



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO FUNCIONAL DE SUSCETIBILIDADE CELULAR AO *Mycobacterium leprae* EM MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS HUMANOS COM MUTAÇÕES NO GENE *PARK2***

ALUNA: RENATA HELENA MONTEIRO SINDEAUX

ORIENTADOR: MARCELO TÁVORA MIRA

CO-ORIENTADORA: VANESSA SANTOS SOTOMAIOR

CURITIBA

2012

**RENATA HELENA MONTEIRO SINDEAUX**

**ESTUDO FUNCIONAL DE SUSCETIBILIDADE CELULAR AO *Mycobacterium leprae* EM MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS HUMANOS COM MUTAÇÕES NO GENE *PARK2***

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientação: Prof. Dr. Marcelo Távora Mira  
Co-orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Vanessa Santos Sotomaior

CURITIBA

2012

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central

Sindeaux, Renata Helena Monteiro  
S616e      Estudo funcional de suscetibilidade celular ao *Mycobacterium leprae* em  
2012      macrófagos primários humanos com mutações no gene PARK2 / Renata  
             Helena Monteiro Sindeaux ; orientação, Marcelo Távora Mira, co-orientação,  
             Vanessa Santos Sotomaior. – 2012.  
             115 f. : il. ; 30 cm

             Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,  
2012  
             Bibliografia: f. 69-84

             1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Genes. 4. Macrófagos. I. Mira,  
             Marcelo Távora. II. Sotomaior, Vanessa Santos. III. Pontifícia Universidade  
             Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV.  
             Título.

CDD 20. ed. – 616.998



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

Aos onze dias do mês de abril de 2012, realizou-se a sessão pública de defesa de tese "ESTUDO FUNCIONAL DE SUSCETIBILIDADE CELULAR AO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EM MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS HUMANOS COM MUTAÇÕES NO GENE *PARK2*" apresentada por **RENATA HELENA MONTEIRO SINDEAUX** para obtenção do título de doutora; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Marcelo Távora Mira (PUCPR) - Presidente	
Prof. Dr. Sérgio Surugi de Siqueira (PUCPR)	
Profª. Drª. Andrea Novais Moreno (PUCPR)	
Profª. Drª. Iara José de Messias Reason (UFPR)	
Profª. Drª. Maria Cristina Vidal Pessolani (FIOCRUZ - RJ)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira                      Conceito: APROVADA  
Prof. Dr. Sérgio Surugi de Siqueira              Conceito: APROVADA  
Profª. Drª. Andrea Novais Moreno              Conceito: APROVADA  
Profª. Drª. Iara José de Messias Reason        Conceito: APROVADA  
Profª. Drª. Maria Cristina Vidal Pessolani    Conceito: APROVADA  
Conceito Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

---

---

---

Prof. Dr. Marcelo Távora Mira  
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho  
Coordenador do PPGCS PUCPR

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese ao meu amado esposo  
Gabriel e aos meus amados pais,  
Waldir e Terezinha.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois Ele é o único quem realmente sabe o empenho e esforço que tive para realizar este trabalho.

Agradeço ao meu grande amor, “Xuxu”, a pessoa quem mais me apoiou com seu amor, paciência, companheirismo e compreensão.

Agradeço aos meus queridos pais, “Gordinho” e “Dona Têre”, por me educarem de maneira excepcional, com amor, paciência, carinho e incentivo as minhas escolhas.

Agradeço ao grande mestre Dr. Metry Bacila, quem me despertou para o mundo da ciência com sua grande experiência e mérito científico.

Agradeço ao meu prezado orientador Dr. Marcelo Távora Mira, meu segundo grande mestre pelo seu entusiasmo, paixão e ética pela ciência. Essas qualidades foram os maiores ensinamentos que recebi ao longo desta caminhada.

Agradeço a minha co-orientadora Dra. Vanessa Santos Sotomaior, pela sua orientação, pelas contribuições, apoio e conselhos importantes.

Agradeço à toda equipe do Laboratório Experimental de Cultivo Celular, em especial à colaboradora Dra. Alexandra Cristina Senegaglia, à Fabiane e à Duca pelo grande suporte e apoio nos experimentos funcionais.

Agradeço à Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani e à Dra. Luciana Silva Rodrigues do Laboratório de Biologia Celular da Fiocruz-RJ, pela colaboração viabilizando treinamento e estabelecimento de ensaios funcionais.

Agradeço aos médicos Dr. Salmo Raskin, Dr. Renato Puppi e ao Dr. Hélio Teive por colaborar com o recrutamento dos pacientes incluídos no estudo e pela caracterização genética dos mesmos.

Agradeço a toda equipe do Banco de Sangue do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba que nos ajudou com as coletas das bolsas de sangue.

Agradeço à Dra. Mariane Stefani do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Faculdade Federal de Goiás pela dosagem de IL-6.

Agradeço a Lili, parceira de grupo que se tornou uma grande amiga, inteligente e lutadora, presente em todas horas importantes.

Agradeço à Rezinha, pessoa decidida e batalhadora. Assim como a Lili, nossa amizade nasceu no grupo e se fortaleceu ao ponto de nos tornarmos comadres.

Agradeço aos outros amigos que fiz no grupo os quais me apoiaram ativamente: Denise, Vinícius, Juliane, Heloisa, Helena, Monica, William, Rosy, Laire, Felipe, Aline, Vanessa, Angela, Caio, Fernando, Zóio e Flávia.

Agradeço aos voluntários envolvidos no estudo, por disponibilizar literalmente seu sangue e tempo ao meu trabalho.

Agradeço aos meus amigos-irmãos de longa data Suzane, Karol, Márcio, Karolzinha, Marquinhos, Celsinho, Keké, Bombril, Fá e em especial, a minha melhor amiga Leleca. Nossos momentos de confraternização e o apoio deles me ajudaram muito há seguir em frente.

Agradeço a minha querida Pheebie, uma cachorrinha que me enche de amor incondicional e alegria ainda mais os meus dias.

Por fim, agradeço o financiamento do CNPq, que possibilitou a execução do projeto.

## EPÍGRAFE

***"It is not in the nature of things for one man to make a sudden violent discovery; science goes step by step, and every man depends on the work of his predecessors. When you hear of a sudden unexpected discovery - a bolt from the blue as it were - you can always be sure that it has grown up by the influence of one man on the other, and it is this mutual influence which makes the enormous possibility of scientific advance. Scientists are not dependent on the ideas of a single man, but on the combined wisdom of thousands of men, all thinking of the same problem, and each doing his little bit to add to the great structure of knowledge which is gradually being erected."***

(Ernest Rutherford)

***"If your experiment needs statistics, you ought to have done a better experiment."***

(Ernest Rutherford)

## RESUMO

O controle genético da suscetibilidade humana à hanseníase é amplamente aceito, no entanto, a base biológica do efeito genético está longe de ser compreendido. Uma série de estudos anteriores resultaram na identificação de variantes genéticas compartilhadas por dois genes, *PARK2* e *PACRG*, como principais fatores de risco para suscetibilidade à hanseníase *per se* em três diferentes populações etnicamente distintas. Interessantemente, mutações severas do gene *PARK2*, que codifica a parquína, uma proteína ubiquitina ligase E3, têm sido implicadas como causadoras de uma forma autossômica recessiva de da Doença de Parkinson de Início Precoce (DPIP). O objetivo deste trabalho foi utilizar macrófagos derivados de monócitos (*Monocyte-Derived Macrophages*, MDMs) de pacientes com DPIP com mutações espontâneas em *PARK2* como modelo para investigar vários aspectos da resposta celular do hospedeiro contra o *M. leprae*. Células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) de três pacientes com mutações em *PARK2* e quatro controles saudáveis sem mutações foram cultivados *in vitro*, em placas de 24 poços durante 5 dias para se obter MDMs (aproximadamente  $1,5 - 2.0 \times 10^5$  células/poço). As células foram tratadas com *M. leprae* irradiado (multiplicidade de infecção para bacilos de monócitos de 50:1) ou IFN $\gamma$  + LPS durante 24 ou 48 horas antes de proceder as seguintes análises funcionais: avaliação da apresentação de antígenos pela expressão dos marcadores CD80, CD86, HLA-ABC, HLA-DR e CD54; viabilidade celular através do marcador de necrose 7-AAD e de apoptose Anexina; produção de NO intracelular e; produção da citocina IL-6 em sobrenadante de cultura. Como resultado, observamos que MDMs mutantes de *PARK2* utilizados em nosso trabalho não interferem na viabilidade celular após desafio com *M. leprae*. Porém, obtivemos evidência de que mutações de *PARK2* interferem na produção de NO, na expressão do co-estimulador CD80 e de moléculas HLA-DR envolvidos no processo de apresentação de antígeno e na produção de IL-6. Concluindo, foram obtidas as primeiras evidências da função biológica de *PARK2* no contexto da patogênese da hanseníase.

**Palavras-chave:** hanseníase, *Mycobacterium leprae*, *PARK2*, parquína, macrófagos.

## ABSTRACT

Genetic control of human susceptibility to leprosy is widely accepted; however, the biological basis of this genetic effect is far from understood. A series of previous studies resulted in the identification of genetic variants shared by two genes, *PARK2* and *PACRG*, as major risk factors for susceptibility to leprosy “*per se*” in three distinct ethnic populations. Interestingly, severe mutations of the *PARK2* gene, that encodes Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase, have been implicated as causative of an autosomal recessive early-onset form of Parkinson’s disease (AR-EOPD). The aim of this initiative was to use monocyte-derived macrophages (MDMs) from AR-EOPD patients with *PARK2* spontaneous mutations as a model to investigate several aspects of host cellular response against *M. leprae*. Primary peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from three AR-EOPD patients with *PARK2* mutations and four healthy controls were cultured *in vitro* in 24-well culture plates for 5 days to obtain MDMs (approximately  $1.5\text{--}2.0 \times 10^5$  cells/ well). The cells were treated with irradiated *M. leprae* (multiplicity of infection bacilli to monocyte of 50:1) or with IFN $\gamma$  + LPS for 24 or 48 hours before proceeding with the following functional analysis: evaluation of antigen presentation, cell viability, production of intracellular NO and production of IL-6 cytokine. As a result, we found that *PARK2* mutations did not affect cell viability after challenge with *M. leprae*. However, we collected evidences that *PARK2* mutations interfere with NO production, with the expression of co-stimulatory CD80 and expression of HLA-DR involved with antigen presentation process and with the production of IL-6. In conclusion, we obtained the first evidence of the biological function of *PARK2* in the context of the pathogenesis of leprosy.

**Keywords:** leprosy, *Mycobacterium leprae*, *PARK2*, parkin, macrophages.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Cultura de <i>M. leprae</i> em camundogos atímicos.....	<b>3</b>
<b>Figura 2</b> - Distribuição mundial das taxas de prevalência da hanseníase no início de 2011.....	<b>4</b>
<b>Figura 3</b> - Coeficiente de detecção da hanseníase na população brasileira por regiões.....	<b>5</b>
<b>Figura 4</b> - Coeficientes de detecção da hanseníase no estado do Paraná comparando com os dados da região Sul e do Brasil.....	<b>5</b>
<b>Figura 5</b> - Patogênese da hanseníase.....	<b>7</b>
<b>Figura 6</b> - Proposta de modelo de interação molecular entre <i>M. leprae</i> e CS a partir de eletromicrografias de secções de nervo ciático.....	<b>9</b>
<b>Figura 7</b> - Modelo representativo das interações entre o domínio G (representado por 5 subdomínios, LG1-LG5) da $\alpha$ 2-laminina e os componentes PGL-1 e ML-LBP21 da parede celular da <i>M. leprae</i> .....	<b>9</b>
<b>Figura 8</b> - O transcrito do gene <i>PARK2</i> e a proteína parquina.....	<b>27</b>
<b>Figura 9</b> - Proteólise pelo sistema ubiquitina-proteassomo.....	<b>28</b>
<b>Figura 10</b> - UPS e substratos da parquina já identificados.....	<b>29</b>
<b>Figura 11</b> - As vias mais importantes que envolvem genes consistentemente associados à hanseníase a partir de dados gerados de estudos genéticos.....	<b>30</b>
<b>Figura 12</b> - Diferenciação dos monócitos em macrófagos ao longo de 5 dias de cultivo.....	<b>37</b>
<b>Figura 13</b> - Produção de óxido nítrico (NO) em MDMs após 24 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> ou com IFN- $\gamma$ + LPS.....	<b>45</b>
<b>Figura 14</b> - Necrose celular em MDMs após 48 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 15</b> - Apoptose celular em MDMs após 48 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 16</b> - Expressão de CD80 após 24 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> ou ou com IFN- $\gamma$ + LPS.....	<b>49</b>

<b>Figura 17</b> - Expressão de CD86 após 24 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> ou com IFN- $\gamma$ + LPS.....	<b>50</b>
<b>Figura 18</b> - Expressão de HLA-DR após 24 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> ou com IFN- $\gamma$ + LPS.....	<b>51</b>
<b>Figura 19</b> - Dosagem de IL-6 de sobrenadantes de cultura de MDMs após 24 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> ou com IFN- $\gamma$ + LPS.....	<b>53</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação entre as características gerais dos genomas da <i>M. leprae</i> e da <i>M. tuberculosis</i> .....	<b>3</b>
<b>Tabela 2</b> - Caracterização dos pacientes com DPIP incluídos no estudo.....	<b>35</b>
<b>Tabela 3</b> – Produção de NO por MDMs 24 horas de tratamento com <i>M. leprae</i> ou com IFN- $\gamma$ + LPS.....	<b>44</b>
<b>Tabela 4</b> - Avaliação de necrose após 48 horas com <i>M. leprae</i> .....	<b>46</b>
<b>Tabela 5</b> - Avaliação de apoptose após 48 horas com <i>M. leprae</i> .....	<b>47</b>
<b>Tabela 6</b> - Expressão do coestimulador CD80 por MDMs.....	<b>48</b>
<b>Tabela 7</b> - Expressão do coestimulador CD86 por MDMs.....	<b>49</b>
<b>Tabela 8</b> - Expressão de MHC-I por MDMs.....	<b>50</b>
<b>Tabela 9</b> - Expressão de MHC-II por MDMs.....	<b>51</b>
<b>Tabela 10</b> – Expressão de ICAM-I por MDMs.....	<b>52</b>
<b>Tabela 11</b> - Dosagem de IL-6 de sobrenadantes de cultura de MDMs.....	<b>53</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ DG	- alfa-distroglicana
ADRP	- Adipofilina ( <i>Adipose Differentiation-Related Protein</i> )
AG	- Arabinogalactana
APC	- Célula apresentadora de antígeno ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
BCG	- <i>Mycobacterium bovis</i> bacillus Calmette-Guèrin
CD	- Conjuntos de diferenciação ( <i>Cluster of differentiation</i> )
CR1, 2 e 3	- Receptores de complemento ( <i>Complement Receptors 1, 2, 3</i> )
DC	- Célula dendríticas ( <i>Dendritic Cells</i> )
CS	- Célula de Schawnn
DAF-FM	- <i>4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate</i>
DP	- Doença de Parkinson
DPIP	- Doença de Parkinson de Início Precoce
ERNs	- Espécies reativas de nitrogênio
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
GWA	- Varredura genômica de associação ( <i>Genome-Wide Association</i> )
HLA	- Antígenos leucocitários humanos ( <i>Human Leucocyte Antigens</i> )
IBR	- <i>In-Between RING</i>
ICAMs	- Moléculas de adesão intercelulares ( <i>Intercellular adhesion molecules</i> )
IFN $\gamma$	- Interferon gama
IL	- Interleucina ( <i>Interleucin</i> )
ILRa1	- Antagonista do receptor IL-1 ( <i>Interleukin-1 receptor antagonist</i> )
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível ( <i>Nitric Oxide Synthase</i> )
LAM	- Lipoarabinomanana ( <i>Lipoarabinomannan</i> )
LD	- Desequilíbrio de ligação ( <i>Linkage Disequilibrium</i> )
LL	- Lepromatoso/ Lepromatoso
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTC	- Lectina do tipo- C
MA	- Ácido micólico ( <i>Mycolic Acid</i> )
MASP	- Serino proteases associadas à MBL ( <i>MBL-associated serine proteases</i> )

MBL	- Lectina ligante de manose ( <i>Mannose-binding lectin</i> )
MCA	- Ácido micocerósico ( <i>Mycocerosic Acid</i> )
MCP-1	- Proteína quimioatraente de monócitos-1 ( <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> )
MDMs	- Macrófagos derivados de monócitos ( <i>Monocyte-Derived Macrophages</i> )
MHC	- Complexo Principal de Hlistocompatibilidade ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
ML	- <i>Mycobacterium leprae</i>
ML-LBP21	- Proteína de 21kDa do <i>M. leprae</i> ligadora à laminina (21 kDa <i>M. leprae laminin binding protein</i> )
MMP-II	- <i>Major Membrane Protein-II</i>
MP	- Proteínas de membrana ( <i>Membrane Proteins</i> )
NCAM	- Moléculas de adesão de célula neural ( <i>Neural Cell Adhesion Molecule</i> )
NF-κB	- Fator nuclear- kappa B ( <i>Nuclear Factor-KappaB</i> )
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PAMPs	- Padrões moleculares associados a patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PBMCs	- Células mononucleares de sangue periférico ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> )
PI3K	- Fosfoinosítido quinase-3 ( <i>Phosphoinositide-3 kinase</i> )
PG	- Peptideoglicano
PGE <sub>2</sub>	- Prostaglandina E <sub>2</sub> ( <i>Prostaglandin E<sub>2</sub></i> )
PGL-1	- Glicolípido fenólico-1 ( <i>Phenolic Glycolipid-1</i> )
PM	- Membrana Plasmática ( <i>Plasmatic Membrane</i> )
PRR	- Receptores de reconhecimento de padrões ( <i>Pattern-Recognition Receptor</i> )
RING	- <i>Really Interesting New Gene</i>
RM	- Receptor de manose
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único ( <i>Single Nucleotide Polymorfism</i> )
SOD	- Superóxido dismutase ( <i>Superoxide Dismutase</i> )

TAP	- Transportadores associados a antígenos ( <i>Transporters-Associated with Antigen Processing</i> )
TLR	- Receptor do tipo <i>Toll</i> ( <i>Toll Like Receptor</i> )
LT <sub>H</sub>	- Linfócito T auxiliar ( <i>T helper</i> )
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> )
TT	- Tuberculóide/ Tuberculóide
UBL	- <i>Ubiquitin-Like Domain</i>
UPS	- Sistema ubiquitina-proteassomo ( <i>Ubiquitin-Proteasome System</i> )
VDR	- Receptor de vitamina D ( <i>Vitamin D receptor</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1#
1.1 HANSENÍASE: DEFINIÇÃO E ASPECTOS ETIOLÓGICOS .....	2#
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	4#
1.3 FISIOPATOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE .....	6#
<b>1.3.1 Patogênese da hanseníase</b> .....	<b>6!</b>
1.4. INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE <i>M. leprae</i> E O HOSPEDEIRO .....	7#
<b>1.4.1 <i>M. leprae</i> e as células de Schwann</b> .....	<b>8!</b>
<b>1.4.2 <i>M. leprae</i> e os fagócitos</b> .....	<b>11!</b>
<b>1.4.2.1 Fagócitos e a imunidade inata contra o <i>M. leprae</i></b> .....	<b>12</b>
1.4.2.1.1 Reconhecimento e fagocitose do <i>M. leprae</i> .....	12
1.4.2.1.2 Fagócitos e seus mecanismos inatos contra o <i>M. leprae</i> .....	13
<b>1.4.2.2 Fagócitos e a imunidade adaptativa contra o <i>M. leprae</i></b> .....	<b>15</b>
1.4.2.2.1 Processamento e apresentação de antígenos .....	15
1.4.2.2.2 Citocinas na hanseníase: paradigma T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2 .....	18
1.5 GENÉTICA DA HANSENÍASE .....	20
<b>1.5.1 As primeiras evidências de um componente genético de controle da suscetibilidade à hanseníase</b> .....	<b>20#</b>
<b>1.5.2 Estudos pioneiros de ligação e de associação</b> .....	<b>21#</b>
<b>1.5.3 Genética funcional da suscetibilidade à hanseníase</b> .....	<b>22#</b>
<b>1.6 O GENE <i>PARK2</i></b> .....	<b>24!</b>
<b>1.6.1 O gene <i>PARK2</i> e a hanseníase</b> .....	<b>24#</b>
<b>1.6.2 Gene <i>PARK2</i> e a Doença de Parkinson de Início Precoce</b> .....	<b>25#</b>
<b>1.6.3 O gene <i>PARK2</i> e as funções da parquína</b> .....	<b>26#</b>
<b>1.6.4 A proteína parquína e a hanseníase</b> .....	<b>30#</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>31#</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>33#</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	34#
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34#
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35#</b>
4.1 DADOS CLÍNICOS E PERFIL GENÉTICO DOS PACIENTES E CONTROLES .....	35#

4.2 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CULTIVO DE PBMCs E MDMs.....	36#
4.3 ENSAIOS FUNCIONAIS .....	37#
<b>4.3.1 Tratamentos dos MDMs com <i>M. leprae</i>, interferon-<math>\gamma</math> e lipopolissacarídeos</b> .....	<b>37#</b>
<b>4.3.2 Preparo das células para citometria de fluxo</b> .....	<b>38#</b>
<b>4.3.3 Análise de produção do óxido nítrico</b> .....	<b>39#</b>
<b>4.3.4 Avaliação da viabilidade celular</b> .....	<b>39#</b>
<b>4.3.5 Avaliação de apresentação de antígenos</b> .....	<b>40#</b>
4.4 ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS NA CITOMETRIA DE FLUXO.....	40#
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA-6 (IL-6).....	40#
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>43#</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	44#
5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	45#
<b>5.2.1 Necrose celular</b> .....	<b>45!</b>
<b>5.2.2 Apoptose celular</b> .....	<b>47!</b>
5.3 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS .....	48#
<b>5.3.1 Expressão de moléculas coestimuladoras</b> .....	<b>48!</b>
5.3.1.1 Expressão de CD80 .....	48#
5.3.1.2 Expressão de CD86 .....	49#
<b>5.3.2 Expressão de moléculas MHC-I (HLA-ABC) e MCH-II (HLA-DR)</b> .....	<b>50</b>
5.3.2.1 Expressão de HLA-ABC.....	50
5.3.2.2 Expressão de HLA-DR .....	51#
<b>5.3.3 Expressão de ICAM-1 (CD54)</b> .....	<b>52!</b>
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE IL-6.....	52#
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>54#</b>
6.1 O IMPACTO DAS VARIAÇÕES GENÉTICAS EM <i>PARK2</i> ENCONTRADAS NOS PACIENTES .....	5655
6.2 INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO EM MDMS MUTANTES PARA <i>PARK2</i> APÓS DESAFIO COM <i>M. LEPRAE</i> .....	56#
6.3 MUTANTES PARA <i>PARK2</i> ESTIMULADOS COM <i>M. LEPRAE</i> E MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	58#
6.4 <i>PARK2</i> E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS APÓS DESAFIO COM <i>M.</i> ....	60#
6.5 MUTANTES PARA <i>PARK2</i> INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE IL-6.....	63#

6.6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	64#
6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	65#
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>67#</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>83</b>

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 HANSENÍASE: DEFINIÇÃO E ASPECTOS ETIOLÓGICOS

Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria de vida intracelular obrigatória *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), a qual acomete primariamente a pele e o sistema nervoso periférico (SNP) [1, 2].

Historicamente, as primeiras referências sobre a hanseníase, denominada anteriormente de “lepra”, foram descritas pelos egípcios através de papiros datados em 4000 a.C. Mais tarde, passagens da bíblia também fazem referência à infecção afetando os povos antigos. Recentemente, ossadas encontradas na Índia, datadas em aproximadamente 2000 a.C., reforçam que a hanseníase atinge a humanidade há milênios. Por exemplo, um esqueleto masculino adulto de meia idade apresentou alterações patológicas na região rinomaxilar, além de sinais de doença articular degenerativa de caráter infeccioso envolvendo a tíbia (periostite) e lesão do esqueleto periférico, compatíveis com hanseníase [3, 4].

Estudiosos acreditam que, até metade do século XIX, outras doenças dermatológicas, como elefantíase e psoríase, eram clinicamente confundidas com hanseníase. Em 1845, os médicos Daniel Danielssen e Carl Boeck na Noruega descreveram a hanseníase no livro *Om Spedalskhed (On Leprosy)*, com base em achados histopatológicos de lesões de pacientes, distinguindo-a de outras doenças [4]. Anos mais tarde, em 1874, o Dr. Gerhard Henrik Armauer Hansen, genro do Dr. Danielssen, descreveu *M. leprae* como agente etiológico da hanseníase após examinar nódulos recém retirados de pacientes. Ele observou corpos em formato bacilar que se coravam com ácido ósmico, localizados no interior das células. Com este trabalho, Hansen descreveu a primeira bactéria identificada como agente patogênico humano [5].

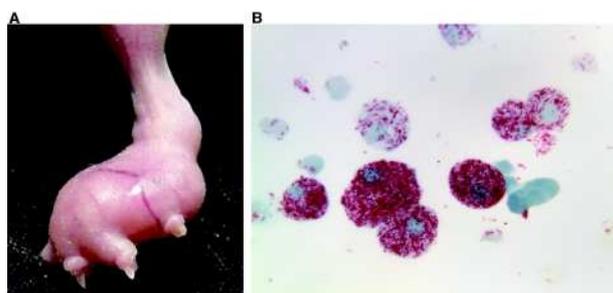
Atualmente, estas bactérias são descritas como bastonetes retos ou ligeiramente curvos, álcool-ácido resistentes, de crescimento lento, microaerófilos e com temperatura ótima de crescimento entre 27 a 30°C. Apesar de seu genoma ter sido sequenciado, seus mecanismos de infecção e de crescimento continuam a causar grande interesse científico, já que ainda não se conseguiu cultivar esse microrganismo em meios de cultura artificiais [6, 7]. Collins e cols. compararam o genoma de *M. leprae* com o de outra micobactéria patogênica importante, *M. tuberculosis*, e descreveram algumas diferenças genômicas interessantes conforme

ilustrado na **tabela 1**, evidenciando a redução e decaimento evolutivo do *M. leprae*, ou seja, o número relativamente reduzido em pares de bases nitrogenadas e o aumento de pseudogenes [7, 8].

**Tabela 1:** Comparação entre as características gerais dos genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis*. Fonte: Adaptado de [8]

Características	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho do genoma (pares de bases-pb)	3.268.203	4.411.532
Conteúdo de G+C (%)	57,79	65,61
Proteínas codificadas (%)	49,5	90,8
Genes codificadores de proteínas (número)	1.604	3.959
Pseudogenes (número)	2.037	1.114
Densidade gênica (pb por gene)	1.011	1.012
Média do tamanho dos genes (pb)	338	653

Diversos modelos animais foram testados em hanseníase, entre eles: sapos, tartarugas, coelhos, gatos, cães, porcos e diversas espécies de macacos [9, 10]. Um grande obstáculo na definição de um modelo animal era o inóculo de *M. leprae*, o qual não era obtido de forma a se manter viável. Porém, este problema foi resolvido quando Charles Shepard, em 1960, demonstrou ser possível o cultivo da bactéria em patas de camundongos atímicos, possibilitando o cultivo de alto número de bactérias viáveis para uso experimental (**figura 1**) [10]. Contudo, os modelos animais continuavam a não demonstrar um perfil de resposta imunológica próxima ao encontrada em humanos. Hoje, sabe-se que os tatús conhecidos como “nove-bandas” da espécie *Dasyus novemcinctus* são os únicos hospedeiros naturais, além do homem, a desenvolver hanseníase em sua forma disseminada, servindo assim como importante modelo animal de estudo, além de fonte de *M. leprae* para ensaios *in vitro* [11, 12].



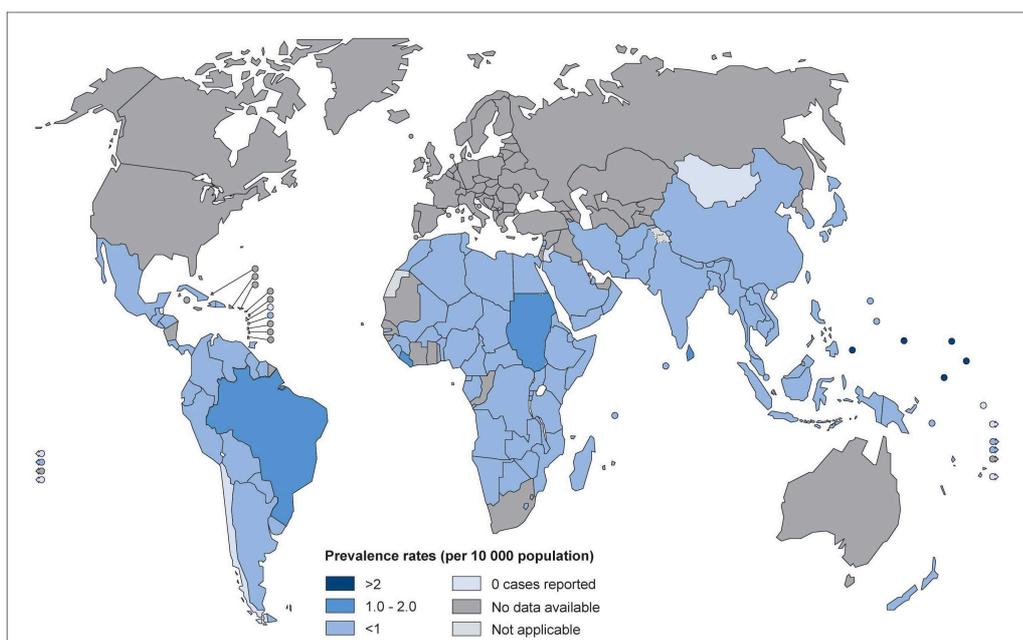
**Figura 1:** Cultura de *M. leprae* em camundongos atímicos. Em A, imagem aumentada de pata de camundongo atímico após 6 meses da infecção com *M. leprae*. Em B, macrófagos provenientes dos camundongos infectados com *M. leprae* corados pelo método Fite-Faraco (aumento de 1000x).

Fonte: [6].

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

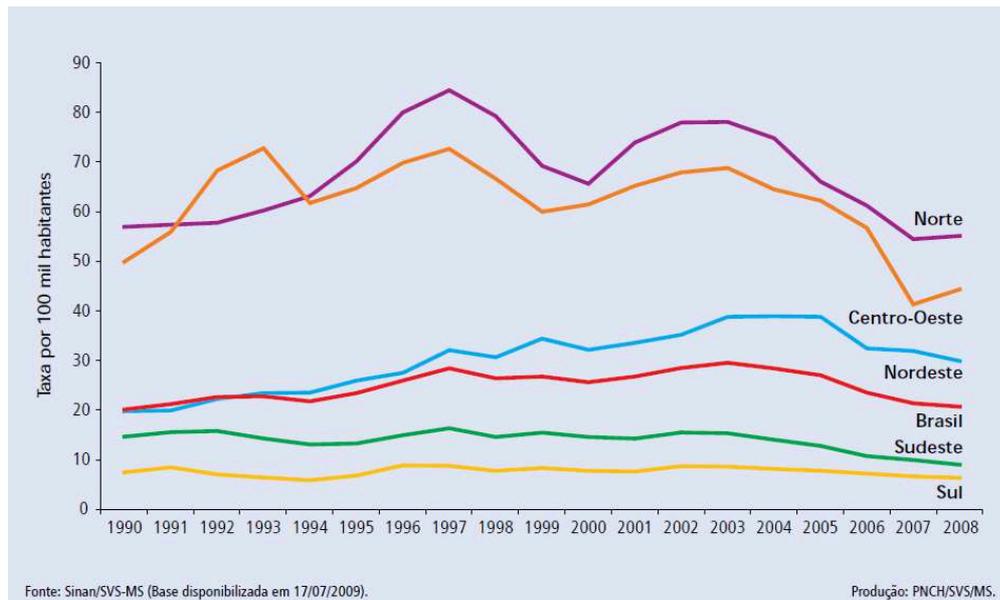
A Organização Mundial da Saúde (OMS) lançou, em meados da década de 80, uma campanha mundial cujo objetivo era eliminar a hanseníase do planeta como problema de saúde pública (prevalência < 1/10.000 habitantes) até o ano 2000. No entanto, em 2010, no mundo foram registrados cerca de 228.000 novos casos, sendo que em torno de 35.000 foram notificados no Brasil, o que coloca o país em segundo lugar em número de novos casos, atrás apenas da Índia, com aproximadamente 127.000 novos casos detectados durante o mesmo período [13]. No início de 2011, a taxa de prevalência no Brasil ficou entre 1,0 - 2,0 casos/10.000 habitantes, ainda fora da meta de eliminação da OMS (**figura 2**).

Leprosy prevalence rates, data reported to WHO as of beginning January 2011



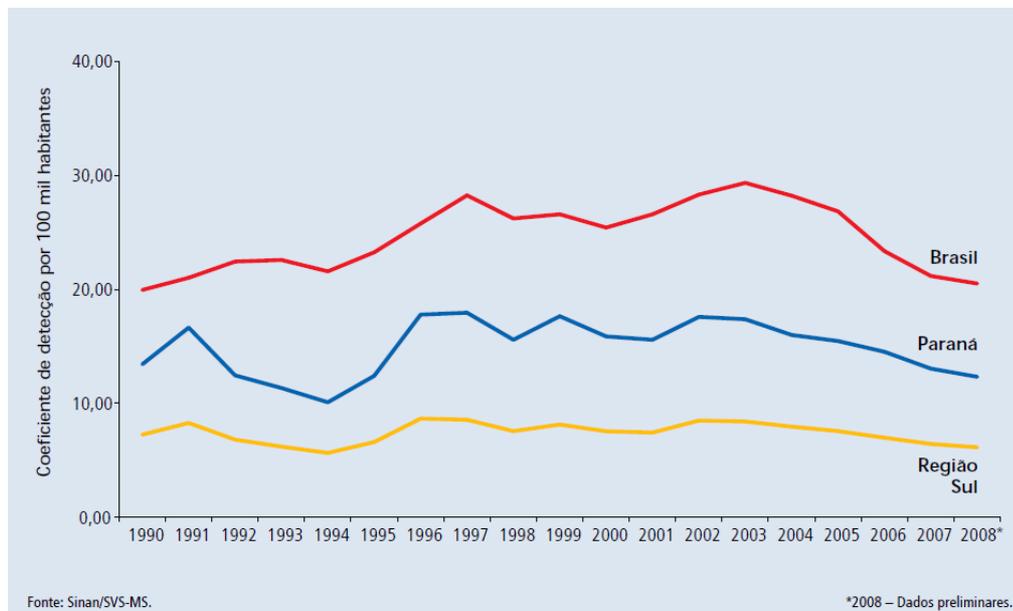
**Figura 2:** Distribuição mundial das taxas de prevalência da hanseníase no início de 2011. Fonte: {WHO, 2012 #164}.

Segundo o dados computados entre o período de 1990 e 2008 pelo Ministério da Saúde, os coeficientes de detecção no Brasil (novos casos/100.000 habitantes) variam significativamente entre as regiões, sendo que as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste permanecem com taxas elevadas (**figura 3**) [15].



**Figura 3:** Coeficiente de detecção da hanseníase na população brasileira por regiões. Dados obtidos entre 1990 e 2008. Fonte:[15]

No estado do Paraná, os coeficientes de detecção oscilaram entre 10,1/100.000 habitantes em 1994 e 17,79/100.000 habitantes em 1997, mantendo-se com valores acima do encontrado quando se considera toda a região sul, porém abaixo da média brasileira (figura 4) [15].



**Figura 4:** Coeficientes de detecção da hanseníase no estado do Paraná comparando com os dados da região Sul e do Brasil. Dados obtidos entre 1990 e 2008. Fonte:[15]

O intrigante é que, como não existe reservatório natural conhecido de importância biológica para o *M. leprae* e o tratamento atual, fornecido gratuitamente pela OMS a todos os pacientes, é 100% eficaz na cura da doença, a origem dos novos casos permanece obscura.

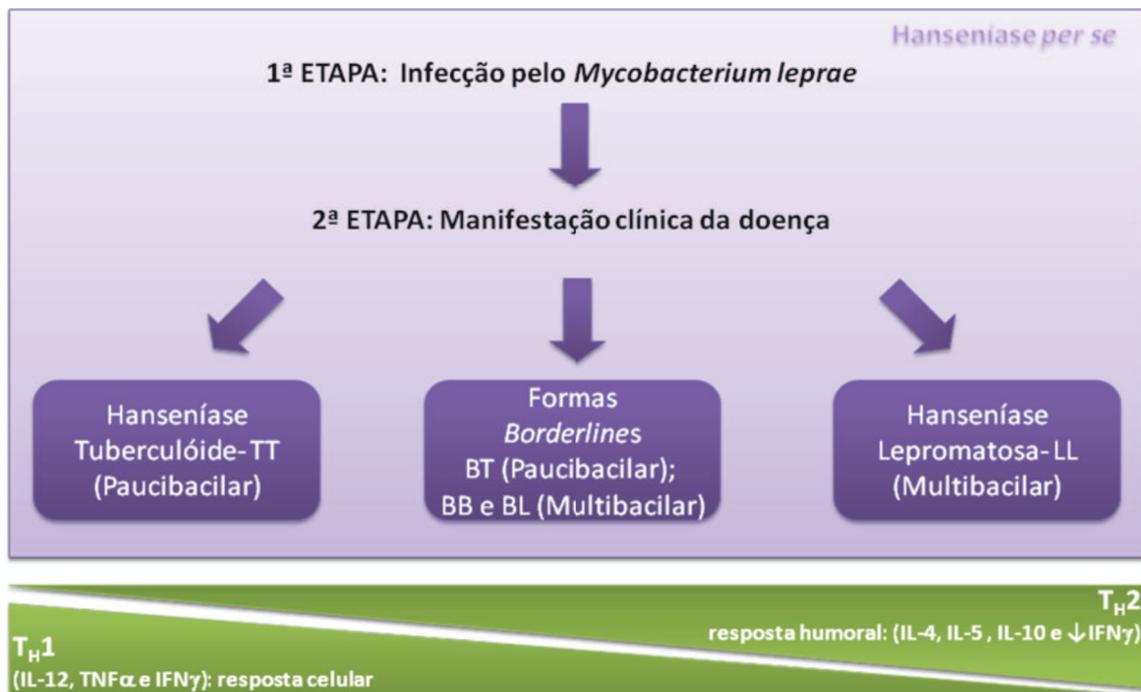
### 1.3 FISIOPATOLOGIA E CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

Como em qualquer infecção, o estado de doença é resultante da combinação entre fatores intrínsecos ao microrganismo (por exemplo, virulência) e ao hospedeiro (por exemplo, fatores genéticos), juntamente com fatores ambientais. Na hanseníase, é observado que a maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolvem a infecção. Daqueles que adquirem a doença, uma fração evoluirá para cura espontânea, e outra desenvolverá hanseníase em uma das suas formas clínicas [1, 16]. Apesar de não estar completamente elucidada, é provável que a transmissão do bacilo ocorra principalmente através das vias respiratórias do hospedeiro. Estudos com camundongos imunossuprimidos expostos a aerossóis contendo *M. leprae* [17] e camundongos atímicos que sofreram aplicação tópica de suspensão do bacilo em fossas nasais mostram que, em ambos os casos, os animais foram infectados [18].

#### 1.3.1 Manifestações clínicas da hanseníase

A evolução clínica da hanseníase pode ser descrita como um processo em duas etapas: na primeira etapa, indivíduos intrinsecamente suscetíveis são infectados pelo *M. leprae*, e são considerados portadores de hanseníase *per se*, ou seja, a doença independente da sua forma clínica. Na segunda etapa, os indivíduos infectados progridem para a manifestação da doença, que ocorre dentro de um amplo espectro de formas clínicas cujos pólos são ocupados pela hanseníase tuberculóide/localizada (Tuberculóide/Tuberculóide - TT), e pela hanseníase

lepromatosa/sistêmica (Lepromatosa/Lepromatosa - LL), com polarização das respostas imunes  $T_H1$  e  $T_H2$ , respectivamente (**figura 5**). De acordo com o sistema de classificação proposto por Ridley-Jopling, existem ainda formas intermediárias (*Borderline*), definidas segundo dados histológicos e clínicos das lesões, que se caracterizam imunologicamente por não seguir um padrão de resposta bem definido [2, 19]. As formas tuberculóide e lepromatosa da doença correspondem aos tipos de hanseníase paucibacilar e multibacilar, respectivamente, preconizados pela OMS para fins de orientação terapêutica [1].



**Figura 5:** Manifestações clínicas da hanseníase.

#### 1.4. INTERAÇÕES MOLECULARES ENTRE *M. leprae* E O HOSPEDEIRO

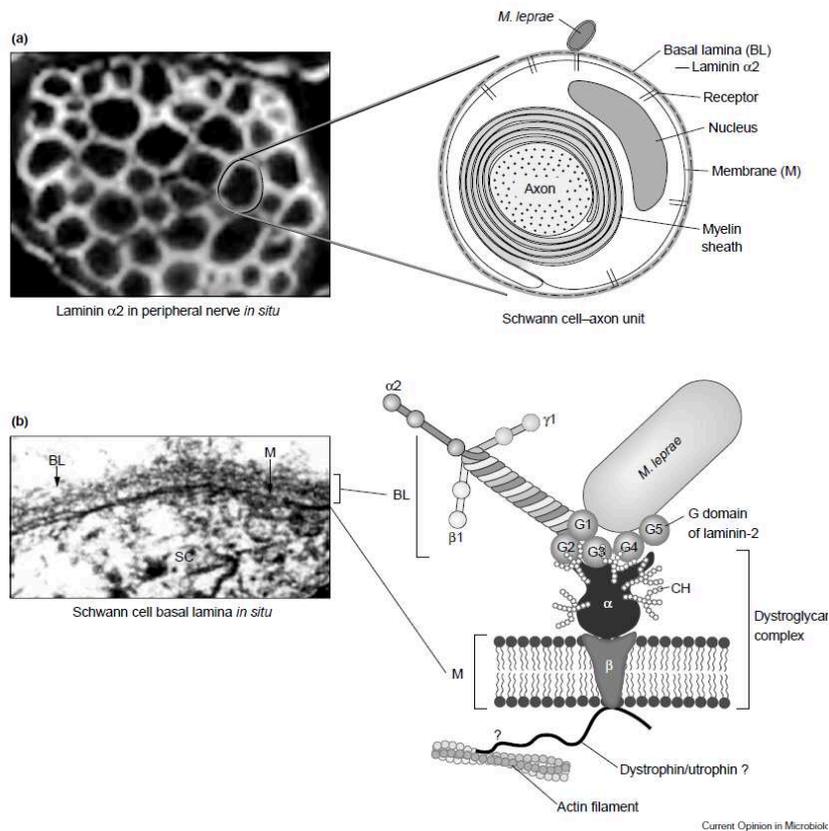
As complexas interações entre microrganismos patogênicos e suas células-alvo são eventos centrais para o estabelecimento da infecção, e os mecanismos moleculares envolvidos nestes estágios precoces da patogênese de doenças infecciosas têm sido objeto de intensa investigação [20]. Na hanseníase, é razoável admitir que o controle da suscetibilidade à doença *per se* é dependente de eventos

moleculares de interação entre o *M. leprae* e suas células-alvo: os macrófagos e as células de Schwann (CSs) do SNP.

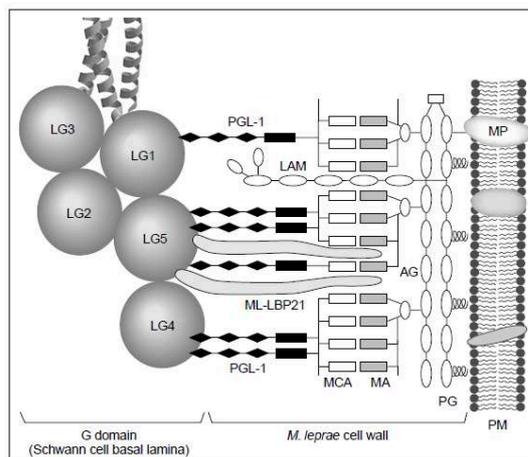
#### 1.4.1 *M. leprae* e as células de Schwann

No SNP dos vertebrados, o axônio recruta a CS, a qual promove seu embainhamento e mielinização, permitindo melhora na condução dos impulsos nervosos e garantindo a integridade axonal [21]. Na hanseníase, acredita-se que as CSs sejam o foco principal do *M. leprae*, sendo este o único patógeno capaz de invadir tais células e, conseqüentemente, causar danos irreversíveis aos nervos periféricos, desde de perda de sensibilidade motora até deformidades de membros. Avanços na área da biologia molecular e celular vêm colaborando no entendimento dos mecanismos envolvidos na neuropatia da hanseníase.

Hunter e cols. [22] descreveram pela primeira vez um componente de parede celular específico do *M. leprae* com importante papel antigênico, o glicolípido fenólico-1 (em inglês, *Phenolic glycolipid-1*, PGL-1), o qual pode ser a chave do tropismo e predileção desse bacilo por suas células-alvo. A invasão da CS pelo *M. leprae* é dependente da interação da fração trissacarídica do PGL-1 com o domínio G da cadeia alfa da laminina-2 na lâmina basal [23, 24]. Contudo, tal interação com  $\alpha$ 2-laminina parece ocorrer com outras bactérias do gênero *Mycobacterium*, incluindo *M. tuberculosis* [25], levando a crer que o processo de invasão celular seletivo depende também de outros intermediadores moleculares tanto da CS como de *M. leprae*. Entre estes, a  $\alpha$ -dístroglicana ( $\alpha$ DG) da lâmina basal da CS [26] e a proteína de 21kDa do *M. leprae* ligadora à laminina (em inglês, *21 kDa M. leprae laminin binding protein*, ML-LBP21) [27] da parede celular do bacilo, ambos identificados como moléculas que contribuem não apenas na adesão, mas também no engolfamento do bacilo pelas CSs. A partir desses achados, Rambukkana [28] propôs um modelo de interação molecular entre *M. leprae* e as CSs, conforme ilustrado nas **figuras 6 e 7**.



**Figura 6:** Proposta de modelo de interação molecular entre *M. leprae* e CS. Em A, à direita uma eletromicrografia revelando expressão de  $\alpha 2$ -laminina ao redor de cada CS ao lado de representação esquemática de um corte transversal de uma CS interagindo com um neurônio. Em B, à direita uma eletromicrografia revelando a lâmina basal (*Basal Lamina*, BL) e membrana celular (M) da CS ao lado de um esquema proposto da interação entre o *M. leprae* e os componentes celulares, enfocando o envolvimento entre o domínio G da laminina-2 e a  $\alpha$ -dístroglicana. Fonte: [28].



**Figura 7:** Modelo representativo das interações entre o domínio G (representado por 5 subdomínios, LG1-LG5) da  $\alpha 2$ -laminina e os componentes PGL-1 e ML-LBP21 da parede celular da *M. leprae*. O domínio G possui três sítios de ligação para PGL-1,  $\alpha 2$ LG1,  $\alpha 2$ LG4 e  $\alpha 2$ LG5. Em contraste, ML-LBP21 realiza ligação apenas com  $\alpha 2$ LG5, sugerindo que a PGL-1 é um ligante bacteriano mais para o domínio de G e à lâmina basal da Cs. Outros componentes da parede celular da *M. leprae* estão representados: lipoarabinomanana (*lipoarabinomannan*, LAM), peptidoglicano (PG), arabinogalactana (AG), ácido micocerósico (*mycocerosic acid*, MCA), ácido micólico (*micolic acid*, MA), membrana plasmática (*plasmatic membrane*, PM) e proteínas de membrana (*membrane proteins*, MP). Fonte:[28].

Quando internalizado, *M. leprae* parece sobreviver e se replicar em culturas de CS e em co-culturas CS-neurônios isoladas de ratos Holtzman mantidas a 33°C por longos períodos. Nessas condições, o patógeno não causa danos evidentes às células, apesar da morfologia celular estar diferente após dias da infecção. No mesmo modelo, *M. leprae* regula a expressão de alguns genes celulares, por exemplo, aumentando a expressão de moléculas de adesão de célula neural (em inglês, *Neural Cell Adhesion Molecules*, NCAMs) e moléculas de adesão intercelulares (em inglês, *Intercellular Adhesion Molecules*, ICAMs) e diminuindo a expressão de N-caderina [29]. Em contraste, trabalhando com co-culturas de CS-neurônios de camundongos *knockout Rag1* (*Rag1*<sup>-/-</sup>) deficientes em células B e T, Rambukkana e cols. demonstraram que CSs infectadas com *M. leprae* provocam desmielinização dos axônios na ausência de resposta imune adaptativa [30, 31]. Complementariamente, ensaios conduzidos com a linhagem de CSs ST88-14 e com células primárias isoladas de lesões de pacientes, permitiram observar que a interação entre uma lipoproteína de 19-kDa do *M. leprae* e o receptor do tipo *Toll*-2 (em inglês, *Toll-like receptor 2*, TLR2) da membrana celular leva à ativação dos mecanismos de morte celular programada [32].

Trabalhos interessantes avaliando o potencial imunogênico das CSs tentaram explicar parte da neuropatia hansênica. Porém, apesar das CSs mostrarem evidências de processar e apresentar antígenos, não são consideradas fagócitos profissionais, pois são incapazes de destruir patógenos diretamente [33, 34].

Recentemente, novos mecanismos de sobrevivência do *M. leprae* em CSs vêm sendo propostos, sugerindo que o bacilo se utiliza do metabolismo lipídico do hospedeiro para sobreviver em fagossomos. Células de Schwann provenientes de lesões de pacientes lepromatosos, altamente infectadas, apresentam formações lipídicas, compostas em parte por gotículas lipídicas, induzidas por *M. leprae*. O bacilo parece ser capaz de promover a síntese dessas organelas e recrutá-las até os fagossomos, onde lhe conferem proteção contra respostas do hospedeiro [35].

Tais achados conferem vantagens ao *M. leprae* em termos de sobrevivência, multiplicação e conseqüente dano neural.

#### 1.4.2 *M. leprae* e os fagócitos

Mesmo que o mecanismo de invasão das CSs não esteja completamente elucidado, foi postulado que monócitos contendo *M. leprae* são um veículo de disseminação da doença para outros tecidos, inclusive o SNP. Por exemplo, *M. leprae* pode ser encontrado em grande número dentro de macrófagos obtidos a partir de granulomas de pacientes lepromatosos, sendo observado que a bactéria desenvolveu a habilidade de sobreviver e se replicar nestas células. Alguns achados sugerem que monócitos infectados são capazes de migrar através da barreira hemato-encefálica no espaço endoneural, onde podem se diferenciar em macrófagos e conseqüentemente viabilizar a infecção nas CSs [33, 36-38].

Os macrófagos são células fagocíticas teciduais do sistema imunológico, derivados dos monócitos circulantes, e possuem um duplo papel na defesa do hospedeiro contra microrganismos: são considerados a primeira barreira contra os patógenos invasores intracelulares, tais como *Leishmania sp* e as micobactérias, além de agirem como importantes células acessórias da resposta adaptativa. Na hanseníase, esses fagócitos mononucleares são consideradas células-alvo do *M. leprae*, assim como também são importantes nas respostas imunológicas inata e adaptativa, desde o reconhecimento do bacilo e seu processamento até a apresentação de antígenos e liberação de citocinas [39, 40].

Outro fagócito bastante estudado *in vitro*, principalmente em ensaios de apresentação de antígenos, é a célula dentrítica (em inglês, *Dendritic Cell*, DC). As DCs são distribuídas em órgãos linfóides, epitélio mucoso e parênquima dos órgãos, conferindo capacidade fagocítica ao hospedeiro, além de serem consideradas células apresentadoras de antígenos (em inglês, *Antigen Presenting Cells*, APCs) profissionais [41].

#### 1.4.2.1 Fagócitos e a imunidade inata contra o *M. leprae*

##### 1.4.2.1.1 Reconhecimento e fagocitose do *M. leprae*

Vários candidatos a mediadores da interação macrófago/ *M. leprae* já foram descritos, tais como componentes do sistema complemento, lectinas do tipo-C (LTC) e TLRs [39] [42, 43]. Essas três categorias de moléculas são consideradas receptores de reconhecimento de padrões (em inglês, *Pattern-Recognition Receptors*, PRRs), importantes no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (em inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs). Por exemplo, há evidências que mostram que o componente do sistema complemento C3 e os receptores de membrana de complemento (em inglês, *Complement Receptors*, CR) CR1 e CR3 participam na fagocitose do *M. leprae* pelos macrófagos [44]. Inclusive, mais tarde foi demonstrado que o PGL-1 intermedia a invasão de macrófagos por *M. leprae* via, mesmo sem prévia opsonização, de modo específico quando comparado com receptor de manose (RM) testado nas mesmas condições [45].

Importante no reconhecimento de patógenos, as LTCs constituem um grande grupo de proteínas que reconhecem PAMPs e induzem direta ou indiretamente (via ativação de complemento), implicando em vários processos celulares como adesão, endocitose e fagocitose. Dentre estes, cabe destacar o RM e a lectina ligante de manose (em inglês, *Mannose-binding lectin* - MBL). O RM é uma proteína transmembrânica que, em macrófagos, permite a fagocitose direta de cepas de *M. tuberculosis* pela sua interação com o componente da parede bacteriana LAM. O resultado dessa interação é a inibição da formação do fagolisossomo [42, 46, 47]. Já a MBL é uma lectina sérica capaz de modular a atividade fagocítica de macrófagos através da ativação via das lectinas do complemento. A ativação do complemento ocorre via serino proteases associadas à MBL (em inglês, *MBL-associated serine proteases*, MASPs), promovendo a opsonização de microrganismos através de C3 que resulta no aumento da fagocitose – inclusive de *M. leprae* – através principalmente de CR1 [46, 48].

Os TLRs também vêm sendo investigados na hanseníase. Esses mediadores da resposta inata formam uma família de receptores de superfície de fagócitos e de outros tipos celulares, envolvidos na ativação de macrófagos através do reconhecimento de PAMPs [49]. Em especial, o heterodímero TLR1/2 participa do reconhecimento de lipopeptídeos micobacterianos, desencadeando uma cascata de sinalização que envolve aumento da expressão do gene do receptor de vitamina D (em inglês, *Vitamin D receptor* - VDR), causando ativação de vitamina D e posterior aumento de expressão de peptídeos com ação microbicida, como a catelicidina [50]. Ainda, a vitamina D parece ser um regulador de mecanismos de autofagia celular quando fagócitos reconhecem a lipoproteína micobacteriana LpqH através dos receptores TLR1/2/CD14. Esses mecanismos de autofagia têm um papel importante na proteção contra microrganismos intracelulares degradados e processados nos fagolisossomos. Outra consequência dessa via de reconhecimento é a indução de uma cascata de sinalização que ativa o fator nuclear- kappa B (em inglês, *Nuclear Factor-KappaB*, NF-κB), regulador importante da expressão de vários genes envolvidos com respostas inatas posteriores [51].

#### 1.4.2.1.2 Fagócitos e seus mecanismos inatos contra o *M. leprae*

Após a internalização pelos fagócitos, quando as respostas inatas são ativadas através de estímulos como interferon gama (IFN $\gamma$ ) e sinais dos TLRs, são desencadeados mecanismos efetivos de defesa que primariamente liberam mediadores microbicidas na tentativa de eliminar o organismo invasor. Dentre esses mediadores estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), tais como ânion superóxido (O $_2^-$ ) e o óxido nítrico (em inglês, *Nitric Oxide* - NO), respectivamente. Esses produtos, gerados após o reconhecimento dos antígenos, são tóxicos aos patógenos, colaborando para a sua eliminação. Interessantemente, há estudos que demonstram que o *M. leprae* é capaz de inibir a produção desses mediadores [52-55], além de modular outras vias metabólicas do hospedeiro, como formação de gotículas lipídicas, tornando-o capaz de sobreviver e se replicar nos macrófagos, permanecendo “invisível” ao sistema imunológico durante anos dentro de fagolisossomos [56-58].

Um exemplo de modulação do *burst* oxidativo é o trabalho de Adams e cols. utilizando macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  e lipopolissacarídeos (LPS) isolados de camundongos *knockout* para óxido nítrico sintase induzível (em inglês, *Nitric Oxide Synthase* - iNOS) estimulados com *M. leprae* viáveis. Como resultado, esses macrófagos deficientes em NO não eram capazes de destruir o patógeno. O mesmo ocorreu com macrófagos ativados originários de camundongos B6 tratados com inibidores da produção de NO [53]. O curioso é que esses camundongos *knockout* para iNOS não são deficientes em EROs, demonstrando que na ausência de ERNs, EROs por si só não são competentes na eliminação das micobactérias como o *M. tuberculosis* [59]. Esses dados complementam os achados de Holzer e cols. quando observam inibição da produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por monócitos e macrófagos humanos e por macrófagos de camundongos após tratamento com *M. leprae* morto ou viável [55].

Estudos demonstram a capacidade de resistência do *M. leprae* através de ensaios de avaliação de apoptose em monócitos ou macrófagos murinos estimulados com o bacilo morto e vivo. Em suma, foi observado que células tratadas com microrganismos viáveis não induzem à morte celular por mecanismo de apoptose, enquanto que, utilizando-se microrganismos mortos, o resultado foi o oposto. O mecanismo de inibição da apoptose pelo *M. leprae* envolve a diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (por exemplo, Bax- $\alpha$  e Bak), caspases 3 e 9 e também da citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral alfa (em inglês, *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ) [60, 61]. Em contraste, outras micobactérias, como *M. tuberculosis*, *M. bovis* bacillus Calmette-Guèrin (BCG) e *M. avium*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis* induzem macrófagos à apoptose de maneira mais rápida [60, 62]. Porém, quando se avalia mecanismos de apoptose por métodos imunohistológicos em células provenientes de lesões granulomatosas de pacientes dos pólos hansênicos TT e LL, observa-se predominância de células apoptóticas em amostras obtidas de pacientes LL, relacionado provavelmente com o aumento de expressão de caspase 3 presente nesse grupo [63].

Outra maneira do *M. leprae* sobreviver e mesmo se multiplicar em macrófagos é se utilizando do metabolismo lipídico do hospedeiro. O mesmo grupo de pesquisadores que descreveu a formação de gotículas lipídicas em CS, já havia estudado as mesmas organelas em macrófagos murinos e humanos. Ambos os tipos celulares foram induzidos a formarem gotículas lipídicas após tratamento com *M.*

*leprae*, mecanismo dependente parcialmente do reconhecimento do bacilo através de TLR2/TLR6. Essas gotículas são constituídas principalmente de adipofilina (em inglês, *Adipose differentiation-related protein*, ADRP) e perilipina, e funcionam como locais de síntese de eicosanóides como prostaglandina E2, (em inglês, *Prostaglandin E2*, PGE<sub>2</sub>), caracterizando as formações encontradas tipicamente em pacientes LL [58]. Existem fortes evidências que o *M. leprae* controla a expressão de genes codificadores dessas proteínas, as quais derivam de fosfolípídeos oxidados presentes em altas concentrações em macrófagos de pacientes hansênicos [57, 58, 64].

#### 1.4.2.2 Fagócitos e a imunidade adaptativa contra o *M. leprae*

##### 1.4.2.2.1 Processamento e apresentação de antígenos

Para desencadear uma resposta imunológica adaptativa, os antígenos protéicos precisam ser convertidos em peptídeos e apresentados na superfície dos fagócitos. Os antígenos, processados associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (em inglês, *Major Histocompatibility Complex*, MHC) de classe I e de classe II (MHC-I e MHC-II), codificadas por genes do sistema de antígenos leucocitários humanos (*Human Leukocyte Antigens*, HLA), servem como ligantes para os receptores antígeno-específicos dos linfócito T. O MHC-I é constituído, entre outros, pelos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, os quais se complexam a peptídeos reconhecidos pelas células T CD8<sup>+</sup>. Já o MHC-II é constituído pelos genes *HLA-DR*, *HLA-DP* e *HLA-DQ* que codificam proteínas reconhecidas por células T CD4<sup>+</sup> [41].

Quando os fagócitos (principalmente macrófagos e DCs) reconhecem o *M. leprae*, pode ocorrer o processamento de seus antígenos via MHC-I ou -II. Na via do MHC-I, ocorre o processamento de antígenos citosólicos, os quais são processados no proteassomo (um grande complexo enzimático proteolítico) e posteriormente transportados via transportadores associados a antígenos processados

(*Transporters associated with antigen processing*, TAPs) ao retículo endoplasmático, onde se ligam às moléculas MHC-I [65]. Essa via está envolvida principalmente em processamento de peptídeos virais, quando não há formação de vesículas como endossomos ou fagossomos. Curiosamente, foi demonstrado que o *M. leprae* e *M. tuberculosis* viáveis são capazes de se translocarem dos fagolisossomos para o citosol de DCs e que tal translocação promovia apoptose celular via ativação de caspase 3 após uma semana do desafio [66]. Conseqüentemente, os antígenos micobacterianos poderiam ser processados pela via MHC-I e causar a morte das DCs.

Diferentemente da via MHC-I, que pode ocorrer em todas as células nucleadas, a via MHC-II é restrita às APCs profissionais, principalmente macrófagos, DCs e linfócitos B capazes de endocitar antígenos extracelulares e fagocitar (apenas macrófagos e DCs) microrganismos de vida intracelular, como as micobactérias. As vesículas endossômicas ou fagossômicas são posteriormente fusionadas com lisossomos resultando em degradação enzimática e ácida. Em seguida, moléculas MHC-II emergem do complexo de Golgi e são dirigidas aos endolisossomos ou fagolisossomos, onde se fundem com os antígenos processados [67].

Quando processados por ambas as vias MHC, os antígenos são apresentados às superfícies das APCs, possibilitando o desencadeamento efetivo da resposta adaptativa. Para que os antígenos ligados tanto em MHC-I quanto MHC-II sejam reconhecidos pelos linfócitos CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, respectivamente, é necessária a participação de proteínas acessórias de superfície, como as moléculas co-estimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), e moléculas de adesão celular, como CD54 (ICAM-1). A interação entre estes ligantes e os receptores específicos expressos por células T resulta em produção de quimiocinas e citocinas, ocasionando uma proliferação de células T especializadas [68, 69].

A capacidade de apresentação de antígenos em DCs derivadas de monócitos humanos já foi avaliada após infecção com *M. leprae* viáveis, revelando que as células eram capazes de inibir a expressão de HLA-ABC e HLA-DR, porém com aumento de expressão de CD86. A inibição não ocorreu quando as células foram infectadas com BCG. No mesmo trabalho, também foi demonstrado que as DC infectadas com *M. leprae* induzem fracamente a respostas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando comparadas com células infectadas com BCG ou *Mycobacterium avium*. A inibição da apresentação de antígenos parece ser dependente de PGL-1

[70]. Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que outro antígeno de *M. leprae*, MMP-II (*Major membrane protein II*), possui um papel imunomodulatório por ser capaz de induzir resposta via MHC-I e MHC-II [71].

Investigando melhor o papel dos co-estimuladores CD80 e CD86, dois trabalhos utilizando monócitos/macrófagos de pacientes hansênicos, mostraram a importância de ambas as moléculas [72, 73]. Quando monócitos foram tratados com *M. leprae* sonicado, houve diminuição na expressão de CD80 em células de pacientes do pólo LL da doença, enquanto que em células de pacientes do pólo TT, não se observou mudanças em relação às células do grupo controle [72]. Achados similares foram encontrados por Sridevi e cols, que observaram baixa expressão de CD80 e CD86 em monócitos recém isolados de pacientes do grupo LL em relação aos grupos controle e TT. Porém, após tratamento de macrófagos dos mesmos grupos anteriores com antígenos de parede celular de *M. leprae*, foi observado aumento de expressão de ambos os co-estimuladores em todos os grupos [73].

Além dos antígenos peptídicos apresentados por moléculas MHC, os antígenos lipídicos, presentes abundantemente em micobactérias, podem ser apresentados através de moléculas CD1. A família CD1 constitui-se de proteínas capazes de interagir com moléculas lipídicas e apresentá-las para células T específicas, normalmente restritas a CD1 do grupo 1 [74]. Na hanseníase, essa via de apresentação foi estudada a partir de DCs obtidas de pacientes com as formas TT e LL tratadas com fração de antígenos lipídicos de *M. leprae*. Enquanto que nas amostras de pacientes TT há aumento significativo da expressão de proteínas CD1 do grupo 1 (CD1a, -b e -c), evidenciando a participação efetiva dessa via no combate à infecção, as amostras de pacientes LL apresentam fraca indução de expressão de CD1 [75]. As células T que reconhecem os antígenos lipídicos apresentados por CD1 parecem ser uma sub-classe de células T CD4<sup>+</sup> que apresentam um padrão de resposta similar a T<sub>H</sub>1, possivelmente contribuindo nas respostas mediadas por células nos pacientes do grupo TT [76].

#### 1.4.2.2.2 Citocinas na hanseníase: paradigma T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2

Os fagócitos ativados, além de poderem causar a morte de microrganismos fagocitados via produção de agentes microbicidas, e realizarem os processos de processamento e apresentação de antígenos, exercem funções de defesa mediadas por citocinas importantes que colaboram na ativação de linfócitos T, desencadeando uma resposta adaptativa.

O *M. leprae* vêm demonstrando ser capaz de ativar fracamente macrófagos [77, 78] e DCs [79] *in vitro* quando se utiliza células sanguíneas de doadores saudáveis, através de múltiplas vias de sinalização celular. Monócitos tratados com *M. leprae* vivo ou morto apresentam produção reduzida das citocinas imunoestimulatórias TNF- $\alpha$ , interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), enquanto que aumentam a produção da citocina imunossupressora antagonista do receptor IL-1 (em inglês, *Interleukin-1 receptor antagonist*, IL-1Ra). O oposto ocorreu quando as células foram tratadas com BCG viáveis, capazes de ativar fortemente os monócitos [77]. Sinsimer e cols. [78] replicaram os achados para IL-6 e IL-1Ra em *M. leprae* e BCG, além de descreverem o papel dos fatores de sinalização celular fosfoinositídeo quinase-3 (em inglês, *Phosphoinositide-3 kinase*, PI3K) e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B na produção dessas e de outras citocinas envolvidas na ativação dos fagócitos. Foi observado que monócitos de indivíduos saudáveis tratados com inibidor de PI3K, e posteriormente expostos ao *M. leprae*, tinham aumento dos níveis de outro imunossupressor, a proteína quimioatraente de monócitos 1 (em inglês, *Monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1), além do IL-1Ra, quando comparado com os controles. Além disso, o bacilo parece ser capaz de diminuir a ativação de NF- $\kappa$ B, causando conseqüente diminuição na produção de citocinas imunoestimulatórias TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, centrais na ativação celular e na progressão da resposta imunológica. Outro trabalho, avaliando a capacidade de ativação e maturação de DCs por *M. leprae*, revelou que os níveis de expressão de genes ativadores de resposta inflamatória, como TNF- $\alpha$  e IL-12, e de resposta adaptativa como HLA-DR e CD80, são menores quando comparados com DCs tratadas com BCG e *M. tuberculosis* [79]. A inibição da expressão de TNF- $\alpha$  também foi relatada em células de linhagem monocítica humana THP-1 desafiadas com *M. leprae* morto e/ou BCG.

Enquanto que o *M. leprae* suprime a expressão de TNF- $\alpha$ , o BCG induz a secreção de níveis relativamente altos desta citocina [80].

Interessantemente, esses mesmos trabalhos, que mostram o *M. leprae* inibindo a ativação e maturação dos fagócitos “virgens”, relatam que, quando as células são previamente ativadas (por exemplo, com IFN $\gamma$  e/ou LPS), respondem prontamente ao *M. leprae*, produzindo perfis de citocinas compatíveis com os encontrados em pacientes que progrediram para o segundo estágio da infecção, manifestando a doença nas formas clínicas descritas por Ripley & Jopling. O desenvolvimento das formas clínicas da infecção é dependente da ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares (T *helper*- T<sub>H</sub>), respondentes a peptídeos antigênicos associados a MHC-II. Por sua vez, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem ser divididos em duas subpopulações, designadas T<sub>H</sub>1 e T<sub>H</sub>2, de acordo com o perfil de citocinas que produzem [41].

Modelos *in vitro* vêm tentando definir padrões de respostas T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 através de técnicas tais como a identificação de clones de células T por métodos imunohistológicos em lesões de pacientes, quantificação de citocinas em sobrenadantes de culturas de células de sangue periférico ou de células isoladas de biópsias de lesões de pacientes, e perfis de expressão dos genes codificadores de citocinas. Apesar de algumas divergências, nota-se claramente perfis de respostas imunológicas distintos entre pacientes hansênicos: enquanto no pólo tuberculóide há predominância de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$ , caracterizando ativação de células T<sub>H</sub>1, no pólo lepromatoso há aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-10 e baixa produção de IFN $\gamma$ , evidenciando ativação de células T<sub>H</sub>2. Como consequência, pacientes com a forma TT da hanseníase apresentam resposta imune efetiva mediada por células, caracterizada pelo aumento da capacidade microbicida dos macrófagos que limita a disseminação da infecção. Já os pacientes com a forma LL da doença possuem predomínio da resposta humoral, com produção de elevadas concentrações de anticorpos anti-*M. leprae*, porém supressão de resposta celular, promovendo a proliferação dos bacilos em macrófagos e subsequente disseminação da infecção. Ainda, pacientes LL apresentam em suas lesões predominância de clones de células T CD8<sup>+</sup> supressoras da ativação de macrófagos em relação a T CD4<sup>+</sup>, o que parece colaborar na inibição da resposta celular nesses pacientes [81-84].

## 1.5 GENÉTICA DA HANSENÍASE

### 1.5.1 As primeiras evidências de um componente genético de controle da suscetibilidade à hanseníase

Sendo uma doença infecciosa, acreditava-se que a suscetibilidade à hanseníase não fosse hereditária e principalmente dependente dos fatores de virulência das cepas de *M. leprae*. Contudo, estudos de genética comparativa e de filogeografia, utilizando-se cepas isoladas de diferentes regiões do mundo, revelaram que o genoma dessas cepas compartilham 99,995% de suas sequências genéticas, apontando para outros fatores não relacionados à genética do *M. leprae*, os quais estariam influenciando mais fortemente do processo infeccioso. Entre estes fatores estariam os fatores ambientais e a genética do hospedeiro [85, 86]. Assim, entre as diversas estratégias possíveis para investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na infecção por *M. leprae*, os estudos genéticos têm produzido resultados promissores, que reforçam a hipótese de que fenótipos da doença são, em grande parte, dependentes de características genéticas do hospedeiro [87, 88].

Os primeiros achados demonstrando a influência de componente genético na suscetibilidade à hanseníase se deram nas décadas de 60 e 70, através de estudos de agregação familiar [89] e em gêmeos [90]. Na década de 80, uma análise de segregação complexa em uma população caribenha indicou que a hanseníase segue um modelo de herança mendeliana com gene principal co-dominante ou recessivo [91]. Este achado foi recentemente replicado parcialmente em uma população brasileira, na qual foi identificado um efeito de gene principal co-dominante, capaz de explicar integralmente a agregação familiar de casos [92].

## 1.5.2 Estudos pioneiros de ligação e de associação

Nas duas últimas décadas, estratégias mais modernas, como análises de ligação e associação, vêm revelando várias regiões genômicas e genes associados tanto com evolução da doença em suas formas clínicas como com suscetibilidade à infecção *per se* já foram identificados. Muitos destes achados já foram replicados em diferentes populações [87].

Como resultado desses estudos genético-moleculares, diversos genes, tais como o *VDR* [93], *SLC11A1* (anteriormente denominado *NRAMP1*) [94], *TAP* [95], *IL10* [96] e variantes da região MHC/HLA I [97] e II [98] foram identificados em associação ou ligação com fenótipos da hanseníase, fornecendo informações importantes no direcionamento de ensaios genéticos funcionais e definição de modelos de estudos celulares como aqueles descritos anteriormente.

Em 2001, uma primeira varredura genômica para genes de suscetibilidade à hanseníase encontrou evidência de ligação entre a região cromossômica 10p13 e hanseníase paucibacilar em uma população da Índia [99]. O achado foi confirmado, dois anos mais tarde, em uma coleção de famílias recrutadas no Vietnã do Sul [100]. O resultado mais importante da varredura genômica de ligação realizada na população vietnamita, porém, foi a localização de *loci* de suscetibilidade à hanseníase *per se* nas regiões cromossômicas 6q25-q27 e 6p21, descritos com maiores detalhes na seção 1.5.1 [101].

Recentemente, uma primeira varredura genômica de associação (em inglês, *Genome-Wide Association*, GWA) em hanseníase foi realizada. Zhang e cols. estudaram uma amostra populacional chinesa, identificando variações em sete genes – *CCDC122*, *CD13orf31*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR-DQ*, *RIPK2* e *LRRK2* – associadas com a suscetibilidade à hanseníase, com resultados mais evidentes para os genes *CD13orf31*, *NOD2*, *RIPK2* e *LRRK2* e hanseníase multibacilar [102]. Na tentativa de replicar esses achados, Wong e cols. genotiparam, em uma população africana, os mesmos marcadores associados no estudo chinês. Foi novamente observada associação significativa entre hanseníase e os genes *C13orf31* e *CCDC122*, cujas variantes têm sido descritas como fatores de risco para doença de Crohn. Curiosamente, os achados para os genes *NOD2*, *RIPK2*, *TNFSF15* e *LRRK2* não foram replicados [103]. Segundo pesquisadores da área, o componente

genético de controle da suscetibilidade às infecções em geral é complexo, heterogêneo e modulado por fatores ambientais, como determinantes da virulência microbiana. Porém, estudos do tipo GWA, que combinam o conhecimento da sequência completa do genoma humano com o da arquitetura complexa de suas variantes mais comuns, têm se mostrado uma ferramenta poderosa para se avançar na elucidação desses fatores inatos de resistência [104].

### 1.5.3 Genética funcional da suscetibilidade à hanseníase

Apesar do exposto acima, para maioria dos genes associados com hanseníase, pouco se sabe sobre suas funções no contexto da infecção por *M. leprae*. Genes candidatos, como *IL10*, *TNFA*, *LTA*, *MRC1* e *PARK2*, vêm sendo alvo de análises funcionais cujo objetivo é entender melhor seus papéis biológicos na fisiopatologia da hanseníase.

O gene *IL10* codifica uma citocina imunorregulatória primariamente secretada por macrófagos ativados e células T reguladoras, envolvidas no controle da imunidade inata e imunidade mediada por células, respectivamente. Análises haplotípicas utilizando SNPs localizados na região promotora desse gene, bem como estudo posterior caso-controle e de meta-análise, revelaram que o alelo -819T está associado com suscetibilidade à hanseníase [96, 105]. Consistentemente, dosagem de IL-10 em sobrenadantes de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos carreadores do alelo -819T, estimuladas com antígenos de *M. leprae*, revelou menor produção da citocina quando comparado com células com o genótipo -819C [106].

O TNF- $\alpha$ , codificado pelo gene *TNFA*, é uma citocina principalmente produzida por monócitos/macrófagos que, diferente da IL-10, tem atividade pró-inflamatória, efetora da resposta imune inata. Na hanseníase, o TNF- $\alpha$  parece estar envolvido no controle da resistência do hospedeiro ao *M. leprae*. Estudo baseado em famílias [107] e estudos subsequentes caso-controle [108, 109] sugerem que o alelo -308A da região promotora do gene *TNFA* promove proteção contra hanseníase *per se*. Contudo, outros achados divergem desse resultado, e mostram o alelo -308A associado com forte resposta inflamatória contra *M. leprae* [110] e com

suscetibilidade à forma multibacilar da infecção [111]. Estudo funcional indicou que portadores do alelo -308A apresentavam uma forte reação inflamatória contra antígenos do *M. leprae* em pele [110]. Ainda, como já citado anteriormente, dosagens de TNF- $\alpha$  em sobrenadante de células isoladas de biópsias de pele revelaram que pacientes classificados na forma tuberculóide expressam mais essa citocina [84]. Outro estudo funcional recente demonstrou que camundongos *knockout* TNF<sup>-/-</sup> possuem menor capacidade de controlar a infecção por *M. leprae*, já que foi observado significativo aumento no número de bacilos durante nove meses de acompanhamento a partir da inoculação do microrganismo em suas patas [112]. Tais divergências em relação do papel do alelo -308A foram recentemente esclarecidas no estudo de Cardoso e cols. revelando o efeito protetor após um robusto estudo de associação seguido de meta-análise e ensaios funcionais com células de pacientes carreadores deste alelo [113].

Outra citocina envolvida na patogênese da hanseníase, a linfotóxina alfa (LT- $\alpha$ ) é um membro da superfamília do TNF. A função da LT- $\alpha$ , codificada pelo gene *LTA*, é menos conhecida em comparação com o TNF- $\alpha$ . Sabe-se que é uma citocina participante na ativação de inflamação crônica, através da regulação da expressão de moléculas de adesão, bem como de outras citocinas e quimionas importantes no recrutamento de linfócitos [114] e na resposta contra patógenos intracelulares [115]. O SNP *LTA*+80 foi relacionado com maior risco à hanseníase *per se*, principalmente em populações de casos jovens [116]. O papel biológico deste SNP já havia sido testado *in vitro* em linhagens de células B, transfectadas para expressar os alelos *LTA* +80A ou *LTA* +80C, revelando que o primeiro é capaz de suprimir a expressão de LT- $\alpha$ . Outro estudo com camundongos *knockout* LT- $\alpha$ <sup>-/-</sup> infectados com *M. leprae* mostrou uma diminuição na ativação de células T, conseqüentemente uma menor resposta inflamatória na fase crônica da infecção [112].

Recentemente, uma análise realizada em uma amostra da mesma população vietnamita estudada no estudo de ligação [100] mostrou associação significativa entre marcadores do gene *MRC1*, localizado na região 10p13, e hanseníase *per se* [117]. Esse resultado argumenta a favor do *MRC1* como um gene de suscetibilidade a hanseníase *per se*; porém, não explica o pico de ligação observado nos estudos de ligação anteriores, exclusivo para famílias contendo indivíduos portadores da forma paucibacilar da doença. No mesmo trabalho, os

pesquisadores buscaram entender o papel biológico do gene *MRC1* na hanseníase, codificador do receptor de manose (em inglês, *Mannose receptor*, RM). Alter *et al.* analisaram polimorfismos do éxon 7 do gene *MRC1* em amostras de famílias de indivíduos afetados por hanseníase do Vietnã e em amostras caso-controle do Brasil. Os achados revelaram o haplótipo G396-A399-F407 associado a hanseníase *per se* e à doença multibacilar. Já o haplótipo S396-A399-F407 apareceu com maior frequência no grupo controle. Os mesmos pesquisadores partiram em seguida para uma abordagem funcional, realizando ensaios de associação com células recombinantes construídas para super-expressar os haplótipos citados anteriormente. Após ensaios celulares com ligantes clássicos de MR (ovoalbumina e zimosan) e ainda com *M. leprae* e *B. bovis* BCG, não verificou-se diferenças significativas entre as variantes em relação a capacidade celular de ligação e internalização. Esses achados funcionais sugerem que o efeito desses haplótipos possa ser indireto, e que o processo de internalização do *M. leprae* ou de outros patógenos dependa de outras moléculas, além dos MRs [117].

## 1.6 O GENE *PARK2*

### 1.6.1 O gene *PARK2* e a hanseníase

Foco do nosso trabalho, o gene *PARK2* foi revelado a partir do *scan* genômico de ligação realizado por Mira e cols. em uma população vietnamita, que identificou um *locus* envolvido na suscetibilidade à hanseníase no cromossomo 6q25-q26. Para a análise de ligação, os pesquisadores partiram de um painel de 86 famílias incluindo 205 irmãos afetados com a doença independente da forma clínica, e obtiveram um *LOD score* de 4,31 ( $P = 5 \times 10^{-6}$ ) para ligação entre o fenótipo e o *locus* 6q25 [101]. Posteriormente, o mesmo grupo partiu para a construção de um mapa denso de desequilíbrio de ligação (em inglês, *Linkage Disequilibrium*, LD) do segmento genômico sob o pico de ligação no cromossomo 6q25-q26, que resultou na identificação de um bloco de 80 Kb contendo variantes envolvidas no controle da suscetibilidade à hanseníase *per se* na mesma população vietnamita: em uma

primeira etapa, mapeamento de alta resolução do intervalo de 6,4 megabases (Mb) do *locus* de ligação foi realizado em 197 famílias compostas pelos dois pais e um filho afetado, e resultou em seis SNPs associados com hanseníase, sendo que quatro estavam localizados na região promotora bidirecional compartilhada por dois genes, *PARK2* e *PACRG*. Através da construção de um denso mapa de LD da região candidata revelou 17 marcadores associados com a doença; porém, análise de regressão logística multivariada subsequente mostrou que apenas dois SNPs (*Tag SNPs* rs9356058 e rs1040079) eram suficientes para capturar toda a informação da associação observada. O alelo comum “T” do SNP rs9356058 e o alelo raro “C” do rs1040079 estavam associados independentemente ao aumento da suscetibilidade a hanseníase. O achado foi replicado em um estudo caso-controle em uma amostra populacional brasileira recrutada no Rio de Janeiro [118]. Um ano mais tarde, os resultados anteriores foram replicados, agora em uma população do norte da Índia, para a qual o genótipo “TT” do marcador rs9356058 estava associado a aumento no risco à doença *per se* [119]. Recentemente, uma análise de associação conduzida em uma população europeia (Croácia) revelou que o alelo “C” para rs9356058 e o alelo “A” para rs1040079 conferem proteção à hanseníase [120].

Em 2006, um achado trouxe à tona a hipótese de que as associações entre hanseníase e variantes dos genes *PARK2/PACRG* não seriam específicas para infecção por *M. leprae*, e sim relacionadas às respostas do hospedeiro contra outros agentes infecciosos intracelulares. A evidência surgiu quando foi demonstrada associação entre aqueles polimorfismos de *PARK2/PACRG*, encontrados primeiramente nos estudos com hanseníase, e febre tifóide e paratifóide, infecções causadas respectivamente pelos patógenos intracelulares *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*. Este trabalho encontrou associação entre o alelo “T” do SNP rs9356058 e as febres entéricas em uma população da Indonésia [121].

### **1.6.2 Gene *PARK2* e a Doença de Parkinson de Início Precoce**

Interessantemente, mutações no gene *PARK2* têm sido consistentemente associadas a uma forma autossômica recessiva de Doença de Parkinson de Início

Precoce (DPIP) [122]. Clinicamente, a DPIP é caracterizada pelo início dos sintomas antes dos 40-45 anos de idade, incluindo rigidez, tremores em repouso, instabilidade postural, bradicinesia e responsividade à levodopa. Em relação a fisiopatologia, a DPIP é uma doença neurodegenerativa, sendo que os principais achados são degeneração de neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra* e ausência de corpúsculos de Lewy [123].

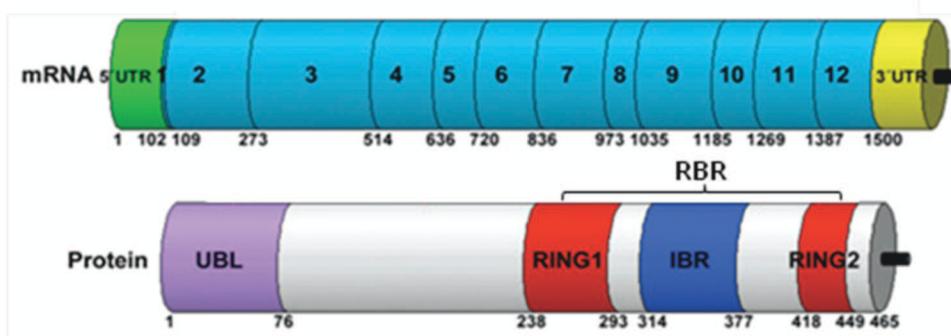
Os primeiros achados genéticos relacionando o cromossomo 6 com DPIP foram publicados no início dos anos 90: um estudo envolvendo 13 famílias multigeracionais japonesas resultou em evidência estatisticamente significativa de ligação entre a doença e a região cromossômica 6q25-q27 (*LOD score*= 7,71) [123]. Reforçando este achado estão os resultados de uma análise de ligação conduzida em 174 famílias com múltiplos membros afetados por Doença de Parkinson (DP), que identificou forte evidência para ligação (*LOD score*= 5.47) entre o cromossomo 6q25-q27 e a doença na sua forma de aparecimento precoce [124].

Dados acumulados indicam que mutações no gene *PARK2* respondem pela maioria dos casos de DPIP. A descoberta do gene *PARK2* como causador da DPIP e a denominação de sua proteína como parquína foi feita por Kitada e cols. em 1998, quando os pesquisadores, por clonagem posicional, descobriram deleções de éxons inteiros em pacientes afetados pela doença [125]. Diversos estudos posteriores revelaram um grande número de mutações de *PARK2* detectadas em pacientes com DP, incluindo desde mutações de ponto até rearranjos (deleções e duplicações), envolvendo todos os 12 éxons do gene. A frequência destas mutações já foi estimada em 50% de famílias com DPIP e 15-18% de pacientes com DPIP isolada [126-131]. Em 2004, uma extensa revisão de literatura foi realizada a partir de mais de 40 trabalhos relatando diferentes mutações encontradas em casos esporádicos ou familiares de DPIP, revelando que a maioria das alterações genéticas ocorrem entre os éxons 2 e 8, com maior prevalência nos éxons 3 e 4 [132].

### **1.6.3 O gene *PARK2* e as funções da parquína**

O gene *PARK2* estende-se por mais de 500kb e contém 12 éxons, codificadores de uma enzima altamente conservada denominada parquína, uma

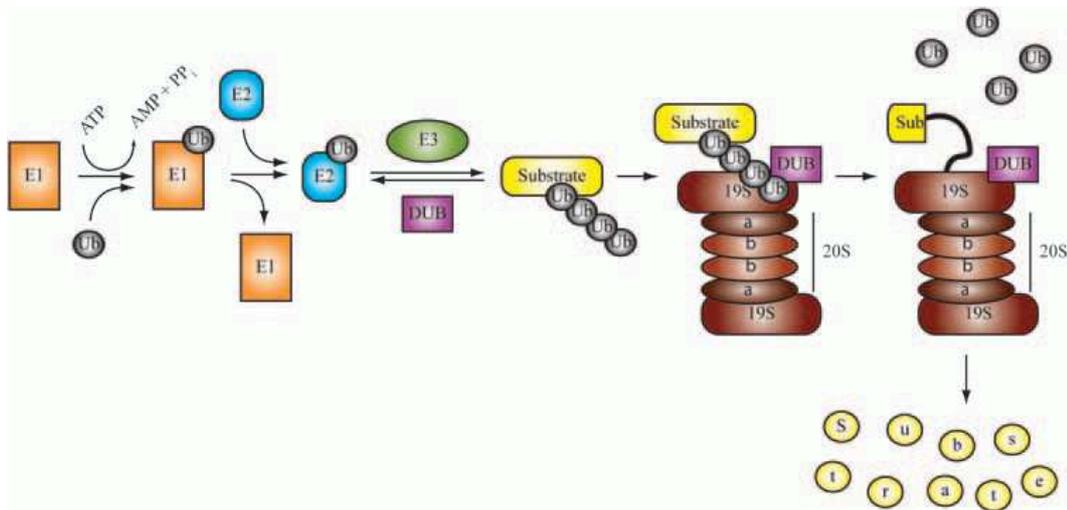
ubiquitina ligase (E3) de 465 aminoácidos e 52-kDa [125]. Sua estrutura molecular contém um domínio UBL (*Ubiquitin-Like Domain*) NH<sub>2</sub>-terminal e duas regiões similares RING (*Really Interesting New Gene*) COOH-terminais separadas por um domínio IBR (*In-Between RING*) rica em cisteína [133, 134]. Esta estrutura proteica RING-IBR-RING é encontrada em uma grande variedade de espécies eucarióticas e pode ser designada como domínio RBR [135]. A parquina é expressa em vários tecidos e tipos celulares, incluindo os neurônios dopaminérgicos presentes na *substantia nigra* do mesencéfalo, células de Schwann do SNP e macrófagos [118, 125] (figura 8).



**Figura 8:** O transcrito do gene *PARK2* e a proteína parquina. Adaptado de Pouligiannis e cols., 2010. Fonte: [136].

Funcionalmente, a parquina tem sido extensivamente estudada na DP. Apenas alguns trabalhos recentes vêm revelando o papel desta enzima na Doença de Huntington e no Mal de Alzheimer [137]. Por ser uma E3, a parquina classicamente é responsável pela ubiquitinação de proteínas-alvo, dirigindo-as para degradação no proteassomo [133, 134]. O sistema ubiquitina-proteassomo (em inglês, *Ubiquitin-proteasome system*, UPS) é dependente de ubiquitina, uma proteína altamente conservada de 76 aminoácidos. Um mecanismo bastante conhecido de proteólise via UPS inicia com ativação da ubiquitina pela enzima E1. Em seguida, a ubiquitina ativada é transferida para uma E2 (em inglês, *ubiquitin-conjugating enzyme*), capaz de catalizar a transferência da ubiquitina para uma E3. Por sua vez, as E3 poli-ubiquitam seus substratos, ou seja, suas proteínas-alvo,

marcando-os e os direcionando para o grande complexo enzimático proteassomo 26S, onde ocorre a proteólise [138]. (**Figura 9**).

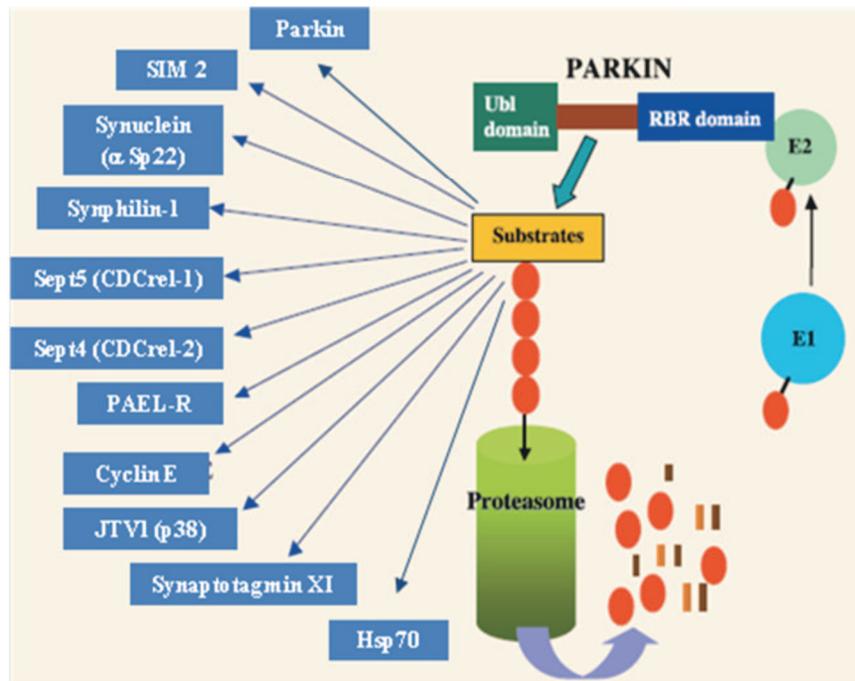


**Figura 9:** Proteólise pelo sistema ubiquitina-proteassomo. Fonte.: [139].

A atividade ubiquitina ligase da parquína e de outras E3s é dependente da integridade de todos os seus domínios funcionais. O domínio RBR é comum a várias E3s e essencial para interação com enzimas E2s e consequente catalização da ligação covalente entre ubiquitina e seus substratos. Para a maioria das proteínas caracterizadas com o domínio RBR, o RING N-terminal (N-RING) e C-terminal (C-RING) são necessários para o recrutamento de E2s específicas e de substratos específicos [140, 141]. Porém, há exceção a tal regra já que, para E3s como a parquína, foram descritos substratos que interagem com regiões não-RBR, e sim no domínio UBL. Este domínio N-terminal, além de participar da interação de várias proteínas, interage com subunidades do proteassomo, promovendo uma ligação direta entre a maquinaria de ubiquinação e a regulação da maquinaria de degradação de proteínas na célula [141-143].

A ubiquitinação de proteínas, além de sinalizar para a degradação, regula diversos processos celulares, como reparo de DNA recém replicado, endocitose, tráfego de proteínas, degradação lisossomal, apoptose, apresentação de antígeno e ativação transcricional [144]. Nesse contexto, a parquína vem demonstrado ser uma proteína multifuncional, por ter diversos substratos, além de sofrer auto-ubiquinação. Vários de seus substratos, listados na **figura 10**, possuem funções celulares diversas [137, 145, 146]. Um exemplo é a proteína p38, envolvida com aumento de morte celular em linhagem de células dopaminérgicas [147]. Sem a atividade da

parquina, p38 e outros substratos como PAEL-R e *synphilin-1*, acumulam-se nas células conferindo um efeito citotóxico. Esses achados indicaram um efeito citoprotetor da parquina [147, 148].



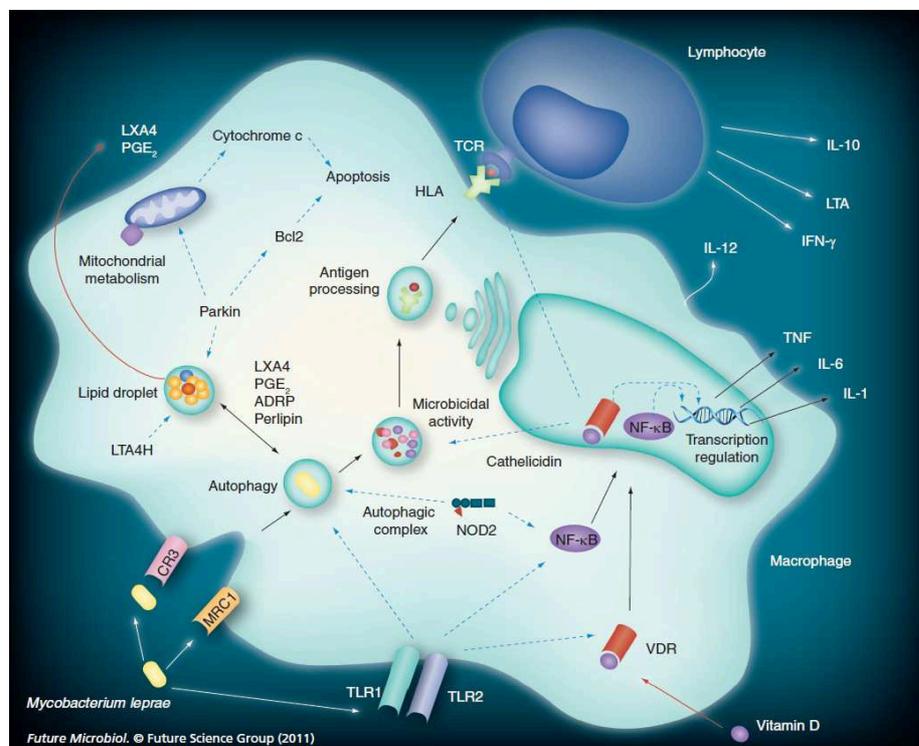
**Figura 10:** UPS e substratos da parquina já identificados. Adaptado de Marín e cols. Fonte: [146]

O papel protetor da parquina vem ganhando força com estudos recentes que utilizam diferentes modelos celulares e animais, destacando sua atividade regulatória sobre a integridade mitocondrial frente ao estresse oxidativo e fosforilação oxidativa. Organismos e células mutantes, *knockdown* e *knockout* para *PARK2* vêm demonstrando aumento do estresse oxidativo e conseqüentemente danos celulares, como mitofagia e apoptose [149-152]. Como exemplo, um trabalho pioneiro com camundongo *park2*<sup>-/-</sup> mostrou que estes animais possuem uma diminuição da capacidade respiratória mitocondrial, através da diminuição da atividade na cadeia de transporte de elétrons, quando comparados com camundongos selvagens. Acompanhado desses dados, os camundongos *knockout* mostraram menor atividade antioxidante com aumento de proteínas e lipídios oxidadas por EROs [149].

### 1.6.4 A proteína parquina e a hanseníase

Apesar dos achados descritos acima, não se sabe quais as conseqüências biológicas diretas da presença de variações genéticas no gene *PARK2* sobre o funcionamento das células em geral, e das células-alvo do *M. leprae* em particular. Indiretamente, a inibição do proteassomo de macrófagos infectados com *M. leprae* reduz o índice de apoptose celular, além de alterar o perfil de produção de certas citocinas [153].

A partir do conhecimento adquirido através de estudos celulares *in vitro*, modelos animais e análises moleculares e genéticas, o grupo do Dr. Milton Moraes [88] propôs, em uma revisão recente, um modelo onde estão representados vários elementos e as possíveis vias envolvidas na resposta do hospedeiro contra o *M. leprae*. Dentre estes elementos, destaca-se a parquina como uma proteína central de regulação da resposta do hospedeiro contra a infecção em seus estágios iniciais (**figura 11**). A proposta, embora excitante, carece até o momento de evidências experimentais.



**Figura 11:** As vias mais importantes que envolvem genes consistentemente associados à hanseníase a partir de dados gerados de estudos genéticos. **Fonte:** [88]

## **2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE**

Com o desenvolvimento acelerado de tecnologias que tem tornado possível estudos em larga escala, geradores de hipóteses, tais como *scan* genômicos de ligação, estudos pan-genômicos de expressão gênica baseados em microarranjos e, mais recentemente, *scan* genômicos de associação envolvendo centenas de milhares de marcadores, espera-se que um grande número de genes e variações genéticas associadas a doenças seja identificado. Assim, o grande desafio da ciência passa a ser a elucidação das causas biológicas por trás dos efeitos genéticos observados. No caso específico deste estudo, a associação entre variações genéticas dos genes *PARK2/PACRG* e hanseníase em quatro populações etnicamente distintas é um forte indício do envolvimento destes genes no controle da suscetibilidade do ser humano à hanseníase. No entanto, os dados produzidos no estudo genético não fornecem informações quanto ao mecanismo biológico responsável pelo efeito genético encontrado, em particular, sobre o controle da suscetibilidade de células-alvo do *M. leprae* à infecção pelo bacilo.

A proposta deste projeto é de avançar na elucidação do papel do gene *PARK2* no controle da patogênese da hanseníase, sugerido em estudos genéticos. Nossa hipótese é de que variações no gene *PARK2* alteram a função normal dos macrófagos, modificando sua resposta frente ao desafio com antígenos do *M. leprae*. Para testar esta hipótese, células mononucleares de sangue periférico (em inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) e macrófagos derivados de monócitos (em inglês, *Monocyte-Derived Macrophages*, MDMs) isolados de pacientes portadores de mutações no gene *PARK2* e DPIIP serão utilizadas como modelo celular *in vitro* para investigar a resposta celular ao desafio com *M. leprae*. Estas células foram submetidas ao desafio por *M. leprae*, e tiveram sua resposta avaliada por uma série de experimentos funcionais. O padrão de resposta encontrado foi então comparado àquele observado para uma população de células controle, obtidos de indivíduos doadores sem sinal de doença neurodegenerativa crônica.

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi utilizar PBMCs e MDMs isolados de pacientes portadores de mutação no gene *PARK2* e DPIIP como modelo celular *in vitro* para investigar a resposta celular ao desafio com *M. leprae*. Os dados foram comparados com os obtidos a partir de células de indivíduos saudáveis clinicamente caracterizados.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar e comparar a produção de óxido nítrico intracelular por MDMs mutantes para *PARK2* e controles após 24 horas de desafio com *M. leprae* irradiado;
- b. Avaliar e comparar índices de MDMs necróticos e apoptóticos de ambos os grupos após 48 horas de desafio com *M. leprae* irradiado;
- c. Avaliar e comparar a expressão de moléculas envolvidas na apresentação de antígenos por MDMs de ambos os grupos após 24 horas de desafio com *M. leprae* irradiado;
- d. Quantificar e comparar os níveis de produção de IL-6 por MDMs a partir de sobrenadantes de ambos os grupos após 24 horas de desafio com *M. leprae* irradiado;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1 DADOS CLÍNICOS E PERFIL GENÉTICO DOS PACIENTES E CONTROLES

Três pacientes com diagnóstico clínico de DPIP, 2 do sexo masculino e 1 do sexo feminino, previamente genotipados para *PARK2* em estudos anteriores foram selecionados para recrutamento (**tabela 2**) através de colaboradores dos serviços de Neurologia do Hospital de Clínicas de Curitiba e da Associação Paranaense dos Portadores de Parkinsonismo (APPP). Os dados ainda não foram publicados pelos pesquisadores colaboradores.

**Tabela 2:** Caracterização dos pacientes com DPIP incluídos no estudo e variações genéticas encontradas para o gene *PARK2*.

Pacientes	Sexo	Idade de início	Idade	Variações exônicas	Variações intrônicas
P1	M	17	34	-	ex2 (+25) TC; ex4 (-20) CC; ex8 (-35) AA
P2	M	40	77	* ex2, homo 255delA, (Asn52Stop81), ex10, hete 1239 G>C, (Val380Leu)	ex4 (-20) CC; ex8 (-35) GA
P3	F	40	53	**ex2, hete 255delA, (Asn52Stop81)	-

\* P2 é homozigoto para uma variação *frameshift* devido a deleção de uma adenina no éxon 2, no nucleotídeo 255, gerando uma proteína truncada a partir da asparagina como aminoácido da posição 52 e um aminoácido de parada (UGA) na posição 81 da proteína. Ainda, é heterozigoto para troca de nucleotídeo (guanina por citosina) na posição 1239 do transcrito gerando uma troca de aminoácido (valina por leucina) na posição 380 da proteína (Polimorfismo *Missense*).

\*\* P3 é heterozigoto para a mesma variação encontrada no éxon 2 de P2.

Paralelamente, foi realizado o recrutamento de 4 indivíduos (codificados de C1 a C4) com idade mínima de 60 anos (dois do sexo masculino e dois do sexo feminino) e sem sinal e histórico familiar de doença neurodegenerativa crônica, conforme caracterização pelos mesmos médicos neurologistas, para compor o grupo controle.

Todos os voluntários foram recrutados e receberam explicações a respeito da pesquisa e de sua participação na mesma. Aqueles que aceitaram participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e fizeram a doação de sangue conforme aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da PUCPR através do parecer CEP-PUCPR # 53/7 de 07/03/2007 (**anexo 1**).

## 4.2 OBTENÇÃO, ISOLAMENTO E CULTIVO DE PBMCs E MDMs

Cada paciente e controle foi submetido à coleta de aproximadamente 400 ml de sangue venoso periférico em bolsa de sangue simples com anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD). Estas coletas foram realizadas no Instituto de Hematologia e Hemoterapia de Curitiba, localizado no Hospital Universitário Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados simultaneamente, a partir de coleta de sangue única.

No isolamento de PBMCs, foi empregado o princípio de separação por gradiente de densidade [154] com Histopaque 1077 Hybri-Max (Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO, USA). Para tanto, imediatamente após coleta, o sangue diluído foi cuidadosamente vertido sobre o Histopaque na proporção 3:1 para evitar a mistura das fases. Após centrifugação a 400 x g por 30 minutos à temperatura ambiente, sem uso de freio e com aceleração mínima, o anel de PBMCs formado foi isolado e lavado 2 vezes em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) por centrifugação a 200 x g por 10 minutos e, por fim, ressuspensas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As células assim obtidas foram contadas em sua totalidade e sua viabilidade avaliada em câmara de Neubauer, após coloração com Azul de Tripán. Para se obter e utilizar um número homogêneo de monócitos entre as diferentes amostras, foi utilizado o contador automático de células sanguíneas ABX MICROS 60 (Horiba, Kyoto, Japão) do Laboratório de Parasitologia da PUCPR a partir de 10 $\mu$ l da suspensão de PBMC isolada. O cálculo utilizado foi:

**a. Contagem total em câmara de Neubauer com Azul de Tripán:**

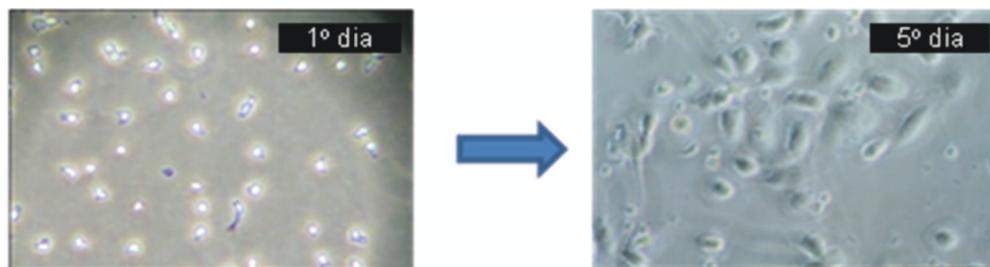
$$\text{Total de PBMCs} = (\text{Número células viáveis} - \text{Número células inviáveis}) \times 10 (\text{volume da câmara}) \times (\text{fator de diluição}) \times \text{volume da suspensão}$$

**b. A partir da contagem diferencial obtida no contador automático:**

$$\text{Total de monócitos} = (\% \text{ monócitos} \times \text{Total de PBMCs}) / 100\%$$

Para a obtenção dos MDMs, PBMCs contendo aproximadamente 1,2 x 10<sup>5</sup> monócitos foram cultivados em 300  $\mu$ L de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino- SFB (GIBCO Invitrogen Corporation, Grand. Island, NY, USA), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina (GIBCO Invitrogen

Corporation, Grand. Island, NY, USA) e 10 mM de tampão HEPES em placas de 24 poços (TPP Techno Plastic Products AG, Switzerland) previamente preparadas com lamínulas de vidro. As condições de cultivo foram: *overnight*, em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C [155], a fim de permitir a aderência dos monócitos às lamínulas. O sistema foi lavado com PBS a 37°C para remoção das células não aderidas. Para a diferenciação morfológica dos monócitos em macrófagos, as células permaneceram em cultivo por 5 dias durante os quais realizou-se uma troca de meio. A diferenciação foi acompanhada por microscopia de campo claro (**figura 12**).



**Figura 12:** Diferenciação dos monócitos em macrófagos ao longo de 5 dias de cultivo. Imagens obtidas em microscópio de campo claro em objetiva de 20x.

### 4.3 ENSAIOS FUNCIONAIS

#### 4.3.1 Tratamentos dos MDMs com *M. leprae*, interferon- $\gamma$ e lipopolissacarídeos

No quinto dia de cultivo, os MDMs foram lavados com PBS a 37°C uma vez e meio fresco suplementado foi adicionado. A seguir, as amostras definidas como **IFN $\gamma$  + LPS** foram tratadas com 100 U/mL de interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$  – Interferon-gama humano, recombinante, Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO, USA) e 1mg/mL de lipopolissacarídeos (LPS- *Lipopolysaccharides* from *Escherichia coli* O55:B5, Sigma-Aldrich, Inc., St.Louis, MO, USA), ambos ativadores clássicos de macrófagos. As amostras definidas como **ML** foram tratadas com *M. leprae*, adicionado às culturas na proporção de 50 bactérias para cada célula (50:1). Para tal, alíquota recém descongelada de suspensão de *M. leprae* irradiado (Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) foi previamente homogeneizada com seringa e

agulha de insulina 10 vezes, para desfazer possíveis grumos. Para garantir que as bactérias entrassem em contato com as células, as placas foram centrifugadas a 450 x g por 5 minutos. Este estímulo foi mantido a 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, até o momento do preparo das células para citometria de fluxo ou para outro ensaio funcional. Finalmente, as amostras definidas como C não receberam qualquer tratamento e foram utilizadas como controles nas diferentes comparações realizadas.

As alíquotas de *M. leprae* irradiados e purificados de tatus foram doadas gentilmente pelos Drs. Patrick Brennan e John Spencer, do Laboratório de Microbiologia da Escola de Medicina Veterinária e Ciências Biomédicas da Universidade do Estado do Colorado, conforme *Biological Material Transfer Agreement* (cópia em **anexo 2**).

#### **4.3.2 Preparo das células para citometria de fluxo**

A avaliação da expressão de moléculas de superfície celular e os testes de viabilidade e fagocitose foram conduzidos por citometria de fluxo em plataforma FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Para isso, após o tratamento adequado, as células cultivadas em placas de 24 poços foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C e soltas com auxílio de tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) e *scraper* (“rodinho”). As suspensões de células assim obtidas foram transferidas para tubos de citometria e imediatamente centrifugadas a 450 x g, por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, os botões de células formados ressuspensos em 500 µL de PBS e os tubos centrifugados novamente nas mesmas condições. Mais uma vez os sobrenadantes foram descartados e os botões ressuspensos. Nesta fase, foram adicionados os marcadores celulares específicos para cada ensaio, e o sistema foi incubado conforme recomendação do fabricante. Em seguida foram acrescentados 500 µL de PBS e os tubos foram centrifugados a 450 x g, por 5 minutos, a 4°C. Em todos os tubos, as células foram fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído e foram consideradas adequadas para leitura em citômetro de fluxo (mínimo de células = 10000). Tubos de controle autólogo (sem qualquer marcação) e de controles isotípicos foram preparados para cada rodada de ensaios

constituindo os controles negativos e controles de marcação inespecífica, respectivamente. A fenotipagem para população de macrófagos foi realizada pelo marcador CD14-APC (*APC Mouse anti-human CD14*, BD Pharmigen, San Diego, CA, USA).

#### **4.3.3 Análise de produção do óxido nítrico**

Após 24h de tratamento com *M. leprae* ou IFN $\gamma$  + LPS, foi conduzida a avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelas células utilizando-se DAF-FM (*4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate*, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). O DAF-FM diacetato é permeável à membrana celular e é capaz de reagir com o NO citoplasmático, transformam-se em um produto altamente fluorescente denominado triazolofluoresceína [156].

O tratamento das células foram realizados conforme instruções do fabricante. Após a adição de 5  $\mu$ M/poço de DAF-FM, as placas foram mantidas por 40 minutos, a 37°C. A seguir, as células foram lavadas com PBS a 37°C e o meio, substituído. Após nova incubação por 30 minutos a 37°C, para permitir completa de-esterificação dos diacetatos intracelulares, as amostras foram preparadas para citometria de fluxo conforme descrito no item 4.3.2, e as células foram adquiridas em intervalo de tempo não superior a duas horas.

#### **4.3.4 Avaliação da viabilidade celular**

A avaliação da viabilidade celular foi conduzida pela avaliação do índice de necrose (marcador 7-amino-actinomicina D - 7-AAD) e apoptose (marcador anexina V) após 48h de desafio com *M. leprae* [157]. As células foram preparadas conforme descrito no item 4.3.2 e a marcação realizada pelo kit *PE Annexin V Apoptosis Detection I* (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA). Quando prontas, as amostras foram adquiridas por citometria de fluxo antes de completar 1 hora do preparo.

#### 4.3.5 Avaliação de apresentação de antígenos

Para a avaliação da capacidade de apresentação de antígenos pelos MDMs, no quinto dia de cultivo, procedeu-se o preparo das células para citometria de fluxo conforme item 4.3.2. Nas suspensões de MDMs obtidas, foram adicionados 10 µL de cada uma dos seguintes anticorpos conjugados com fluoróforos: FITC-CD80, PE-CD86, APC-CD54, FITC-HLA-ABC e PE-HLA-DR (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA). Em outro tubo de citometria, foram adicionados 5 µL de cada um dos respectivos controles isotípicos, e a aquisição das células foi realizada pelo citômetro de fluxo.

#### 4.4 ANÁLISES DOS DADOS OBTIDOS NA CITOMETRIA DE FLUXO

A aquisição das células foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) através do *software* CellQuest. Pelo menos 40000 aquisições foram realizadas a partir de cada tubo. As análises dos dados obtidos nas citometrias foram realizadas através do *software* FLOW-JO, que permite a estimativa da proporção, em porcentagem, de MDMs positivos (CD14+) para cada marcador testado. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA-6 (IL-6)

Após as células terem sido tratadas por 24 horas conforme o item 4.3.1 e imediatamente antes do preparo das células para os demais ensaios funcionais, os sobrenadantes foram recolhidos e transferidos para tubos cônicos e levados à centrifuga a 13400 r.p.m por 10 minutos. Os sobrenadantes livres de debris celulares foram aliquoteados em novos tubos e congelados a -20°C até o momento da quantificação de IL-6.

A determinação de IL-6 foi executada na Faculdade Federal de Goiás no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública coordenada pela Dra. Mariane Stefani. O procedimento foi realizado em duplicata amostral pelo método de ELISA utilizando o Kit ELISA Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go<sup>®</sup> (eBioscience, San Diego, CA, USA). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante e o resultado foi dado em pg/mL de sobrenadante conforme cálculo baseado em uma curva padrão.

## **5. RESULTADOS**

A estratégia de obtenção de células foi bem sucedida em produzir amostra suficiente de todos os pacientes (P) e controles (C) para todos os ensaios, com exceção do indivíduo controle C4; para este, o rendimento de PBMCs isoladas não foi suficiente para realização dos seguintes ensaios: produção de NO, capacidade de fagocitose, expressão de MHC-I, expressão de MHC-II e dosagem de IL-6.

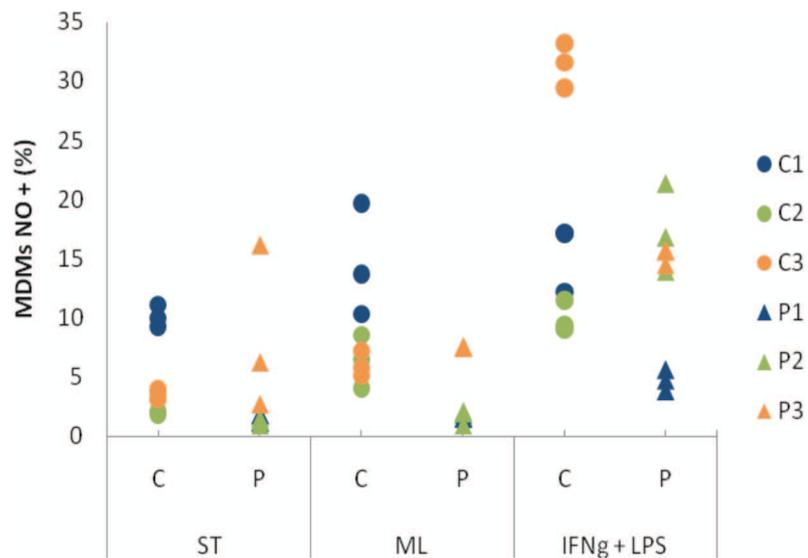
## 5.1 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) INTRACELULAR

Após 24 horas de tratamento com IFN- $\gamma$  e LPS, ocorreu um aumento, já esperado, da produção deste metabólito para todos os controles e pacientes quando comparado com as células sem tratamento. Quando estas células foram desafiadas com *M. leprae*, notou-se um aumento na produção de NO entre os controles, não observado entre os pacientes. (**tabela 3 e figura 13**).

**Tabela 3:** Produção NO intracelular por MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS.

	% MDMs NO+ (Médias de três determinações )		
	ST	ML ( $\Delta$ )*	IFN $\gamma$ + LPS ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>			
<b>C1</b>	10,12	14,57 (4,45)	15,50 (5,38)
<b>C2</b>	2,39	6,38 (3,99)	9,97 (7,58)
<b>C3</b>	3,60	6,04 (2,44)	31,40 (27,8)
<b>Pacientes:</b>			
<b>P1</b>	1,60	1,66 (0,06)	4,72 (3,12)
<b>P2</b>	1,26	1,68 (0,42)	17,37 (16,11)
<b>P3</b>	8,36	7,56 (-0,80)	15,27 (6,91)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula);  
 \*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 13:** Produção de óxido nítrico (NO) em MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

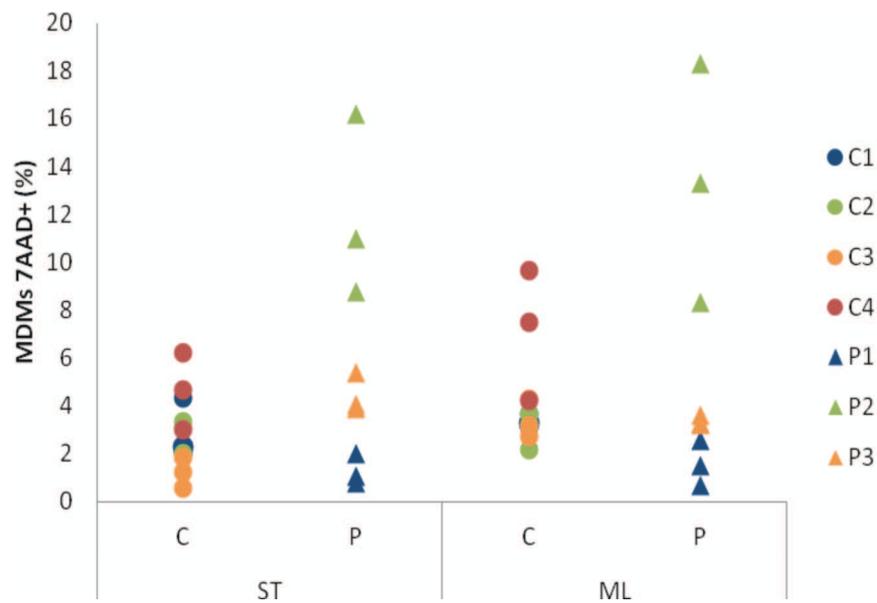
### 5.2.1 Necrose celular

Resultados da avaliação do índice de necrose celular pelo marcador 7-ADD mostram que as células mantêm viabilidade superior a 90% para todos os controles e para P1 e P3 após tratamento por 48 horas com *M. leprae* e cultivo por 7 dias. Interessante notar que P2 apresentou naturalmente uma tendência à ocorrência de necrose celular, independente do tratamento com *M. leprae* (tabela 4 e figura 14).

**Tabela 4:** Avaliação de necrose após 48 horas com *M. leprae* (Sétimo dia de cultivo).

	% MDMs 7AAD+ (Médias de três determinações)	
	ST	ML ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>		
<b>C1</b>	2,88	3,35 (0,47)
<b>C2</b>	2,80	3,00 (0,2)
<b>C3</b>	1,22	3,39 (2,17)
<b>C4</b>	4,64	7,11 (2,47)
<b>Pacientes:</b>		
<b>P1</b>	1,30	1,59 (0,29)
<b>P2</b>	11,98	13,30 (1,32)
<b>P3</b>	4,43	3,36 (-1,07)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).  
\*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 14:** Necrose celular em MDMs após 48 horas de tratamento com *M. leprae*. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

## 5.2.2 Apoptose celular

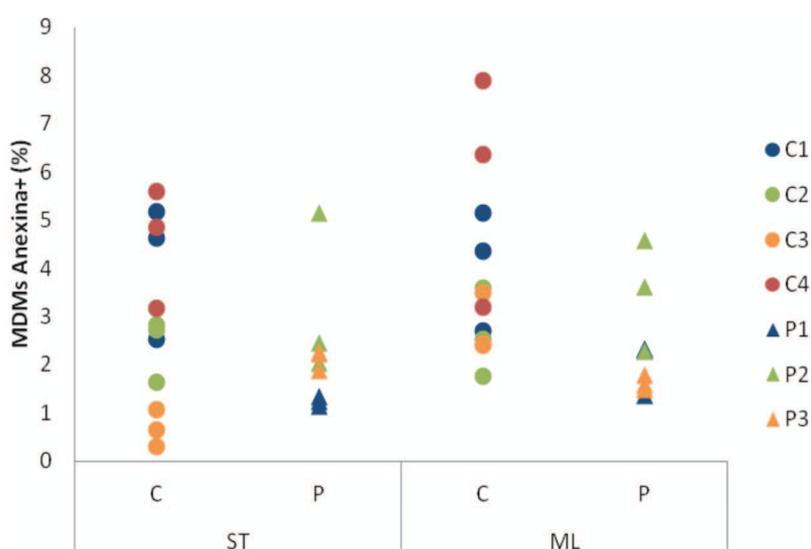
Resultados da avaliação do índice de apoptose celular pelo marcador anexina V mostram que as células de todos os controles e pacientes mantêm viabilidade superior a 94% após tratamento por 48 horas com *M. leprae* e cultivo por 7 dias (**tabela 5 e figura 15**). Não há diferença aparente de viabilidade celular entre os grupos P e C.

**Tabela 5** : Avaliação de apoptose após 48 horas de tratamento com *M. leprae* (Sétimo dia de cultivo).

	% MDMs Anexina+ (Média de três determinações)	
	ST	ML ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>		
<b>C1</b>	4,11	4,06 (-0,05)
<b>C2</b>	2,40	2,62 (0,22)
<b>C3</b>	0,68	2,78 (2,10)
<b>C4</b>	4,54	5,82 (1,28)
<b>Pacientes:</b>		
<b>P1</b>	1,25	1,99 (0,74)
<b>P2</b>	3,22	3,50 (0,28)
<b>P3</b>	2,12	1,62 (-0,5)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

\*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 15:** Apoptose celular em MDMs após 48 horas de tratamento com *M. leprae*. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

## 5.3 EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NA APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS

### 5.3.1 Expressão de moléculas coestimuladoras

#### 5.3.1.1 Expressão de CD80

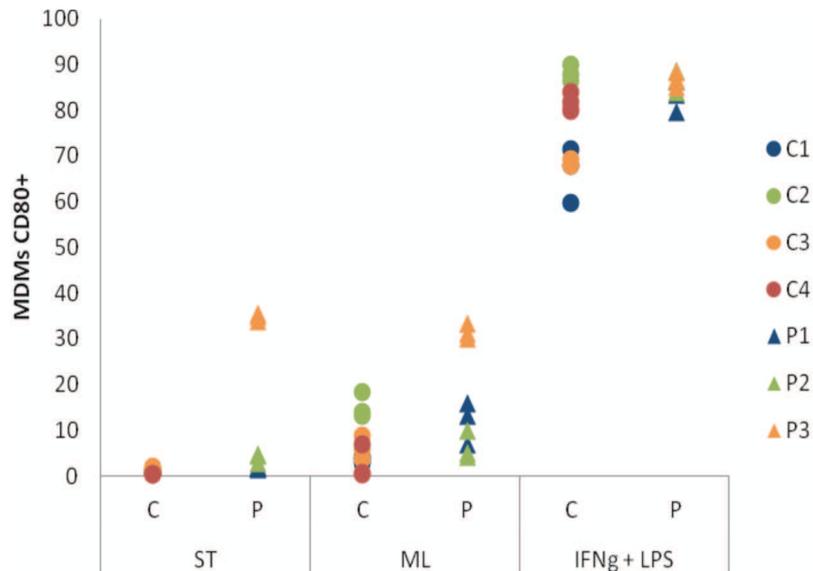
Para o marcador CD80, observou-se aumento considerável de sua expressão após desafio com *M. leprae* para os controles e P1, porém para os demais pacientes esse efeito não ocorreu, cabendo notar que seus MDMs (principalmente para P3) apresentam uma expressão basal elevada de CD80 em relação aos demais indivíduos. Ainda, conforme esperado, quando as células foram ativadas com IFN $\gamma$  e LPS, aumentava expressivamente a quantidade de CD80, em ambos os grupos (**tabela 6 e figura 16**).

**Tabela 6** : Expressão do coestimulador CD80 por MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS (Sexto dia de cultivo).

	% MDMs CD80+ (Médias de três determinações)		
	ST	ML ( $\Delta$ )*	IFN $\gamma$ + LPS ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>			
<b>C1</b>	0,80	3,55 (2,75)	66,30 (65,50)
<b>C2</b>	1,12	15,13 (14,01)	88,07 (86,95)
<b>C3</b>	1,54	6,16 (4,62)	72,53 (70,99)
<b>C4</b>	0,41	2,67 (2,63)	81,97 (81,56)
<b>Pacientes:</b>			
<b>P1</b>	1,72	12,03 (10,31)	83,17 (81,45)
<b>P2</b>	4,05	6,36 (2,31)	86,33 (82,28)
<b>P3</b>	34,73	31,53 (-3,20)	86,70 (51,97)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

\*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 16:** Expressão de CD80 após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

### 5.3.1.2 Expressão de CD86

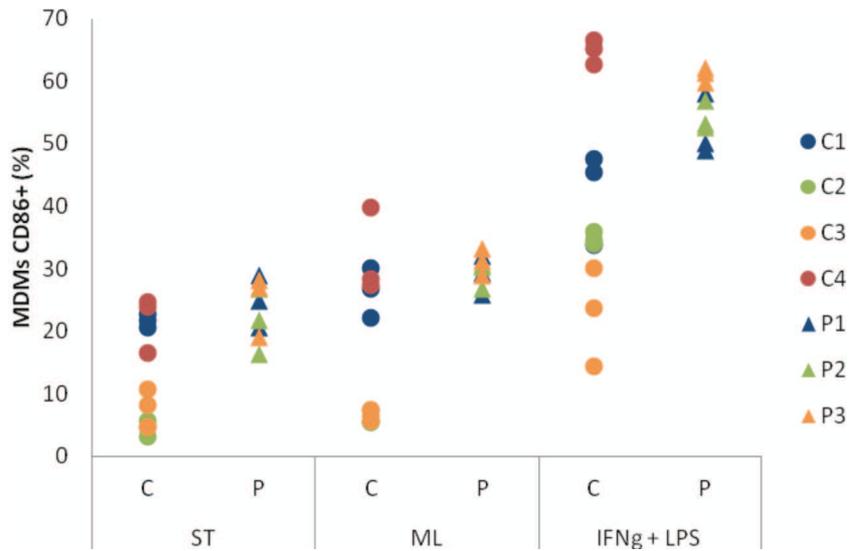
No ensaio de expressão do coestimulador CD86, notou-se um padrão semelhante de expressão entre controles e pacientes após os tratamentos (**tabela 7 e figura 17**).

**Tabela 7 :** Expressão do coestimulador CD86 por MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS (Sexto dia de cultivo).

	% MDMs CD86+ (Médias de três determinações)		
	ST	ML ( $\Delta$ )*	IFN $\gamma$ + LPS ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>			
C1	21,67	26,40 (4,73)	42,23 (20,56)
C2	4,49	6,10 (1,61)	34,83 (30,34)
C3	7,82	6,52 (-1,30)	22,63 (14,81)
C4	21,67	31,80 (10,13)	64,73 (43,06)
<b>Pacientes:</b>			
P1	24,77	29,13 (4,36)	52,3 (27,53)
P2	21,60	29,23 (7,63)	54,17 (32,57)
P3	24,67	31,1 (6,43)	61,03 (36,36)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

\*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 17:** Expressão de CD86 após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

### 5.3.2 Expressão de moléculas MHC-I (HLA-ABC) e MCH-II (HLA-DR)

#### 5.3.2.1. Expressão de HLA-ABC

Em relação à expressão de moléculas MHC-I, foi observada a expressão de HLA-ABC por praticamente todas as células dos controles e dos pacientes frente aos diferentes tratamentos aplicados por 24 horas (**tabela 8**).

**Tabela 8 :** Expressão de HLA-ABC por MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS (Sexto dia de cultivo).

	% MDMs HLA-ABC+ (Médias de três determinações)		
	ST	ML	IFN $\gamma$ + LPS
<b>Controles:</b>			
C1	98,80	99,77	98,63
C2	100,00	100,00	100,00
C3	99,93	100,00	100,00
<b>Pacientes:</b>			
P1	100,00	99,97	100,00
P2	100,00	100,00	100,00
P3	100,00	100,00	100,00

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

### 5.3.2.1. Expressão de HLA-DR

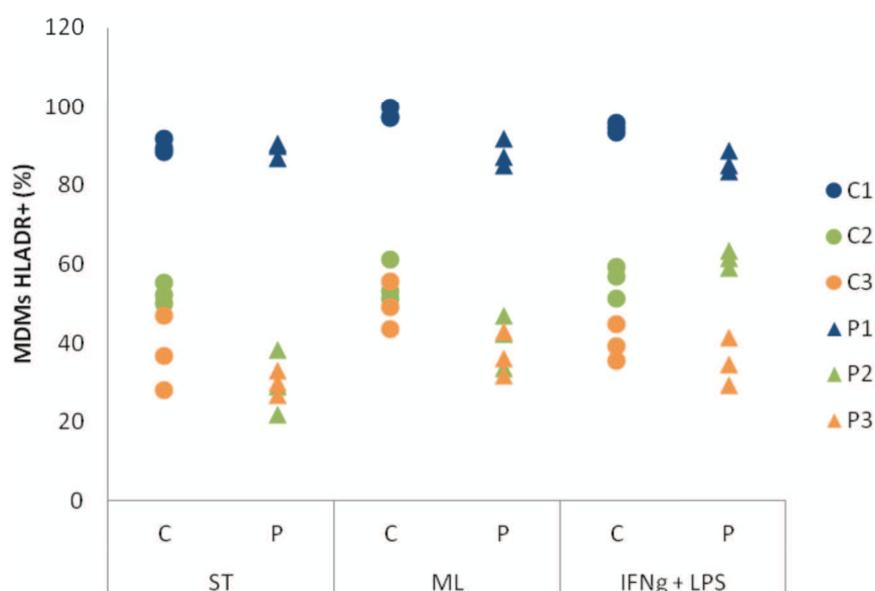
Em relação à expressão de MHC-II, foi observada a expressão do marcador HLA-DR basais acima de 37% das células dos C e de P1. Já para P2 e P3 os índices são menores que 30%. Após tratamentos com *M. leprae* ou com IFN $\gamma$  + LPS, não se observou mudança nos padrões de resposta entre controles e pacientes (tabela 9 e figura 18).

**Tabela 9** : Expressão de HLA-DR por MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS (Sexto dia de cultivo).  
% MDMs HLA-DR+ (Médias de três determinações)

	ST	ML ( $\Delta$ )*	IFN $\gamma$ + LPS ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>			
C1	89,97	98,17 (8,20)	94,67 (4,70)
C2	52,30	55,30 (3,00)	55,90 (3,60)
C3	37,23	49,37 (12,14)	39,83 (2,60)
<b>Pacientes:</b>			
P1	89,13	88,00 (-1,13)	85,83 (-3,30)
P2	29,73	40,97 (11,24)	61,43 (31,7)
P3	29,93	36,93 (7,00)	35,13 (5,20)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

\*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 18:** Expressão de HLA-DR após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

### 5.3.3 Expressão de ICAM-1 (CD54)

A expressão da molécula de adesão celular ICAM-I ocorreu na totalidade das células, dos controles e dos pacientes com os diferentes tratamentos (**tabela 10**).

**Tabela 10** : Expressão ICAM-I por MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou com IFN- $\gamma$  + LPS (Sexto dia de cultivo).  
% MDMs CD54+ (Médias de três determinações)

	ST	ML	IFN $\gamma$ + LPS
<b>Controles:</b>			
C1	99,60	99,53	99,77
C2	99,67	99,37	99,77
C3	99,87	99,87	100,00
C4	99,47	99,67	99,33
<b>Pacientes:</b>			
P1	99,77	99,90	99,97
P2	99,87	99,90	100,00
P3	99,97	100,00	100,00

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE IL-6

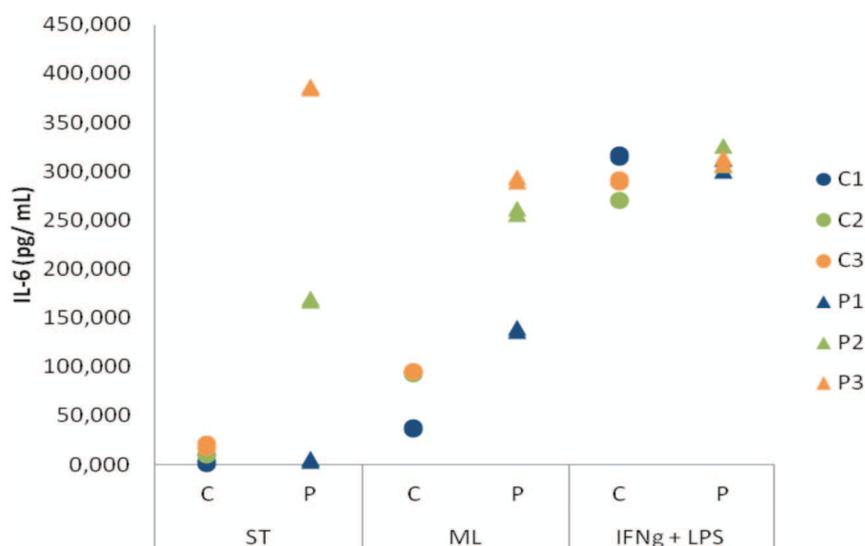
Conforme observado na **tabela 11** e **figura 19**, as concentrações basais de IL-6 em sobrenadante de MDMs sem tratamento dos pacientes P2 e P3 foram maiores em relação a todos os controles e ao paciente P1. Após tratamento com *M. leprae* todas as células foram responsivas aumentando as concentrações de IL-6, com exceção do paciente P3. Quando as células receberam ativadores IFN $\gamma$  e LPS produziram IL-6 de maneira similar em ambos os grupos.

**Tabela 11:** Concentração de IL-6 em sobrenadantes de culturas de MDMs após 24 horas de estímulo com *M. leprae* ou presença de IFN- $\gamma$  + LPS (Sexto dia de cultivo).

	IL-6 (pg/mL) (Média de duas determinações)		
	ST	ML ( $\Delta$ )*	IFN $\gamma$ + LPS ( $\Delta$ )*
<b>Controles:</b>			
<b>C1</b>	2,21	37,16 (16,16)	315,48 (313,27)
<b>C2</b>	9,69	93,26 (83,54)	270,06 (260,37)
<b>C3</b>	19,06	95,35 (76,29)	289,90 (270,84)
<b>Pacientes:</b>			
<b>P1</b>	4,66	138,38 (133,72)	306,95 (302,29)
<b>P2</b>	168,94	259,49 (90,55)	316,08 (147,14)
<b>P3</b>	385,93	291,30 (-94,63)	310,09 (-75,84)

ST = Sem tratamento; ML = *M. leprae* irradiado (50 bacilos: 1 célula).

\*  $\Delta$  = Diferenças em relação aos ensaios ST.



**Figura 19:** Concentração de IL-6 em sobrenadantes de cultura de MDMs após 24 horas de tratamento com *M. leprae* ou IFN- $\gamma$  + LPS. ST: Sem Tratamento; ML: *M. leprae*.

## **6. DISCUSSÃO**

Desde o trabalho de Mira e cols. [118] relatando forte associação entre variantes presentes na região regulatória compartilhada entre os genes *PARK2* e *PACRG* e suscetibilidade à hanseníase, achados obtidos de estudos focalizando as funções biológicas da proteína parkina vêm sendo descritos quase que exclusivamente na fisiopatologia da DP. Por isso, nosso objetivo maior foi buscar compreender como o gene *PARK2* participa da biologia de uma das células-alvo da infecção por *M. leprae*, os macrófagos. Como resultado geral, descrevemos as primeiras evidências do papel funcional neste gene em células imunes humanas no contexto da suscetibilidade a hanseníase. A seguir, apresentamos uma discussão das observações, tanto comparando pacientes com controles, quanto comparando pacientes entre si, dada a distinta natureza das variações genéticas apresentadas.

## 6.1 O IMPACTO DAS VARIAÇÕES GENÉTICAS EM *PARK2* ENCONTRADAS NOS PACIENTES

Na discussão dos nossos resultados, é importante analisá-los levando-se em conta a diferente natureza das variações encontradas nos pacientes. Dentre elas, a mais interessante é a encontrada tanto em P2 (homozigoto) quanto em P3 (heterozigoto), já descrita em diversos casos de indivíduos com DPIIP [126, 132, 158]: a mutação 255delA, uma deleção no nucleotídeo adenina na posição 255 do transcrito localizada no domínio UBL da parkina, que gera uma mudança na matriz de leitura da proteína (*frameshift*), a partir do códon 52 (asparagina), e que causa o surgimento de um códon de parada (UGA) na posição 81. Consequentemente, há a geração de uma proteína truncada, com perda de todos os seus domínios RINGs e IBR necessários para a interação de proteínas E2s do UPS e substratos da parkina [134, 158, 159]. Ainda, esta proteína truncada é altamente instável, e rapidamente degradada pelo proteassomo [137]. Outras variações afetando o domínio UBL já foram descritas e várias, especialmente do tipo *missense*, também afetam a estabilidade da proteína e consequente diminuição da sua habilidade de interagir com o complexo proteassomo [142, 143]. Nesta forma, podemos considerar P2 é um modelo *knockout* para *PARK2* e P3, um modelo *knockdown*.

A outra variação exônica, encontrada exclusivamente em P2, é uma troca *missense* de guanina por citosina no nucleotídeo 1239 do transcrito, levando à troca do aminoácido valina por leucina no códon 380 da parquina. Sua frequência em pacientes com DPIP é alta em populações já estudadas [126, 160], porém, esta variação também é frequente em indivíduos sem fenótipo de DPIP; além disso, há uma discussão na literatura quanto à real contribuição desta variação para a instalação da doença [126]. Todos os outros polimorfismos encontrados entre os pacientes eram intrônicos – inclusive, todas as variações de P1 – cujo impacto sobre a função de parquina e o fenótipo de DPIP é incerto.

## 6.2 INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO EM MDMs MUTANTES PARA *PARK2* APÓS DESAFIO COM *M. leprae*

O NO é uma importante molécula microbicida mediadora no combate à patógenos recém-fagocitados incluindo *Salmonella typhimurium* [161], *M. tuberculosis* [162] e *Leishmania chagasi* [163] e *Streptococcus pneumoniae* [164]. Níveis intracelulares elevados de NO são capazes de induzir células à morte celular através de dois principais mecanismos: (i) depleção da anergia celular provocando necrose, ou (ii) desenvolvimento de estresse oxidativo mediando o processo apoptótico [165]. Surpreendentemente, um dos resultados interessantes do trabalho foi a constatação de que os pacientes com mutações em *PARK2* apresentaram capacidade reduzida de produzir NO quando infectados com *M. leprae*, enquanto os controles induzem nitidamente a produção deste intermediário oxidativo. Após estímulo com IFN $\gamma$  + LPS, os MDMs dos pacientes desenvolveram uma resposta aumentando o número de células produtoras de NO, porém é difícil afirmar que esta resposta seja diferente da apresentada pelos controles, dada a grande variabilidade interindividual observada. Assim, tais resultados sugerem que a parquina está envolvida no controle do mecanismo de produção de NO, possivelmente de forma dependente e específica ao estímulo com *M. leprae*. Em trabalho recente, desenvolvido como estudo piloto, no qual foi dosado o índice de NO a partir de amostras de plasma sanguíneo de pacientes com DPIP e sem mutações em *PARK2*, verificou-se que não houve diferença estatística significativa nos níveis de NO em pacientes com mutações, porém suas concentrações

eram sutilmente menores em relação as encontradas em pacientes sem mutações (31,3 nmols/L e 32,4 nmols/L, respectivamente), concordando com nossos achados [166]. Corroborando com estes resultados, quando avaliada a expressão de genes participantes de vias responsáveis por estresse oxidativo na inflamação em modelos de camundongos *parkin*<sup>-/-</sup> deficientes, foi revelado que estes animais, tratados por período de 6 meses com baixas dosagens de LPS, não diferiam dos camundongos selvagens em níveis de expressão de óxido nítrico sintase induzível (em inglês, *Inducible nitric oxide synthase*, iNOS), enzima chave na produção de NO [167]. Interessantemente, em modelos celulares com atividade de iNOS deficiente desafiados com *M. leprae* viáveis, observou-se a sobrevivência dos bacilos, porém sem significativo aumento em seu número [53]. A somatória dessas informações nos leva a acreditar que existe uma relação entre a parkina na modulação da expressão de NO no macrófago e a resistência de *M. leprae*.

Apesar do NO ter um papel importante no contexto na defesa inata do hospedeiro, cabe discutir que o estresse oxidativo não é apenas dependente das ERNs, mas também das EROs, tais como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxil (HO<sup>-</sup>) [168]. Inclusive, sabe-se que a produção de EROs ocorre mesmo na ausência de ERNs [59], sendo importante investigar como cada uma das vias bioquímicas é desencadeada, levando à formação de seus produtos tóxicos. Todos estes agentes oxidantes podem causar danos celulares a partir da oxidação de ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas; no combate do estresse oxidativo, a célula se arma com um arsenal de agentes antioxidantes incluindo: a glutathiona, peroxidases, catalases e superóxido dismutase (em inglês, *Superoxide dismutase*, SOD) [169]. Apesar dos efeitos deletérios da exacerbação do estresse oxidativo em processos patológicos como em doenças neurodegenerativas, na arterosclerose e no câncer, um sutil e balanceado aumento desses intermediários oxidativos colabora no combate a infecções em seus estágios iniciais [170, 171].

Neste contexto, há trabalhos que revelam a parkina interferindo na modulação de EROs e de seus agentes antioxidantes, sendo que na deficiência funcional de parkina, ocorre aumento do estresse oxidativo pelo diminuição da capacidade antioxidante [149, 150, 172, 173]. Por exemplo, células dopaminérgicas da linhagem PC12 *knockdown* para parkina apresentam significativa diminuição na quantidade de glutathiona e na atividade de SOD, com consequente aumento de produtos celulares oxidados [150]. Surpreendentemente, achados recentes muito similares em relação à

atividade de SOD e ao aumento de produtos originários do estresse oxidativo foram encontrados em tecidos de pacientes com ambas as formas clínicas da hanseníase, paucibacilar e multibacilar [174]. Contudo, este trabalho não objetivou relacionar o papel da parquina na hanseníase.

Desta maneira, seria de extrema importância compreender melhor como parquina colabora da modulação da produção de NO como encontrado em nosso estudo, além de saber se também no mesmo modelo laboratorial há alguma mudança nos níveis de ROS e seus antioxidantes.

### 6.3 MUTANTES PARA *PARK2* ESTIMULADOS COM *M. leprae* E MECANISMOS DE MORTE CELULAR

Outro objetivo do nosso estudo foi avaliar se o gene *PARK2* estaria envolvido com morte celular de macrófagos na hanseníase. O envolvimento da parquina na regulação de vias que levam à morte celular vem sendo estudado em outros modelos celulares e animais, diferentes daqueles estudados na infecção. Em modelos animais é observado que a parquina, graças à sua atividade de E3 ubiquitina ligase, possui ação antiapoptótica pela atenuação da ativação da transcrição do gene p53 e subsequente ativação da via das caspases [175]. Adicionalmente, bcl-2, proteína de ação antiapoptótica membro da família Bcl-2, foi atualmente reconhecida como substrato a ser mono-ubiquitinado pela parquina, provocando maior estabilidade desta proteína e consequente inibição da morte celular [176]. A ação de bcl-2 é bem conhecida na mitocôndria, onde inibe a liberação do citocromo c e subsequente ativação da via das caspases [177].

Na infecção, a apoptose e necrose são mecanismos importantes no processo de eliminação das células infectadas pelo patógeno. A modulação das vias de sobrevivência celular pode influenciar o curso das infecções, permitindo a sobrevivência de patógenos intracelulares. Enquanto micobactérias não patogênicas como BCG, *M. smegmatis* e *M. fortuitum* induzem macrófagos à apoptose, *M. leprae* viável demonstra ser capaz de inibir a morte em macrófagos principalmente interferindo nas vias que levam as células à apoptose, a qual envolve proteínas da família Bcl-2 [61, 62, 178, 179]. Cabe destacar que em lesões provenientes de pacientes com hanseníase, principalmente daqueles LL, são encontrados baixo índices de apoptose

em macrófagos acompanhado do aumento da expressão *in situ* da proteína bcl-2, de conhecida atividade antiapoptótica [179]. Em contraste como os achados com *M. leprae* viável, em macrófagos isolados de pacientes LL e BL ou provenientes de camudongos saudáveis tratados com *M. leprae* irradiado (como utilizado em nosso modelo), ocorre a indução da apoptose como observado para as espécies não patogênicas [60, 61].

Em modelos de infecção, não apenas para estudo da hanseníase, nada foi descrito diretamente sobre parquina. O único trabalho que foi publicado, o qual traz informação sobre o papel do sistema UPS, mais pontualmente sobre a função do proteassomo na infecção por *M. leprae*, é o trabalho de Fulco e cols. [153]. Os pesquisadores demonstraram que culturas de PBMCs isolados de indivíduos saudáveis tratadas com inibidor de proteassomo e estimuladas com *M. leprae* irradiados apresentam diminuição de morte celular quando comparadas com células apenas estimuladas com *M. leprae*, ou seja, a redução da atividade catalítica do proteassomo influencia na citotoxicidade provocada pela micobactéria em células mononucleares. Porém, é difícil dizer se a parquina está influenciando ou não neste resultado.

Sabendo da função citoprotetora da parquina dependente da íntegra atividade do sistema UPS [180], e que *M. leprae* é capaz de influenciar em processos de morte celular, em nosso modelo esperávamos observar alguma diferença entre MDMs mutantes para *PARK2* após contato com *M. leprae*. Nesta investigação, quantificamos o percentual de MDMs nas fases de necrose e apoptose através dos marcadores 7-AAD e anexina V, respectivamente. No entanto, não foram encontradas diferenças em controles e pacientes em relação ao índice de MDMs necróticas e apoptóticas após 48 horas na ausência ou presença de *M. leprae*. O percentual de células em processo de morte celular foi consideravelmente baixo (menor que 8%) para controles e pacientes. Apenas o paciente P2 apresentou índices maiores de 10% em células necróticas antes e após a exposição ao *M. leprae*, o qual deve ser melhor investigado.

Curiosamente, em nosso trabalho, nem mesmo o esperado efeito de indução de apoptose provocado pelo bacilo morto ocorreu; porém, esta observação concorda com o trabalho de Hasan e cols. no qual foi demonstrado que células da linhagem THP-1 diferenciadas em macrófagos e desafiadas, por 48 horas, com *M. leprae* irradiado não são levadas à morte celular [178]. Uma forma de se aprofundar esta investigação seria aplicar nosso modelo para descrever o efeito do *M. leprae* viável, e não irradiado, sobre a apoptose dos MDMs.

#### 6.4 *PARK2* E APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS APÓS DESAFIO COM *M. leprae*

A capacidade de apresentação de antígenos é outro processo importante na hanseníase. Já está bem descrito que fagócitos processam e apresentam antígenos protéicos de *M. leprae* tanto via MHC-I e MHC-II [70, 71]. Porém, quais os elementos celulares envolvidos em eventos que precedem o processamento dos seus antígenos, definindo por qual das vias a infecção irá seguir, ainda é pouco conhecido. A escassez de informação a respeito desses mecanismos unida ao conhecimento do importante papel das UPS no processamento de antígenos via MHC-I [181], nos levou a investigar se macrófagos mutantes para *PARK2* possuem a expressão de moléculas centrais da apresentação de antígenos alterada com ou sem desafio ao *M. leprae*.

Como resultado, a expressão do marcador HLA-ABC, um representante MHC-I foi vista praticamente na totalidade das células para todas as amostras e condições testadas. Esse achado já era esperado já que tal marcador é constitutivamente expresso em todas as células nucleadas. Porém, alguns apontamentos importantes surgiram a partir dos resultados obtidos após obtenção dos índices de MDMs expressando o marcador HLA-DR, uma molécula MHC-II. Enquanto que para os controles e P1 os índices de expressão constitutiva de HLA-DR foram mais elevados, para P2 e P3 isto não foi observado. Este resultado vai de encontro à proposta de as células P1 apresentarem, em determinados ensaios, um comportamento de controle. Tal possibilidade não é desprovida de sentido: as alterações de *PARK2* apresentadas pelo P1 são todas intrônicas, em contraste com as variações exônicas severas de P2 e P3 discutidas anteriormente; é possível, portanto, que a DPIP apresentada por P1 seja causada por variações genéticas desconhecidas de outros genes. Se real, esta hipótese gera a excitante possibilidade de P1 ser um controle negativo para os efeitos específicos de parquina, e ao mesmo tempo, um controle positivo (caso) para o fenótipo de DPIP. Neste caso, efeitos observados para todos os pacientes seriam gerais para a doença DPIP, mas inespecíficos para parquina; simetricamente, os efeitos observados apenas para P2 e P3 seriam especificamente causados pela deficiência de *PARK2*. Ainda, índices muito elevados encontrados para C1 e P1, mesmo para MDMs sem qualquer tratamento são comumente em células em cultura que sofreram diferenciação, quando comparado com células recém isoladas ou imatura como monócitos [70, 71, 182].

Estes achados para HLA-ABC e HLA-DR concordam parcialmente com trabalhos utilizando DCs, os quais demonstraram que células sem tratamento ou desafiadas com determinados antígenos de *M. leprae* ou BCG apresentam alta expressão desses marcadores [70, 71]. Em contraste, quando as células são tratadas com *M. leprae* vivo, fica evidente sua capacidade de reduzir a expressão de HLA-ABC e HLA-DR [70]. É possível que, em nosso modelo utilizando-se de *M. leprae* morto, este age como uma micobactéria não patogênica no processamento de antígenos. Portanto, ainda não se pode afirmar ao certo que parquina não influencia na expressão de moléculas de MHC-I e MHC-II, sem testar, em modelos como o nosso, as respostas ao *M. leprae* viável. Recentemente, diversas E3s, incluindo membros da família RING, já foram identificadas como capazes de realizar ubiquinação moléculas MHC-I e MHC-II, controlando desta maneira a expressão das mesmas [183]. Complementariamente, há necessidade de se investigar mais a fundo e confirmar se há uma direta interferência de parquina na modulação da expressão constitutiva de HLA-DR em macrófagos mutantes para *PARK2* estará confirmando também achados encontrados em estudos genéticos epidemiológicos que revelam associação entre o gene *HLADR* e suscetibilidade à hanseníase *per se* [98, 184].

Outro resultado interessante foi aquele fornecido a partir das análises de expressão do coestimulador CD80. Enquanto os controles e P1 apresentam índices de expressão basal praticamente nulos e aumentam expressivamente a quantidade desse coestimulador após tratamento com *M. leprae* conforme esperado, novamente os MDMs de P2 e P3 apresentam perfis de respostas diferentes. Além de revelarem índices evidentemente elevados de MDMs (principalmente P3) expressando constitutivamente CD80, após tratamento com *M. leprae* irradiado não respondem aumentando a expressão. Índices reduzidos de CD80 em PBMCs e seu papel imunossupressor na hanseníase estão associados ao pólo lepromatoso [72, 185], indicando que CD80 colabora fortemente na resposta imune contra o bacilo. Em contraste, quando células de pacientes em estados reacionais hansênicos foram analisadas para o mesmo marcador, sua expressão foi significativamente aumentada [185], o que mostra sua efetiva participação em quadros inflamatórios agudos.

Na análise de expressão do coestimulador CD86, nós encontramos um padrão de expressão similar para todos os indivíduos, com aumentos proporcionais da expressão após as condições de tratamento fornecidas. Um perfil de resposta semelhante foi visto no estudo de Sridevi e cols. no qual PBMCs provenientes de

pacientes das formas tuberculóide e lepromatosa com antígenos de parede de *M. leprae* apresentaram aumento na expressão de CD86 para ambos os grupos, inclusive pelos controles saudáveis [73]. Desta maneira, a expressão de CD86 em relação aos níveis constitutivos podem não estar sendo influenciado pela parquina. O resultado da ativação de células T irá depender do balanço de expressão entre ambos os coestimuladores, CD80 e CD86, que parecem agir em sinergismo, possuindo funções distintas na diferenciação e manutenção de respostas  $T_H1$  e  $T_H2$  [186], assim como em processos inflamatórios severos [187]. Quando, *in vivo*, CD80 e CD86 são simultaneamente bloqueados, ocorre total anergia das células T  $CD4^+$ . Efeito semelhante ocorre quando apenas CD86 é bloqueado, indicando ser crítico tanto no desencadeamento de  $T_H1$  quanto de  $T_H2$ . Já bloqueando somente CD80, ocorre o desenvolvimento de resposta  $T_H1$  com potencialização da ativação de células T  $CD8^+$  [186]. O papel do CD80 em respostas inflamatórias agudas já foi descrito em modelos de estudo da septicemia *in vivo* quando há a exacerbação do processo inflamatório associado ao aumento de expressão de CD80 e, interessantemente, a uma diminuição de CD86. Confirmando o achado, em grupo de animais  $CD80^{-/-}$  a mortalidade durante a evolução da infecção é reduzida provavelmente por apresentarem baixa produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-10 [187].

Tal modulação da resposta imune é dependente da afinidade destes coestimuladores com seus ligantes presentes nos linfócitos T, CD28 e CTLA-4. Enquanto CD28 tem uma expressão constitutiva em células T e está relacionado com ativação desses linfócitos, CTLA-4 é expresso via indução e está relacionado com regulação negativa da resposta imunológica. Ainda, a interação de CD80/CTLA-4 possui maior afinidade que CD86/CTLA-4, enquanto CD28 preferencialmente interage com CD86 [188].

O conjunto dessas informações vem de encontro com nossos achados para os mutantes de *PARK2*, o que nos permite especular que o balanço entre CD80 e CD86 que encontramos para P2 e P3 pode estar levando à imunossupressão na infecção por *M. leprae*, através do aumento de expressão constitutiva de CD80. Consequentemente, este fenômeno, corroborado pelo achado de diminuição da expressão de HLA-DR pelos mesmos indivíduos, pode estar promovendo uma maior interação CD80/CTLA-4, o que leva à atenuação na ativação de linfócitos T.

## 6.5 MUTANTES PARA *PARK2* INTERFEREM NA PRODUÇÃO DE IL-6

A iniciativa de se analisar o perfil de produção de IL-6 em nosso modelo está baseada em estudos que descrevem o papel central nesta citocina em infecções por micobactérias e também sua participação em processos de regeneração e mielinização de nervos periféricos. Nas infecções causadas por micobactérias, a IL-6 é uma potente citocina pró-inflamatória participante no recrutamento de neutrófilos ao local da infecção [189] e na diferenciação e ativação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> [190]. Ao lado da função em células no sistema imune, IL-6 sinaliza os mecanismos de regeneração nervosa [191], importante processo celular interrompido pelo *M. leprae* [31]. Consistente com esses dados, em culturas de CSs, IL-6 é capaz de promover a mielinização [192, 193]. Além disso, dados ainda não publicados, produzidos por grupo colaborador, revela forte indicação do envolvimento da parquina na modulação da expressão de IL-6.

Partimos assim, para dosagem de IL-6 em sobrenadantes de MDMs tratados ou não por 24 horas com *M. leprae* ou IFN $\gamma$  + LPS. Surpreendentemente, obtivemos resultados intrigantes que vão de encontro com aqueles encontrados para os ensaios de apresentação de antígenos. As células mutantes para *PARK2* dos pacientes P2 e P3, constitutivamente expressaram altos níveis de IL-6 quando comparados com os controles e P1, independentemente do tratamento e, quando desafiadas com *M. leprae*, aqueles mutantes P2 e P3 não foram capazes de induzir à produção de IL-6 como observado para os controles e para P1, possivelmente devido aos níveis basais já elevados. Ainda, após a ativação por IFN $\gamma$  + LPS os níveis de IL-6 se igualaram entre todos os indivíduos. Com estes resultados, obtivemos talvez o achado mais revelador do nosso trabalho. Cabe lembrar que P1, para este ensaio, comporta-se como os controles, assim como foi visto para os resultados de expressão de HLA-DR e CD80.

Em parte, nossos achados discondam com os de Sinsimer e cols. que mostram que *M. leprae* inibe uma resposta efetiva do hospedeiro encontrando baixos níveis de expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 em monócitos isolados de doadores saudáveis [78]. Em nosso modelo, a supressão foi mais evidente para os pacientes P2 e P3. Neste sentido, podemos pensar que os níveis basais altos encontrados nos sobrenadantes destes mutantes para *PARK2* pode ser consequência da interação CD80/CD28 que acarreta em produção de IL-6. Deve ser colocado que, apesar de

isolar monócitos dos PBMCs, diferenciá-los em macrófagos, muitos linfócitos permanecem em cultura durante o tempo de duração dos ensaios realizados, o que acarreta numa interação entre ambos os tipos celulares. Portanto, a parquina, em sua atividade normal, possivelmente poder estar colaborando diretamente na modulação da expressão constitutiva de IL-6 ou indiretamente através da regulação da expressão de CD80 e conseqüente balanço de interação com seus receptores nos linfócitos. Uma maneira de responder a esta pergunta seria realizando a dosagem de IL-6 em um modelo celular com ausência de linfócitos.

Também devemos levar em conta que, enquanto monócitos “virgens” respondem prontamente ao estímulo com BCG ou *M. tuberculosis*, com o *M. leprae*, observa-se a necessidade de ativar as células previamente com indutores reconhecidamente eficazes, como IFN $\gamma$  e LPS, para que passem a responder a esta micobactéria [70, 78, 194]. Esses achados são consistentes com os nossos, já que observamos níveis significativamente altos e similares de IL-6 somente quando as células de todos os voluntários, controles e pacientes, foram previamente ativadas com IFN $\gamma$ + LPS. Isso nos ajuda a enxergar que o papel da parquina é fundamental em estágio prévio ao da ativação dos macrófagos, regulando a expressão de IL-6, talvez conseqüência de sua participação na regulação da expressão dos coestimuladores discutidos anteriormente.

## 6.6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Desde o início do projeto sabíamos que o modelo adotado não seria o ideal para gerar hipóteses, mas sim, para testá-las. Neste sentido, a interpretação de nossos achados depende fortemente de resultados anteriores, obtidos por grupos independentes. As três principais limitações de nosso estudo são:

- a. Número pequeno de pacientes e controles: o modelo celular utilizado no presente trabalho consiste em células raras que naturalmente carregam mutações importantes do gene-alvo a ser estudado. O projeto inicial previa 6 pacientes com DPIP previamente caracterizados para o gene *PARK2*, porém 3 foram excluídos por motivo de falecimento ou perda do contato. De qualquer forma, nossa intenção não era de acumular observações para a realização de

uma análise estatística formal, mas sim, de desenvolver um modelo de célula primária, muito mais válido quando comparados a linhagens celulares as quais apresentam fenótipos muito distantes ao da célula de origem. Um exemplo de trabalho de genética que se utiliza de um número amostral pequeno de casos com DPIP foi publicado por Grunewald e cols. [151], utilizando modelos de fibroblastos isolados de 6 pacientes e 5 controles;

- b. Ausência de dados de expressão de *PARK2*: seria interessante neste estudo, a demonstração de alteração ou de expressão, ou de estrutura da parquinha em nossos pacientes, através de ensaios como o Western Blot e/ou PCR em tempo real (RT-PCR). Porém, a ausência destes ensaios se justifica em parte pela abundante literatura, que relata o enorme impacto das variações de P2 e P3 sobre a estrutura e função da parquinha [158].
- c. Sequenciamento dos controles incluídos no estudo: todos os voluntários do grupo controle tinham acima de 60 anos de idade, foram clinicamente avaliados como sadios por médicos neurologistas e não possuíam histórico familiar de qualquer doença neurodegenerativa. Estas características tornam improvável a existência de mutações de *PARK2* – fortemente associadas a DPIP, e não a casos de DP tardio – neste grupo de indivíduos [123-128]. Apesar disso, o sequenciamento do gene *PARK2* para amostras dos controles está em andamento em nosso laboratório.

## 6.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conforme esperado na proposta do estudo, nossos resultados forneceram os primeiros dados funcionais relacionados ao gene *PARK2* no contexto na infecção por *M. leprae*. Temos convicção que nossos achados, obtidos a partir de um modelo único de células primárias humanas, carreadoras naturais de mutações severas no gene alvo do estudo, representam uma importante contribuição na direção do completo entendimento do impacto do gene *PARK2* e suas variantes sobre a patogênese da hanseníase.

Entre as próximas iniciativas do grupo está, por exemplo, o aprofundamento da investigação da possível interferência da parquina na modulação do processo de apresentação de antígenos e na produção de IL-6. Neste sentido, um novo projeto com enfoque desta citocina está sendo submetido em processos de avaliação por editais para captação de recursos. Paralelamente, estamos viabilizando outros modelos celulares similares ao utilizado que nos possibilite replicar os achados em escala maior e possivelmente utilizando *M. leprae* vivo, além de outros microrganismos intracelulares.

## **7. CONCLUSÕES**

Considerando que o objetivo maior do presente trabalho foi direcionar o grupo para novos caminhos em busca da elucidação da função do gene *PARK2* na suscetibilidade a hanseníase partindo-se de um modelo de macrófagos primários humanos, concluímos que:

- a. Os MDMs mutantes para *PARK2* não produzem NO após desafio com *M. leprae* irradiado, ao contrário dos controles. Já em macrófagos ativados com IFN $\gamma$  + LPS, todas as amostras respondem aumentando a produção de NO;
- b. A viabilidade celular não é alterada por mutações em *PARK2* após 48 horas de desafio com *M. leprae* irradiado quando comparado com as células sem qualquer tratamento. Os índices de células necróticas (< 13,30%) e apoptóticas (< 5,82%) após o desafio permaneceram baixos e similares aos das células sem tratamentos (< 11,98% - necrose e; < 4,54% - apoptose);
- c. Mutações em *PARK2* apresentam alteração na expressão das moléculas de superfície de MDMs envolvidas na apresentação de antígenos, CD80 e HLA-DR mas não interferem na expressão de CD86, HLA-ABC e ICAM-I. Os MDMs carreadores de mutações detectadas em P2 e P3, apresentam índices relativamente altos de células CD80+ sem tratamento, enquanto índices mais baixos de células HLA-DR+ também em células não tratadas. Quando tratadas com *M. leprae* ou com IFN $\gamma$  + LPS, não foram encontradas diferenças no padrão de respostas.
- d. MDMs com mutações em *PARK2* apresentam expressão da citocina IL-6 diferenciada. Os macrófagos carreadores de mutações exônicas detectadas em P2 e P3, apresentam valores basais elevados para IL-6 em relação a P1 (com apenas mutações intrônicas) e aos controles, não alterado-os após desafio com *M. leprae*. Em macrófagos ativados com IFN $\gamma$  + LPS, a produção de IL-6 é aumentada e as concentrações se tornam semelhantes entre si para todas as amostras.

## **8. REFERÊNCIAS**

1. Jacobson, R.R. and J.L. Krahenbuhl, *Leprosy*. Lancet, 1999. **353**(9153): p. 655-60.
2. Britton, W.J. and D.N. Lockwood, *Leprosy*. Lancet, 2004. **363**(9416): p. 1209-19.
3. Robbins, G., et al., *Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.)*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5669.
4. Tan, S.Y. and C. Graham, *Armauer Hansen (1841-1912): discoverer of the cause of leprosy*. Singapore Med J, 2008. **49**(7): p. 520-1.
5. Hansen, G.A., *Spedalskhedens Arsager*. Norsk Magazin for Laegevidenskaben, 1874: p. 76-79.
6. Scollard, D.M., et al., *The continuing challenges of leprosy*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(2): p. 338-81.
7. Vissa, V.D. and P.J. Brennan, *The genome of Mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set*. Genome Biol, 2001. **2**(8): p. REVIEWS1023.
8. Cole, S.T., et al., *Massive gene decay in the leprosy bacillus*. Nature, 2001. **409**(6823): p. 1007-11.
9. Johnstone, P.A., *The search for animal models of leprosy*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1987. **55**(3): p. 535-47.
10. Shepard, C.C., *The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice*. J Exp Med, 1960. **112**(3): p. 445-454.
11. Truman, R., *Leprosy in wild armadillos*. Lepr Rev, 2005. **76**(3): p. 198-208.
12. Kirchheimer, W.F. and E.E. Storrs, *Attempts to establish the armadillo (Dasypus novemcinctus Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1971. **39**(3): p. 693-702.
13. *Global leprosy situation*. Wkly Epidemiol Rec, 2011. **86**(36): p. 389-400.
14. WHO, *Leprosy prevalence, data reported to WHO as of beginning of 2011*. 2011. p. Available from: [http://www.who.int/lep/situation/Leprosy\\_PR\\_2010.pdf](http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf).
15. *Hanseníase no Brasil: Dados e Indicadores Seleccionados*, in *Caderno Institucional do Ministério da Saúde*. 2009: Brasília. p. 1-66.
16. Casanova, J.L. and L. Abel, *Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 581-620.

17. Rees, R.J. and A.C. McDougall, *Airborne infection with Mycobacterium leprae in mice*. J Med Microbiol, 1977. **10**(1): p. 63-8.
18. Chehl, S., C.K. Job, and R.C. Hastings, *Transmission of leprosy in nude mice*. Am J Trop Med Hyg, 1985. **34**(6): p. 1161-6.
19. Ridley, D.S. and W.H. Jopling, *Classification of leprosy according to immunity. A five-group system*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1966. **34**(3): p. 255-73.
20. Finlay, B.B. and P. Cossart, *Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens*. Science, 1997. **276**(5313): p. 718-25.
21. Quintes, S., et al., *Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells*. J Peripher Nerv Syst, 2010. **15**(1): p. 10-6.
22. Hunter, S.W., T. Fujiwara, and P.J. Brennan, *Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of Mycobacterium leprae*. J Biol Chem, 1982. **257**(24): p. 15072-8.
23. Rambukkana, A., et al., *Neural targeting of Mycobacterium leprae mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain*. Cell, 1997. **88**(6): p. 811-21.
24. Ng, V., et al., *Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae*. Cell, 2000. **103**(3): p. 511-24.
25. Marques, M.A., et al., *Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells*. J Med Microbiol, 2001. **50**(1): p. 23-8.
26. Rambukkana, A., et al., *Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2076-9.
27. Shimoji, Y., et al., *A 21-kDa surface protein of Mycobacterium leprae binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9857-62.
28. Rambukkana, A., *Molecular basis for the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae*. Curr Opin Microbiol, 2001. **4**(1): p. 21-7.
29. Hagge, D.A., et al., *A new model for studying the effects of Mycobacterium leprae on Schwann cell and neuron interactions*. J Infect Dis, 2002. **186**(9): p. 1283-96.
30. Rambukkana, A., *Mycobacterium leprae-induced demyelination: a model for early nerve degeneration*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(4): p. 511-8.
31. Rambukkana, A., et al., *Contact-dependent demyelination by Mycobacterium leprae in the absence of immune cells*. Science, 2002. **296**(5569): p. 927-31.

32. Oliveira, R.B., et al., *Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy*. *Infect Immun*, 2003. **71**(3): p. 1427-33.
33. Spierings, E., et al., *Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol*, 2000. **78**(4): p. 349-55.
34. Spierings, E., et al., *Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy*. *J Immunol*, 2001. **166**(10): p. 5883-8.
35. Mattos, K.A., et al., *Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes*. *Cell Microbiol*, 2011. **13**(2): p. 259-73.
36. Weinstein, D.E., V.H. Freedman, and G. Kaplan, *Molecular mechanism of nerve infection in leprosy*. *Trends Microbiol*, 1999. **7**(5): p. 185-6.
37. Scollard, D.M., *Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model*. *Microbes Infect*, 2000. **2**(15): p. 1835-43.
38. Rambukkana, A., *Molecular basis of the interaction of Mycobacterium leprae with peripheral nerve: implications for therapeutic strategies*. *Lepr Rev*, 2000. **71 Suppl**: p. S168-9.
39. Schorey, J.S., M.C. Carroll, and E.J. Brown, *A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria*. *Science*, 1997. **277**(5329): p. 1091-3.
40. Ma, J., et al., *Regulation of macrophage activation*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(11): p. 2334-46.
41. Abbas, A.K.L., A. H.; Pillai, S., *Imunologia Celular e Molecular*. 6 ed. ed. 2008, Rio de Janeiro: Elsevier.
42. Schlesinger, L.S., *Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors*. *J Immunol*, 1993. **150**(7): p. 2920-30.
43. Modlin, R.L., *The innate immune response in leprosy*. *Curr Opin Immunol*, 2010 **22**(1): p. 48-54.
44. Schlesinger, L.S. and M.A. Horwitz, *Phagocytosis of leprosy bacilli is mediated by complement receptors CR1 and CR3 on human monocytes and complement component C3 in serum*. *J Clin Invest*, 1990. **85**(4): p. 1304-14.

45. Tabouret, G., et al., *Mycobacterium leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. PLoS Pathog, 2010. **6**(10): p. e1001159.
46. Kerrigan, A.M. and G.D. Brown, *C-type lectins and phagocytosis*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 562-75.
47. Kang, P.B., et al., *The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 987-99.
48. de Messias-Reason, I.J., et al., *The association between mannan-binding lectin gene polymorphism and clinical leprosy: new insight into an old paradigm*. J Infect Dis, 2007. **196**(9): p. 1379-85.
49. Krutzik, S.R., et al., *Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 525-32.
50. Liu, P.T., et al., *Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response*. Science, 2006. **311**(5768): p. 1770-3.
51. Shin, D.M., et al., *Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling*. Cell Microbiol, 2010. **12**(11): p. 1648-65.
52. Marolia, J. and P.R. Mahadevan, *Reactive oxygen intermediates inactivate Mycobacterium leprae in the phagocytes from human peripheral blood*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1989. **57**(2): p. 483-91.
53. Adams, L.B., C.K. Job, and J.L. Krahenbuhl, *Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to Mycobacterium leprae in mice*. Infect Immun, 2000. **68**(9): p. 5462-5.
54. Visca, P., et al., *Nitric oxide and Mycobacterium leprae pathogenicity*. IUBMB Life, 2002. **54**(3): p. 95-9.
55. Holzer, T.J., et al., *Mycobacterium leprae fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation*. Infect Immun, 1986. **51**(2): p. 514-20.
56. Hagge, D.A., et al., *An in vitro model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of Mycobacterium leprae from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7771-9.
57. Cruz, D., et al., *Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy*. J Clin Invest, 2008. **118**(8): p. 2917-28.

58. Mattos, K.A., et al., *Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis*. J Leukoc Biol. **87**(3): p. 371-84.
59. Adams, L.B., et al., *Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to Mycobacterium tuberculosis using transgenic mice*. Tuber Lung Dis, 1997. **78**(5-6): p. 237-46.
60. Hernandez, M.O., et al., *Induction of apoptosis in monocytes by Mycobacterium leprae in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha*. Immunology, 2003. **109**(1): p. 156-64.
61. Lahiri, R., B. Randhawa, and J.L. Krahenbuhl, *Infection of mouse macrophages with viable Mycobacterium leprae does not induce apoptosis*. J Infect Dis, 2010. **201**(11): p. 1736-42.
62. Bohsali, A., et al., *The non-pathogenic mycobacteria M. smegmatis and M. fortuitum induce rapid host cell apoptosis via a caspase-3 and TNF dependent pathway*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 237.
63. Quaresma, J.A., et al., *Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy*. Microb Pathog, 2010. **49**(4): p. 135-40.
64. Tanigawa, K., et al., *Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with Mycobacterium leprae*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **289**(1): p. 72-9.
65. Hansen, T.H. and M. Bouvier, *MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 503-13.
66. van der Wel, N., et al., *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1287-98.
67. Gatti, E. and P. Pierre, *Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(4): p. 468-73.
68. Fleischer, J., et al., *Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes*. Immunology, 1996. **89**(4): p. 592-8.
69. Mukherjee, S., P.K. Maiti, and D. Nandi, *Role of CD80, CD86, and CTLA4 on mouse CD4(+) T lymphocytes in enhancing cell-cycle progression and survival after activation with PMA and ionomycin*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(5): p. 921-31.
70. Hashimoto, K., et al., *Mycobacterium leprae infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 5167-76.

71. Maeda, Y., et al., *Identification of an Immunomodulating Agent from Mycobacterium leprae*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2744-50.
72. Agrewala, J.N., B. Kumar, and H. Vohra, *Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy*. Clin Exp Immunol, 1998. **111**(1): p. 56-63.
73. Sridevi, K., et al., *Expression of costimulatory molecules (CD80, CD86, CD28, CD152), accessory molecules (TCR alphabeta, TCR gammadelta) and T cell lineage molecules (CD4+, CD8+) in PBMC of leprosy patients using Mycobacterium leprae antigen (MLCWA) with murabutide and T cell peptide of Trt protein*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(1): p. 1-14.
74. Barral, D.C. and M.B. Brenner, *CD1 antigen presentation: how it works*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 929-41.
75. Sieling, P.A., et al., *CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1851-8.
76. Sieling, P.A., et al., *Evidence for human CD4+ T cells in the CD1-restricted repertoire: derivation of mycobacteria-reactive T cells from leprosy lesions*. J Immunol, 2000. **164**(9): p. 4790-6.
77. Suzuki, K., et al., *Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with Mycobacterium leprae and M. bovis BCG*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1993. **61**(4): p. 609-18.
78. Sinsimer, D., et al., *Mycobacterium leprae actively modulates the cytokine response in naive human monocytes*. Infect Immun, 2009. **78**(1): p. 293-300.
79. Murray, R.A., et al., *Mycobacterium leprae inhibits dendritic cell activation and maturation*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 338-44.
80. Oliveira, M.M., R. Charlab, and M.C. Pessolani, *Mycobacterium bovis BCG but not Mycobacterium leprae induces TNF-alpha secretion in human monocytic THP-1 cells*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001. **96**(7): p. 973-8.
81. Modlin, R.L., *Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(6): p. 828-32.
82. Nath, I., et al., *The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients*. Immunol Lett, 2000. **75**(1): p. 69-76.
83. Stefani, M.M., et al., *In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression*. J Infect Dis, 2003. **188**(7): p. 1024-31.

84. Moura, D.F., 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. **157**(2): p. 273-83.
85. Monot, M., et al., *Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae*. Nat Genet, 2009. **41**(12): p. 1282-9.
86. Singh, P. and S.T. Cole, *Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity*. Future Microbiol, 2010. **6**(1): p. 57-71.
87. Alter, A., et al., *Leprosy as a genetic disease*. Mamm Genome. **22**(1-2): p. 19-31.
88. Cardoso, C.C., et al., *Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome*. Future Microbiol, 2011. **6**(5): p. 533-49.
89. Beiguelman, B., *Some remarks on the genetics of leprosy resistance*. Acta Genet Med Gemellol (Roma), 1968. **17**(4): p. 584-94.
90. Chakravartti, M.R.V., F., *A twin study on leprosy*. Topics in human genetics 1973, Stuttgart: George Thieme.
91. Abel, L. and F. Demenais, *Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island*. Am J Hum Genet, 1988. **42**(2): p. 256-66.
92. Lazaro, F.P., et al., *A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil*. J Infect Dis, 2010. **201**(10): p. 1598-605.
93. Roy, S., et al., *Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type*. J Infect Dis, 1999. **179**(1): p. 187-91.
94. Meisner, S.J., et al., *Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(6): p. 733-5.
95. Rajalingam, R., D.P. Singal, and N.K. Mehra, *Transporter associated with antigen-processing (TAP) genes and susceptibility to tuberculoid leprosy and pulmonary tuberculosis*. Tissue Antigens, 1997. **49**(2): p. 168-72.
96. Moraes, M.O., et al., *Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy*. Genes Immun, 2004. **5**(7): p. 592-5.

97. Wang, L.M., et al., *HLA linked with leprosy in southern China: HLA-linked resistance alleles to leprosy*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1999. **67**(4): p. 403-8.
98. Vanderborght, P.R., et al., *HLA-DRB1\*04 and DRB1\*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients*. Genes Immun, 2007. **8**(4): p. 320-4.
99. Siddiqui, M.R., et al., *A major susceptibility locus for leprosy in India maps to chromosome 10p13*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 439-41.
100. Mira, M.T., et al., *Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes*. Genes Immun, 2003. **4**(1): p. 67-73.
101. Mira, M.T., et al., *Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 412-5.
102. Zhang, F.R., et al., *Genomewide association study of leprosy*. N Engl J Med, 2009. **361**(27): p. 2609-18.
103. Wong, S.H., A.V. Hill, and F.O. Vannberg, *Genomewide association study of leprosy*. N Engl J Med, 2010. **362**(15): p. 1446-7; author reply 1447-8.
104. Schurr, E. and P. Gros, *A common genetic fingerprint in leprosy and Crohn's disease?* N Engl J Med, 2009. **361**(27): p. 2666-8.
105. Malhotra, D., et al., *IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy*. Hum Genet, 2005. **118**(2): p. 295-300.
106. Pereira, A.C., et al., *Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility*. Genes Immun, 2009. **10**(2): p. 174-80.
107. Shaw, M.A., et al., *Association and linkage of leprosy phenotypes with HLA class II and tumour necrosis factor genes*. Genes Immun, 2001. **2**(4): p. 196-204.
108. Santos, A.R., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy*. J Infect Dis, 2002. **186**(11): p. 1687-91.
109. Franceschi, D.S., et al., *Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil*. Int J Infect Dis, 2009. **13**(4): p. 493-8.

110. Moraes, M.O., et al., *Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients*. Immunogenetics, 2001. **53**(1): p. 45-7.
111. Vejbaesya, S., et al., *TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy*. J Med Assoc Thai, 2007. **90**(6): p. 1188-92.
112. Hagge, D.A., et al., *Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy*. Am J Pathol, 2009. **174**(4): p. 1379-89.
113. Cardoso, C.C., et al., *TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study*. J Infect Dis, 2011. **204**(8): p. 1256-63.
114. Kratz, A., et al., *Chronic inflammation caused by lymphotoxin is lymphoid neogenesis*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1461-72.
115. Roach, D.R., et al., *Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection*. J Exp Med, 2001. **193**(2): p. 239-46.
116. Alcais, A., et al., *Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy*. Nat Genet, 2007. **39**(4): p. 517-22.
117. Alter, A., et al., *Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility*. Hum Genet, 2010. **127**(3): p. 337-48.
118. Mira, M.T., et al., *Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG*. Nature, 2004. **427**(6975): p. 636-40.
119. Malhotra, D., et al., *Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population*. Eur J Hum Genet, 2006. **14**(4): p. 438-42.
120. Bakija-Konsuo, A., et al., *Leprosy epidemics during history increased protective allele frequency of PARK2/PACRG genes in the population of the Mljet Island, Croatia*. Eur J Med Genet, 2011. **54**(6): p. e548-52.
121. Ali, S., et al., *PARK2/PACRG polymorphisms and susceptibility to typhoid and paratyphoid fever*. Clin Exp Immunol, 2006. **144**(3): p. 425-31.
122. Yamamura, Y., *The long journey to the discovery of PARK2*. Neuropathology, 2010.

123. Matsumine, H., et al., *Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27*. Am J Hum Genet, 1997. **60**(3): p. 588-96.
124. Scott, W.K., et al., *Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes*. Jama, 2001. **286**(18): p. 2239-44.
125. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
126. Abbas, N., et al., *A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(4): p. 567-74.
127. Hattori, N., et al., *Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals*. Ann Neurol, 1998. **44**(6): p. 935-41.
128. Lucking, C.B., et al., *Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene*. N Engl J Med, 2000. **342**(21): p. 1560-7.
129. Periquet, M., et al., *Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism*. Brain, 2003. **126**(Pt 6): p. 1271-8.
130. Rawal, N., et al., *New parkin mutations and atypical phenotypes in families with autosomal recessive parkinsonism*. Neurology, 2003. **60**(8): p. 1378-81.
131. Chien, H.F., et al., *Early-onset Parkinson's disease caused by a novel parkin mutation in a genetic isolate from north-eastern Brazil*. Neurogenetics, 2006. **7**(1): p. 13-9.
132. Hedrich, K., et al., *Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies*. Mov Disord, 2004. **19**(10): p. 1146-57.
133. Zhang, Y., et al., *Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13354-9.
134. Shimura, H., et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 302-5.
135. Marin, I. and A. Ferrus, *Comparative genomics of the RBR family, including the Parkinson's disease-related gene parkin and the genes of the ariadne subfamily*. Mol Biol Evol, 2002. **19**(12): p. 2039-50.

136. Pouligiannis, G., et al., *PARK2 deletions occur frequently in sporadic colorectal cancer and accelerate adenoma development in Apc mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(34): p. 15145-50.
137. Rankin, C.A., et al., *Parkin, A Top Level Manager in the Cell's Sanitation Department*. Open Biochem J, 2011. **5**: p. 9-26.
138. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
139. Eldridge, A.G. and T. O'Brien, *Therapeutic strategies within the ubiquitin proteasome system*. Cell Death Differ, 2009. **17**(1): p. 4-13.
140. Ardley, H.C. and P.A. Robinson, *E3 ubiquitin ligases*. Essays Biochem, 2005. **41**: p. 15-30.
141. Eisenhaber, B., et al., *The ring between ring fingers (RBR) protein family*. Genome Biol, 2007. **8**(3): p. 209.
142. Safadi, S.S., K.R. Barber, and G.S. Shaw, *Impact of autosomal recessive juvenile Parkinson's disease mutations on the structure and interactions of the parkin ubiquitin-like domain*. Biochemistry, 2011. **50**(13): p. 2603-10.
143. Henn, I.H., et al., *Pathogenic mutations inactivate parkin by distinct mechanisms*. J Neurochem, 2005. **92**(1): p. 114-22.
144. Robinson, P.A. and H.C. Ardley, *Ubiquitin-protein ligases*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 22): p. 5191-4.
145. Moore, D.J., *Parkin: a multifaceted ubiquitin ligase*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 5): p. 749-53.
146. Marin, I., et al., *Parkin and relatives: the RBR family of ubiquitin ligases*. Physiol Genomics, 2004. **17**(3): p. 253-63.
147. Corti, O., et al., *The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(12): p. 1427-37.
148. Cookson, M.R., *Parkin's substrates and the pathways leading to neuronal damage*. Neuromolecular Med, 2003. **3**(1): p. 1-13.
149. Palacino, J.J., et al., *Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18614-22.

150. Yang, H., et al., *Downregulation of parkin damages antioxidant defenses and enhances proteasome inhibition-induced toxicity in PC12 cells*. J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(3): p. 276-83.
151. Grunewald, A., et al., *Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts*. PLoS One. **5**(9): p. e12962.
152. Fett, M.E., et al., *Parkin is protective against proteotoxic stress in a transgenic zebrafish model*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11783.
153. Fulco, T.O., et al., *The proteasome function is required for Mycobacterium leprae-induced apoptosis and cytokine secretion*. Immunol Lett, 2007. **110**(1): p. 82-5.
154. Boyum, A., *A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1g gravity field*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 51-76.
155. Lima, C.S., et al., *Intracellular signals triggered during association of Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis BCG with human monocytes*. Microb Pathog, 2001. **31**(1): p. 37-45.
156. Bryan, N.S. and M.B. Grisham, *Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples*. Free Radic Biol Med, 2007. **43**(5): p. 645-57.
157. Philpott, N.J., et al., *The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2244-51.
158. Munoz, E., et al., *Relative high frequency of the c.255delA parkin gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **73**(5): p. 582-4.
159. Sriram, S.R., et al., *Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(17): p. 2571-86.
160. Mata, I.F., P.J. Lockhart, and M.J. Farrer, *Parkin genetics: one model for Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 1**: p. R127-33.
161. Vazquez-Torres, A., et al., *Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 227-36.
162. Scanga, C.A., et al., *The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of Mycobacterium tuberculosis in mice*. Infect Immun, 2001. **69**(12): p. 7711-7.

163. Gantt, K.R., et al., *Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of Leishmania chagasi*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 893-901.
164. Marriott, H.M., et al., *Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection*. FASEB J, 2004. **18**(10): p. 1126-8.
165. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(11): p. 1440-50.
166. Vinish, M., A. Anand, and S. Prabhakar, *Altered oxidative stress levels in Indian Parkinson's disease patients with PARK2 mutations*. Acta Biochim Pol, 2011. **58**(2): p. 165-9.
167. Frank-Cannon, T.C., et al., *Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration*. J Neurosci, 2008. **28**(43): p. 10825-34.
168. Rutkowski, R., et al., *[Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process]*. Pol Merkur Lekarski, 2007. **23**(134): p. 131-6.
169. Halliwell, B., *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* Lancet, 1994. **344**(8924): p. 721-4.
170. Roberts, R.A., et al., *Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species*. Toxicology, 2010. **276**(2): p. 85-94.
171. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(1): p. 44-84.
172. Grunewald, A., et al., *Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12962.
173. Hyun, D.H., et al., *Proteasomal inhibition causes the formation of protein aggregates containing a wide range of proteins, including nitrated proteins*. J Neurochem, 2003. **86**(2): p. 363-73.
174. Abdel-Hafez, H.Z., E.E. Mohamed, and A.A. Abd-Elghany, *Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2010. **24**(6): p. 704-8.
175. da Costa, C.A., et al., *Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1370-5.
176. Chen, D., et al., *Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy*. J Biol Chem, 2010. **285**(49): p. 38214-23.

177. Yang, J., et al., *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science, 1997. **275**(5303): p. 1129-32.
178. Hasan, Z., et al., *M. leprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression*. BMC Microbiol, 2006. **6**: p. 78.
179. Brito de Souza, V.N., et al., *Analysis of apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010. **60**(3): p. 270-4.
180. Morrison, E., et al., *A simple cell based assay to measure Parkin activity*. J Neurochem, 2010. **116**(3): p. 342-9.
181. Liu, Y.C., *Ubiquitin ligases and the immune response*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 81-127.
182. Bertho, N., et al., *HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2379-85.
183. Ishido, S., et al., *E3 ubiquitin ligases for MHC molecules*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(1): p. 78-83.
184. Zhang, F., et al., *Evidence for an association of HLA-DRB1\*15 and DRB1\*09 with leprosy and the impact of DRB1\*09 on disease onset in a Chinese Han population*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 133.
185. Santos, D.O., et al., *Expression of B7-1 costimulatory molecules in patients with multibacillary leprosy and reactional states*. Clin Exp Dermatol, 2007. **32**(1): p. 75-80.
186. Lang, T.J., et al., *In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3786-92.
187. Nolan, A., et al., *Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6600.
188. Collins, A.V., et al., *The interaction properties of costimulatory molecules revisited*. Immunity, 2002. **17**(2): p. 201-10.
189. Andersson, M., et al., *Mycobacterium bovis bacilli Calmette-Guerin regulates leukocyte recruitment by modulating alveolar inflammatory responses*. Innate Immun, 2011.

190. de la Barrera, S., et al., *Differential development of CD4 and CD8 cytotoxic T cells (CTL) in PBMC across the leprosy spectrum; IL-6 with IFN-gamma or IL-2 generate CTL in multibacillary patients*. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1997. **65**(1): p. 45-55.
191. Hirota, H., et al., *Accelerated Nerve Regeneration in Mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma*. J Exp Med, 1996. **183**(6): p. 2627-34.
192. Haggiag, S., et al., *Stimulation of myelin gene expression in vitro and of sciatic nerve remyelination by interleukin-6 receptor-interleukin-6 chimera*. J Neurosci Res, 2001. **64**(6): p. 564-74.
193. Ito, T., et al., *Interleukin-6 upregulates the expression of PMP22 in cultured rat Schwann cells via a JAK2-dependent pathway*. Neurosci Lett, 2010. **472**(2): p. 104-8.
194. Hasan, Z., et al., *Elevated serum CCL2 concomitant with a reduced mycobacterium-induced response leads to disease dissemination in leprosy*. Scand J Immunol, 2006. **63**(3): p. 241-7.