell Host Microbe*. 2012 May 17;11(5):469–80.
- Martens S, Howard J. The interferon-inducible GTPases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006;22:559–89.
- Martineau AR, Honecker FU, Wilkinson RJ, Griffiths CJ. Vitamin D in the treatment of pulmonary tuberculosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2007a mar;103(3-5):793–8.
- Martineau AR, Wilkinson RJ, Wilkinson KA, Newton SM, Kampmann B, Hall BM, et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007b jul 15;176(2):208–13.
- Martinez J, Almendinger J, Oberst A, Ness R, Dillon CP, Fitzgerald P, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Oct 18;108(42):17396–401.
- Martinez J, Cunha LD, Park S, Yang M, Lu Q, Orchard R, et al. Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*. 2016 May 5;533(7601):115–9.
- Martinez J, Malireddi RKS, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol.* 2015 Jul;17(7):893–906.
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat. Neurosci.* 2010 maio;13(5):567–76.
- Massey DCO, Bredin F, Parkes M. Use of sirolimus (rapamycin) to treat refractory Crohn's disease. *Gut*. 2008 set;57(9):1294–6.
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 2010 mar;87(3):371–84.
- Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, et al. Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell. Microbiol.* 2011a fev;13(2):259–73.
- Mattos KA, Oliveira VGC, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* 2014 Jun;16(6):797–815.
- Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J. Immunol.* 2011b set 1;187(5):2548–58.

- McPhee CK, Logan MA, Freeman MR, Baehrecke EH. Activation of autophagy during cell death requires the engulfment receptor Draper. *Nature*. 2010 Jun 24;465(7301):1093–6.
- Meijer AJ, Codogno P. Autophagy: a sweet process in diabetes. *Cell Metab*. 2008 out;8(4):275–6.
- Mira MT, Alcaïs A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*. 2004 Feb 12;427(6975):636–40.
- Misra N, Selvakumar M, Singh S, Bharadwaj M, Ramesh V, Misra RS, et al. Monocyte derived IL 10 and PGE2 are associated with the absence of Th 1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol. Lett*. 1995 dez;48(2):123–8.
- Mistry NF, Birdi TJ, Antia NH. *M. leprae* phagocytosis and its association with membrane changes in macrophages from leprosy patients. *Parasite Immunol*. 1986 Mar;8(2):129–38.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728–41.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008 Feb 28;451(7182):1069–75.
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998 Sep 24;395(6700):395–8.
- Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct*. 2002 Dec;27(6):421–9.
- Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 2007 Dec;3(6):542–5.
- Mizushima N. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*. 2005 nov;12 Suppl 2:1535–41.
- Modlin RL, Gersuk GM, Nelson EE, Pattengale PK, Gunter JR, Chen L, et al. T-lymphocyte clones from leprosy skin lesions. *Lepr Rev*. 1986 dez;57 Suppl 2:143–7.
- Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1988 fev;85(4):1213–7.
- Modlin RL, Rea TH. Immunopathology of leprosy granulomas. *Springer Semin. Immunopathol*. 1988;10(4):359–74.
- Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol*. 1994 jun;102(6):828–32.
- Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr. Opin. Immunol*. 2010 fev;22(1):48–54.

- Mohanty PS, Naaz F, Katara D, Misba L, Kumar D, Dwivedi DK, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2016 Feb;82(1):23–7.
- Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004 set;2(9):747–65.
- Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe.* 2009 Oct 22;6(4):343–53.
- Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv. Immunol.* 2010;105:1–24.
- Mortensen M, Ferguson DJP, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M, et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 jan 12;107(2):832–7.
- Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int. J. Dermatol.* 1998 out;37(10):733–40.
- Moura AC, Modolell M, Mariano M. Down-regulatory effect of *Mycobacterium leprae* cell wall lipids on phagocytosis, oxidative respiratory burst and tumour cell killing by mouse bone marrow derived macrophages. *Scand. J. Immunol.* 1997 nov;46(5):500–5.
- Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012 Nov;42(11):2925–36.
- Moura DF, Teles RMB, Ribeiro-Carvalho MM, Teles RB, Santos IMCF, Ferreira H, et al. Long-term culture of multibacillary leprosy macrophages isolated from skin lesions: a new model to study *Mycobacterium leprae*-human cell interaction. *Br. J. Dermatol.* 2007 Aug;157(2):273–83.
- Münz C. Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol.* 2009;27:423–49.
- Murray HW. Current and future clinical applications of interferon-gamma in host antimicrobial defense. *Intensive Care Med.* 1996 out;22 Suppl 4:S456–461.
- Murray HW. Interferon-gamma and host antimicrobial defense: current and future clinical applications. *Am. J. Med.* 1994 nov;97(5):459–67.
- Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J. Immunol.* 2007 jan 1;178(1):338–44.
- Musso T, Calosso L, Zucca M, Millesimo M, Ravarino D, Giovarelli M, et al. Human monocytes constitutively express membrane-bound, biologically active, and interferon-gamma-upregulated interleukin-15. *Blood.* 1999 maio 15;93(10):3531–9.

- Mustafa T, Bjune TG, Jonsson R, Pando RH, Nilsen R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand. J. Immunol.* 2001 dez;54(6):630–9.
- N'Diaye E-N, Kajihara KK, Hsieh I, Morisaki H, Debnath J, Brown EJ. PLIC proteins or ubiquilins regulate autophagy-dependent cell survival during nutrient starvation. *EMBO Rep.* 2009 Feb;10(2):173–9.
- Naafs B. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop Geogr Med.* 1994;46(2):80–4.
- Naderi beni F, Fattahi F, Mirshafiey A, Ansari M, Mohsenzadegan M, Movahedi M, et al. Increased production of nitric oxide by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on interferon-gamma treatment. *Int Immunopharmacol.* 2012 Apr;12(4):689–93.
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, et al. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science.* 2004 Nov 5;306(5698):1037–40.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee S-J, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat. Immunol.* 2011 mar;12(3):222–30.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell.* 2007 Jul 13;130(1):165–78.
- Narayan NP, Ramu G, Desikan KV, Vallishayee RS. Correlation of clinical, histological and immunological features across the leprosy spectrum. *Indian J Lepr.* 2001 Dec;73(4):329–42.
- Nath I, Van Rood JJ, Mehra NK, Vaidya MC. Natural suppressor cells in human leprosy: the role of HLA-D-identical peripheral lymphocytes and macrophages in the in vitro modulation of lymphoproliferative responses. *Clin. Exp. Immunol.* 1980 Nov;42(2):203–10.
- Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, et al. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. *Immunol. Lett.* 2000 dez 1;75(1):69–76.
- Nathan C, Squires K, Griffo W, Levis W, Varghese M, Job CK, et al. Widespread intradermal accumulation of mononuclear leukocytes in lepromatous leprosy patients treated systemically with recombinant interferon gamma. *J. Exp. Med.* 1990 Nov 1;172(5):1509–12.
- Nathan CF, Kaplan G, Levis WR, Nusrat A, Witmer MD, Sherwin SA, et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. *N. Engl. J. Med.* 1986 Jul 3;315(1):6–15.
- 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 Dec;40(6):363–70.

- Neyrolles O, Hernández-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornès P, Tailleux L, Barrios Payán JA, et al. Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence? PLoS ONE. 2006;1:e43.
- Ngo BT, Pascoe M, Khan D. Drug interaction between rifampicin and sirolimus in transplant patients. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2011 jan;22(1):112–5.
- Nguyen KB, Cousens LP, Doughty LA, Pien GC, Durbin JE, Biron CA. Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. Nat. Immunol. 2000 jul;1(1):70–6.
- Niida M, Tanaka M, Kamitani T. Downregulation of active IKK beta by Ro52-mediated autophagy. Mol Immunol. 2010 Aug;47(14):2378–87.
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, et al. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. Nature. 2009 oct 1;461(7264):654–8.
- Nixon RA. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? Trends Neurosci. 2006 Sep;29(9):528–35.
- Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. Autophagy targeting of Listeria monocytogenes and the bacterial countermeasure. Autophagy. 2011 mar;7(3):310–4.
- Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. Escape of intracellular Shigella from autophagy. Science. 2005 Feb 4;307(5710):727–31.
- Orvedahl A, Alexander D, Tallóczy Z, Sun Q, Wei Y, Zhang W, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. Cell Host Microbe. 2007 Mar 15;1(1):23–35.
- Orvedahl A, MacPherson S, Sumpter R Jr, Tallóczy Z, Zou Z, Levine B. Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. Cell Host Microbe. 2010 Feb 18;7(2):115–27.
- Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I, Marcel YL. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. Cell Metab. 2011 Jun 8;13(6):655–67.
- Ouimet M, Koster S, Sakowski E, Ramkhelawon B, van Solingen C, Oldebeken S, et al. Mycobacterium tuberculosis induces the miR-33 locus to reprogram autophagy and host lipid metabolism. Nat Immunol. 2016 Jun;17(6):677–86.
- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. Science. 2005 Jan 28;307(5709):593–6.
- Pampliega O, Orhon I, Patel B, Sridhar S, Díaz-Carretero A, Beau I, et al. Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. Nature. 2013 Oct 10;502(7470):194–200.
- Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Mar 18;105(11):4376–80.
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1

binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 2007 ago 17;282(33):24131–45.

Parihar SP, Guler R, Khutlang R, Lang DM, Hurdal R, Mhlanga MM, et al. Statin therapy reduces the mycobacterium tuberculosis burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J Infect Dis.* 2014 Mar 1;209(5):754–63.

Park H-J, Lee SJ, Kim S-H, Han J, Bae J, Kim SJ, et al. IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway. *Mol. Immunol.* 2011 jan;48(4):720–7.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genet.* 2007 jul;39(7):830–2.

Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005 Sep 23;122(6):927–39.

Pedro JMB-S, Wei Y, Sica V, Maiuri MC, Zou Z, Kroemer G, et al. BAX and BAK1 are dispensable for ABT-737-induced dissociation of the BCL2-BECN1 complex and autophagy. *Autophagy.* 2015;11(3):452–9.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev.* 2004 Dec;202:8–32.

Petruccioli E, Romagnoli A, Corazzari M, Coccia EM, Butera O, Delogu G, et al. Specific T cells restore the autophagic flux inhibited by Mycobacterium tuberculosis in human primary macrophages. *J Infect Dis.* 2012 May 1;205(9):1425–35.

Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11):e1000204.

Pilli M, Arko-Mensah J, Ponpuak M, Roberts E, Master S, Mandell MA, et al. TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation. *Immunity.* 2012 Aug 24;37(2):223–34.

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 fev;6(2):217–30.

Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 2009 Feb;11(2):181–90.

Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 May;74(5):868–79.

- Ponpuak M, Davis AS, Roberts EA, Delgado MA, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity*. 2010 Mar 26;32(3):329–41.
- Porcelli SA, Modlin RL. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:297–329.
- Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N, He Y-W. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J. Exp. Med.* 2007 Jan 22;204(1):25–31.
- Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J. Immunol.* 2009 Apr 1;182(7):4046–55.
- Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*. 2013 Sep 12;154(6):1285–99.
- Ramírez-Valle F, Braunstein S, Zavadil J, Formenti SC, Schneider RJ. eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J Cell Biol.* 2008 Apr 21;181(2):293–307.
- Ramjeet M, Hussey S, Philpott DJ, Travassos LH. “Nodophagy”: New crossroads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes*. 2010;1(5):307–15.
- Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 2001 ago;13(4):417–28.
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol.* 2010 Aug;12(8):747–57.
- Realegeno S, Kelly-Scumpia KM, Dang AT, Lu J, Teles R, Liu PT, et al. S100A12 Is Part of the Antimicrobial Network against *Mycobacterium leprae* in Human Macrophages. *PLoS Pathog.* 2016 Jun;12(6):e1005705.
- Rees RJ. LEPROA’s elective period student programme, 1973-1983. *Lepr Rev.* 1984 Dec;55(4):321–5.
- Reichen J, Stickel F, Bhattacharya I, Matschke K, Maller E, Korth-Bradley J. Repeat-dose sirolimus pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with hepatic allografts. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012 May;68(5):589–97.
- Renna M, Schaffner C, Brown K, Shang S, Tamayo MH, Hegyi K, et al. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 2011 set;121(9):3554–63.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1966 Sep;34(3):255–73.
- Ridley DS, Waters MF. Significance of variations within the lepromatous group. *Lepr Rev.* 1969 Jul;40(3):143–52.
- Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis.* 2011 Jun;11(6):464–70.

- Romagnoli A, Etna MP, Giacomini E, Pardini M, Remoli ME, Corazzari M, et al. ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy*. 2012 Sep;8(9):1357–70.
- Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology*. 1986 nov;59(3):333–8.
- Rothenberg C, Srinivasan D, Mah L, Kaushik S, Peterhoff CM, Ugolino J, et al. Ubiquitin functions in autophagy and is degraded by chaperone-mediated autophagy. *Hum Mol Genet*. 2010 Aug 15;19(16):3219–32.
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J. Infect. Dis*. 1999 jan;179(1):187–91.
- Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. *Nat Immunol*. 2009 Sep;10(9):943–8.
- Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2001 Aug;2(8):569–77.
- Ryter A, Frehel C, Rastogi N, David HL. Macrophage interaction with mycobacteria including *M. leprae*. *Acta Leprol*. 1984 Dec;2(2-4):211–26.
- Saiga H, Kitada S, Shimada Y, Kamiyama N, Okuyama M, Makino M, et al. Critical role of AIM2 in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Int Immunol*. 2012 Oct;24(10):637–44.
- Saiga H, Shimada Y, Takeda K. Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin. Dev. Immunol*. 2011;2011:347594.
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Dec 8;106(49):20842–6.
- Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009 dez 8;106(49):20842–6.
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008 nov 13;456(7219):264–8.
- Sakowski ET, Koster S, Portal Celhay C, Park HS, Shrestha E, Hetzenecker SE, et al. Ubiquitin 1 Promotes IFN-γ-Induced Xenophagy of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2015 Jul;11(7):e1005076.
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 1991 out 11;254(5029):279–82.
- Salgame PR, Mahadevan PR, Antia NH. Mechanism of immunosuppression in leprosy: presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. *Infect. Immun*. 1983 Jun;40(3):1119–26.

- Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguel CP, Viana SM, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.* 1993 ago;168(2):408–14.
- Sampaio EP, Malta AM, Sarno EN, Kaplan G. Effect of rhIFN-gamma treatment in multibacillary leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1996 Sep;64(3):268–73.
- Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J. Exp. Med.* 1992 Jun 1;175(6):1729–37.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 1991 mar 1;173(3):699–703.
- Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998 Jan;31(1):69–76.
- Samuel NM, Grange JM, Samuel S, Lucas S, Owilli OM, Adalla S, et al. A study of the effects of intradermal administration of recombinant gamma interferon in lepromatous leprosy patients. *Lepr Rev.* 1987 dez;58(4):389–400.
- Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature.* 2007 Dec 20;450(7173):1253–7.
- Sarkar S, Perlstein EO, Imarisio S, Pineau S, Cordenier A, Maglathlin RL, et al. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in Huntington's disease models. *Nat. Chem. Biol.* 2007 jun;3(6):331–8.
- 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 abr;84(1):103–8.
- Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1996 dez;64(4 Suppl):S69–73; discussion S73–74.
- Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J. Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1290–6.
- Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RMB, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med.* 2012 Mar 25;18(4):555–63.
- Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of Mycobacterium leprae by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J. Immunol.* 1991 Sep 15;147(6):1983–94.
- Schmid D, Münz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity.*

2007 Jul;27(1):11–21.

- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Dec 4;104(49):19500–5.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006 abr;19(2):338–81.
- Sehgal VN, Joginder, Sharma VK. Immunology of leprosy. A comprehensive survey. *Int. J. Dermatol.* 1989 nov;28(9):574–84.
- Sekar B, Arunagiri K, Kumar BN, Narayanan S, Menaka K, Oommen PK. Detection of mutations in *folp1*, *rpoB* and *gyrA* genes of *M. leprae* by PCR- direct sequencing--a rapid tool for screening drug resistance in leprosy. *Lepr Rev.* 2011 mar;82(1):36–45.
- Selvaraj P. Vitamin D, vitamin D receptor, and cathelicidin in the treatment of tuberculosis. *Vitam. Horm.* 2011;86:307–25.
- Sen GC. Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001;55:255–81.
- Seto S, Tsujimura K, Koide Y. Coronin-1a inhibits autophagosome formation around *Mycobacterium tuberculosis*-containing phagosomes and assists mycobacterial survival in macrophages. *Cell Microbiol.* 2012 May;14(5):710–27.
- Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ.* 2013 Jan;20(1):21–30.
- Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr.* 1962 Sep;30:291–306.
- Shi C-S, Kehrl JH. TRAF6 and A20 regulate lysine 63-linked ubiquitination of Beclin-1 to control TLR4-induced autophagy. *Sci Signal.* 2010;3(123):ra42.
- Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol.* 2012 Jan 29;13(3):255–63.
- Shi J, Fung G, Piesik P, Zhang J, Luo H. Dominant-negative function of the C-terminal fragments of NBR1 and SQSTM1 generated during enteroviral infection. *Cell Death Differ.* 2014 Sep;21(9):1432–41.
- Shi J, Wong J, Piesik P, Fung G, Zhang J, Jagdeo J, et al. Cleavage of sequestosome 1/p62 by an enteroviral protease results in disrupted selective autophagy and impaired NF κ B signaling. *Autophagy.* 2013 Oct;9(10):1591–603.
- Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, et al. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009 maio 1;382(2):419–23.
- Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, Ueno T, Nishimura T, Inoue T, et al. LC3, a microtubule-associated protein1A/B light chain3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010 mar 5;393(2):274–9.

- Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res.* 2014 Jan;24(1):58–68.
- Shin D-M, Jeon B-Y, Lee H-M, Jin HS, Yuk J-M, Song C-H, et al. Mycobacterium tuberculosis eis regulates autophagy, inflammation, and cell death through redox-dependent signaling. *PLoS Pathog.* 2010a;6(12):e1001230.
- Shin D-M, Yuk J-M, Lee H-M, Lee S-H, Son JW, Harding CV, et al. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell. Microbiol.* 2010b nov;12(11):1648–65.
- Shpilka T, Welter E, Borovsky N, Amar N, Mari M, Reggiori F, et al. Lipid droplets and their component triglycerides and steryl esters regulate autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2015 Aug 13;34(16):2117–31.
- Shui W, Petzold CJ, Redding A, Liu J, Pitcher A, Sheu L, et al. Organelle membrane proteomics reveals differential influence of mycobacterial lipoglycans on macrophage phagosome maturation and autophagosome accumulation. *J. Proteome Res.* 2011 jan 7;10(1):339–48.
- Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, et al. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science.* 1995 jul 14;269(5221):227–30.
- Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J. Immunol.* 1999 fev 1;162(3):1851–8.
- Sieling PA, Modlin RL. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology.* 1994a out;191(4-5):378–87.
- Sieling PA, Modlin RL. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1994b ago 15;730:42–52.
- Sieling PA, Torrelles JB, Stenger S, Chung W, Burdick AE, Rea TH, et al. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J. Immunol.* 2005 mar 1;174(5):2637–44.
- Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J. Immunol.* 1994 out 15;153(8):3639–47.
- Silva BJ de A, Barbosa MG de M, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA da C, Côte-Real S, et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog.* 2017 Jan;13(1):e1006103.
- Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *J. Infect. Dis.* 1989 abr;159(4):787–90.
- Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015 Apr 7;112(14):4459–64.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy

regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009 abr 30;458(7242):1131–5.

- Singh S, Narayanan NP, Jenner PJ, Ramu G, Colston MJ, Prasad HK, et al. Sera of leprosy patients with type 2 reactions recognize selective sequences in *Mycobacterium leprae* recombinant LSR protein. *Infect. Immun.* 1994 Jan;62(1):86–90.
- Singh SB, Davis AS, Taylor GA, Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*. 2006 set 8;313(5792):1438–41.
- Singh SB, Ornatowski W, Vergne I, Naylor J, Delgado M, Roberts E, et al. Human IRGM regulates autophagy and cell-autonomous immunity functions through mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 2010 dez;12(12):1154–65.
- 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.
- Sivaprasad U, Basu A. Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumour necrosis factor-alpha-induced cell death in MCF-7 cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2008 Aug;12(4):1265–71.
- Soilleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, et al. DC-SIGN association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J. Pathol.* 2006 Jun;209(2):182–9.
- Stanley SA, Cox JS. Host-pathogen interactions during *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;374:211–41.
- Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol.* 2014 Jun;16(6):495–501.
- Subramani S, Malhotra V. Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep.* 2013 Feb;14(2):143–51.
- Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Dec 9;105(49):19211–6.
- Suzuki K, Takeshita F, Nakata N, Ishii N, Makino M. Localization of CORO1A in the macrophages containing *Mycobacterium leprae*. *Acta Histochem Cytochem.* 2006 ago 30;39(4):107–12.
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D362–8.
- Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh C-W, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J. Cell Biol.* 2010 set 6;190(5):881–92.
- Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, et al. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell.* 1999 May;10(5):1367–79.

- Tanigawa K, Suzuki K, Kimura H, Takeshita F, Wu H, Akama T, et al. Tryptophan aspartate-containing coat protein (CORO1A) suppresses Toll-like receptor signalling in *Mycobacterium leprae* infection. *Clin. Exp. Immunol.* 2009 Jun;156(3):495–501.
- Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, Ling A, Soares F, Carneiro LAM, et al. Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host Microbe.* 2012 Jun 14;11(6):563–75.
- Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 2004 fev;4(2):100–9.
- Taylor MP, Burgon TB, Kirkegaard K, Jackson WT. Role of microtubules in extracellular release of poliovirus. *J. Virol.* 2009 jul;83(13):6599–609.
- Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, et al. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science.* 2013 Mar 22;339(6126):1448–53.
- Teles RMB, Kelly-Scumpia KM, Sarno EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, et al. IL-27 Suppresses Antimicrobial Activity in Human Leprosy. *J Invest Dermatol.* 2015 Oct;135(10):2410–7.
- Teles RMB, Kelly-Scumpia KM, Sarno EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, et al. IL-27 Suppresses Antimicrobial Activity in Human Leprosy. *J Invest Dermatol.* 2015 Oct;135(10):2410–7.
- Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* 2009 Nov;10(11):1215–21.
- Thurston TLM, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A, Randow F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature.* 2012 Jan 15;482(7385):414–8.
- Torrelles JB, Sieling PA, Arcos J, Knaup R, Bartling C, Rajaram MVS, et al. Structural differences in lipomannans from pathogenic and nonpathogenic mycobacteria that impact CD1b-restricted T cell responses. *J. Biol. Chem.* 2011 out 14;286(41):35438–46.
- Tousif S, Singh Y, Prasad DVR, Sharma P, Van Kaer L, Das G. T cells from Programmed Death-1 deficient mice respond poorly to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS ONE.* 2011;6(5):e19864.
- Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 2010 jan;11(1):55–62.
- Triccas JA, Roche PW, Winter N, Feng CG, Butlin CR, Britton WJ. A 35-kilodalton protein is a major target of the human immune response to *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 1996 dez;64(12):5171–7.
- Trombone APF, Pedrini SCB, Diório SM, Belone A de FF, Fachin LRV, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude

- mice. *J Vis Exp*. 2014 Mar 23;(85).
- Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H, Mizushima N. The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science*. 2016 Nov 25;354(6315):1036–41.
- Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1993 Oct 25;333(1–2):169–74.
- Tu SP, Quante M, Bhagat G, Takaishi S, Cui G, Yang XD, et al. IFN- γ inhibits gastric carcinogenesis by inducing epithelial cell autophagy and T-cell apoptosis. *Cancer Res*. 2011 Jun 15;71(12):4247–59.
- Universidade de Stanford. A photomicrograph of *M. leprae* from a leprosy skin lesion (CDC) [Internet]. *Leprosy. Biological Characteristics. Infectious Agent*. 2005 [acesso em: 20 de agosto de 2016]. Disponível em: <http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2005/Leprosy/bio.htm>.
- Ustianowski AP, Lockwood DNJ. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2003 Out;16(5):421-427.
- Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. *Lepr Rev*. 1994 Sep;65(3):190–203.
- van der Vaart M, Korbee CJ, Lamers GEM, Tengeler AC, Hosseini R, Haks MC, et al. The DNA damage-regulated autophagy modulator DRAM1 links mycobacterial recognition via TLR-MYD88 to autophagic defense [corrected]. *Cell Host Microbe*. 2014 Jun 11;15(6):753–67.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1287–98.
- Van Voorhis WC, Kaplan G, Sarno EN, Horwitz MA, Steinman RM, Levis WR, et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N. Engl. J. Med*. 1982 dez 23;307(26):1593–7.
- Vázquez CL, Colombo MI. *Coxiella burnetii* modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. *Cell Death Differ*. 2010 Mar;17(3):421–38.
- Vergne I, Roberts E, Elmaoued RA, Tosch V, Delgado MA, Proikas-Cezanne T, et al. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *EMBO J*. 2009 Aug 5;28(15):2244–58.
- Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J. Cell. Sci*. 1998 Apr;111 (Pt 7):897–905.
- Virchow R. *Die krankhaften Geschwülste*. Berlin, Germany, August Hirschwald, 1863; 208 pp.
- Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2001;2(8):REVIEWS1023.
- Vital RT, Illarramendi X, Antunes SLG, Nascimento M, Da Costa Nery JA,

- Nascimento O, et al. Isolated median neuropathy as the first symptom of leprosy. *Muscle Nerve*. 2013 Aug;48(2):179–84.
- Walker SL, Waters MFR, Lockwood DNJ. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev*. 2007 Sep;78(3):197–215.
- Walsh DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KSA. TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2004 Jul 1;41(3):265–9.
- Wan G, Zhaorigetu S, Liu Z, Kaini R, Jiang Z, Hu CA. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *J Biol Chem*. 2008 Aug 1;283(31):21540–9.
- Wang J, Yang K, Zhou L, Minhaowu null, Wu Y, Zhu M, et al. MicroRNA-155 promotes autophagy to eliminate intracellular mycobacteria by targeting Rheb. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003697.
- Wang Z, Cao L, Kang R, Yang M, Liu L, Zhao Y, et al. Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RAR α oncoprotein. *Autophagy*. 2011 Apr;7(4):401–11.
- Wassermann R, Gulen MF, Sala C, Perin SG, Lou Y, Rybniker J, et al. Mycobacterium tuberculosis Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1. *Cell Host Microbe*. 2015 Jun 10;17(6):799–810.
- Watson RO, Bell SL, MacDuff DA, Kimmey JM, Diner EJ, Olivas J, et al. The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe*. 2015 Jun 10;17(6):811–9.
- Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*. 2012 Aug 17;150(4):803–15.
- Weichhart T, Hengstschläger M, Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct;15(10):599–614.
- WHO, World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical Report Series. Geneva, 1982; 675.
- WHO, World Health Organization. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *Wkly Epidemiol Rec*. 2016 Sep 2;91(35):405–20.
- WHO, World Health Organization. Laboratory Techniques for Leprosy, WHO/CSD/LEP/86.4. 1987; 30-35.
- WHO, World Health Organization. Surveillance of drug resistance in leprosy: 2010. *Wkly. Epidemiol. Rec*. 2011 Jun 3;86(23):237.
- Wu T, Li Y, Huang D, Han F, Zhang Y-Y, Zhang D-W, et al. Regulator of G-protein signaling 19 (RGS19) and its partner G α -inhibiting activity polypeptide 3 (GNAI3) are required for zVAD-induced autophagy and cell death in L929 cells. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e94634.

- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006 Feb 10;124(3):471–84.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102–9.
- Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):277–9.
- Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 1992 ago 15;149(4):1470–5.
- Yang D, Chen J, Shi C, Jing Z, Song N. Autophagy gene polymorphism is associated with susceptibility to leprosy by affecting inflammatory cytokines. *Inflammation*. 2014 Apr;37(2):593–8.
- Yang D, Chen J, Zhang L, Cha Z, Han S, Shi W, et al. *Mycobacterium leprae* upregulates IRGM expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Inflammation*. 2014 Aug;37(4):1028–34.
- Yano T, Mita S, Ohmori H, Oshima Y, Fujimoto Y, Ueda R, et al. Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat. Immunol.* 2008 ago;9(8):908–16.
- Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Yoshida M, Fukumatsu M, Kim M, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nat. Cell Biol.* 2009 out;11(10):1233–40.
- Yuk J-M, Shin D-M, Lee H-M, Yang C-S, Jin HS, Kim K-K, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe*. 2009 Sep 17;6(3):231–43.
- Zhang C, Cuervo AM. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance and hepatic function. *Nat. Med.* 2008 set;14(9):959–65.
- Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 2009 dez 31;361(27):2609–18.
- Zhang L, Zhang H, Zhao Y, Mao F, Wu J, Bai B, et al. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6/CFP-10 Fusion Protein on the Autophagy Function of Mouse Macrophages. *DNA Cell Biol.* 2012 fev;31(2):171–9.
- Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, et al. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe*. 2008 Nov 13;4(5):458–69.
- Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* 2009 Nov 1;183(9):5909–16.
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011 Jan 13;469(7329):221–5.

Zullo AJ, Lee S. Mycobacterial induction of autophagy varies by species and occurs independently of mammalian target of rapamycin inhibition. *J Biol Chem.* 2012 Apr 13;287(16):12668–78.

8 APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes tuberculoides e lepromatosos

Os RNAsm purificados de lesões cutâneas de pacientes tuberculoides e lepromatosos foram analisados por RT-qPCR utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia. Os genes relacionados à autofagia diferencialmente expressos entre os grupos de hanseníase foram identificados pelos critérios de “fold-change” (\geq “1,5-fold”) e teste-t moderado ($P < 0,05$) usando a uma abordagem bayesiana empírica no software de análise estatística R e então subcategorizados. Os nomes completos, as categorias, e os valores de “fold” e P dos genes com expressão aumentada nas lesões de pacientes hansenícos foram tabulados. Os dados mostrados neste apêndice estão ligados aos experimentos descritos na figura 3.8. Os dados são representativos de quatro amostras de pacientes tuberculoides e sete amostras de lepromatosos.

Apêndice A. Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes tuberculoídes e lepromatosos. São mostrados os genes aumentados nos pacientes tuberculoídes.

Símbolo	Nome	Categoria	logFC	P valor
BECN1	Beclin 1, autophagy-related	Autofagia	12,112545967	0,010487812
GPSM3	G-protein signaling modulator 3	Reguladores da autofágicos	10,410297394	0,027737713
BARKOR	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator (ATG14, autophagy related 14)	Autofagia	10,347899914	0,028682076
APOL1	Apolipoprotein L1	Reguladores da autofágicos	10,134815852	0,032119103
TPR	Translocated promoter region, nuclear basket protein	Reguladores da autofágicos	9,477239909	0,045038372
EPS15L1	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like1	Reguladores da autofágicos	8,881702820	0,060288951
SEC24C	SEC24 homolog C, COPII coat complex component	Reguladores da autofágicos	8,851692120	0,061159248
PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	Autofagia	8,400307814	0,075554484
SEC24D	SEC24 homolog D, COPII coat complex component	Reguladores da autofágicos	8,325125058	0,078202221
GF11B	Growth factor independent 1B transcription repressor	Reguladores da autofágicos	8,204761664	0,082598257
FRS3	Fibroblast growth factor receptor substrate 3	Reguladores da autofágicos	8,181941425	0,083453946
LETM1	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1	Reguladores da autofágicos	7,990461191	0,090920683
UVRAG	UV radiation resistance associated gene	Reguladores da autofágicos	7,716476440	0,102531059
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	Reguladores da autofágicos	7,657677333	0,105170611
BAX	BCL2-associated X protein	Reguladores da autofágicos	7,262591039	0,124333765
ATF4	Activating transcription factor 4	Reguladores da autofágicos	7,088622570	0,133593441
MAP1LC3C	Microtubule associated protein 1 light chain 3 gamma	Autofagia	6,890257225	0,14479438
RASD1	Ras related dexamethasone induced 1	Reguladores da autofágicos	6,866842588	0,146162747
ATG16L2	Autophagy related 16 like 2	Autofagia	6,809968313	0,149527803
BECN1L1	Beclin-1-like protein 1 (BECN2, beclin 2)	Autofagia	6,606868108	0,162029116
SEC24A	SEC24 homolog A, COPII coat complex component	Reguladores da autofágicos	6,287292957	0,183277265
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	Reguladores da autofágicos	6,147480647	0,193198235
SEC16A	SEC16 homolog A, endoplasmic reticulum export factor	Reguladores da autofágicos	6,061592738	0,19948566
FKBP15	FK506 binding protein 15	Reguladores da autofágicos	5,797624270	0,219744829
SH3GLB1	SH3-domain GRB2 like endophilin B1	Reguladores da autofágicos	5,388112545	0,254033494
ATG4B	Autophagy related 4B cysteine peptidase	Autofagia	5,060172081	0,28405979
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	Autofagia	5,000853380	0,289738207
ATG4C	Autophagy related 4C cysteine peptidase	Autofagia	4,907637755	0,298815278
TP73	Tumor protein p73	Reguladores da autofágicos	4,887839317	0,300767425
RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR complex 2	Reguladores da autofágicos	4,851568222	0,30436584
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein	Reguladores lisossomais	4,779955864	0,311554209
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein	Autofagia	4,779955864	0,311554209
ATG3	Autophagy related 3	Autofagia	4,719157378	0,317744446
WIPI1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	Autofagia	4,651419163	0,324735752
SEC23B	SEC23 homolog B, coat complex II component	Reguladores da autofágicos	4,599661350	0,330144824
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	Reguladores da autofágicos	4,520702362	0,33850856
ULK4	Unc-51 like kinase 4	Autofagia	4,485302448	0,342302171
TP53	Tumor protein p53	Reguladores da autofágicos	4,437484503	0,347469635
ATG10	Autophagy related 10	Autofagia	4,341372649	0,358005543
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1	Lisossomo	4,273154497	0,365604633
LAMP2	Lysosomal associated membrane protein 2	Lisossomo	4,225989819	0,370917043
EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Reguladores da autofágicos	4,215900103	0,372059706
ATG7	Autophagy related 7	Autofagia	4,138424238	0,380906573
RAPTOR	Regulatory associated protein of MTOR complex 1 (RPTOR)	Reguladores da autofágicos	3,893633207	0,409699013
PPM1K	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent 1K	Reguladores da autofágicos	3,855040630	0,414353816
ATG2B	Autophagy related 2B	Autofagia	3,674368382	0,436558603
ATG4D	ATG4 autophagy related 4 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	Autofagia	3,619008223	0,443497507
ATG9A	Autophagy related 9A	Autofagia	3,426631292	0,46809526
MCL1	Myeloid cell leukemia 1	Reguladores da autofágicos	3,379565477	0,47422649
MAP1LC3A	Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	Autofagia	3,364586130	0,476187075
BCL2L1	BCL2 like 1 (Bcl-xL)	Reguladores da autofágicos	3,295661926	0,485265388
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	Reguladores da autofágicos	3,294582049	0,485408367
ATG5	Autophagy related 5	Autofagia	3,002116362	0,524959459
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	Reguladores da autofágicos	2,999415954	0,525332198
LAMP3	Lysosomal associated membrane protein 3	Reguladores lisossomais	2,900415897	0,539090252
LETM2	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 2	Reguladores da autofágicos	2,848992507	0,546307297
ATG2A	Autophagy related 2A	Autofagia	2,826018874	0,549546979
ULK3	Unc-51 like kinase 3	Autofagia	2,657692750	0,573569335
GABARAPL2	GABA type A receptor associated protein like 2	Autofagia	2,563818614	0,587179599
ATG12	Autophagy related 12	Autofagia	2,444878101	0,60463611
RB1CC1	RB1 inducible coiled-coil 1	Autofagia	2,399752299	0,611319593
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1	Autofagia	2,295726935	0,626849994
ATG4A	Autophagy related 4A cysteine peptidase	Autofagia	2,141454617	0,650188728
ATG16L1	Autophagy related 16 like 1	Autofagia	2,058241844	0,662923566
MAP1LC3B	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	Autofagia	2,056403637	0,663206007
HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	Reguladores da autofágicos	2,055038055	0,66341586
GNAI3	G protein subunit alpha i3	Reguladores da autofágicos	1,999687036	0,671943931
GPSM2	G-protein signaling modulator 2	Reguladores da autofágicos	1,502109369	0,750396614
AMBRA1	Autophagy/beclin-1 regulator 1	Reguladores da autofágicos	1,379144192	0,770228098
FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (MTOR, mechanistic target of rapamycin)	Reguladores da autofágicos	0,365560137	0,938288734
MAP1LC3B2	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta 2	Autofagia	0,293756167	0,950392591
GPSM1	G-protein signaling modulator 1	Reguladores da autofágicos	0,050922553	0,991395177

Apêndice A. Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes tuberculoides e lepromatosos. São mostrados os genes aumentados nos pacientes lepromatosos.

Símbolo	Nome	Categoria	logFC	P valor
ULK2	Unc-51 like autophagy activating kinase 2	Autofagia	5,540986220	0,240820832
SH3GLB2	SH3-domain GRB2-like endophilin B2	Reguladores autofágicos	4,813948313	0,308128212
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2alpha)	Reguladores autofágicos	3,548045794	0,452483685
EIF4EBP2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	Reguladores autofágicos	3,452830156	0,464701507
GABARAPL1	GABA type A receptor associated protein like 1	Autofagia	3,366276582	0,475965596
DRAM	DNA damage regulated autophagy modulator (DRAM1)	Reguladores autofágicos	2,957193057	0,531177835
DRAM	DNA damage regulated autophagy modulator (DRAM1)	Reguladores lisossomais	2,957193057	0,531177835
GBL	G protein beta subunit-like (MLST8, MTOR associated protein, LST8 homolog)	Reguladores autofágicos	2,783544540	0,555561484
SEC16B	SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor	Reguladores autofágicos	2,382787103	0,613840727
WIPI2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	Autofagia	2,212980111	0,639323557
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Reguladores autofágicos	1,699690978	0,718879584
WDR45L	WD repeat domain 45-like (WDR45B, WD repeat domain 45B)	Autofagia	1,613892078	0,732510544
SEC23A	SEC23 homolog A, coat complex II component	Reguladores autofágicos	1,531196753	0,745729009
SNX30	Sorting nexin family member 30 (ATG24A)	Reguladores autofágicos	1,243249575	0,792320791
RGS19	Regulator of G-protein signaling 19	Reguladores autofágicos	1,110677878	0,814035666
SQSTM1	Sequestosome 1 (p62)	Reguladores autofágicos	0,479152044	0,919171015
SEC24B	SEC24 homolog B, COPII coat complex component	Reguladores autofágicos	0,455978235	0,923067773
AKT1S1	AKT1 substrate 1 (proline rich)	Reguladores autofágicos	0,157266299	0,973429762

APÊNDICE B – Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes lepromatosos com ou sem reação reversa.

Os RNAsm purificados de lesões cutâneas de pacientes lepromatosos com ou sem reação reversa foram analisados por RT-qPCR utilizando um kit de PCR “array” da via de autofagia. Os genes relacionados à autofagia diferencialmente expressos entre os grupos de hanseníase foram identificados pelos critérios de “fold-change” (\geq “1,5-fold”) e teste-t moderado ($P < 0,05$) usando a uma abordagem bayesiana empírica no software de análise estatística R e então subcategorizados. Os nomes completos, as categorias, e os valores de “fold” e P dos genes com expressão aumentada nas lesões de pacientes hansenícos foram tabulados. Os dados mostrados neste apêndice estão ligados aos experimentos descritos na figura 4.1. Os dados são representativos de sete amostras de cada grupo de pacientes.

Apêndice B. Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes lepromatosos com ou sem reação reversa. São mostrados os genes aumentados nos pacientes lepromatosos sem reação reversa.

Símbolo	Nome	Categoria	logFC	P valor
BCL2L1	BCL2 like 1 (Bcl-xL)	Reguladores autofágicos	7,404064451	0,069890816
ULK2	Unc-51 like autophagy activating kinase 2	Autofagia	7,266454106	0,075242341
EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Reguladores autofágicos	7,192275365	0,078263298
WIPI2	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	Autofagia	6,921011834	0,090162517
MAP1LC3B2	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta 2	Autofagia	6,420499847	0,115913884
SEC24C	SEC24 homolog C, COPII coat complex component	Reguladores autofágicos	5,885327657	0,149511265
EIF4EBP2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	Reguladores autofágicos	5,864554723	0,150951623
RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR complex 2	Reguladores autofágicos	5,620503834	0,168675528
ATG4A	Autophagy related 4A cysteine peptidase	Autofagia	5,455712773	0,181499532
MAP1LC3B	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	Autofagia	5,285903522	0,195457911
PPM1K	Protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1K	Reguladores autofágicos	5,110946610	0,21064765
ATG16L2	Autophagy related 16 like 2	Autofagia	4,785971732	0,241096194
MCL1	Myeloid cell leukemia 1	Reguladores autofágicos	4,740543365	0,245588201
RB1CC1	RB1 inducible coiled-coil 1	Autofagia	3,826876822	0,348524309
AKT1S1	AKT1 substrate 1 (proline rich)	Reguladores autofágicos	3,676917984	0,367728515
RGS19	Regulator of G-protein signaling 19	Reguladores autofágicos	3,379249119	0,407759293
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Reguladores autofágicos	3,295582590	0,419462725
FKBP15	FK506 binding protein 15	Reguladores autofágicos	3,232980229	0,428347632
ATG9A	Autophagy related 9A	Autofagia	3,079376584	0,450606932
GBL	G protein beta subunit-like (MLST8, MTOR associated protein, LST8 homolog)	Reguladores autofágicos	3,038427217	0,456649977
ATG4D	ATG4 autophagy related 4 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>)	Autofagia	2,957916441	0,468663222
TP53	Tumor protein p53	Reguladores autofágicos	2,913345882	0,475388332
GABARAPL2	GABA type A receptor associated protein like 2	Autofagia	2,573019209	0,528445229
SNX30	Sorting nexin family member 30 (ATG24A)	Reguladores autofágicos	2,514949481	0,537790839
ULK3	Unc-51 like kinase 3	Autofagia	2,505859738	0,53926121
LAMP1	Lysosomal associated membrane protein 1	Lisossomo	2,500146730	0,540186386
DRAM	DNA damage regulated autophagy modulator (DRAM1)	Reguladores autofágicos	2,388674554	0,558396007
DRAM	DNA damage regulated autophagy modulator (DRAM1)	Reguladores lisossomais	2,388674554	0,558396007
SQSTM1	Sequestosome 1 (p62)	Reguladores autofágicos	2,374598685	0,560716457
ATG16L1	Autophagy related 16 like 1	Autofagia	2,363638605	0,562526493
PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 4	Autofagia	2,304099537	0,572408306
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	Reguladores autofágicos	2,247153555	0,581936313
SEC24B	SEC24 homolog B, COPII coat complex component	Reguladores autofágicos	2,213601294	0,58758469
ATG4C	Autophagy related 4C cysteine peptidase	Autofagia	2,041461854	0,616955095
ATG2A	Autophagy related 2A	Autofagia	1,679838226	0,680648
ATG2B	Autophagy related 2B	Autofagia	1,516037669	0,710303065
ATG3	Autophagy related 3	Autofagia	1,465576626	0,719530518
SH3GLB1	SH3-domain GRB2 like endophilin B1	Reguladores autofágicos	1,369713783	0,737172507
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3	Autofagia	1,333534332	0,743867553
EIF4EBP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	Reguladores autofágicos	0,984295618	0,809423131
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	Reguladores autofágicos	0,782053312	0,848041189
BAX	BCL2-associated X protein	Reguladores autofágicos	0,777029764	0,849005509
WIPI1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1	Autofagia	0,435572352	0,915007605
ATG12	Autophagy related 12	Autofagia	0,422751563	0,917500217
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein	Reguladores lisossomais	0,367781367	0,928196404
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein	Autofagia	0,367781367	0,928196404
ATG7	Autophagy related 7	Autofagia	0,291080157	0,943142361
ATG10	Autophagy related 10	Autofagia	0,266023273	0,948029539
GABARAPL1	GABA type A receptor associated protein like 1	Autofagia	0,235481853	0,95398907
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase 1	Autofagia	0,033022653	0,99354417

Apêndice B. Análise de expressão de genes da via autofágica em lesões de pele de pacientes lepromatosos com ou sem reação reversa.

São mostrados os genes aumentados nos pacientes lepromatosos com reação reversa.

Símbolo	Nome	Categoria	logFC	P valor
TPR	Translocated promoter region, nuclear basket protein	Reguladores autofágicos	13,651891890	0,000851764
GF11B	Growth factor independent 1B transcription repressor	Reguladores autofágicos	12,053015664	0,003212581
GNAI3	G protein subunit alpha i3	Reguladores autofágicos	8,490326109	0,03770984
BECN1	Beclin 1, autophagy-related	Autofagia	6,571161543	0,107616076
SEC16A	SEC16 homolog A, endoplasmic reticulum export factor	Reguladores autofágicos	6,512088594	0,110811602
SH3GLB2	SH3-domain GRB2-like endophilin B2	Reguladores autofágicos	6,249607540	0,125926702
GPSM1	G-protein signaling modulator 1	Reguladores autofágicos	4,932846978	0,226970571
SEC16B	SEC16 homolog B, endoplasmic reticulum export factor	Reguladores autofágicos	4,859769821	0,233923057
GPSM2	G-protein signaling modulator 2	Reguladores autofágicos	4,761436780	0,243514989
SEC23A	SEC23 homolog A, coat complex II component	Reguladores autofágicos	4,609118507	0,258913525
TP73	Tumor protein p73	Reguladores autofágicos	4,171904700	0,306813111
LETM2	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 2	Reguladores autofágicos	4,112952187	0,313695126
BECN1L1	Beclin-1-like protein 1 (BECN2, beclin 2)	Autofagia	3,755397433	0,357597225
RASD1	Ras related dexamethasone induced 1	Reguladores autofágicos	3,421989078	0,401856725
BARKOR	Beclin 1-associated autophagy-related key regulator (ATG14, autophagy related 14)	Autofagia	3,371478762	0,408837944
LETM1	Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1	Reguladores autofágicos	3,275557018	0,422923003
RAPTOR	Regulatory associated protein of MTOR, complex 1 (RPTOR)	Reguladores autofágicos	2,777682622	0,496180662
APOL1	Apolipoprotein L1	Reguladores autofágicos	2,731225241	0,503411015
MAP1LC3C	Microtubule associated protein 1 light chain 3 gamma	Autofagia	2,703145618	0,507808032
FRS3	Fibroblast growth factor receptor substrate 3	Reguladores autofágicos	2,659409251	0,514696755
UVRAG	UV radiation resistance associated gene	Reguladores autofágicos	2,388590676	0,558409821
SEC24A	SEC24 homolog A, COPII coat complex component	Reguladores autofágicos	2,089568411	0,608682349
BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5	Reguladores autofágicos	1,770773706	0,664392194
ATF4	Activating transcription factor 4	Reguladores autofágicos	1,730663300	0,671543494
SEC24D	SEC24 homolog D, COPII coat complex component	Reguladores autofágicos	1,702644666	0,676556723
SEC23B	SEC23 homolog B, coat complex II component	Reguladores autofágicos	1,682110241	0,680239996
ULK4	Unc-51 like kinase 4	Autofagia	1,675467627	0,681433128
MAP1LC3A	Microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha	Autofagia	1,536502021	0,706572893
FRS2	Fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2alpha)	Reguladores autofágicos	1,461156346	0,7203408
WDR45L	WD repeat domain 45-like (WDR45B, WD repeat domain 45B)	Autofagia	1,413054602	0,729178502
HSPA5	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	Reguladores autofágicos	1,294408162	0,751129768
EPS15L1	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like1	Reguladores autofágicos	1,028395471	0,801060221
GPSM3	G-protein signaling modulator 3 (AGS3-like, <i>C. elegans</i>)	Reguladores autofágicos	1,008905547	0,804753454
AMBRA1	Autophagy/beclin-1 regulator 1	Reguladores autofágicos	0,909978867	0,823565213
LAMP3	Lysosomal associated membrane protein 3	Reguladores lisossomais	0,854169301	0,834223603
ATG4B	Autophagy related 4B cysteine peptidase	Autofagia	0,800069128	0,844584758
FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1 (MTOR, mechanistic target of rapamycin)	Reguladores autofágicos	0,771276247	0,850110232
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	Reguladores autofágicos	0,695517313	0,864683264
ATG5	Autophagy related 5	Autofagia	0,403818494	0,921182654
LAMP2	Lysosomal associated membrane protein 2	Lisossomo	0,340109825	0,933585819

APÊNDICE C – Artigos publicados, manuscritos aceitos ou submetidos para publicação durante o doutorado

Artigo 1 – Publicado (primeiro artigo dos dados obtidos no doutorado)

Título:

Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization

Autores:

Bruno Jorge de Andrade Silva, Mayara Garcia de Mattos Barbosa, Priscila Ribeiro Andrade, Helen Ferreira, José Augusto da Costa Nery, Suzana Côrte-Real, Gilberto Marcelo Sperandio da Silva, Patricia Sammarco Rosa, Mario Fabri, Euzenir Nunes Sarno, **Roberta Olmo Pinheiro**

Revista:

PLoS Pathogens 13(1): e1006103 (2017). doi:10.1371/journal.ppat.1006103

RESEARCH ARTICLE

Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization

Bruno Jorge de Andrade Silva¹*, Mayara Garcia de Mattos Barbosa¹*, Priscila Ribeiro Andrade¹, Helen Ferreira¹, José Augusto da Costa Nery¹, Suzana Côte-Real², Gilberto Marcelo Sperandio da Silva³, Patricia Sammarco Rosa⁴, Mario Fabri^{5,6}, Euzenir Nunes Sarno¹, Roberta Olmo Pinheiro¹*

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

* These authors contributed equally to this work.

* rolmo@ioc.fiocruz.br



CrossMark
click for updates

 OPEN ACCESS

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

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

Received: August 1, 2016

Accepted: November 29, 2016

Published: January 5, 2017

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

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

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

Abstract

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

Artigo 2 – Publicado (relacionado ao tema da tese, inclui dados obtidos no doutorado)

Título:

STING-Dependent 2' -5' Oligoadenylate Synthetase–Like Production Is Required for Intracellular *Mycobacterium leprae* Survival

Autores:

Thiago Gomes de Toledo-Pinto, Anna Beatriz Robottom Ferreira, Marcelo Ribeiro-Alves, Luciana Silva Rodrigues, Leonardo Ribeiro Batista-Silva, **Bruno Jorge de Andrade Silva**, Robertha Mariana Rodrigues Lemes, Alejandra Nóbrega Martinez, Felipe Galvan Sandoval, Lucia Elena Alvarado-Arnez, Patrícia Sammarco Rosa, Edward Joseph Shannon, Maria Cristina Vidal Pessolani, **Roberta Olmo Pinheiro**, Sérgio Luís Gomes Antunes, Euzenir Nunes Sarno, Flávio Alves Lara, Diana Lynn Williams, Milton Ozório Moraes

Revista:

The Journal of Infectious Diseases (2016). doi: 10.1093/infdis/jiw144

STING-Dependent 2'-5' Oligoadenylate Synthetase–Like Production Is Required for Intracellular *Mycobacterium leprae* Survival

Thiago Gomes de Toledo-Pinto,^{1,a} Anna Beatriz Robottom Ferreira,^{1,a} Marcelo Ribeiro-Alves,^{1,3} Luciana Silva Rodrigues,² Leonardo Ribeiro Batista-Silva,¹ Bruno Jorge de Andrade Silva,¹ Robertha Mariana Rodrigues Lemes,² Alejandra Nóbrega Martínez,^{1,b} Felipe Galvan Sandoval,^{5,6} Lucia Elena Alvarado-Arnez,¹ Patrícia Sammarco Rosa,⁴ Edward Joseph Shannon,^{5,6} Maria Cristina Vidal Pessolani,² Roberta Olmo Pinheiro,¹ Sérgio Luis Gomes Antunes,¹ Euzenir Nunes Sarno,¹ Flávio Alves Lara,² Diana Lynn Williams,^{5,6} and Milton Ozório Moraes¹

¹Laboratório de Hanseníase, ²Laboratório de Microbiologia Celular, Pavilhão de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, ³Laboratório de Pesquisa em Farmacogenética, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ-RJ, Rio de Janeiro, and ⁴Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, Brazil; ⁵National Hansen's Disease Programs, Bureau of Primary Health Care, Health Resources and Services Administration, and ⁶Laboratory Research Branch, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, Baton Rouge

Cytosolic detection of nucleic acids elicits a type I interferon (IFN) response and plays a critical role in host defense against intracellular pathogens. Herein, a global gene expression profile of *Mycobacterium leprae*-infected primary human Schwann cells identified the genes differentially expressed in the type I IFN pathway. Among them, the gene encoding 2'-5' oligoadenylate synthetase-like (OASL) underwent the greatest upregulation and was also shown to be upregulated in *M. leprae*-infected human macrophage cell lineages, primary monocytes, and skin lesion specimens from patients with a disseminated form of leprosy. OASL knock down was associated with decreased viability of *M. leprae* that was concomitant with upregulation of either antimicrobial peptide expression or autophagy levels. Downregulation of MCP-1/CCL2 release was also observed during OASL knock down. *M. leprae*-mediated OASL expression was dependent on cytosolic DNA sensing mediated by stimulator of IFN genes signaling. The addition of *M. leprae* DNA enhanced nonpathogenic *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin intracellular survival, downregulated antimicrobial peptide expression, and increased MCP-1/CCL2 secretion. Thus, our data uncover a promycobacterial role for OASL during *M. leprae* infection that directs the host immune response toward a niche that permits survival of the pathogen.

Keywords. leprosy; type I IFN; OASL; *Mycobacterium leprae*; cytoplasmic DNA sensing; autophagy.

Virulent mycobacteria modulate the host immune response to create an appropriate survival niche, and the ESX-1 secretion system plays a key role in the mycobacterial triggering mechanism of this permissive response. In the early stages of infection, the ESX-1 system mediates the phagosome breach, leading to content leakage into the host cytosol [1–4]. During *Mycobacterium tuberculosis* infection, extracellular mycobacterial DNA has been shown to trigger cytoplasmic DNA sensing receptors and induce interferon β (IFN- β) production [5]. In contrast to type II IFN (IFN- γ), activation of type I IFN promotes *M. tuberculosis* replication and contributes to disease progression [2–7]. Recently, a type I IFN signature was noticeable in the disseminated lepromatous form of leprosy, while type II IFN pattern was observed in localized tuberculoid leprosy [8].

Stimulator of interferon genes (STING) is a key mediator of the non-CpG-induced type I IFN response through detection of cyclic dinucleotides, such as cyclic diadenylate monophosphate (c-di-AMP), and it activates both type I IFN and autophagy [5, 9]. Recent reports have revealed that double-stranded DNA (dsDNA)-mediated activation of cyclic GMP-AMP (cGAMP) synthase (cGAS) sensor leads to production of cGAMP, a STING agonist, and consequently activates type I IFN and autophagic mechanisms [10–12]. However, the downstream pathways triggered by type I IFNs and autophagy that define the outcome of infection are yet to be defined.

Herein, DNA microarray analysis of primary human Schwann cells infected with live *Mycobacterium leprae* suggested a type I IFN gene expression signature that is common to Schwann cells and macrophage infections, while the gene encoding 2'-5' oligoadenylate synthetase-like (OASL) underwent the greatest upregulation. Activation of STING signaling was required for OASL production in *M. leprae*-infected macrophages. We observed that OASL activation impaired bacterial killing activation mechanisms such as antimicrobial peptide expression and autophagy. Thus, our data indicate a key role for OASL in the innate immune response against mycobacteria, revealing an important link between the type I IFN response and autophagy.

Received 8 December 2015; accepted 30 March 2016.

^aT. G. d. T.-P. and A. B. R. F. contributed equally to this work.

^bPresent affiliation: Division of Bacteriology and Division of Parasitology, Tulane National Primate Research Center, Covington, Louisiana.

Correspondence: M. Ozório Moraes, Leprosy Laboratory, FIOCRUZ, Avenida Brazil 4365, Manginhos, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 21040-360 Brazil (mmoraes@fiocruz.br).

The Journal of Infectious Diseases®

© The Author 2016. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For permissions, e-mail journals.permissions@oup.com. DOI: 10.1093/infdis/jiw144

Artigo 3 – Publicado (não relacionado ao tema da tese, participação como colaborador)

Título:

Different immunosuppressive mechanisms in multi-drug-resistant tuberculosis and nontuberculous mycobacteria patients

Autores:

Roberta Olmo Pinheiro, E. B. de Oliveira, G. dos Santos, G. M. Sperandio da Silva, **Bruno Jorge de Andrade Silva**, R. M. B. Teles, A. Milagres, E. N. Sarno, M. P. Dalcolmo, E. P. Sampaio

Revista:

Clinical & Experimental Immunology. 2013 Feb;171(2):210-9. doi: 10.1111/cei.12007

Different immunosuppressive mechanisms in multi-drug-resistant tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria patients

R. O. Pinheiro,* E. B. de Oliveira,*
G. dos Santos,† G. M. Sperandio
da Silva,‡ B. J. de Andrade Silva,*
R. M. B. Teles,* A. Milagres,§
E. N. Sarno,* M. P. Dalcolmo†
and E. P. Sampaio*[¶]

*Leprosy Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz,
Oswaldo Cruz Foundation, Fiocruz, †Helio Fraga
Reference Center, ENSP/Fiocruz, ‡Chagas
Laboratory, Evandro Chagas Institute of Clinical
Research, IPEC/Fiocruz, §Health Unit, District
Hospital Raphael de Paula Souza, Rio de Janeiro,
Brazil, and ¶Immunopathogenesis Section,
Laboratory of Clinical Infectious Diseases,
LCID/NIAID, National Institutes of Health, NIH,
Bethesda, WA, USA

Accepted for publication 10 October 2012
Correspondence: E. P. Sampaio, LCID, NIH,
CRC B3-4233, MSC 1684, Bethesda, MD
20892-1684, USA.
E-mail: sampaioe@niaid.nih.gov

Introduction

Tuberculosis (TB) is the second leading cause of death worldwide among infectious diseases. Despite the existence of effective multi-drug therapy, efforts to treat patients with active disease and to control the spread of TB are complicated by poor patient compliance, co-infection with human immunodeficiency virus (HIV) and the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-resistant strains. Tubercular resistance to both isoniazid and rifampicin defines multi-drug-resistant TB (MDR-TB). In addition, the occurrence of extensive and totally drug-resistant MTB strains have been largely documented [1–3].

More recently, infection caused by non-tuberculous mycobacteria (NTM) has been recognized increasingly as

Summary

Previous studies have demonstrated that cells from both multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and non-tuberculous mycobacteria (NTM) patients respond poorly to mycobacterial antigens *in vitro*. In the present study, we compared the *in vitro* response of cells isolated from sensitive TB (NR-TB)-, MDR-TB- and NTM-infected patients. Analysis of T cell phenotype *ex vivo* revealed that both MDR-TB and NTM patients present an increased percentage of CD4⁺CD25⁺ forkhead box protein 3 (FoxP3)⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T (T_{reg}) cells when compared to NR-TB. Increased numbers of T_{reg} cells and interleukin (IL)-10 serum levels were detected in MDR-TB, whereas elevated serum transforming growth factor (TGF)- β was found in the NTM group. Cells of MDR-TB patients stimulated with early secretory antigenic target (ESAT)-6, but not purified protein derivative (PPD), showed a lower frequency of CD4⁺/interferon (IFN)- γ ⁺ T cells and enhanced CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, CD4⁺CD25⁺CD127⁻ and CD4⁺CD25⁺IL-10⁺ T cell population. In addition, increased IL-10 secretion was observed in cultured MDR-TB cells following ESAT-6 stimulation, but not in NR-TB or NTM patients. *In vitro* blockade of IL-10 or IL-10R α decreased the CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ frequencies induced by ESAT-6 in MDR-TB, suggesting a role of IL-10 on impaired IFN- γ responses seen in MDR-TB. Depletion of CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes restored the capacity of MDR-TB T cells to respond to ESAT-6 *in vitro*, which suggests a potential role for T_{reg}/T regulatory 1 cells in the pathogenesis of MDR-TB. Together, our results indicate that although the similarities in chronicity, NTM- and MDR-TB-impaired antigenic responses involve different mechanisms.

Keywords: IL-10, immunosuppression, MDR-TB, NTM, regulatory T cells

an important cause of chronic pulmonary disease in patients with structural abnormalities of the lung, such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cystic fibrosis and bronchiectasis [4]. NTM are environmental microorganisms classified as slow grower (SGM) or rapid grower mycobacteria (RGM). Interestingly, the prevalence of lung disease due to NTM in many countries exceeds that of MTB. Even though the pathogenesis of NTM infection is not completely understood, it is clear that both host and mycobacterial factors are involved [4–6].

Early secretory antigenic target (ESAT)-6 is an immunodominant region of difference (RD) 1 protein that has been demonstrated to be absent in all strains of *M. bovis* BCG [7] which confers both diagnostic and immunogenic potential

Artigo 4 – Submetido (não relacionado ao tema da tese, participação como colaborador)

Título:

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

Autores:

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

Revista:

Microbes and Infection, Manuscript Number: MICINF-D-16-00280, 2016

Manuscript Number: MICINF-D-16-00280

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

Article Type: Original article

Keywords: leprosy, macrophages, iron, indoleamine 2,3-dioxygenase, Mycobacterium leprae

Corresponding Author: Dr. Roberta Olmo Pinheiro, DR.

Corresponding Author's Institution: Oswaldo Cruz Foundation

First Author: Mayara G Mattos Barbosa, Master

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

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

Suggested Reviewers: Valéria M. Borges PhD
Researcher, Human and Experimental Patology, Gonçalo Moniz Research Center - Fiocruz - BA
vborges@bahia.fiocruz.br

I believe that Dr. Valéria Borges may perform the revision of the manuscript in function of her expertise in inflammation and pathogen - host cell interaction. Some of her manuscripts involves the analysis of CD163, haptoglobin, and Heme oxygenase 1 in the pathogenesis of malaria and Leishmania.