



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

DÉBORA DANTAS NUCCI CERQUEIRA

**ANÁLISE DA AUTOFAGIA E PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
INFECTADOS PELO *Mycobacterium leprae* COM REAÇÕES HANSÊNICAS**

Recife - PE
2024

DÉBORA DANTAS NUCCI CERQUEIRA

**ANÁLISE DA AUTOFAGIA E PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
INFECTADOS PELO *Mycobacterium leprae* COM REAÇÕES HANSÊNICAS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Aplicada à Saúde da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre(a)
em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Imunologia.

Orientador (a): Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Coorientador (a): Dr^a Patrícia d'Emery Alves Santos

Recife - PE

2024

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Cerqueira, Débora Dantas

Análise de autofagia e perfil imunológico de pacientes infectados pelo *Mycobacterium leprae* com reações hansênicas . / Débora Dantas Cerqueira. – 2024.

88 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Fabrício Oliveira Souto.

Coorientadora: Patrícia d'Emery Alves Santos.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, 2024.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Hanseníase. 3. Reações hansênicas. 4. Xenofagia. I. Souto, Fabrício Oliveira (Orient.). II. Santos, Patrícia d'Emery Alves (Coorient.). III. Título.

5616

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-179

DÉBORA DANTAS NUCCI CERQUEIRA

**ANÁLISE DA AUTOFAGIA E PERFIL IMUNOLÓGICO DE PACIENTES
INFECTADOS PELO *Mycobacterium leprae* COM REAÇÕES HANSÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Imunologia.

Aprovado em: 28/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Michelle Christiane da Silva Rabello (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz (IAM-FIOCRUZ)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família e amigos que sempre estiveram do meu lado durante a minha jornada acadêmica, apoiando e vibrando com todas as minhas conquistas, sou muito grata por ter vocês comigo.

Aos meus orientadores: Prof. Fabrício e Patrícia por terem me aceitado, acreditado em mim e me ensinado tanto nesses 2 anos. Sair da zona de conforto e mudar de área não é fácil, mas quando você encontra um grupo de pesquisa tão motivador, o processo se torna mais tranquilo.

Agradeço também à toda equipe médica envolvida no desenvolvimento desse projeto, tanto do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), quanto da Unidade Sentinela de Referência para Resistência à Multidrogaterapia em Hanseníase do Estado, em Caruaru (NCV/CAA/UFPE). E aos pacientes que aceitaram participar do estudo confiando na ciência e na esperança de que um dia a hanseníase acabe, ou que pelo menos suas consequências sejam evitadas.

À FACEPE pela bolsa de mestrado, que me permitiu dedicação integral ao desenvolvimento desse projeto

E a todos aqueles que colaboraram, de forma direta e indireta, para que eu pudesse chegar aqui.

Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório causador da hanseníase, uma doença crônica que representa um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Durante a doença, os pacientes estão sujeitos às reações hansênicas, condições de exacerbação da resposta inflamatória localizada (tipo 1 - RT1) ou sistêmica (tipo 2 - RT2). Há diferentes mecanismos imunológicos relacionados à identificação e remoção de bactérias, um deles, a xenofagia, é um tipo de autofagia seletiva. Existem poucos estudos relacionando o processo autofágico com os episódios reacionais. O objetivo do estudo foi analisar o papel da autofagia em linfócitos, monócitos e neutrófilos derivados de pacientes com RT1 e RT2 recrutados nos Serviços de Referência para Hanseníase dos municípios de Caruaru e Recife/PE, em comparação ao grupo controle (indivíduos saudáveis). Além das marcações para caracterização dos linfócitos (anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8), monócitos (anti-CD45 e anti-CD14) e neutrófilos (anti-CD45, anti-CD15, anti-CD16 e anti-CD66b), também ocorreu marcação para a análise de moléculas relacionadas ao reconhecimento de patógenos e processo autofágico: anti-TLR2, anti-TLR4, anti-Caspase-1, anti-LC3B e anti-LAMP1 através da citometria de fluxo e ensaio de imunofluorescência para a Caspase-1. O soro foi utilizado para a dosagem das citocinas inflamatórias: IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF. Para análise estatística foi realizado o ANOVA one-way seguido do teste de Tukey, onde foi considerado significativo $p < 0,05$. Os resultados da citometria de fluxo indicam uma maior frequência de LC3B, LAMP1 e Caspase-1 no grupo RT2. Já o TLR2 encontra-se mais expresso nas células TCD4⁺ de pacientes com RT2, enquanto que o TLR4 está mais expresso nas TCD8⁺ dos grupos reacionais (RT1 e RT2). Nas análises de imunofluorescência houve uma maior expressão de Caspase-1 no grupo RT2, quando comparado ao controle, que junto com os dados da citometria, indicam a presença do processo inflamatório e autofágico. Os níveis das citocinas inflamatórias apresentaram um aumento no grupo RT2, comparado ao grupo RT1, o que pode estar relacionado ao esquema de tratamento. Apesar dos nossos resultados apresentarem um grande avanço no entendimento da imunopatologia das reações do tipo 2, visto que não há trabalhos na literatura explorando o papel da xenofagia em pacientes com RT2, estudos adicionais

precisam ser realizados para melhor caracterização dos mecanismos imunes envolvidos.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*; Hanseníase; Reações Hansênicas; Xenofagia.

ABSTRACT

Mycobacterium leprae is an intracellular pathogen that causes leprosy, a chronic disease that represents an important public health problem in Brazil and worldwide. During the disease, patients are susceptible to leprosy reactions, conditions of localized (type 1 - RT1) or systemic (type 2 - RT2) inflammatory response exacerbation. There are different immunological mechanisms related to the identification and removal of bacteria, one of them, xenophagy, is a type of selective autophagy. There are few studies linking the autophagic process with reaction episodes. The aim of the study was to analyze the role of autophagy in lymphocytes, monocytes, and neutrophils from RT1 or RT2 patients recruited from the Reference Services for Leprosy in the municipalities of Caruaru and Recife/PE, compared to the control group (healthy individuals). In addition to markings for characterizing lymphocytes (anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8), monocytes (anti-CD45 and anti-CD14) and neutrophils (anti-CD45, anti-CD15, anti-CD16 and anti-CD66b), molecules related to pathogen recognition and autophagic process were also marked: anti-TLR2, anti-TLR4, anti-Caspase-1, anti-LC3B and anti-LAMP1 through flow cytometry and immunofluorescence assay for Caspase-1. Inflammatory cytokines (IL-12p70, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, and TNF) were measured in serum. For statistical analysis, ANOVA one-way was performed followed by Tukey's test, where $p < 0.05$ was considered significant. Flow cytometry results indicate a higher frequency of LC3B, LAMP1 and Caspase-1 in the RT2 group. TLR2 is more expressed in CD4⁺ T cells from patients with RT2, while TLR4 is more expressed in CD8⁺ T cells from the reaction groups (RT1 and RT2). In the immunofluorescence analyzes there was a higher expression of Caspase-1 in the RT2 group, when compared to the control, which together with the cytometry data, indicate the presence of the inflammatory and autophagic process. Inflammatory cytokine levels increased in the RT2 group compared to the RT1 group, which may be related to the treatment regimen. Although our results present a major advance in understanding the immunopathology of type 2 reactions, as there are no studies in the literature exploring the role of xenophagy in RT2 patients, additional studies need to be carried out to better characterize the immunological mechanisms involved.

Keywords: *Mycobacterium leprae*; Leprosy; Leprosy Reactions; Xenophagy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Objetivos	14
1.1.1	<i>Objetivo Geral</i>	14
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Hanseníase	14
2.1.1	<i>Epidemiologia</i>	15
2.1.2	<i>Imunopatologia e Classificação</i>	18
2.1.3	<i>Diagnóstico e Tratamento</i>	22
2.1.4	<i>Reações Hansênicas</i>	23
2.1.5	<i>Desafios na Erradicação</i>	28
2.2	Autofagia	29
2.2.1	<i>Vias da autofagia</i>	31
2.2.2	<i>Maquinaria autofágica</i>	33
2.3	Autofagia e sistema imune	34
2.3.1	<i>Xenofagia</i>	36
3	METODOLOGIA	39
3.1	População, Local de estudo e Obtenção das amostras	39
3.1.1	<i>População e Local de estudo</i>	39
3.1.2	<i>Isolamento de Células Sanguíneas e Obtenção de Soro</i>	41
3.2	Marcação Celular por Citometria de Fluxo	42
3.2.1	<i>Estratégia de gate para identificação dos tipos celulares</i>	42
3.3	Determinação dos Níveis das Citocinas por CBA	43
3.4	Imunofluorescência	43
3.5	Análises estatísticas	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Perfis celulares e Autofagia	44
4.2.1	<i>Linfócitos e Monócitos</i>	44
4.2.2	<i>Neutrófilos</i>	49
4.2	Análise da expressão de Caspase-1	51
4.3	Citocinas Inflamatórias	53
5	CONCLUSÃO	56

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A- Fluxograma da metodologia da pesquisa	62
APÊNDICE B- Gates utilizados para seleção de linfócitos na citometria de fluxo	63
APÊNDICE C- Gates utilizados para seleção de monócitos na citometria de fluxo	64
APÊNDICE D- Gates utilizados para seleção de neutrófilos na citometria de fluxo	65
APÊNDICE E- Artigo publicado na revista <i>Pathogens</i> (Qualis A3)	66
ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UFPE	79
ANEXO B- Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UFPE com inclusão do Hospital das Clínicas	85

1. INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, conhecido por causar hanseníase, que invade os macrófagos e as células de Schwann, afetando pele, nervos periféricos, olhos e trato respiratório (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que representa um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo devido às graves consequências causadas, incluindo alterações na aparência e incapacidades físicas (MI; LIU; ZHANG, 2020). Apesar de ter cura, cerca de 200.000 casos são diagnosticados por ano mundialmente e o Brasil é o segundo país com maior número de casos, ficando atrás apenas da Índia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a).

A classificação de Ridley-Jopling (1966) é um dos sistemas mais utilizados para classificar a hanseníase, que divide os pacientes em cinco grupos, de acordo com seu estado clínico e imunológico (SILVA et al., 2017). A hanseníase tuberculóide (TT) é caracterizada por uma resposta imune celular robusta contra determinantes antigênicos do *M. leprae*, presença de lesão única, granulomas bem desenvolvidos e bacilos negativos ou raros (SILVA et al., 2017). Em contrapartida, a hanseníase virchowiana (LL) é caracterizada por uma forte resposta humoral que não impede a proliferação bacteriana e tende a se manifestar clinicamente com lesões cutâneas e alta carga bacteriana (PINHEIRO et al., 2011). A maioria dos pacientes apresenta fenótipos limítrofes/borderlines, imunologicamente instáveis: borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-virchowiano (BL) (EICHELMANN et al., 2013).

Durante o curso da doença, os pacientes estão sujeitos a ocorrência de reações hansênicas, condições clínicas agudas de exacerbação da resposta inflamatória localizada ou sistêmica, que podem ser classificadas em dois tipos distintos (GOMES et al., 2020). As reações do tipo 1 (RT1 ou também chamadas de reação reversa/RR) são caracterizadas por uma exacerbação da resposta imune celular contra determinantes antigênicos do *M. leprae*, com linfócitos T CD4+ e infiltração de macrófagos CD163+, e tendem a ocorrer com maior

frequência em pacientes que apresentam as formas clínicas PB, porém as RT1 também podem acometer pacientes BB e BL (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; SILVA et al., 2021). Por outro lado, as reações do tipo 2 (RT2 ou eritema nodoso hansênico/ENH) são uma exacerbação da resposta imune humoral com deposição tecidual de imunocomplexos e infiltração de neutrófilos, mais comumente observadas em pacientes que apresentam as formas BL e LL (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

Essas complicações imunológicas são a principal causa de lesões nervosas irreversíveis e deformidades anatômicas relacionadas à hanseníase, podendo surgir espontaneamente antes, durante e até anos após o tratamento. Esses episódios representam uma grande preocupação clínica e até 50% dos pacientes com hanseníase experimentam uma reação pelo menos uma vez durante a vida (GELUK, 2018). O diagnóstico é baseado em sintomas clínicos e histopatológicos, quando feito de imediato contribui significativamente para a recuperação do paciente, reduzindo os riscos de dano tecidual permanente (LOCKWOOD; SAUNDERSON, 2012).

A autofagia consiste no processo pelo qual componentes celulares são degradados ou reciclados no interior do lisossomo (DERETIC; LEVINE, 2018). É um conjunto de vias de sinalização complexas que geram uma organela de membrana dupla, o autofagossomo, que posteriormente se funde com o lisossomo, gerando o autolisossomo, para degradar o conteúdo presente em seu interior (WANG; LI, 2020).

Já a xenofagia é um tipo de autofagia seletiva que está relacionada com a identificação e remoção de bactérias e outros patógenos intracelulares (WANG; LI, 2020), auxiliando na ativação do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro como forma de limitar a inflamação exacerbada e controlar a infecção (MIZUSHIMA; LEVINE, 2020a). A inibição da autofagia de macrófagos e uma forte resposta imune anti-inflamatória levam a persistência de *M. leprae* no hospedeiro e mau prognóstico da doença (MA et al., 2017).

Existem poucos estudos relacionando o processo autofágico com os episódios reacionais, mas, Silva e colaboradores (2017) mostraram que pacientes TT com reação tipo 1 apresentaram maiores níveis de autofagia do que os pacientes LL e a ativação da autofagia possui papel importante na

eliminação de *M. leprae*. Dessa forma, existe a necessidade de uma maior compreensão dos mecanismos autofágicos associados às reações hansênicas de tipo 1 e 2 para uma melhor compreensão da imunopatogênese dessa doença.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar o papel da autofagia em linfócitos, monócitos e neutrófilos, de pacientes hansênicos com reações do tipo 1 e 2 dos municípios de Recife e Caruaru, estado de Pernambuco.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar fenotipicamente a expressão de marcadores autofágicos em linfócitos, monócitos e neutrófilos de amostras de sangue coletadas de pacientes reacionais infectados pelo *Mycobacterium leprae*;
- Correlacionar os linfócitos, subtipos de monócitos e neutrófilos identificados com os tipos de reações hansênicas desenvolvidas pelos pacientes;
- Identificar por imunofluorescência a atividade inflamatória nos monócitos e linfócitos a partir de amostras sanguíneas de pacientes reacionais;
- Avaliar o perfil de citocinas inflamatórias nestes mesmos pacientes e sua associação com as reações do tipo 1 e 2, e os marcadores autofágicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hanseníase

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que pertence a classe *Schizomycetes*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium* (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). As bactérias são ligeiramente curvadas e medem 1–8 µm de comprimento e 0,3–0,5 µm de diâmetro. O *M. leprae* é um bacilo ácido-resistente, imóvel e microaerófilo que invade e infecta macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos causando uma infecção crônica em humanos conhecida como

hanseníase (MAYMONE et al., 2020). O *M. leprae* requer baixas temperaturas para crescer, portanto, tende a parasitar preferencialmente áreas mais frias como pele, mucosa nasal e orelhas (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022).

A hanseníase é uma doença caracterizada por manifestações clínicas baseadas no acometimento dermatoneurológico, com aparecimento de lesões cutâneas características, as quais apresentam diminuição da sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, podendo evoluir para condições de incapacidades físicas que comprometem de forma significativa a rotina das pessoas portadoras (VELÔSO et al., 2018). De acordo com o estado clínico e a resposta imunológica do hospedeiro à infecção, a hanseníase pode ser classificada, em: Tuberculóide (TT), borderline-tuberculóide (BT), Boderline-boderline (BB), Boderline-virchowiano (BL) e Virchowiano (LL) (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere um esquema mais simples para distinguir os diferentes tipos de hanseníase, que é utilizado como base do modelo de tratamento atual. Neste modelo, a hanseníase é classificada com base nos sintomas visíveis e presença ou ausência de bacilos em esfregaços de pele, em: Paucibacilar, quando são identificadas até 5 lesões de pele e baciloscopia negativa; e Multibacilar, quando há mais de 5 lesões de pele e baciloscopia positiva (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

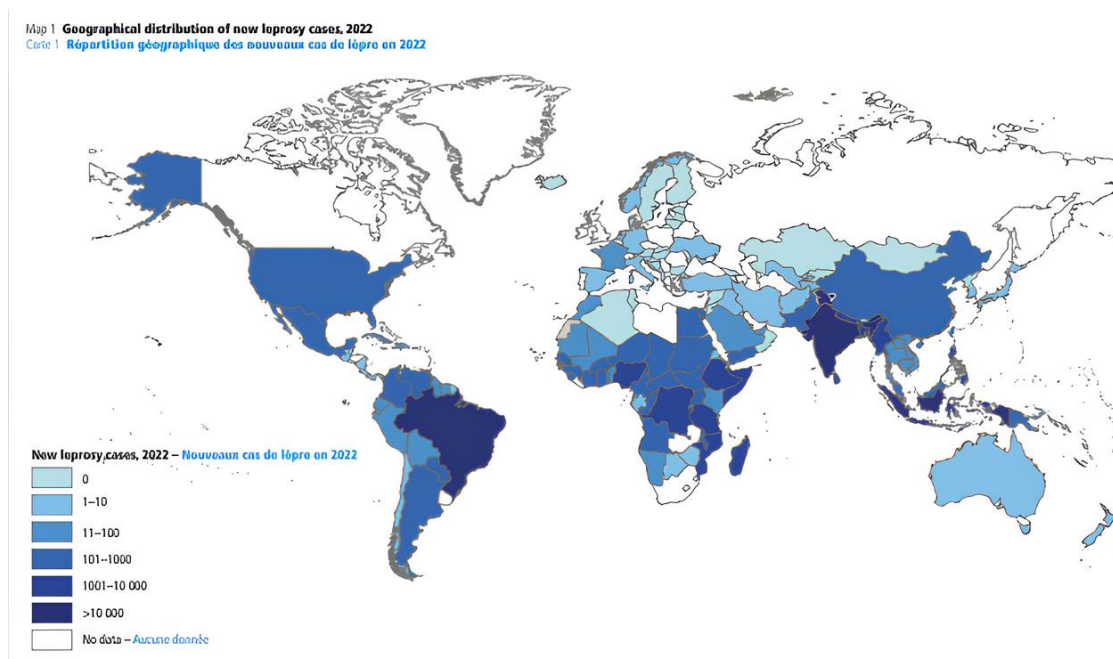
O mecanismo de transmissão depende da infectividade do hospedeiro e a proximidade, frequência e duração do contato. As secreções respiratórias são a via de transmissão mais comum. O período de incubação normalmente varia de 3 a 5 anos para a hanseníase tuberculóide e de 9 a 12 anos para a hanseníase virchowiana. A maioria dos indivíduos expostos aos bacilos não desenvolvem sintomas clínicos (MAYMONE et al., 2020).

2.1.1 Epidemiologia

Durante o ano de 2021, foram notificados 140.594 novos casos de hanseníase no mundo, com uma taxa de detecção de 17,83 casos por 1 milhão de habitantes. Brasil, Índia e Indonésia são os países que mais reportam novos casos, correspondendo a 74,5% do total global (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b) (Figura1).

A identificação de novos casos em menores de 15 anos de idade indica transmissão recente, e 9.052 novos casos infantis foram notificados em todo o mundo durante o ano de 2021, com uma taxa correspondente de 4,5 casos por milhão de população infantil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b). Um aumento no número de casos infantis (4,7%) foi observado em 2021 quando comparado com 2020 (8.642).

Figura 1- Número de casos de hanseníase no mundo.



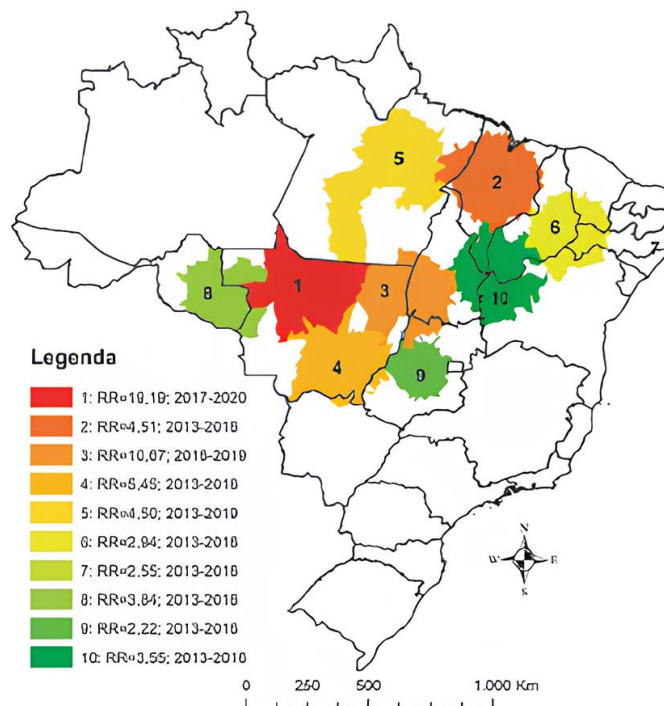
Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b.

Nesse contexto, o Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo. Em 2021 foram notificados 18.318 casos no país, sendo 761 em menores de 15 anos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023).

Os chamados *clusters* definem áreas com maior risco e onde se encontra a maioria dos casos. Na análise atual, os dez *clusters* mais importantes incluíram 860 municípios e 24,4% dos casos novos detectados no período analisado. O primeiro *cluster* foi detectado entre 2017 e 2020, sendo composto de 41 municípios, todos localizados no Mato Grosso, e constituiu a área de maior risco para contrair a hanseníase. O terceiro *cluster* apresentou o segundo maior risco para hanseníase entre os anos 2016 e 2019, sendo composto por 70 municípios localizados no extremo sul do Pará, Nordeste de Mato Grosso, Centro-Sul de

Tocantins e norte de Goiás. Pernambuco possui 2 clusters, um localizado mais na região do Sertão e outro na Região Metropolitana (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023) (Figura 2).

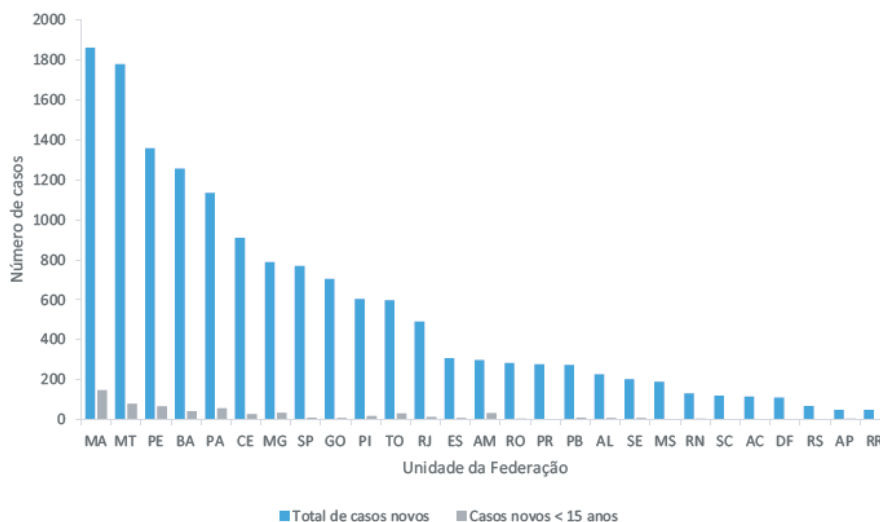
Figura 2- Áreas (Clusters) com maior número de casos de hanseníase no Brasil.



Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023.

Dados preliminares de 2022 demonstram que o Brasil diagnosticou 19.635 casos novos de hanseníase, sendo 836 novos casos em menores de 15 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). O Maranhão é o estado que apresenta o maior número de casos novos na população geral, com 1.860 casos, seguido de Mato Grosso, Pernambuco, Bahia e Pará, com mais de mil casos cada um. O Maranhão também ocupa a primeira posição em número de casos novos em menores de 15 anos (148), seguido de Mato Grosso (79) e Pernambuco (67) (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023) (Figura 3).

Figura 3- Número de casos de hanseníase por estado do Brasil.



Fonte: SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023.

Do total de casos novos diagnosticados em 2022, 80,2% foram classificados como multibacilares (MB). Cerca de 83,4% dos casos novos foram avaliados quanto ao Grau de Incapacidade Física (GIF) no diagnóstico, 1.449 casos foram diagnosticados com GIF 2, representando 11,6% do total, e 4.041 foram diagnosticados com GIF 1, o que corresponde a 32,4% (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023). Esse indicador evidencia o diagnóstico tardio, devido ao maior grau de comprometimento físico ocasionado pela hanseníase. Índia e Brasil são os únicos países que apresentam mais de 1.000 casos com GIF 2 no mundo (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022a).

2.1.2 Imunopatologia e Classificação

A fisiopatologia da hanseníase é multifatorial, sendo que aspectos genéticos, imunológicos e ambientais determinam a suscetibilidade de cada indivíduo ao bacilo (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). Como dito anteriormente, existem dois esquemas principais de classificação utilizados para

pacientes com hanseníase: o sistema Ridley-Jopling e a classificação operacional da OMS.

O sistema de classificação Ridley-Jopling (1966) combina manifestações clínicas, características histopatológicas e a resposta imune do paciente, dividindo a hanseníase em:

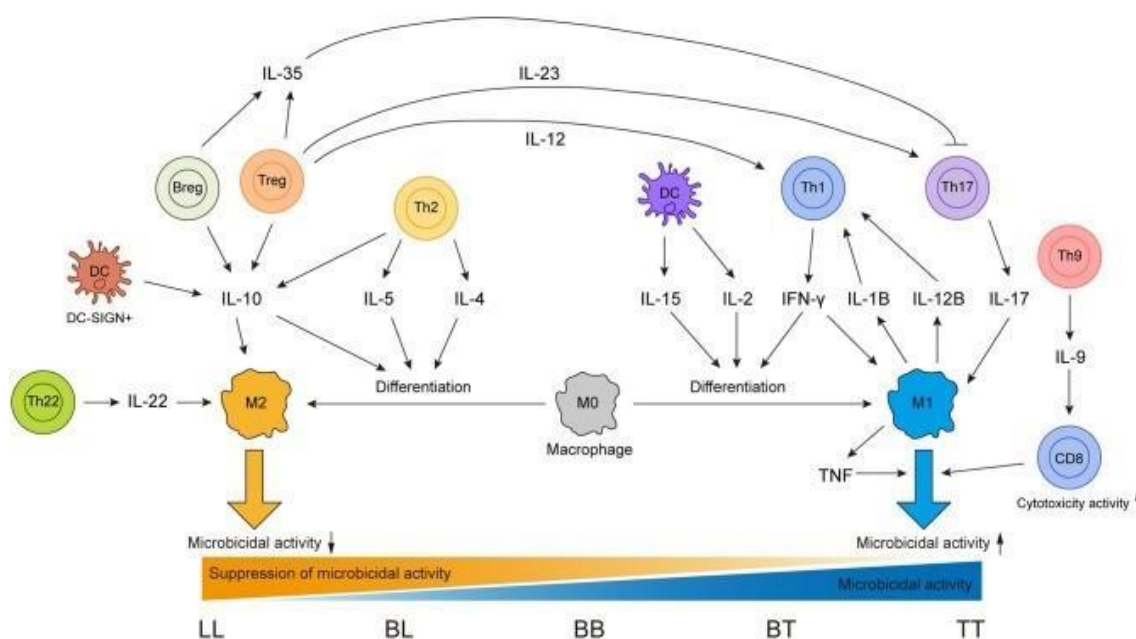
Hanseníase tuberculóide (TT), caracterizada por uma forte resposta imune celular, presença de uma única lesão, granulomas bem desenvolvidos e raros bacilos (SILVA et al., 2017). Em modelo murino, as células Th1 que produziram IL-2 e IFN- γ induziram os macrófagos para o estado polar M1 (pró-inflamatório) resultando em uma forma restrita da doença; nas lesões de pacientes tuberculóides (TT) também foi constatado maior expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-2 e IFN- γ (MI; LIU; ZHANG, 2020). Em outro estudo, foi avaliado o papel da resposta Th9, que demonstrou níveis mais elevados de IL-9 na forma tuberculóide (TT), sugerindo que essa citocina tem função antagônica à IL-4 e IL-10, desviando a resposta imune do polo Th2 para o polo Th1 (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). Também foi observado um aumento na expressão de IL-17, a resposta Th17 contribui para o recrutamento de células inflamatórias, ativação de células endoteliais e manutenção do processo inflamatório crônico, desempenhando ainda um papel crítico na modulação da atividade de macrófagos, induzindo a produção de TNF- α , IL-6 e iNOS, levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que destroem o bacilo, contribuindo para uma forma mais limitada da doença (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022).

Já a hanseníase virchowiana (LL) é caracterizada por múltiplas lesões cutâneas com grande número de bacilos e presença de macrófagos do tipo M2 (anti-inflamatórios) (PINHEIRO et al., 2011). Em modelo experimental, as células Th2 que produziram IL-4 e IL-5 inibiram a função microbicida dos macrófagos de perfil anti-inflamatório, resultando na forma progressiva da doença (MODLIN, 1994). Já nas lesões de pacientes virchowianos, as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5 e IL-10 foram mais abundantes (MI; LIU; ZHANG, 2020). A linhagem Th22 é caracterizada pela produção de citocinas como IL-22, TNF- α , IL-13 e IL-26, fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), em estudos que avaliaram a existência de IL-22 nas lesões da hanseníase, foi observada a presença desta

citocina na forma mais disseminada (LL) (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022). A liberação de IL-22 nestes casos pode ser uma tentativa alternativa de estimular a atividade fagocítica de macrófagos, que é comprometida pelo *M. leprae* como um mecanismo de escape do sistema imunológico (FROES; TRINDADE; SOTTO, 2022) (Figura 4).

Porém, a maioria dos pacientes apresentam fenótipos limítrofes/boderlines, imunologicamente instáveis: Boderline-tuberculóide (BT), Boderline-boderline (BB) e Boderline-virchowiano (BL) (EICHELMANN et al., 2013). Nestes fenótipos, a carga bacteriana se correlaciona com as características histológicas, sendo a BT e BB mais relacionadas aos pacientes TT e a BL aos pacientes LL (HOOIJ; GELUK, 2021).

Figura 4- Imunopatogênese da hanseníase.

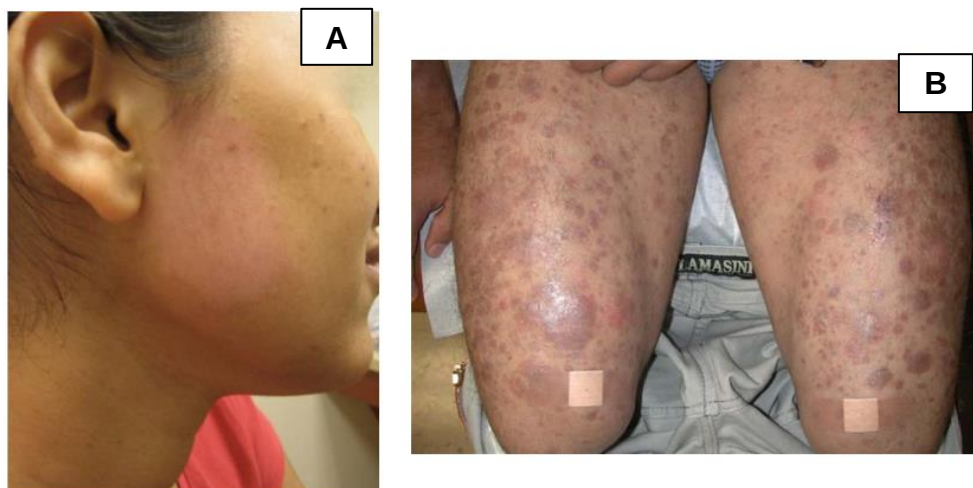


Fonte: MI; LIU; ZHANG, 2020.

Em 1982, a OMS propôs uma classificação operacional para fins de tratamento, baseando-se no Índice Baciloscópico (IB) no exame cutâneo ou no número de lesões cutâneas. Os pacientes são classificados como Paucibacilares (PB) quando o número de lesões cutâneas for de 1 a 5 e sem bacilos aparentes em esfregaços cutâneos (envolve TT e BT) (Figura 5A) e Multibacilares (MB) quando o número de lesões cutâneas forem >5 lesões e bacilos visíveis por

análises microscópicas de esfregaços cutâneos (envolve LL e BL) (Figura 5B). (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

Figura 5: Lesão em paciente com hanseníase Paucibacilar (PB) (A) e paciente com hanseníase multibacilar (MB) (B).



Fonte: WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015.

Um papel importante na resposta imune ao *M. leprae* tem sido atribuído aos receptores toll-like (TLRs), um tipo de receptor de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) encontrado em monócitos e células dendríticas (BOCHUD et al., 2008). Após a ativação, os TLR desencadeiam a liberação de citocinas e a indução de moléculas co-estimulatórias que influenciam a natureza da resposta imune adaptativa T ou B (KRUTZIK et al., 2003). Os TLR2 medeiam a resposta às lipoproteínas triaciladas microbianas, enquanto que os TLR4 reconhecem lipopolissacarídeo (LPS) e a sua ativação também induz vias antimicrobianas que destroem organismos intracelulares (KRUTZIK et al., 2003).

Estudos mostram que a expressão de TLR2 é maior em monócitos de lesões de pele derivadas de pacientes TT e que esse aumento pode ser influenciado pelo padrão de resposta imune Th1, levando a formas mais limitadas da doença, enquanto que nas lesões de pacientes LL a expressão de TLR2 encontra-se inibida pela IL-4 característica das respostas Th2, favorecendo a permanência de *M. leprae* no organismo (KRUTZIK et al., 2003). Uma variação genética, mais fortemente associada às formas virchowianas, foi descrita no gene que codifica o TLR2 (BOCHUD et al., 2008).

O papel do inflamassoma na hanseníase também foi estudado. Componente da resposta imune inata, o inflamassoma é um complexo de proteínas citosólicas que medeiam a resposta inflamatória por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), sendo este último responsável pela maturação da caspase-1, secreção de IL-1 β e IL-18, além de um tipo de morte celular chamada piroptose (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022).

2.1.3 Diagnóstico e Tratamento

A hanseníase é fortemente suspeitada quando se manifesta um dos seguintes sinais cardinais: 1) perda definitiva de sensibilidade em uma mancha cutânea pálida (hipopigmentada) ou avermelhada; 2) Espessamento ou aumento do nervo periférico com perda de sensibilidade e/ou fraqueza dos músculos supridos por esse nervo; e 3) presença de BAAR em esfregaço cutâneo (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

O exame baciloscópio, ou baciloscopia, é usado para estimar o número de bactérias ácido-resistentes, este valor é relatado como Índice Baciloscópio (IB) (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). São coletados materiais nos lóbulos das orelhas e outras áreas mais frias, da borda da lesão em pacientes paucibacilares (PB) e do centro das lesões em pacientes multibacilares (MB) (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015). O esfregaço é feito apertando a pele, para anestesiá-la e diminuir o sangramento, enquanto se faz uma incisão na derme de aproximadamente 5mm de extensão por 3mm de profundidade, retirando o material necessário (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019).

Recentemente, o diagnóstico pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tornou-se uma técnica útil e recomendada devido à sua alta precisão, no entanto, essas ferramentas ainda são caras e exigem técnicos qualificados (MARTINEZ et al., 2014). Esta tecnologia passou a ser utilizada não só para diagnóstico, mas também para detecção de bactérias resistentes, avaliação de efeitos terapêuticos e confirmação de contatos domiciliares (MARTINEZ et al., 2014). Foi verificado e relatado que a PCR quantitativa multiplex em tempo real (qPCR) usando os genes, *RLEP*, 16S rRNA e superóxido dismutase (*sodA*) é

eficaz para o diagnóstico correto e possibilidade de identificação precoce do *M. leprae* (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022).

Em 1982, foi introduzida a poliquimioterapia (PQT) pela Organização Mundial da Saúde como tratamento-padrão da hanseníase, sendo eficaz na prevenção da resistência aos medicamentos, ao mesmo tempo que diminui rapidamente a infectividade dos pacientes e reduz as chances de reações e recorrência, sendo amplamente administrada até os dias atuais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Para a hanseníase Paucibacilar (PB), recomenda-se 600mg de rifampicina uma vez por mês sob supervisão, 100mg de dapsona diariamente sem supervisão, por um período de 6 meses (MUNGROO; KHAN; SIDDIQUI, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Já para a hanseníase Multibacilar (MB), o indicado é 600mg de rifampicina e 300mg de clofazimina uma vez por mês sob supervisão e 100mg de dapsona e 50mg de clofazimina diariamente sem supervisão, por 12 meses (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Após a conclusão do tratamento, a doença pode voltar devido à resistência, persistência ou novas infecções. Para a hanseníase resistente à rifampicina, as diretrizes recomendam o tratamento com pelo menos dois medicamentos de segunda linha (claritromicina, minociclina ou quinolona) mais clofazimina diariamente durante 6 meses, seguidos de clofazimina mais um desses medicamentos por mais 18 meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Quando a resistência à ofloxacina também estiver presente, o regime de escolha consiste de 6 meses de claritromicina, minociclina e clofazimina seguidos de claritromicina ou minociclina mais clofazimina por mais 18 meses (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

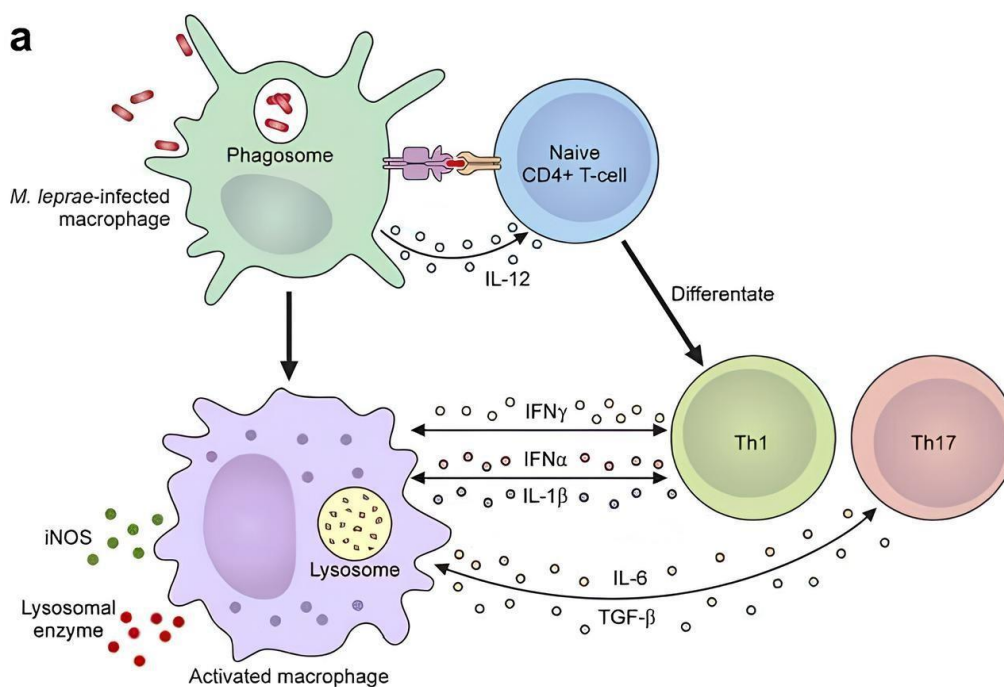
2.1.4 Reações Hansênicas

As reações hansênicas são episódios de hipersensibilidade aguda caracterizados pelo agravamento de lesões anteriores ou aparecimento de novas lesões, ocorrendo antes, durante ou após o tratamento (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022). As reações hansênicas são classificadas como tipo 1 ou reação reversa (RT1) e tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). Essas

reações ocorrem em 30 a 50% de todos os pacientes, sendo a fonte mais comum de dano nervoso persistente, deformidades e incapacidades associadas à infecção pelo *M. leprae* (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022).

As reações de tipo 1 (RT1), também conhecidas como reação reversa, ocorrem principalmente nas formas tuberculóides da hanseníase (TT, BT e BB), sendo relacionada à uma reação de hipersensibilidade do tipo IV (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). É caracterizada pela inflamação aguda de lesões cutâneas pré-existentes e neuroinflamação, presença de infiltrado celular constituído predominantemente por linfócitos T CD4+, além de macrófagos CD163+, com secreção significativa de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL1-beta, IL-6, IL-17 e CXCL-10. A liberação de TNF- α e IFN- γ está associada à dor e ao inchaço que são frequentemente observados (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022) (Figura 6).

Figura 6: Resposta imunológica durante as reações de tipo 1.



Fonte: SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022.

O diagnóstico de RT1 geralmente é feito clinicamente, mas uma biópsia de pele pode ser realizada para auxiliar na confirmação (LUO et al., 2021). Os

sintomas incluem: aumento da inflamação de lesões pré-existentes, lesões que já apresentavam sinais de regressão, ou lesões hipocrômicas, tornam-se vermelhas e edematosas, escamosas e podem até ulcerar (NERY et al., 2013) (Figura 7). O edema de extremidades ou face pode estar presente, aparecendo sozinho ou com outras lesões, principalmente em pacientes BL, sendo um sinal-chave das reações hansênicas (NERY et al., 2013). O envolvimento dos nervos periféricos leva à perda da função dos nervos sensoriais e motores, com sensibilidade e dor (LUO et al., 2021).

Figura 7: Manifestações clínicas das reações de tipo 1.

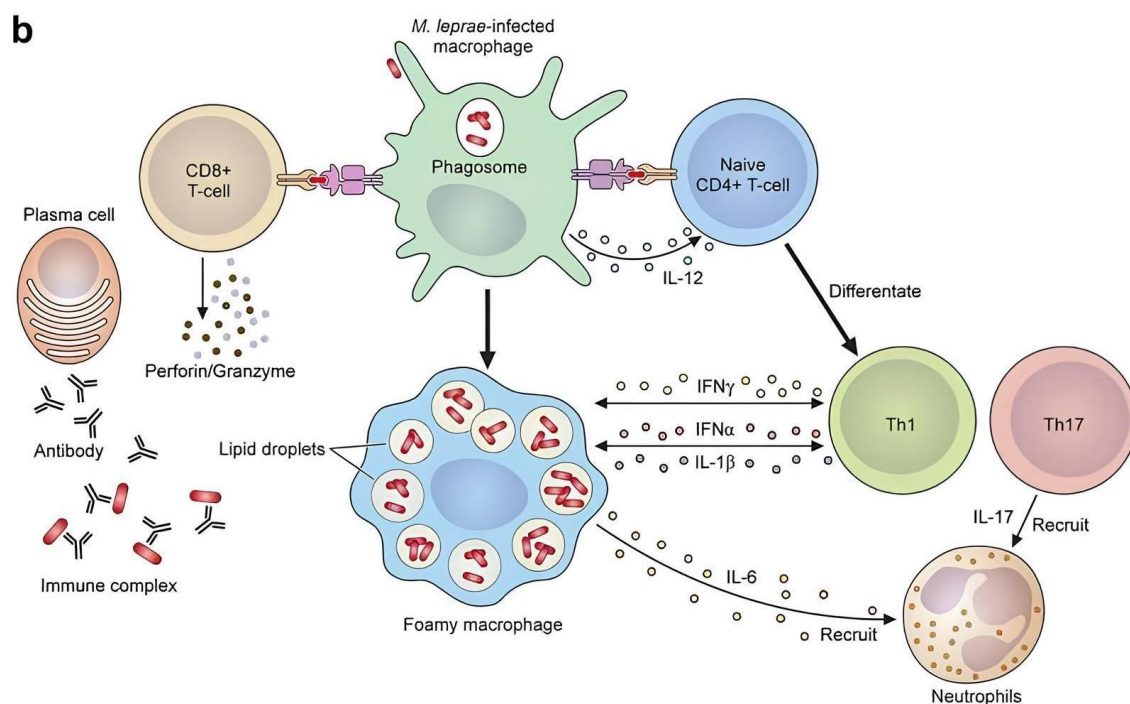


Fonte: WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015

As reações de tipo 2, também conhecidas como Eritema Nodoso Hansênico (RT2/ENH), ocorrem principalmente em pacientes com as formas virchowianas (LL e BL) que apresentam baixa imunidade celular, mas possuem número suficiente de células B e plasmócitos para produzir anticorpos contra *M. leprae* (SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022). Os anticorpos formam complexos imunes que se depositam em tecidos e vasos sanguíneos causando uma reação de hipersensibilidade do tipo III. O principal sintoma das RT2 são lesões subcutâneas vermelhas e dolorosas com infiltração de neutrófilos, presença de níveis elevados de TNF- α , tanto nas lesões quanto no sangue periférico, além

das citocinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, típico de respostas Th2 (FROES; SOTTO; TRINDADE, 2022) (Figuras 8 e 9).

Figura 8: Resposta imunológica durante as reações de tipo 2.



Fonte: SUGAWARA-MIKAMI et al., 2022.

Além disso, pode ocorrer inflamação sistêmica, que afeta os nervos, articulações, olhos, testículos e gânglios linfáticos, podendo cursar com febre alta. O comprometimento da função nervosa está presente em mais de 50% dos casos de ENH (LUO et al., 2021).

Figura 9: Manifestações clínicas das reações de tipo 2.



Fonte: WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015.

Assim que as RT1 são identificadas, o tratamento com 20–60mg de prednisolona é iniciado, seguido por uma diminuição gradual na dosagem em 5mg a cada 14 dias, com base na regressão dos sintomas (MUNGROO; KHAN; SIDDIQUI, 2020). O tratamento deve ser idealmente interrompido dentro de algumas semanas para prevenir a incidência de efeitos colaterais que podem ocorrer devido ao uso prolongado de esteroides (MUNGROO; KHAN; SIDDIQUI, 2020).

No caso das RT2, a principal opção de tratamento são 100–400mg de talidomida diariamente, proporcionando um rápido efeito anti-inflamatório ao atuar sobre o TNF- α , no entanto, seu uso é limitado por seus efeitos teratogênicos (BHAT; VAIDYA, 2020). O tratamento geralmente dura meses ou anos, pois poucos pacientes apresentam um único episódio de RT2 agudo e a maioria apresenta doença recorrente ou crônica, podendo levar à morbidade e mortalidade nos pacientes acometidos (POLYCARPOU; WALKER; LOCKWOOD, 2017).

2.1.5 Desafios na erradicação da hanseníase

Apesar dos esforços de controle, incluindo o uso generalizado da PQT e a estabilização das taxas de detecção de novos casos notificados nos últimos anos, a hanseníase permanece endêmica em muitos países em desenvolvimento (CHEN et al., 2022). Os principais fatores relacionados são: o diagnóstico tardio, estigma e resistência bacteriana (NAAZ et al., 2017).

Em muitas partes do mundo, a falta de informação juntamente com os significados religiosos e sociais associados à doença ou às alterações físicas que dela podem resultar, continuam a gerar atitudes estigmatizantes e crenças negativas sobre as pessoas afetadas pela hanseníase (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019). Como consequência do estigma presente na sociedade, quando diagnosticados alguns pacientes podem não aderir à PQT, principalmente no caso da hanseníase MB em que o tempo de tratamento é longo (12 meses), aumentando o risco de desenvolvimento de resistência aos medicamentos (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019).

A resistência a medicamentos por *M. leprae* é mais frequentemente atribuída a mutações em partes específicas de genes cromossômicos que codificam alvos de medicamentos, também chamados de região determinante de resistência a medicamentos (DRDR) (AUBRY et al., 2022).

Existe um risco maior de seleção de mutações resistentes a medicamentos em pacientes com hanseníase MB, especialmente nas formas virchowianas, uma vez que abrigam grandes cargas bacterianas, com cerca de 10^{11} a 10^{12} bacilos de *M. leprae* em todo o corpo (AUBRY et al., 2022). Como o *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro*, a frequência de mutações de resistência aos medicamentos numa população de bactérias foi estimada a partir de estudos sobre o *M. tuberculosis* e dos resultados de estudos experimentais e clínicos (ALEMU BELACHEW; NAAFS, 2019). A frequência de mutações de resistência à dapsona e à rifampicina em uma população de *M. leprae* é estimada em 10^6 e 10^7 , respectivamente (AUBRY et al., 2022; NAAZ et al., 2017). A frequência de resistência à clofazimina no *M. leprae* é desconhecida, mas parece ser extremamente baixa em isolados clínicos (AUBRY et al., 2022).

Uma revisão sistemática feita por Dharmawan e colaboradores (2021), analisando 27 artigos, mostrou que a detecção de casos de hanseníase é frequentemente atrasada, com atraso médio variando de 12 a 36 meses. O fator mais proeminente associado ao atraso no diagnóstico de novos casos foi o comportamento na procura de serviços de saúde: 70,2% dos pacientes com hanseníase não procuram cuidados após perceberem o primeiro sinal de hanseníase, 12–59% dos pacientes começam a procurar cuidados comprando medicamentos numa farmácia sem recomendação médica, ou visitando um “curandeiro” e apenas um quarto dos pacientes procuraram cuidados visitando um médico ou clínica privada.

Os fatores individuais associados ao atraso na detecção dos casos foram: idade avançada, sexo masculino, menor percepção dos sintomas da doença, hanseníase MB e a falta de conhecimento. Os fatores socioeconómicos mais identificados foram viver em áreas rurais, realizar trabalho remunerado diário (por exemplo: trabalho agrícola) e estar desempregado. E o fator social e comunitário mais relatado associado foi o estigma (DHARMAWAN et al., 2021).

2.2 Autofagia

Autofagia é o processo em que o conteúdo celular, como grandes complexos de macromoléculas ou organelas, é fundido com o lisossomo para degradação e reciclagem (SEBASTIÁN; ZORZANO, 2020). Além disso, a autofagia representa uma resposta adaptativa ao estresse celular, como a privação de nutrientes ou a retirada do fator de crescimento, condições que também influenciam as células do sistema imunológico (MIHALACHE; SIMON, 2012).

A descoberta dos mecanismos de degradação intracelular de proteínas foi provocada pela descoberta do lisossomo por Christian de Duve (1955). Análises feitas por de Duve revelaram uma nova organela envolvendo uma fosfatase ácida e também vários tipos de enzimas hidrolíticas com atividade ideal em pH ácido, ele chamou essa organela única de “lisossomo”, referindo-se ao seu papel como organela para função lítica (DE DUVE et al., 1955). Novikoff e colaboradores identificaram lisossomos *in situ* dentro de células e tecidos

empregando estudos de microscopia eletrônica (NOVIKOFF; BEAUFAY; DE DUVE, 1956).

Em 1957, Clarck observou células tubulares renais de camundongos recém-nascidos e encontrou, além dos lisossomos, vacúolos de formato irregular contendo materiais amorfos e ocasionalmente mitocôndrias (CLARK, 1957). Novikoff e colaboradores também observaram estruturas de membrana positivas para fosfatase ácida semelhantes contendo mitocôndrias, retículo endoplasmático e ribossomos. Estas estruturas de membrana podiam ser induzidas por certos tratamentos químicos ou condições de estresse (NOVIKOFF; BEAUFAY; DE DUVE, 1956). Arstila e Trump mostraram que uma estrutura dupla ligada à membrana contendo uma porção de citoplasma e organelas sem enzimas hidrolíticas conhecidas como autofagossomo é formada inicialmente. Essa estrutura é posteriormente observada como uma estrutura de membrana única, denominada autofagolisossomo, apresentando vários estágios de degradação de organelas por enzimas lisossômicas (ARSTILA; TRUMP, 1968). Com base nessas observações, Deter e de Duve definiram esse modo de entrega de materiais citoplasmáticos aos lisossomos para degradação como “autofagia” (do grego “comer a si mesmo”) em 1963 (OHSUMI, 2014).

Porém, os detalhes do processo de autofagia não foram descritos até que Tsukada e Ohsumi desenvolverem um modelo de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) com corpos autofágicos visíveis. Ao estudar mutações aleatórias e alterações fenotípicas nas células de levedura, eles conseguiram identificar 15 genes (ATG 1-15) envolvidos no processo autofágico (TSUKADA; OHSUMI, 1993). E que em condições de deficiência nutricional, a autofagia degrada componentes citoplasmáticos, mostrando também que a autofagia é necessária para a sobrevivência da levedura (TAKESHIGE et al., 1992).

Em 2016, o pesquisador japonês Yoshinori Ohsumi recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela identificação e caracterização precoce da maquinaria autofágica, em particular, os genes relacionados a autofagia (ATG), em leveduras (GALLUZZI et al., 2017). Desde então a autofagia tem sido relacionada com o desenvolvimento e diferenciação de vários tecidos, homeostasia, particularmente em populações de células de vida longa. A autofagia também é importante para o ajuste dos níveis de certas proteínas e

lipídios, degradação de membranas intracelulares e gotículas lipídicas. As vias relacionadas à autofagia são mecanismos centrais na imunidade e na inflamação (MIZUSHIMA; LEVINE, 2020b). E danos no processo autofágico podem levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, câncer, doenças inflamatórias e doenças autoimunes (MIZUSHIMA; LEVINE, 2020b).

2.2.1 Vias da autofagia

Em células de mamíferos, existem três tipos principais de autofagia: microautofagia, macroautofagia e autofagia mediada por chaperona (CMA).

A microautofagia refere-se a um processo pelo qual o conteúdo citoplasmático entra no lisossomo através de uma invaginação da membrana lisossomal (PARZYCH; KLIONSKY, 2014) (Figura 10B). Após a caracterização inicial da microautofagia em mamíferos na década de 1980, grande parte do progresso nas duas décadas seguintes veio da pesquisa em leveduras. Essas investigações descobriram a microautofagia de peroxissomos, citosol, mitocôndrias, partes do núcleo, gotículas lipídicas, retículo endoplasmático (ER), certas enzimas citosólicas e vacúolo de proteínas de membrana (GALLUZZI et al., 2017). As funções mais conhecidas da microautofagia estão relacionadas ao transporte biossintético, adaptação metabólica, remodelação de organelas e controle de qualidade.

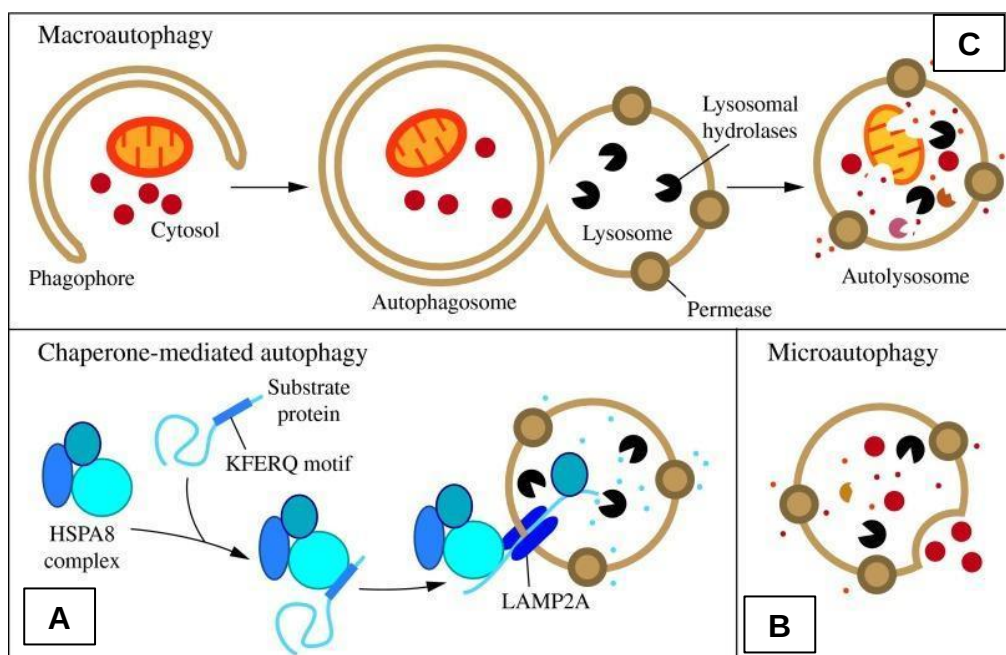
Um segundo tipo de autofagia, que até agora só foi descrito em células de mamíferos, é a autofagia mediada por Chaperonas (CMA) (Figura 10A). Ao contrário da microautofagia e da macroautofagia, que podem englobar inespecificamente o citoplasma volumoso, a CMA é altamente específica (PARZYCH; KLIONSKY, 2014). A CMA é estimulada ao máximo em resposta ao estresse, conferindo a esta via um papel importante no controle da qualidade de proteínas, bem como uma fonte alternativa de aminoácidos (ARIAS; CUERVO, 2011).

Já o terceiro tipo, a macroautofagia, é a via da autofagia melhor caracterizada até agora, devido às suas características morfológicas facilmente distinguíveis (GALLUZZI et al., 2017) (Figura 10C). A característica morfológica que torna a macroautofagia única em relação às outras vias é que as vesículas sequestrantes, denominadas autofagossomos, se formam por expansão e não

através do brotamento de uma organela preexistente já contendo carga (PARZYCH; KLIONSKY, 2014).

Após a iniciação, a membrana começa a se expandir. Nesta fase, é chamado de fagóforo, que é o principal compartimento sequestrador de membrana dupla. A fonte da membrana que constitui o fagóforo é altamente debatida, mas vários estudos implicaram a membrana plasmática, RE, complexo de Golgi e mitocôndrias como possíveis fontes. À medida que o fagóforo se expande, a membrana se curva para gerar um autofagossomo esférico. Após a conclusão, o fagóforo envolve totalmente sua carga e se funde para formar uma estrutura de membrana dupla, o autofagossomo, que então se funde com o lisossomo dando origem ao autolisossomo, local onde ocorre a degradação da carga selecionada (PARZYCH; KLIONSKY, 2014).

Figura 10: As 3 vias da autofagia: autofagia mediada por chaperonas (A), microautofagia (B) e macroautofagia (C).



Fonte: PARZYCH; KLIONSKY, 2014.

2.2.2 Maquinaria autofágica

A autofagia é um processo rigidamente regulado que envolve mais de 40 proteínas relacionadas à autofagia (ATG) na levedura, das quais 19 proteínas são necessárias para a formação do autofagossomo, a maioria tem homólogos em mamíferos, sugerindo que são conservados evolutivamente (SEBASTIÁN; ZORZANO, 2020).

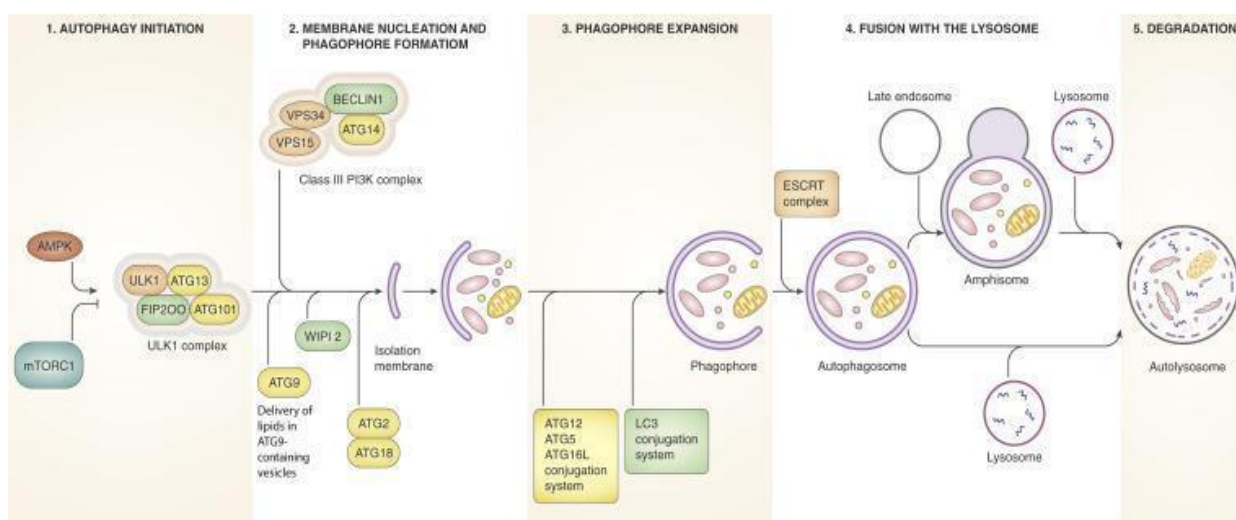
Em resposta a estímulos, a autofagia é desencadeada pela ativação do complexo ULK1, formado por ULK1, ATG13, FIP200 e ATG101. Após a indução da autofagia, a serina treonina quinase ULK1 é ativada, fosforilando assim ATG13 e FIP200. Uma vez ativado, o complexo ULK1 recruta o complexo Beclin 1-Vps34 (complexo PI3K classe III) para o local de formação do autofagossomo. Além disso, ULK1 fosforila diretamente Beclin 1, que pode interagir com ATG14L. Vps34 é responsável pela formação de fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P), que recruta proteínas como DFCP1 e WIPI para promover o início da nucleação de vesículas de membrana dupla. A família de proteínas WIPI é composta por quatro membros, sendo WIPI1 e WIPI2 os mais estudados. O WIPI2 está envolvido no recrutamento do complexo de maturação do autofagossomo ATG12-ATG5-ATG16L para a membrana de isolamento por ligação direta ao ATG16L, enquanto o WIPI1 opera como um regulador negativo dos autofagossomas.

Outras etapas importantes na formação da membrana de isolamento envolvem o complexo Atg2-Atg18, que se liga a membranas contendo PIP3 e Atg9, que são sugeridas para fornecer o material de partida para a formação da membrana de isolamento. O alongamento da vesícula e a conclusão do autofagossomo são mediados por dois sistemas de conjugação semelhantes à ubiquitina, nomeadamente ATG12-ATG5-ATG16L e ATG8 (LC3) fosfatidiletanolamina (PE), levando à formação da forma conjugada com lipídios de LC3 (LC3-PE ou LC3-II). LC3-II então se localiza nas membranas autofagossômicas. O fechamento do autofagossomo é regulado por membros do complexo de triagem endossomal necessário para o transporte (ESCRT). Uma vez formado, o autofagossomo maduro se funde com o lisossomo para formar o autolisossomo, onde a carga é degradada pela ação de diversas

hidrolases ácidas lisossomais.(GALLUZZI et al., 2017; PARZYCH; KLIONSKY, 2014; SEBASTIÁN; ZORZANO, 2020) (Figura 11).

Outro marcador que pode ser utilizado para monitorar a autofagia é a proteína de membrana associada ao lisossomo 1 (LAMP1). Essas proteínas medeiam várias funções nos lisossomos e podem estar envolvidas na fusão destes com outros componentes celulares, como os fagossomos (ESKELINEN, 2006).

Figura 11: Maquinaria autofágica.



Fonte: SEBASTIÁN; ZORZANO, 2020.

2.3 Autofagia e sistema imune

A autofagia está relacionada com diversos aspectos do sistema imunológico como: desenvolvimento de linfócitos, sinalização da imunidade inata, apresentação de antígenos e outros processos que são relevantes na patogênese das doenças inflamatórias e infecciosas (MATSUZAWA-ISHIMOTO; HWANG; CADWELL, 2018).

Embora a inflamação seja essencial para a defesa do hospedeiro, a indução exacerbada do processo inflamatório pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias (SHIBUTANI et al., 2015). Evidências mostram que a autofagia tem um papel importante na regulação das respostas inflamatórias através da limitação da ativação do inflamassoma (MATSUZAWA-ISHIMOTO; HWANG; CADWELL, 2018). O inflamassoma é um complexo proteico citosólico

que consiste em NLRs, ou no receptor citosólico AIM2, juntamente com o adaptador ASC e a protease caspase-1 que leva a produção das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18 (SHIBUTANI et al., 2015). O inflamassoma mais bem caracterizado é o NLRP3, que é ativado em resposta a espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mROS) (SHIBUTANI et al., 2015). Deficiências na via autofágica estão relacionadas com o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, que levam a produção de ROS e ativação do NLRP3, enquanto que a indução da autofagia inibe a produção de IL-1 β e IL-18, melhorando o dano tecidual associado à inflamação (NAKAHIRA et al., 2011; SHAW et al., 2013).

Os macrófagos são células que iniciam as respostas inflamatórias, produzindo citocinas e quimiocinas em resposta à patógenos. Em resposta a diversos fatores, os macrófagos ativados podem ser divididos em dois tipos: M1 clássicos (pró-inflamatórios) secretam uma variedade de citocinas inflamatórias que estimulam o processo de inflamação, enquanto os macrófagos M2 alternativos (anti-inflamatórios) são responsáveis pelo processo de cicatrização tecidual (KRZYSZCZYK et al., 2018). Um bloqueio da autofagia de macrófagos favorece a polarização para o fenótipo M1, que aumenta a resposta imune enquanto que o estímulo do processo autofágico leva a um fenótipo M2 (WEN et al., 2022).

Os neutrófilos são os leucócitos circulantes mais abundantes, essenciais para proteção contra patógenos. Durante a infecção, os neutrófilos são recrutados para o local da infecção e eliminam os patógenos por meio de vários mecanismos efetores, como a degradação dos micróbios fagocitados com proteínas granulares, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de estruturas extracelulares de cromatina com proteínas antimicrobianas, denominadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (ULLAH; RITCHIE; EVANS, 2017).

Durante a fagocitose pelos neutrófilos, a bactéria é engolfada pelos fagossomas. Estudos recentes indicam que os neutrófilos exibem autofagia seletiva dependente de fagocitose ou não canônica (LAP) durante a atividade bactericida, as bactérias ligadas ao PRR no fagossomo induzem a translocação de LC3, iniciando assim a autofagia (SHRESTHA; LEE; HONG, 2020). A autofagia independente da fagocitose (ou xenofagia) também existe e é iniciada

por p62/SQSTM1 ubiquitinado ligado a bactérias intracelulares ou bactérias que escaparam da via fagocítica e ocorre independentemente da geração de ROS (SHRESTHA; LEE; HONG, 2020). Além disso, o aumento da autofagia melhorou a fagocitose de bactérias por neutrófilos e sua atividade bactericida, facilitando a eliminação eficaz de cepas bacterianas sensíveis a medicamentos e multirresistentes a medicamentos, em contraste, a autofagia prejudicada ou inibida aumentou a sobrevivência e o crescimento de bactérias dentro dos neutrófilos (ITO et al., 2015; SHRESTHA; LEE; HONG, 2020; ULLAH; RITCHIE; EVANS, 2017).

O aprisionamento e a morte de patógenos também são mediados pela NETose (um tipo de morte celular que culmina na liberação de NETs), a inibição farmacológica da autofagia reduziu a formação de NETs (MATSUZAWA-ISHIMOTO; HWANG; CADWELL, 2018). Por outro lado, a inibição da mTOR ou ativação da autofagia pela rapamicina melhorou a formação de NETs, enquanto a inibição da autofagia pela wortmanina (um inibidor de PI3K) diminuiu a liberação de NETs (SHRESTHA; LEE; HONG, 2020)

2.3.1 Xenofagia

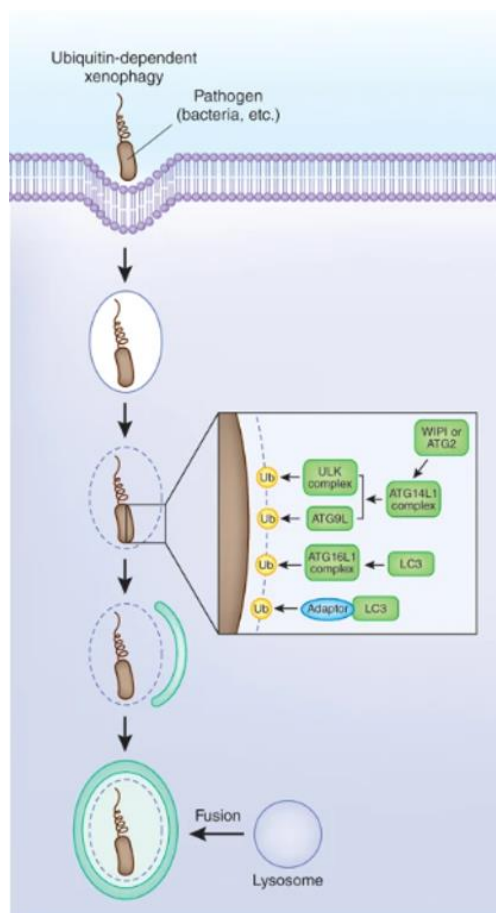
Xenofagia (originado de “xeno” que significa “estrangeiro” e “fagia” que significa comer) é um tipo de autofagia seletiva que tem como alvo patógenos invasores, como bactérias, vírus e fungos, agindo por vias independentes e dependentes de ubiquitina (RUBIO-TOMÁS; SOTIRIOU; TAVERNARAKIS, 2023). Após a fagocitose de bactérias por macrófagos, a indução de autofagia mostrou-se crucial na eliminação de diversos patógenos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* e *Streptococcus pyogenes* (MIHALACHE; SIMON, 2012).

A via de sinalização molecular responsável pelo controle autofágico durante a infecção por *M. leprae* permanece incerta, embora exista uma forte ligação entre o reconhecimento de patógenos por receptores Toll-like (TLRs) e a indução de autofagia (VAN DER VAART et al., 2014). Os receptores *toll-like* (TLR's) são receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) responsáveis por identificar bactérias através do reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMP's), ativando células do sistema imune inato e

adaptativo e também autofagia (PANT et al., 2022). Xu e colaboradores demonstraram que após a estimulação de macrófagos com TLR4, houve expressão de LC3 no citoplasma e aumento da eliminação de micobactéria através da xenofagia (XU et al., 2007).

Quando as bactérias infectam as células hospedeiras, elas são reconhecidas e marcadas por ubiquitinas no citosol como alvos de autofagia (ZHENG; WEI; LI, 2022). A ubiquitina ligase E3 heterogênea desempenha um papel crítico na ubiquitinação específica, e as proteínas da família SMURF1 (fator de regulação da ubiquitinação SMAD1) e TRIM (motivo tripartido) são as E3 ligases mais estudadas em xenofagia (ZHENG; WEI; LI, 2022). As bactérias ubiquitinadas podem ser reconhecidas por um grupo de adaptadores com um domínio de ligação à ubiquitina e uma região de interação com LC3 (WU; LI, 2019). Os adaptadores típicos incluem p62/SQSTM1, optineurina (OPTN) e NDP52 (proteína 52 de domínio nuclear 10), para ligar a carga ubiquitinada à cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo (LC3) (DERETIC; SAITOH; AKIRA, 2013). Em seguida, componentes da maquinaria geral de autofagia, incluindo o complexo ATG12-ATG5-ATG16L1, são recrutados para a maturação do autofagossomo (LEVINE; MIZUSHIMA; VIRGIN, 2011) (Figura 12).

Figura 12: Reconhecimento das bactérias e iniciação da xenofagia.



Fonte: Adaptado de MATSUZAWA-ISHIMOTO; HWANG; CADWELL, 2018 .

O papel da xenofagia durante a hanseníase ainda é incerto. Pacientes TT apresentam uma maior expressão de LC3-II do que os pacientes LL, que mostraram maiores níveis de LC3-I (SILVA et al., 2017). Estudos mostram que uma baixa autofagia de macrófagos e forte resposta imune anti-inflamatória levam a persistência de *M. leprae* no hospedeiro e mau prognóstico da doença (MA et al., 2017). Isso ocorre devido a um ciclo de feedback negativo em que, inicialmente, o nível de autofagia de macrófagos é aumentado, levando a expressão de níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias, esses macrófagos então ativam células T anti-inflamatórias, suprimindo a indução adicional de autofagia através da produção de IL-10 (MA et al., 2017).

Com relação às reações hansênicas, SILVA e colaboradores (2017) mostraram que pacientes LL que desenvolveram reação de tipo 1 apresentaram maiores níveis de autofagia do que os pacientes LL sem reação, o que está associado com o aumento dos níveis de IFN- γ , e que a ativação da autofagia possui papel importante na eliminação de *M. leprae*. Algumas citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na ocorrência de reações hansênicas, incluindo a IL-1 β (BARBOSA et al., 2018), mas esse mecanismo ainda não é bem elucidado. Porém, para as reações de tipo 2 não foram encontrados estudos na literatura que mostrassem sua relação com a xenofagia, levando-nos a estudar essa associação em linfócitos, monócitos e neutrófilos de pacientes reacionais infectados pelo *M. leprae*.

3. METODOLOGIA

3.1 População, Local de estudo e Obtenção das amostras

3.1.1 População e local de estudo

O estudo foi realizado nos municípios de Caruaru e Recife, situados no estado de Pernambuco. Ambos apresentam altas taxas de detecção de novos casos. Foram recrutados 26 pacientes no total, 21 pacientes foram atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), localizado em Recife, sob a supervisão da médica hansenologista Dra. Márcia Oliveira, e 5 pacientes foram atendidos na Unidade Sentinela de Referência para Resistência à Multidrogaterapia em Hanseníase do Estado, do Centro Clínico do Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste (NCV/CAA/UFPE), localizado em Caruaru, sob supervisão da médica hansenologista Dra. Mecciene Rodrigues. Após aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos voluntários ou responsáveis legais, além do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) pelos menores de 18 anos. Também foram coletadas amostras de sangue de 3 indivíduos saudáveis, como controles.

O projeto faz parte de um projeto maior já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco sob o CAAE:50480121.0.0000.5208 e Pareceres: 4.962.188 e 6.415.605 (ANEXOS A e B).

Ambos os locais são serviços de referência em Pernambuco para o diagnóstico e tratamento de hanseníase, dessa forma a cidade de origem dos pacientes recrutados envolveu diversos municípios do estado como: Recife (4 casos), Jaboatão dos Guararapes (4 casos), Gravatá (4 casos), Vitória de Santo Antão (2 casos), Surubim (2 casos), Sirinhaém/ Bom Jardim/ Nazaré da Mata/ Camaragibe/ Buenos Aires/ Olinda/ Camutanga/ Paulista/ São Lourenço da Mata/ Santa Cruz do Capibaribe (1 caso cada).

A forma clínica mais prevalente foram as reações de tipo 2 (RT2/ENH), com 17 casos em Recife e 4 casos em Caruaru, seguida das reações de tipo 1 (RT1) com 4 casos em Recife e 1 caso em Caruaru. Em Recife, a idade média dos 21 pacientes foi de 45,7 anos, para as mulheres a média foi de 41 anos (10 pacientes) e para os homens foi de 50,4 anos (11 pacientes). Já em Caruaru a idade média dos 5 pacientes foi de 57,3 anos, sendo 50 anos para as mulheres (1 paciente) e 59,5 anos para os homens (4 pacientes) (Tabela 1).

Critérios de Inclusão: pacientes atendidos no período de março/2022 janeiro/2024, de 10 a 80 anos e de ambos os sexos com o diagnóstico de reação hansênica tipo 1 ou tipo 2. Critérios de Exclusão: gestantes, pacientes que abandonaram o tratamento médico ou com informações incompletas, e pacientes com histórico de comorbidades.

Para cada paciente foi solicitada a coleta de 12mL de sangue, 8mL foram coletados em tubos contendo ACD® (Ácido Cítrico-Citrato de Sódio-Dextrose; BD Vacutainer®) e 4mL em tubos Secos (BD Vacutainer®). As amostras biológicas foram transportadas e processadas no Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE).

Tabela 1- Caracterização clínica e epidemiológica dos participantes.

	CARUARU	RECIFE
Nº de pacientes	5	21
Sexo	Feminino = 1	Feminino = 10
	Masculino = 4	Masculino = 11
Idade Média	57,3 anos	45,7 anos
	Feminino = 50 anos	Feminino = 41 anos
	Masculino = 59,5 anos	Masculino = 50,4 anos
Forma Clínica	RT1 = 1	RT1= 4
	RT2 = 4	RT2= 17
Cidade de Origem		Recife e Jaboatão dos Guararapes = 4 cada
	Gravatá = 3	Vitória de Santo Antão = 2
	Santa Cruz do Capibaribe = 1	Sirinhaém/ Bom Jardim/ Nazaré da Mata/ Camaragibe/
	Surubim = 1	Buenos Aires/ Gravatá/ Olinda/ Camutanga/ Surubim/
		Paulista/ São Lourenço da Mata = 1 cada

3.1.2 Isolamento de Células Sanguíneas e Obtenção de Soro

Foram coletados 8mL de sangue em tubos com ACD para isolamento das células em estudo, realização da marcação celular e análise por citometria de fluxo. Para obtenção dos linfócitos/monócitos e neutrófilos, foi realizado o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e dos neutrófilos granulócitos polimorfonucleares (PMNs), respectivamente, através da centrifugação de densidade com Histopaque1077® (Sigma-Aldrich) e Histopaque1119® (Sigma-Aldrich), 2.200rpm por 30min. à temperatura ambiente. As células foram recuperadas nos halos celulares formados após as centrifugações, lavadas com solução salina tamponada contendo 2% de Soro Fetal Bovino (PBS+SBF) e contadas na câmara de Neubauer, verificando a viabilidade através do corante azul de Trypan.

Já os 4ml de sangue em tubos secos, foram submetidos à centrifugação, 1.500rpm por 5min. à temperatura ambiente, para coleta e armazenamento de soro. As amostras foram depois utilizadas para determinação dos níveis das citocinas inflamatórias pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA).

3.2 Marcação Celular por Citometria de Fluxo

Após separação e contagem, as células (1×10^6) foram marcadas com os anticorpos de superfície para a identificação dos linfócitos (anti-CD45 $0,5\mu l$, anti-CD3 $5\mu l$, anti-CD4 $2,5\mu l$ e anti-CD8 $5\mu l$), monócitos (anti-CD45 e anti-CD14 $2,5\mu l$) e neutrófilos (anti-CD45, anti-CD15 $5\mu l$, anti-CD16 $5\mu l$ e anti-CD66b $2,5\mu l$), quanto para análise de moléculas de superfície relacionadas ao processo autofágico: anti-TLR2 ($5\mu l$), anti-TLR4 ($2,5\mu l$) e anti-CD107a (LAMP-1) ($5\mu l$), as amostras foram incubadas por 30min. à $4^\circ C$ e em seguida lavadas 2x com PBS+SBF 2% (Soro Fetal Bovino). Após, foram submetidas à fixação e permeabilização utilizando o kit BD Cytotfix/Cytoperm™ por 30min. temperatura ambiente, no escuro. As células então foram marcadas com os anticorpos intracelulares: anti-Caspase-1 ($2,5\mu l$) e anti-LC3B ($0,2\mu l$), por 30min. à $4^\circ C$ e em seguida lavadas 2x com a solução de lavagem BD Perm/Wash™, segundo as instruções do fabricante. As células foram ressuspensas em $150\mu l$ de PBS+SBF 2% e os tubos foram estocados à $4^\circ C$ até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACSymphony™ A5 (BD™). As análises estatísticas foram realizadas através do programa FlowJo (FlowJo™).

3.2.1 Estratégia de gate para identificação dos tipos celulares

Nas PBMCs, primeiro foram identificados os linfócitos pelos parâmetros FSC-SSC, em seguida de acordo com a expressão de CD45+/CD3+, os linfócitos então foram divididos em duas populações: CD4+ e CD8+. Para cada população foram avaliados os marcadores das vias autofágica e inflamatória (APÊNDICE B). Os monócitos foram selecionados pelos parâmetros FSC-SSC e selecionados de acordo com a expressão de CD45+ e CD14+ (APÊNDICE C).

Os PMNs foram identificados de acordo com FSC-SSC, em seguida foram selecionados os granulócitos de acordo com a expressão de CD15+/CD14- (excluindo os monócitos) e identificados através da expressão de CD16+/CD66b+ (APÊNDICE D).

3.3 Determinação dos Níveis das Citocinas por CBA

As citocinas séricas IL-1®, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF foram dosadas por citometria de fluxo através de partículas (bead) fluorescentes conjugadas à ficoeritrina (PE). O procedimento foi realizado conforme a descrição do manual de instrução do BD™ Cytometric Bead Array (CBA) para o Human Inflammatory Cytokine Kit. O Software FCAP™ Array (BD™) foi utilizado para análise dos resultados.

3.4 Imunofluorescência

Um ensaio de imunofluorescência indireto foi realizado com as PBMCs e PMNs isoladas. Uma suspensão de 1×10^5 células/mL foi pipetada no citofunil e centrifugada a 1.500rpm por 5min. utilizando uma citocentrífuga para montar as lâminas. Após esta etapa, as lâminas foram deixadas à temperatura ambiente por 1h para secar e então foram fixadas usando paraformaldeído 4% (PFA) em tampão salina (PBS) por 15min. Foi realizada a permeabilização das amostras usando Tween20 por 15min. e o bloqueio das ligações inespecíficas com Soro Fetal Bovino (SBF) por 30min.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-Caspase-1 (1:100) por 1h cada e em seguida foram lavadas com PBS 3 vezes e incubadas com um anticorpo secundário fluorescente: Alexa-Fluor488 (Thermo Fischer, 1:100) por 45min. e novamente lavadas com PBS 3 vezes. Para montagem das lâminas foi adicionado o meio de montagem com DAPI (Abcam) e deixado à temperatura ambiente por 10min. para marcação dos núcleos das células, em seguida foi feita a montagem com a lamínula. As lâminas prontas foram armazenadas em 4°C, no escuro, até o momento da leitura.

A fluorescência foi analisada através do microscópio de fluorescência invertido Leica DMI8 (Leica Microsystems) e as imagens foram obtidas através do software Leica LAS X. Para quantificação, a intensidade da imunofluorescência foi determinada pelo programa de imagem GIMP versão 2.6 e a análise estatística foi realizada através do software Graphpad PRISM versão 8.0.

3.5 Análises Estatísticas

Foram calculadas as médias da frequência de cada marcador celular ou dos níveis das citocinas dentro de uma população de células específicas que foram submetidas à Análise de Variância (ANOVA one way) para analisar as diferenças entre 3 ou mais grupos. Para acessar as diferenças entre cada grupo foi aplicado o pós-teste de Tukey, onde foi considerado significativo $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfis celulares e Autofagia

Após isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e dos polimorfonucleares (PMNs), as células foram submetidas a análises por citometria de fluxo dos marcadores relacionados à via autofágica e perfil imunológico.

4.1.1 Linfócitos e Monócitos

Nos linfócitos T CD4+, embora não houve diferença estatística entre os grupos em relação à expressão de LC3B, Caspase-1, LAMP1 e TLR2, observa-se uma tendência de maior expressão desses marcadores em pacientes com RT2, do que naqueles com RT1 em relação aos controles (Figura 13A-D). Possivelmente pelo “n” amostral, a inclusão de novos pacientes ao estudo poderá esclarecer melhor o observado. Com relação a expressão de TLR4, essa molécula estava mais expressa nas células de pacientes com RT2 em relação aos demais grupos (Figura 13E).

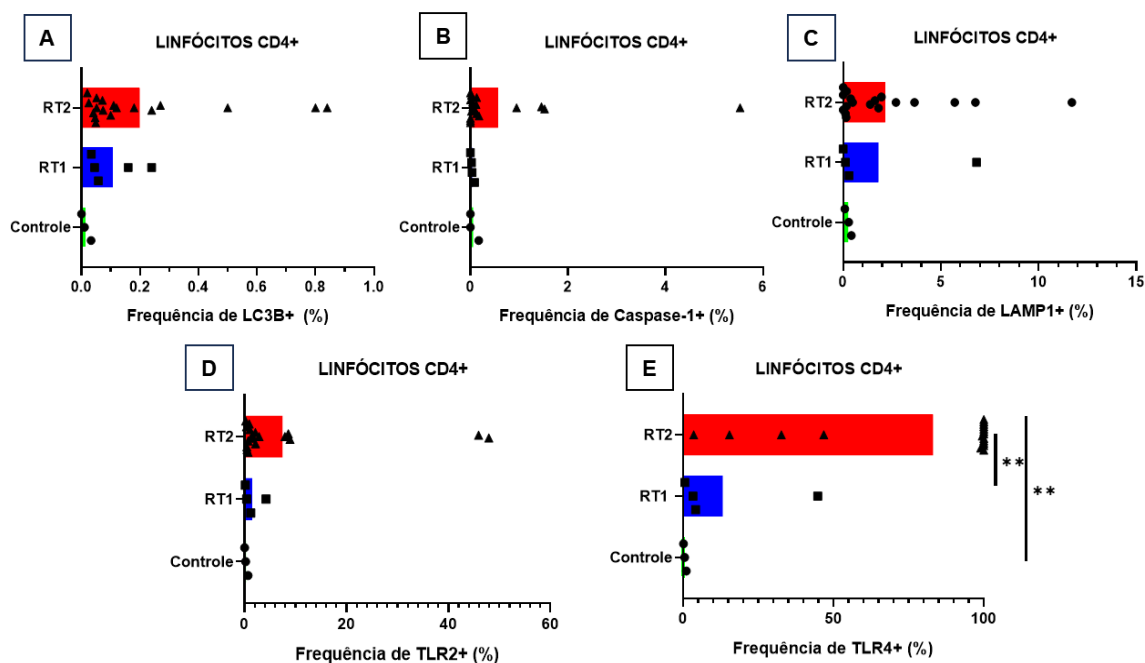


Figura 13: Análise das moléculas LC3B, Caspase-1, LAMP1, TLR2, TLR4 de linfócitos T CD4+ em PBMCs isoladas de sangue de pacientes com reação tipo 1 (RT1), reação tipo 2 (RT2) e controle. Os gráficos representam a média da frequência (%) por grupos e $p < 0,05$.

Nos linfócitos T CD8+, nenhum dos marcadores analisados apresentou diferença estatística entre os grupos, porém, novamente, parece haver uma tendência de maior percentual dos níveis de Caspase-1 e LAMP1 em pacientes com RT2, em relação aos grupos RT1 e controle (Figura 14B-C). Vale destacar a alta expressão de LC3B e TLR4 em todos os grupos de pacientes com reação hanseniana (RT1 e RT2) em relação ao grupo controle (Figura 14A e E).

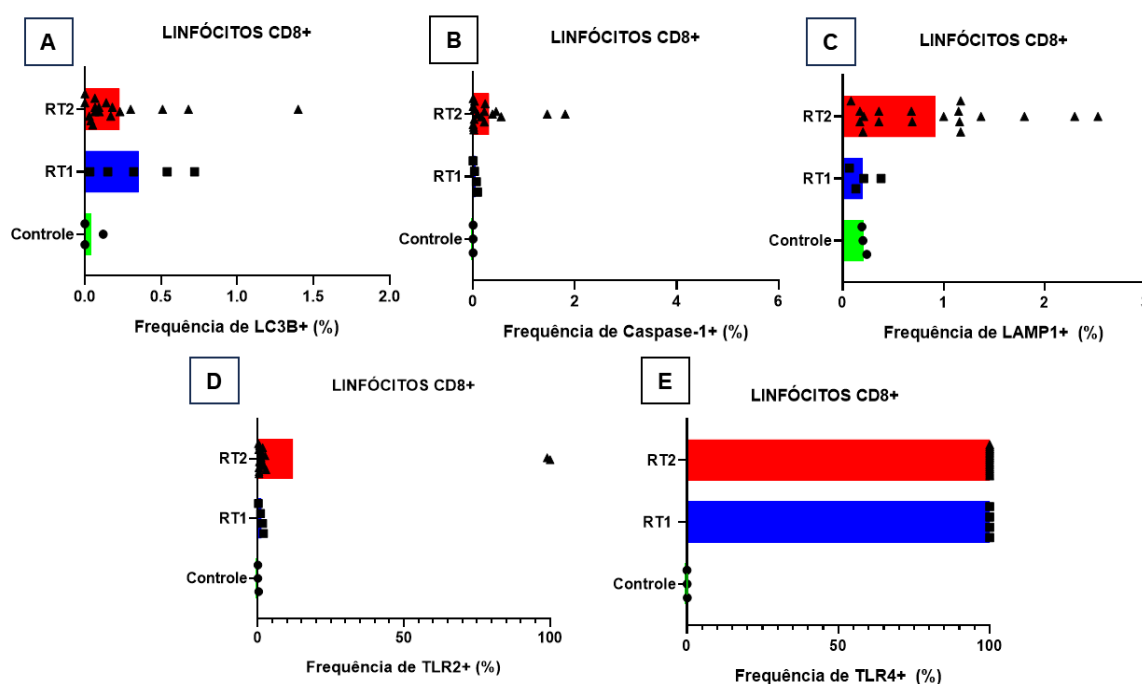


Figura 14: Análise das moléculas LC3B, Caspase-1, LAMP1, TLR2, TLR4 de linfócitos T CD8+ em PBMCs isoladas de sangue de pacientes com reação tipo 1 (RT1), reação tipo 2 (RT2) e controle. Os gráficos representam a média da frequência (%) por grupos e $p < 0,05$.

Em relação aos monócitos, mais uma vez, não conseguimos observar diferença significativa entre os grupos (que acreditamos estar relacionado ao “n” de alguns grupos), porém os níveis de LC3B, TLR2 e TLR4 parecem estar mais aumentados nos grupos RT2 e RT1 em comparação aos controles, com o RT2 sempre um pouco maior que o RT1 (Figura 15A, D-E). Com relação ao LAMP1, parece haver uma maior expressão no grupo RT2 quando comparado aos outros grupos, o que pode indicar um possível acúmulo de lisossomos (Figura 15C), enquanto a Caspase-1 parece fazer um aumento gradativo com o grupo controle expressando menos, seguido pelo grupo RT1 e por último o RT2 com maior expressão, indicando a presença do processo inflamatório (Figura 15B).

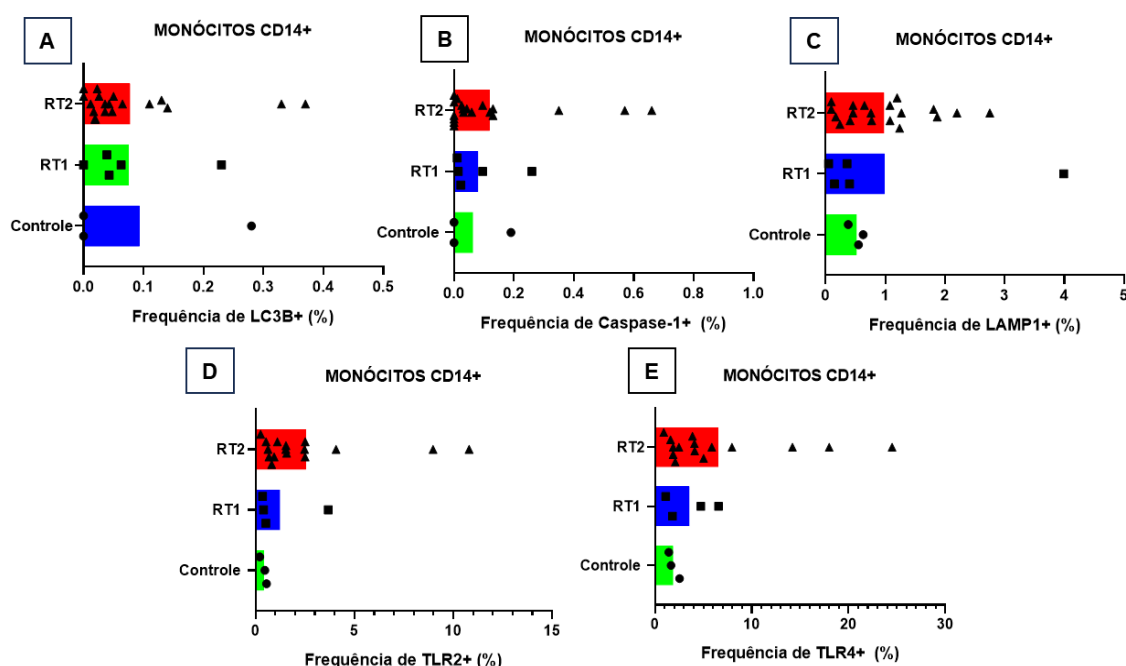


Figura 15: Análise das moléculas LC3B, Caspase-1, LAMP1, TLR2, TLR4 de monócitos (CD14+) em PBMCs isoladas de sangue de pacientes com reação tipo 1 (RT1), reação tipo 2 (RT2) e controle. Os gráficos representam a média da frequência (%) por grupos e $p < 0,05$.

De fato, a autofagia é um mecanismo de defesa inato, atuando como um sistema celular autônomo para eliminação de patógenos intracelulares através da xenofagia (SHIBUTANI et al., 2015). Um importante indicador de autofagia é a translocação do LC3-I, da sua forma citosólica, para a forma lipídica, LC3-II (LC3B), presente na membrana do autofagossomo (GALLUZZI et al., 2017). Silva e colaboradores (2017) mostraram que a expressão de LC3-II estava aumentada em todas as células de lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide (TT) em comparação as lesões de pacientes virchowianos (LL), indicando que a autofagia estava mais ativa nas formas TT da doença. Nesse mesmo estudo foi observado que os pacientes LL que desenvolveram RT1 apresentaram altos níveis de LC3, o que pode estar relacionado a resposta imune Th1 envolvida na imunopatologia das RT1 e que favorece ativação da via autofágica (SILVA et al., 2017). De acordo com Silva e colaboradores (2021), os pacientes que desenvolvem RT1 apresentam maior expressão de IL-15, que se liga a IL-15R na superfície de células T CD4+ levando a produção de IFN- γ e indução da via autofágica. Evidências sugerem que a autofagia deva estar relacionada com o desenvolvimento de formas menos severas da hanseníase, durante a hanseníase MB ocorre um bloqueio da via autofágica devido a

produção de IL-10 pelos macrófagos M2 que favorecem a persistência de *M. leprae* no hospedeiro (VAN HOOIJ; GELUK, 2021). Em nosso estudo, observamos uma maior tendência de expressão do LC3B nos pacientes com RT2, tanto em linfócitos como em monócitos, mesmo que sem diferença estatística. De todo modo, vale destacar que são dados inéditos, uma vez que não foram descritos na literatura resultados analisando essas células em pacientes com reação tipo 2.

Em paralelo, outro marcador que pode ser utilizado para monitorar a autofagia é a proteína de membrana associada ao lisossomo 1 (LAMP1). Essa proteína medeia várias funções nos lisossomos e pode estar envolvida na fusão com outros componentes celulares, como os fagossomos (ESKELINEN, 2006). Um estudo com camundongos deficientes para as proteínas LAMP1 e LAMP2 mostrou que esses animais apresentavam acúmulo de vacúolos autofágicos em vários tecidos (ESKELINEN, 2006). Levando em consideração as funções do LAMP1, os resultados obtidos nessa pesquisa apontam que os níveis elevados de LAMP1 e do LC3B, presente nos pacientes com RT2, sugerem que o processo autofágico não está comprometido, porém mais análises são necessárias para saber se não há algum bloqueio em outras etapas da via autofágica.

De Mattos Barbosa e colaboradores (2018) em um estudo com pacientes com hanseníase MB que desenvolveram ou não RT1, observaram que os pacientes que entraram em quadros reacionais apresentavam um aumento significativo da expressão de TLR2 e outros genes relacionados a respostas imunes pró-inflamatórias, e aumento de proteínas relacionadas à ativação do inflamassoma como a Caspase-1, em comparação aos pacientes que não desenvolveram RT1. Em nosso estudo, os níveis de Caspase-1 tendem a estar mais aumentados nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes RT2, e nos monócitos dos pacientes com RT2 seguido dos com RT1, indicando que pode estar havendo uma ativação do inflamassoma, o que é esperado visto que os episódios reacionais são caracterizados pela exacerbação do processo inflamatório.

Os receptores Toll-like (TLRs) representam um mecanismo pelo qual o sistema imunológico inato reconhece padrões bioquímicos exibidos por

invasores infecciosos, levando a liberação de citocinas e indução de moléculas co-estimulatórias. A expressão dos TLRs 2 e 4 encontram-se aumentados durante hanseníase LL, porém, o TLR4 é mais expresso em células T citotóxicas (CD3+CD8+) e o TLR2, por outro lado, tem sua proporção aumentada em células T auxiliares (CD3+CD4+) (SADHU et al., 2022). Estes dados corroboram com o nosso estudo, onde pudemos observar uma alta expressão de TLR2 nas células T CD4+ dos pacientes com RT2, enquanto que a expressão de TLR4 foi maior nas células T CD8+ dos pacientes tanto com RT1, quanto com RT2. Já os monócitos demonstram um aumento gradual da expressão de TLR2 e TLR4, com o grupo RT2 tendendo a apresentar maior frequência.

Antunes e colaboradores (2019) mostraram que a expressão gênica do TLR2 encontra-se aumentada em pacientes com RT1 e RT2 e que isso pode estar relacionado com o desenvolvimento dos quadros reacionais, devido ao estímulo de citocinas inflamatórias como a IL-10.

Além disso, o uso de medicamentos corticóides (prednisona, metilprednisona e dexametasona) levaram ao aumento da expressão dos genes que codificam os TLRs 2 e 4 em experimentos *in vivo* utilizando células do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis, enquanto que nas lesões de pacientes com RT1 houve uma diminuição da expressão de TLRs 2 e 4 juntamente com o fim do tratamento com corticoides (WALKER et al., 2012).

4.1.2 Neutrófilos

Para os neutrófilos também não foram observadas diferenças significativas entre os resultados, mais uma vez acreditamos que se deva à diferença entre o “n” amostral de cada grupo, visto que, podemos observar uma tendência de uma maior frequência de LC3B, Caspase-1 e LAMP1 nos pacientes com RT2 do que naqueles com RT1 e os controles (Figura 16A-C). Com relação ao TLR2 aparenta haver um aumento gradativo da expressão, sendo o grupo RT2 com maior frequência, seguido do RT1 e controle (Figura 16D).

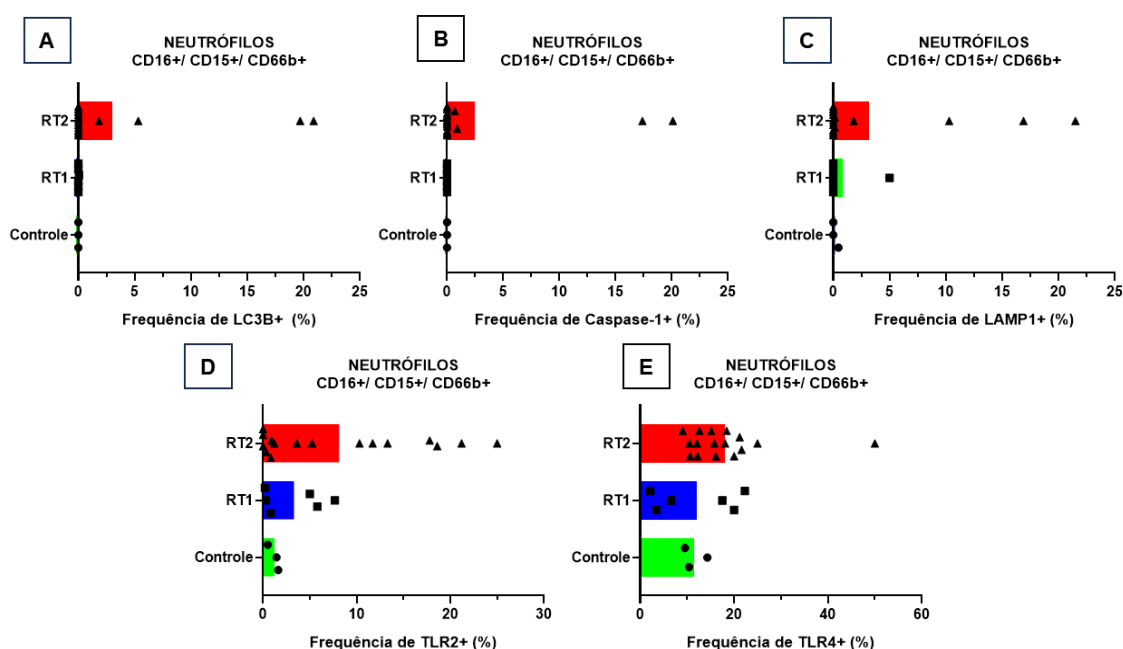


Figura 16: Análise das moléculas LC3B, Caspase-1, LAMP1, TLR2, TLR4 de neutrófilos isolados de sangue periférico de pacientes com reação tipo 1 (RT1), reação tipo 2 (RT2) e controle. Os gráficos representam a média da frequência (%) por grupos e $p < 0,05$.

Os neutrófilos são células efetoras da imunidade inata, participando da resposta rápida à infecção e inflamação, devido a sua alta capacidade fagocítica. As reações de tipo 2 são caracterizadas por serem episódios mediados por imunocomplexos neutrofílicos, o que contribui para a inflamação multissistêmica associada (SAHU et al., 2021). Quando ativados, os neutrófilos possuem a capacidade de eliminar microrganismos extracelulares com mecanismos distintos, como a liberação de armadilhas extracelulares neutrofílicas (NETs) (SCHMITZ et al., 2019). As funções das NETs incluem imobilizar patógenos para evitar que se disseminem e facilitar a subsequente fagocitose dos microrganismos aprisionados (SCHMITZ et al., 2019). Outro mecanismo, a autofagia regula diversas funções nos neutrófilos, incluindo a formação das NETs. Guo e colaboradores (2021) mostraram que a indução de autofagia contribui para a NETose espontânea. Em lesões cutâneas e no sangue de pacientes com RT2 foi identificada a formação excessiva de NETs, o que está relacionado com a liberação em grandes quantidades de bacilos mortos pelo tratamento, que são reconhecidos pelo sistema imune (DA SILVA et al., 2019).

Podendo explicar os resultados obtidos em nosso estudo, onde o aumento do LC3B e do LAMP1 no grupo RT2, mas não no grupo RT1, podem estar

relacionados com a ocorrência do processo autofágico e a formação de NETs para a eliminação do *M. leprae*.

O TLR2 possui papel importante no reconhecimento de micobactérias pois conseguem reconhecer um grande número de componentes da membrana celular de bactérias gram-positivas, enquanto que o TLR4 está mais relacionado ao reconhecimento de estruturas de bactérias gram-negativas (HU; SPAINK, 2022). Porém, o TLR2 pode apresentar um papel duplo nos processos infecciosos, onde por um lado ele auxilia na resposta pró-inflamatória e eliminação do patógeno, e por outro lado a inflamação excessiva gerada por sua ativação pode levar ao dano tecidual (HU; SPAINK, 2022). Carvalho e colaboradores (2018) observaram que a expressão de TLR2 e TLR4 foram maiores nos neutrófilos de pacientes com RT2 do que naqueles com RT1. Dados que corroboram com o do nosso estudo, onde pudemos observar uma maior frequência de TLR2 nos neutrófilos dos pacientes com RT2, o que pode estar relacionado com o reconhecimento do bacilo do *M. leprae*.

4.2 Análise da expressão de Caspase-1

Após isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram confeccionadas lâminas, que foram submetidas à imunofluorescência para avaliação da expressão de Caspase-1.

Nas PBMCs, houve uma maior expressão de Caspase-1 nos quadros reacionais, quando comparados ao grupo controle. A expressão de Caspase-1 foi significativamente maior nas reações de tipo 1, quando comparado com o grupo controle, enquanto que nas reações de tipo 2 houve um aumento significativo ainda maior da expressão de Caspase-1 em comparação ao grupo controle. Já entre RT1 e RT2 não houveram diferenças significativas, porém, aparenta uma maior expressão de Caspase-1 no grupo RT2 (Figura 17).

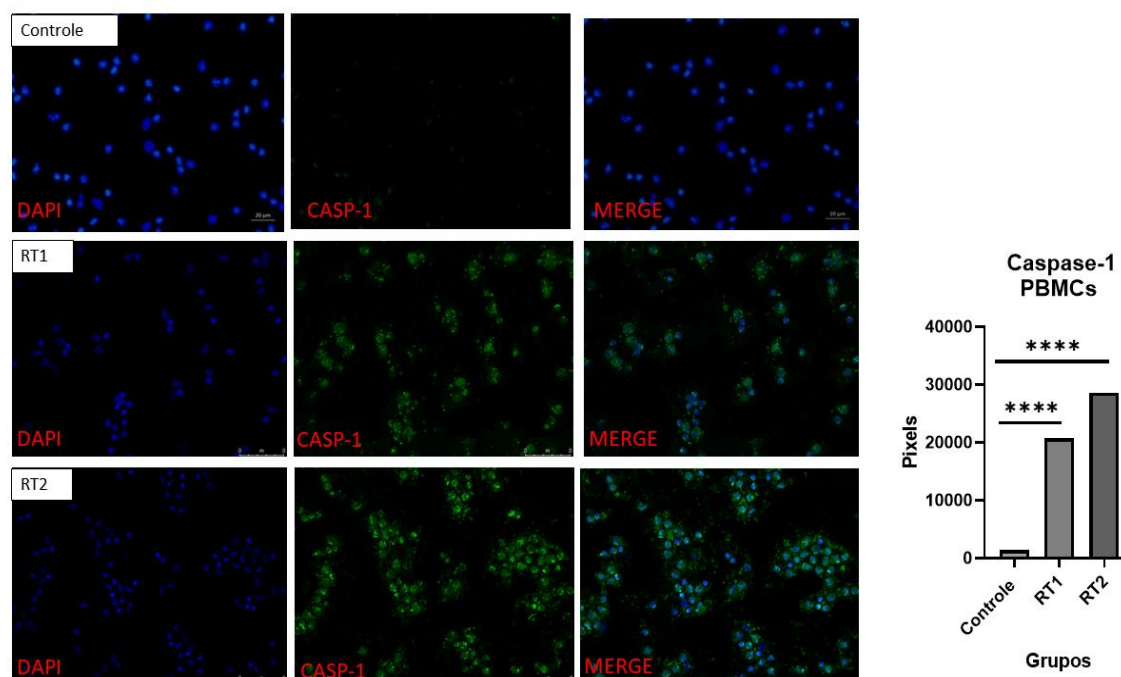


Figura 17: Após isolamento das PBMCs dos pacientes controle, RT1 e RT2, foram confeccionadas lâminas, utilizando uma citocentrífuga, que foram submetidas à marcação com o anticorpo primário Caspase-1. Os resultados são apresentados com a média dos pixels e $*p < 0,05$.

Quando ativada, a Caspase-1 cliva as citocinas pró-inflamatórias IL-1 α e IL-1 β através do inflamassoma. Uma ampla gama de PAMPs bacterianos e DAMPs endógenos podem levar a ativação do inflamassoma NLRP3 (BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020). A autofagia remove organelas danificadas, como as mitocôndrias, levando à redução da liberação de DAMPs derivados de mitocôndrias e à supressão da ativação do inflamassoma (BIASIZZO; KOPITAR-JERALA, 2020)

Em infecções persistentes, como a tuberculose causada por *Mycobacterium tuberculosis*, a ativação do inflamassoma NLRP3 e a consequente resposta inflamatória iniciada por IL-1 β são reguladas para manter a integridade do tecido e a inibição do inflamassoma mediada por óxido nítrico (NO) representa um mecanismo importante para prevenir danos teciduais durante infecções persistentes e crônicas (MISHRA et al., 2013).

Além disso, em um estudo com pacientes com hanseníase MB que desenvolveram ou não RT1, a indução da autofagia em monócitos estimulados com *M. leprae* gamma-irradiado foi capaz de aumentar os níveis de LC3 e reduzir

da expressão do NLRP3, mostrando que a autofagia tem papel importante no controle do processo inflamatório que pode levar ao desenvolvimento de episódios reacionais durante a hanseníase (DE MATTOS BARBOSA et al., 2018). Em nossos resultados, pudemos observar um aumento da expressão de Caspase-1 no grupo RT2, em comparação ao grupo controle, dados que corroboram com os obtidos na citometria de fluxo, indicando a ativação do inflamassoma. O que é esperado devido às características inflamatórias dos quadros reacionais, porém, como foi demonstrado anteriormente, a autofagia também encontra-se ativada nesse grupo de pacientes, ao contrário do que se hipotetizava. Esses dados são inéditos pois não foram relatados na literatura a ocorrência do processo autofágico nas RT2.

4.3 Citocinas Inflamatórias

Após a obtenção do soro a partir do sangue total, foram dosadas as citocinas séricas IL-1®, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF. As médias da concentração de IL-12p70, IL-6, IL-10, IL-1® e TNF não foram significativamente diferentes entre os grupos controle, RT1 e RT2, porém, os resultados indicam uma tendência de maior concentração de algumas dessas citocinas (IL-6, IL-1® e TNF) no grupo RT2 (Figura A-E). Observando a concentração da IL-8, houve um aumento significativo entre os grupos controle (12pg/mL), RT1 (21,5pg/mL) e RT2 (41pg/mL) (Figura 18F). Novamente, acreditamos que esses resultados podem ser melhor confirmados com aumento do “n” amostral dos grupos.

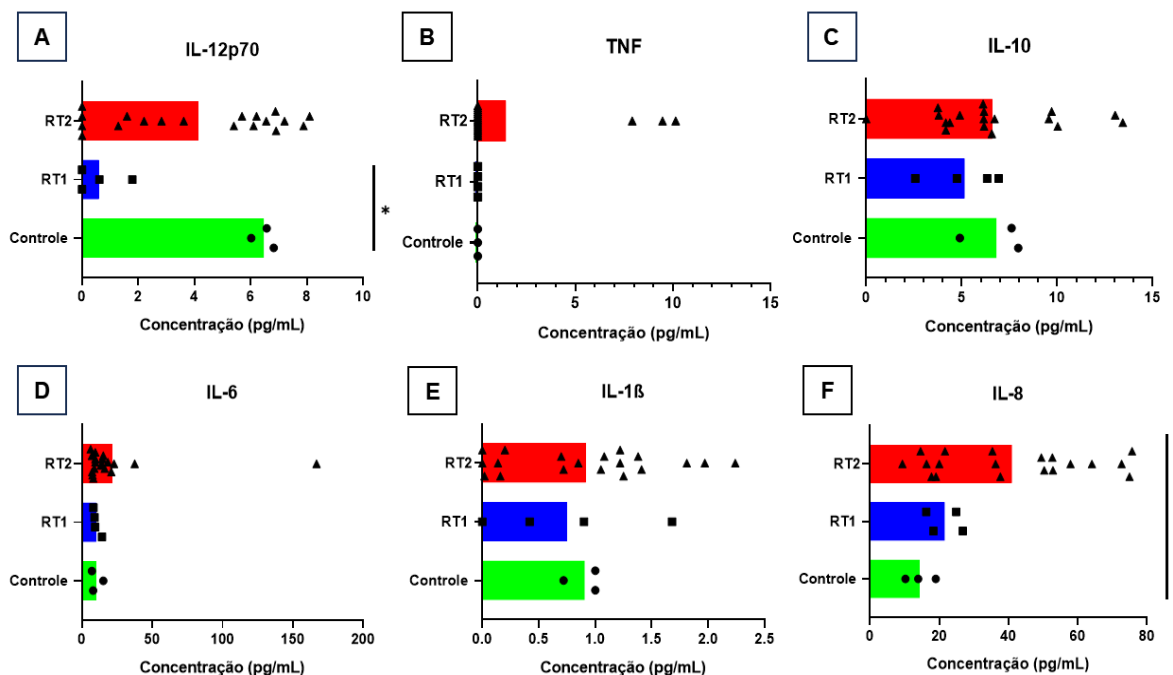


Figura 18: Análise das citocinas inflamatórias IL-1®, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 e TNF no soro de pacientes com reação tipo 2 (RT2), reação tipo 1 (RT1) e controle através de partículas (bead) fluorescentes conjugadas à ficoeritrina (PE). Os gráficos representam a média da concentração (pg/mL) por grupos e $p < 0,05$.

As citocinas desempenham papéis importantes tanto na proteção quanto na imunopatologia da hanseníase e são consideradas componentes importantes das reações hansênicas (STEFANI et al., 2009). Um estudo de caso-controle com pacientes do estado de Goiânia realizou um rastreio das citocinas envolvidas nas reações hansênicas, foi demonstrado que um potencial marcador para as RT1 é a CXCL10, uma das quimiocinas indutoras do IFN-γ, que se encontrava elevada nesse grupo de pacientes e que indica o envolvimento da resposta imune Th1 (pró-inflamatória), também foi identificado um aumento de IL-6 que pode estar relacionado com o processo inflamatório agudo (STEFANI et al., 2009). Madan; Agarwal e Chander (2011) identificaram que entre os pacientes RT1 e RT2, os níveis de IFN-γ, IL-1® e IL-10 foram maiores nos pacientes com RT2, dados consistentes com os obtidos em nosso estudo.

Outro estudo feito com células de pacientes com RT2 mostrou que os níveis de TNF-α em PBMCs estimuladas com *M. leprae* foi maior naqueles que não estavam realizando tratamento com prednisolona, e que, durante o tratamento os níveis dessa citocina tendem a cair (NEGERA et al., 2018). Isso

ocorre porque a prednisolona atua inibindo a ativação dos fatores de transcrição NF-kB, que regula genes que codificam IL-1 β , TNF- α , IL-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (NEGERA et al., 2018). Com relação a expressão gênica, foi observado um aumento de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-8 em amostras de sangue de pacientes com RT2 antes do tratamento e que após o uso de prednisolona, a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 diminuiu, enquanto que a expressão de IL-10 aumentou e a de IL-8 não apresentou alterações (NEGERA et al., 2018).

Embora os estudos disponíveis na literatura mostram uma tendência a diminuição da expressão de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e IL-17 durante as RT2 em tratamento com corticoides, essas informações são conflitantes, pois a diminuição dessas citocinas também pode ocorrer apenas após o tratamento (NEGERA et al., 2018).

Apesar de nossos resultados indicarem uma tendência de aumento das concentrações das citocinas inflamatórias principalmente de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF nos pacientes com RT2, esse aumento foi significativo apenas para a IL-8, porém, como não possuímos um grupo apenas com hanseníase sem reação, a comparação dos resultados foi limitada. Mas é esperado o aumento desse grupo de citocinas devido à resposta imune envolvida nas reações hansênicas, principalmente em relação às RT2 que são mais inflamatórias, por outro lado o fato dessas concentrações obtidas não aparentarem ser tão altas pode ser devido aos esquemas terapêuticos utilizados para cada paciente. Porém, mais análises são necessárias para confirmação dos resultados.

Porém, houve algumas limitações nesse estudo, como a diferença do “n” amostral entre os grupos controle, RT1 e RT2 e a falta de um grupo de pacientes só com hanseníase, sem reação. Futuramente planejamos aumentar o número de participantes para assim melhorar a qualidade dos dados, e também incluir novas análises como PCR em tempo real (rt-PCR) para os genes relacionados à via autofágica e análises de proteômica/metabolômica, estas últimas já em andamento.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que durante as Reações de Tipo 2 (RT2) o processo autofágico está ocorrendo em linfócitos, monócitos e neutrófilos, e não bloqueado como se hipotetizava, porém mais análises são necessárias a fim de esclarecer se pode haver algum tipo de interferência em outras etapas da via autofágica. Também observamos uma tendência de maiores concentrações de citocinas inflamatórias nesse grupo de pacientes, apesar dos níveis em alguns momentos parecerem controlados, provavelmente pelas medicações.

Esse estudo apresenta um grande avanço no entendimento da imunopatologia das reações de tipo 2, visto que não foram encontrados trabalhos na literatura explorando o papel da xenofagia em células imunes de pacientes com RT2. Devido a essa lacuna na literatura sobre a temática, realizamos um artigo de revisão sistemática que aborda e traz novas observações sobre o proposto e discutido nessa dissertação (APÊNDICE E).

REFERÊNCIAS

- ALEMU BELACHEW, W.; NAAFS, B. Position statement: <scp>LEPROSY</scp>: Diagnosis, treatment and follow-up. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. 7, p. 1205–1213, 3 jul. 2019.
- ANTUNES, D. E. et al. Differential Expression of IFN- γ , IL-10, TLR1, and TLR2 and Their Potential Effects on Downgrading Leprosy Reaction and Erythema Nodosum Leprosum. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–14, 7 nov. 2019.
- ARIAS, E.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 184–189, abr. 2011.
- ARSTILA, A. U.; TRUMP, B. F. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. **The American journal of pathology**, v. 53, n. 5, p. 687–733, nov. 1968.
- AUBRY, A. et al. Drug resistance in leprosy: An update following 70 years of chemotherapy. **Infectious Diseases Now**, v. 52, n. 5, p. 243–251, ago. 2022.
- BARBOSA, M. G. DE M. et al. Autophagy impairment is associated with increased inflammasome activation and reversal reaction development in multibacillary leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUN, 2018.
- BHAT, R.; VAIDYA, T. What is new in the pathogenesis and management of erythema nodosum leprosum. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 11, n. 4, p. 482, 2020.
- BIASIZZO, M.; KOPITAR-JERALA, N. Interplay Between NLRP3 Inflammasome and Autophagy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 9 out. 2020.
- BOCHUD, P. et al. Toll-Like Receptor 2 (TLR2) Polymorphisms Are Associated with Reversal Reaction in Leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 2, p. 253–261, 15 jan. 2008.
- CARVALHO, J. C. DE et al. Phenotypic and functional features of innate and adaptive immunity as putative biomarkers for clinical status and leprosy reactions. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 230–239, dez. 2018.
- CHEN, K.-H. et al. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2022, p. 1–13, 4 jul. 2022.
- CLARK, S. L. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 3, n. 3, p. 349–62, 25 maio 1957.
- DA SILVA, C. O. et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of leprosy type 2 reactions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007368, 10 set. 2019.
- DE DUVE, C. et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. **Biochemical Journal**, v. 60, n. 4, p. 604–617, 1 ago. 1955.
- DE MATTOS BARBOSA, M. G. et al. Autophagy Impairment Is Associated With Increased Inflammasome Activation and Reversal Reaction Development in Multibacillary Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 4 jun. 2018.
- DERETIC, V.; LEVINE, B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 243–251, 1 fev. 2018.

DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 10, p. 722–737, 25 out. 2013.

DHARMAWAN, Y. et al. Individual and community factors determining delayed leprosy case detection: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009651, 12 ago. 2021.

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 104, n. 7, p. 554–563, set. 2013.

ESKELINEN, E.-L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 5–6, p. 495–502, out. 2006.

FROES, L. A. R.; SOTTO, M. N.; TRINDADE, M. A. B. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, n. 3, p. 338–347, maio 2022.

FROES, L. A. R.; TRINDADE, M. A. B.; SOTTO, M. N. Immunology of leprosy. **International Reviews of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 72–83, 4 mar. 2022.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 13, p. 1811–1836, 3 jul. 2017.

GELUK, A. Correlates of immune exacerbations in leprosy. **Seminars in Immunology**, v. 39, p. 111–118, out. 2018.

GOMES, L. T. et al. Diagnostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with leprosy reactions. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03369, fev. 2020.

GUO, Y. et al. Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps is associated with autophagy. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 24005, 14 dez. 2021.

HOOIJ, A.; GELUK, A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Immunological Reviews**, v. 301, n. 1, p. 175–192, 11 maio 2021.

HU, W.; SPAINK, H. P. The Role of TLR2 in Infectious Diseases Caused by *Mycobacteria*: From Cell Biology to Therapeutic Target. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 246, 5 fev. 2022.

ITOH, H. et al. Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 98, n. 1, p. 107–117, 1 jul. 2015.

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

KRZYSZCZYK, P. et al. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 1 maio 2018.

LEITE, T. R. C. et al. Ações de controle da hanseníase na atenção primária à saúde: uma revisão integrativa. **VITTALLE - Revista de Ciências da Saúde**, v. 32, n. 3, p. 175–186, 22 dez. 2020.

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

LOCKWOOD, D. N.; SAUNDERSON, P. R. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. **International Health**, v. 4, n. 2, p. 77–85, jun. 2012.

- LUO, Y. et al. Host-Related Laboratory Parameters for Leprosy Reactions. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 22 out. 2021.
- MA, Y. et al. A negative feedback loop between autophagy and immune responses in mycobacterium leprae infection. **DNA and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 1–9, 2017.
- MADAN, N. K.; AGARWAL, K.; CHANDER, R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 371–82, dez. 2011.
- MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2655, 10 abr. 2014.
- MATSUZAWA-ISHIMOTO, Y.; HWANG, S.; CADWELL, K. Autophagy and Inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 73–101, 26 abr. 2018.
- MAYMONE, M. B. C. et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 83, n. 1, p. 1–14, jul. 2020.
- MI, Z.; LIU, H.; ZHANG, F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 16 abr. 2020.
- MIHALACHE, C. C.; SIMON, H.-U. Autophagy regulation in macrophages and neutrophils. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 11, p. 1187–1192, jul. 2012.
- MISHRA, B. B. et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . **Nature Immunology**, v. 14, n. 1, p. 52–60, 18 jan. 2013.
- MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B. Autophagy in Human Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 16, p. 1564–1576, 2020a.
- MIZUSHIMA, N.; LEVINE, B. Autophagy in Human Diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 16, p. 1564–1576, 15 out. 2020b.
- MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 828–832, jun. 1994.
- MUNGROO, M. R.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Mycobacterium leprae: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104475, dez. 2020.
- NAAZ, F. et al. Challenges beyond elimination in leprosy. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 6, n. 3, p. 222, 2017.
- NAKAHIRA, K. et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature Immunology**, v. 12, n. 3, p. 222–230, 12 mar. 2011.
- NEGERA, E. et al. The Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Erythema Nodosum Leprosum Reactions. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 9 fev. 2018.
- NERY, J. A. DA C. et al. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 787–792, out. 2013.
- NOVIKOFF, A. B.; BEAUFAY, H.; DE DUVE, C. Electron microscopy of lysosomeric fractions from rat liver. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 2, n. 4 Suppl, p. 179–84, 25 jul. 1956.
- OHSUMI, Y. Historical landmarks of autophagy research. **Cell Research**, v. 24, n. 1, p. 9–23, 24 jan. 2014.

PANT, A. et al. Interactions of Autophagy and the Immune System in Health and Diseases. **Autophagy Reports**, v. 1, n. 1, p. 438–515, 31 dez. 2022.

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

PINHEIRO, R. O. et al. Mycobacterium leprae –host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiology**, v. 6, n. 2, p. 217–230, fev. 2011.

POLYCARPOU, A.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 13 mar. 2017.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association**, v. 34, n. 3, p. 255–73, 1966.

RUBIO-TOMÁS, T.; SOTIRIOU, A.; TAVERNARAKIS, N. The interplay between selective types of (macro)autophagy: Mitophagy and xenophagy. In: [s.l: s.n.]. p. 129–157.

SADHU, S. et al. Activated TLR2/4-positive T cells boost cell exhaustion during lepromatous leprosy infection via PD-1 upregulation. **Heliyon**, v. 8, n. 11, p. e11633, nov. 2022.

SAHU, S. et al. Neutrophil NETworking in ENL: Potential as a Putative Biomarker: Future Insights. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 14 jul. 2021.

SCHMITZ, V. et al. Neutrophils in Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 19 mar. 2019.

SEBASTIÁN, D.; ZORZANO, A. Self-Eating for Muscle Fitness: Autophagy in the Control of Energy Metabolism. **Developmental Cell**, v. 54, n. 2, p. 268–281, jul. 2020.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Hanseníase**. [s.l: s.n.].

SHAW, S. Y. et al. Selective Modulation of Autophagy, Innate Immunity, and Adaptive Immunity by Small Molecules. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 12, p. 2724–2733, 20 dez. 2013.

SHIBUTANI, S. T. et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 10, p. 1014–1024, 18 out. 2015.

SHRESTHA, S.; LEE, J. M.; HONG, C.-W. Autophagy in neutrophils. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 1, 2020.

SILVA, B. J. DE A. et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. 1–29, 2017.

SILVA, B. J. DE A. et al. Autophagy-Associated IL-15 Production Is Involved in the Pathogenesis of Leprosy Type 1 Reaction. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2215, 27 ago. 2021.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 75, 27 dez. 2009.

SUGAWARA-MIKAMI, M. et al. Pathogenicity and virulence of Mycobacterium leprae. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 1985–2011, 31 dez. 2022.

TAKESHIGE, K. et al. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **The Journal of cell biology**, v. 119, n. 2, p. 301–311, 15 out. 1992.

TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. **FEBS Letters**, v. 333, n. 1–2, p. 169–174, 25 out. 1993.

ULLAH, I.; RITCHIE, N. D.; EVANS, T. J. The interrelationship between phagocytosis, autophagy and formation of neutrophil extracellular traps following infection of human neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. **Innate Immunity**, v. 23, n. 5, p. 413–423, 11 jul. 2017.

VAN DER VAART, M. et al. The DNA Damage-Regulated Autophagy Modulator DRAM1 Links Mycobacterial Recognition via TLR-MYD88 to Autophagic Defense. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 6, p. 753–767, jun. 2014.

VAN HOOIJ, A.; GELUK, A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Immunological Reviews**, v. 301, n. 1, p. 175–192, 11 maio 2021.

VELÔSO, D. S. et al. Perfil Clínico Epidemiológico da Hanseníase: Uma Revisão Integrativa. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 10, n. 1, p. 1429–1437, 2018.

WALKER, S. L. et al. The effect of systemic corticosteroid therapy on the expression of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in the cutaneous lesions of leprosy Type 1 reactions. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 1, p. 29–35, jul. 2012.

WANG, Z.; LI, C. Xenophagy in innate immunity: A battle between host and pathogen. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 109, p. 103693, ago. 2020.

WEN, J.-H. et al. Macrophage autophagy in macrophage polarization, chronic inflammation and organ fibrosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 6 out. 2022.

WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st Century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 80–94, jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy**. [s.l.: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission**. Disponível em: <<https://www.who.int/%0Apublications/i/item/who-wer9736-429-450>>.

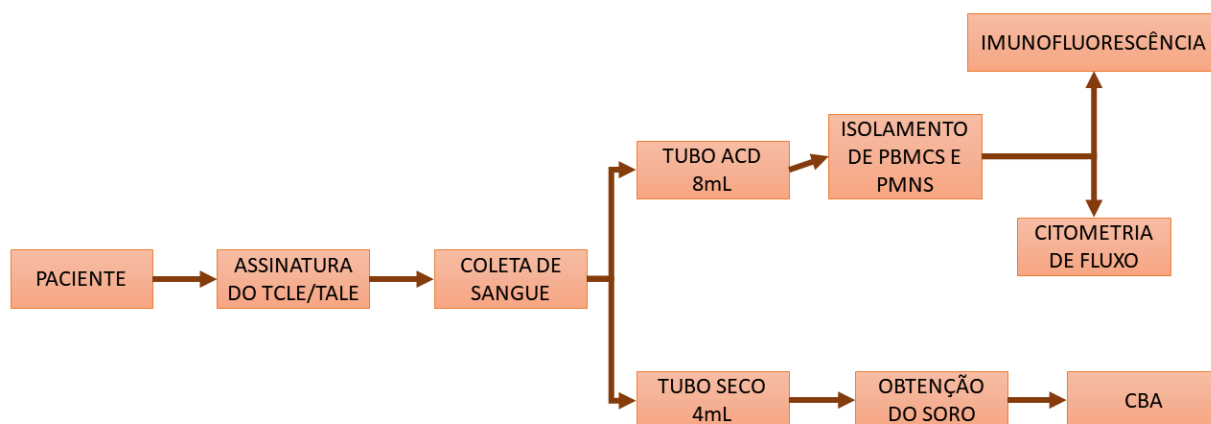
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record**. [s.l.: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Number of new leprosy cases**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/number-of-new-leprosy-cases>>.

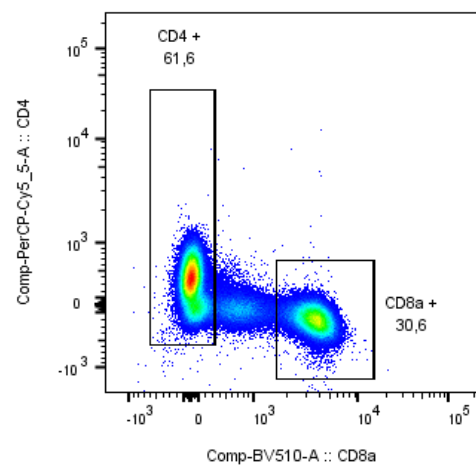
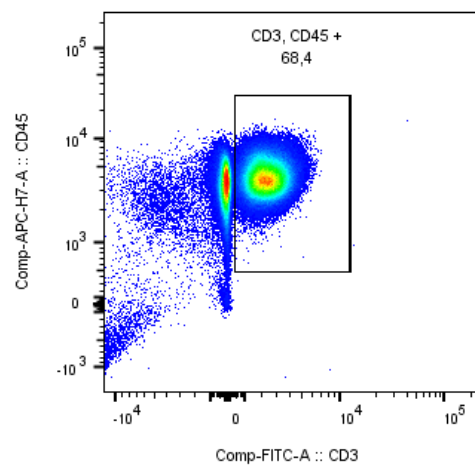
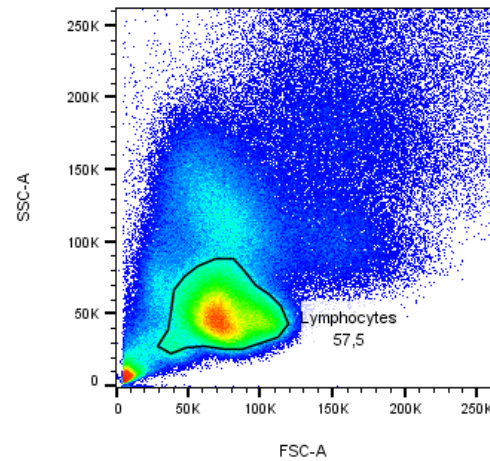
WU, Y.-W.; LI, F. Bacterial interaction with host autophagy. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 352–362, 1 jan. 2019.

XU, Y. et al. Toll-like Receptor 4 Is a Sensor for Autophagy Associated with Innate Immunity. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 135–144, jul. 2007.

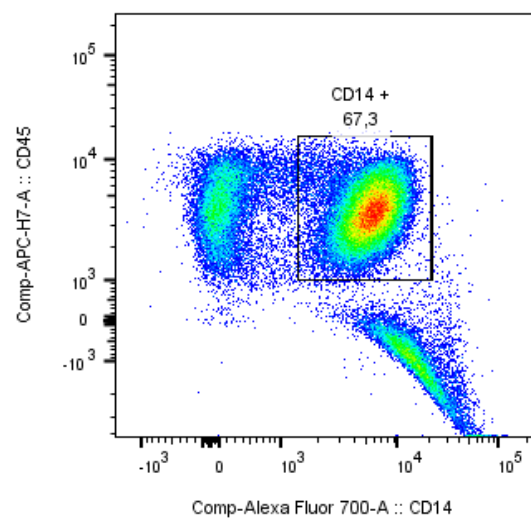
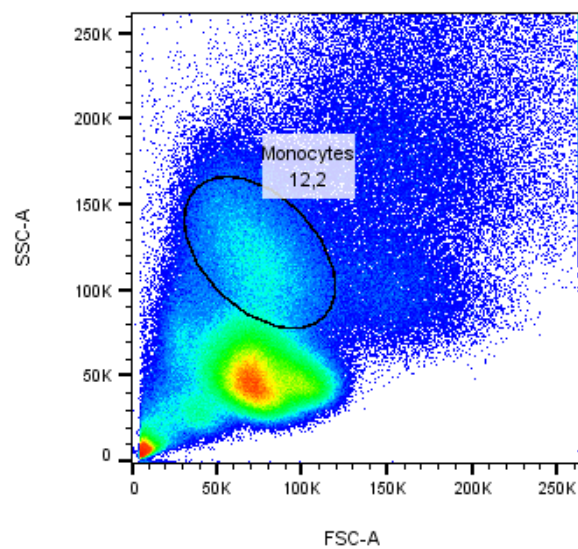
ZHENG, L.; WEI, F.; LI, G. The crosstalk between bacteria and host autophagy: host defense or bacteria offense. **Journal of Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 451–460, 2022.

APÊNDICE A- Fluxograma da metodologia da pesquisa

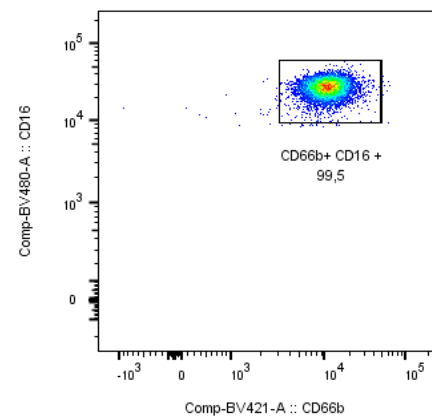
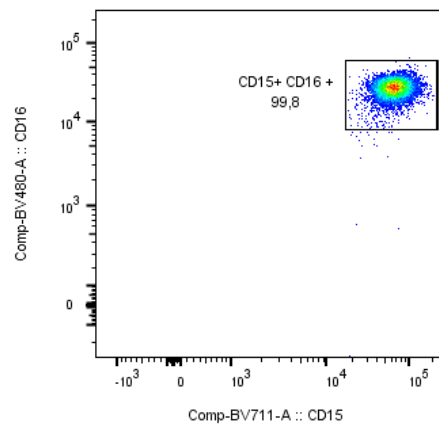
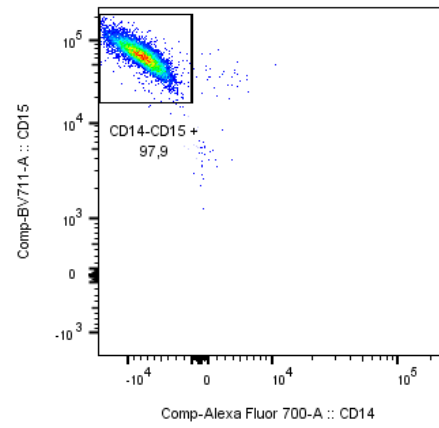
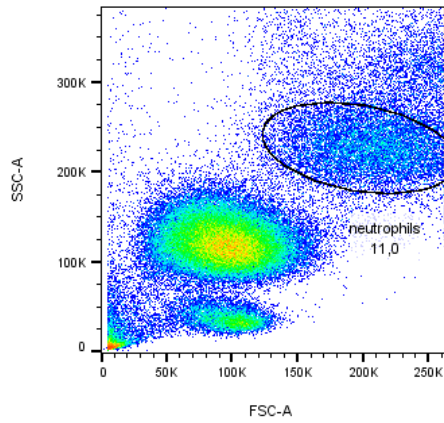
APÊNDICE B- Gates utilizados para seleção de linfócitos na citometria de fluxo



APÊNDICE C- Gates utilizados para seleção de monócitos na citometria de fluxo



APÊNDICE D- Gates utilizados para seleção de neutrófilos na citometria de fluxo



APÊNDICE E- Artigo publicado na revista *Pathogens* (Qualis A3).



Systematic Review

Xenophagy as a Strategy for *Mycobacterium leprae* Elimination during Type 1 or Type 2 Leprosy Reactions: A Systematic Review

Débora Dantas Nucci Cerqueira^{1,2}, Ana Letícia Silva Pereira¹, Ana Elisa Coelho da Costa¹, Tarcísio Joaquim de Souza³, Matheus Santos de Sousa Fernandes^{1,2}, Fabrício Oliveira Souto^{1,2,3} and Patrícia d'Emery Alves Santos^{1,2,3,*}

- ¹ Department of Immunology, Keizo Asami Institute-iLIKA, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil; debora.nucci@ufpe.br (D.D.N.C.); leticia.spereira@ufpe.br (A.L.S.P.); ana.elisa@ufpe.br (A.E.C.d.C.); matheus.sfernandes@ufpe.br (M.S.d.S.F.); fabricio.souto@ufpe.br (F.O.S.)
 - ² Postgraduate Program in Biology Applied to Health-PPGBAS, Federal University of Pernambuco-UFPE, Recife 50670-901, Pernambuco, Brazil
 - ³ Life Sciences Center-NCV, Agreste Academic Center-CAA, Federal University of Pernambuco-UFPE, Caruaru 55014-900, Pernambuco, Brazil; tarcisio.joaquim@ufpe.br
- * Correspondence: patricia.asantos@ufpe.br



Citation: Cerqueira, D.D.N.; Pereira, A.L.S.; da Costa, A.E.C.; de Souza, T.J.; de Sousa Fernandes, M.S.; Souto, F.O.; Santos, P.d.A. Xenophagy as a Strategy for *Mycobacterium leprae* Elimination during Type 1 or Type 2 Leprosy Reactions: A Systematic Review. *Pathogens* **2023**, *12*, 1455. <https://doi.org/10.3390/pathogens12121455>

Academic Editors: Roberta Olmo Pinheiro and Marcia Berrêdo-Pinho

Received: 28 October 2023
Revised: 13 December 2023
Accepted: 13 December 2023
Published: 15 December 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: *Mycobacterium leprae* is an intracellular bacillus that causes leprosy, a neglected disease that affects macrophages and Schwann cells. Leprosy reactions are acute inflammatory responses to mycobacterial antigens, classified as type1 (T1R), a predominant cellular immune response, or type2 (T2R), a humoral phenomenon, leading to a high number of bacilli in infected cells and nerve structures. Xenophagy is a type of selective autophagy that targets intracellular bacteria for lysosomal degradation; however, its immune mechanisms during leprosy reactions are still unclear. This review summarizes the relationship between the autophagic process and *M. leprae* elimination during leprosy reactions. Methods: Three databases, PubMed/Medline (n = 91), Scopus (n = 73), and ScienceDirect (n = 124), were searched. After applying the eligibility criteria, articles were selected for independent peer reviewers in August 2023. Results: From a total of 288 studies retrieved, eight were included. In multibacillary (MB) patients who progressed to T1R, xenophagy blockade and increased inflammasome activation were observed, with IL-1 β secretion before the reactional episode occurrence. On the other hand, recent data actually observed increased IL-15 levels before the reaction began, as well as IFN- γ production and xenophagy induction. Conclusion: Our search results showed a dichotomy in the T1R development and their relationship with xenophagy. No T2R studies were found.

Keywords: *Mycobacterium leprae*; leprosy reactions; autophagy; xenophagy

1. Introduction

Mycobacterium leprae is an intracellular acid-fast bacillus that causes leprosy, a disease that affects the peripheral nerves, skin, eyes, and respiratory tract [1]. Despite medical advancements, leprosy is still an important public health problem in Brazil and worldwide due to its severe consequences [2]. Factors that contribute to this include the stigma related to the disease, a lack of understanding and knowledge, failure in early detection, a sub-notification of cases, and bacterial resistance to dapsone and rifampicin [3].

The Ridley–Jopling classification (1966) is one of the most widely used systems to classify leprosy, which divides patients into five groups, according to their clinical and immunological status [4]. Tuberculoid leprosy (TT) is characterized by a robust cellular immune response against *M. leprae* antigenic determinants, the presence of a single lesion, well-developed granulomas, and negative or rare bacilli [5]. In contrast, lepromatous leprosy (LL) is characterized by a strong humoral response that does not prevent bacterial proliferation and tends to clinically manifest with skin lesions and high bacterial load [6].

Most patients present borderline phenotypes, which are immunologically unstable: borderline tuberculoid (BT), borderline borderline (BB), and borderline lepromatous (BL). Indeterminate (II) cases are considered to represent the initial stage of the disease. These cases eventually move toward one of the poles but progression can be halted with treatment [7]. However, in 1998, the World Health Organization's Leprosy Expert Committee established a practical and easy classification for treatment: paucibacillary (PB) cases are those in which the cutaneous lesions number does not exceed five, including TT forms, while multibacillary (MB) cases present six or more skin lesions, including LL forms [7].

During the course of the disease, patients may experience exacerbated inflammatory responses known as leprosy reactions, which can be classified into two distinct types [8]. Type 1 reactions (also called reversal reaction/RR) are characterized by an exacerbation of the cellular immune response against *M. leprae* antigenic determinants, with CD4+ T lymphocytes and CD163+ macrophage infiltration, and tend to occur more frequently in patients presenting the PB clinical forms, but RR can also affect BB and BL patients. On the other hand, type 2 reactions (erythema nodosum leprosum/ENL) are an exacerbation of the humoral immune response with tissue deposition of immune complexes and neutrophil infiltration, which are more commonly observed in patients presenting the BL and LL forms [9,10]. These reactions are the primary cause of irreversible nerve damage and anatomical deformities related to leprosy and may arise spontaneously in up to 50% of patients before, during, and after treatment [8].

Autophagy (Greek: *autos* = self + *phaguein* = eating) is the process through which cellular components are degraded or recycled within the lysosome [11]. Xenophagy (Greek: *xenos* = strange + *phaguein* = eating) is a specific type of selective autophagy related to the identification and removal of intracellular bacteria [12], aiding in the activation of the host's innate and adaptive immune system as a way to limit exacerbated inflammation and control infection [13].

When bacteria infect host cells, they can be recognized among others by Pattern Recognition Receptors (PRRs) and subsequently labeled by ubiquitin in the cytosol [14]. The ubiquitinated pathogen is then recognized by a group of adaptors featuring a ubiquitin-binding domain and a LC3-interacting region motif, such as p62/SQSTM1 (sequestosome 1), optineurin (OPTN), and NDP52 (nuclear domain 10 protein 52), which bind the ubiquitinated cargo to LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) on autophagosomes [14,15]. Then, the maturation of the autophagosome occurs through the autophagy-related protein complex (ATG): ATG12-ATG5-ATG16L1 and other components [16]. LC3 is the main indicator of autophagic activity [17]. During the autophagy process, the cytosolic form of LC3 (LC3-I) conjugates with phosphatidylethanolamine (PE) through the ATG3 to form the LC3- phosphatidylethanolamine conjugate (LC3-II), which is located in pre-autophagosomes and autophagosomes, making this protein an autophagosome marker [17]. Furthermore, the adaptors can also target bacteria-residing vacuoles or damaged vacuolar membranes in a ubiquitin-independent manner. In this scenario, the adaptors can respond to a wide variety of protein-, lipid- or sugar-base signals, which encompass galectin, complementing protein C3 and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) proteins [14].

Xenophagy has been shown to play an immunological role in *M. leprae* control [18]. Specifically, patients with the TT form of leprosy have been found to exhibit higher levels of xenophagy compared to LL-form patients [19]. Inhibition of macrophage xenophagy and a strong anti-inflammatory immune response could contribute to the bacillus persistence in LL patients [5]. On the other hand, MB patients who developed type 1 reactions showed a restoration of autophagic flux, leading to a limited form of this episode [19]. However, studies on the role of xenophagy in *M. leprae* elimination remain limited. In this systematic review, we will explore the relationship between the autophagic process and *M. leprae* elimination during type 1 and type 2 leprosy reactions.

2. Methods

The present systematic review followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) guidelines.

2.1. Study Selection and Eligibility Criteria

Eligibility criteria were previously used to minimize the risk of bias. The inclusion and exclusion criteria followed the PICOS (Population/Intervention/Control/ Outcomes/Study) (Table 1). There were no restrictions on language or publication date. Articles that did not meet the following eligibility criteria were excluded: (a) studies that use only mice and rats from different species; (b) studies that do not have a control group or comparator; (c) studies in animal models and/or other organisms; as well as reviews, letters for editors, duplicates, and the presence of data used in different studies.

Table 1. Eligibility criteria based on the PICOS strategy.

	Inclusion Criteria	Exclusion Criteria
Population	Humans	Animals and other organisms
Intervention/Exposure	Leprosy	No leprosy
Control	No leprosy patients	-
Outcomes	Autophagy parameters	No autophagy parameters
Study Design	Clinical studies	Reviews; case reports; letters to editors; comments; etc.

2.2. Information Sources and Literature Search Strategies

The search strategy was carried out during the period from March to April 2023. The databases used were PubMed (Medline), Scopus, and Embase. The search strategies used were: PubMed (Medline): (((*Mycobacterium leprae*) OR (Leprosy)) OR (Hansen's Disease)) OR (Hansen Disease)) AND (((Autophagy) OR (Autophagy, Cellular)) OR (Cellular Autophagy)) OR (Xenophagy)). In the Scopus and Science Direct databases, the following search equation was used: (((*"Mycobacterium leprae"*) OR (*"Leprosy"*) OR (*"Hansen's Disease"*) OR (*"Hansen Disease"*)) AND (((*"Autophagy"*) OR (*"Autophagy, Cellular"*) OR (*"Cellular Autophagy"*) OR (*"Xenophagy"*)).

2.3. Selection and Data Collection

The screening of studies was performed through reading the titles, abstracts, and full texts. The selection of studies was performed by two independent researchers (D.D.N.C. and M.S.d.S.F.). Discrepancies were resolved by a third rater (P.d.A.S.) (Figure 1).

2.4. Data Items

Within the included articles, information related to authors, year of publication, study design, group, number of participants (n), sex, average age, average bacillary index (BI), and logarithmic bacillary index of skin lesion (LBI) was extracted. Furthermore, information about patients with leprosy and their treatment status was also extracted. Finally, information was obtained about the cell types used and the outcomes linked to autophagy/xenophagy in in vitro studies and in humans with leprosy.

2.5. Risk of Bias Assessment

The recommendations of the Cochrane risk of bias assessment tool were used [20]. Each study was categorized according to the percentage of positive responses to the questions corresponding to the assessment instrument (Figures 2 and 3). Risk of bias was analyzed using RevMan 5.3.0 software developed for Systematic Reviews, available for free download (<https://training.cochrane.org/online-learning/core-softwareCochrane%20reviews/revman/revman-5-to%20go%20down>, accessed on 24 July 2023). This program was used to detect intervening factors based on the 7 judgment criteria provided by the program, which are: (1) random sequence generation, (2) allocation concealment,

(3) subject and staff blinding, (4) blinding evaluation procedures, (5) incomplete results data, (6) selective reporting, and (7) other biases.

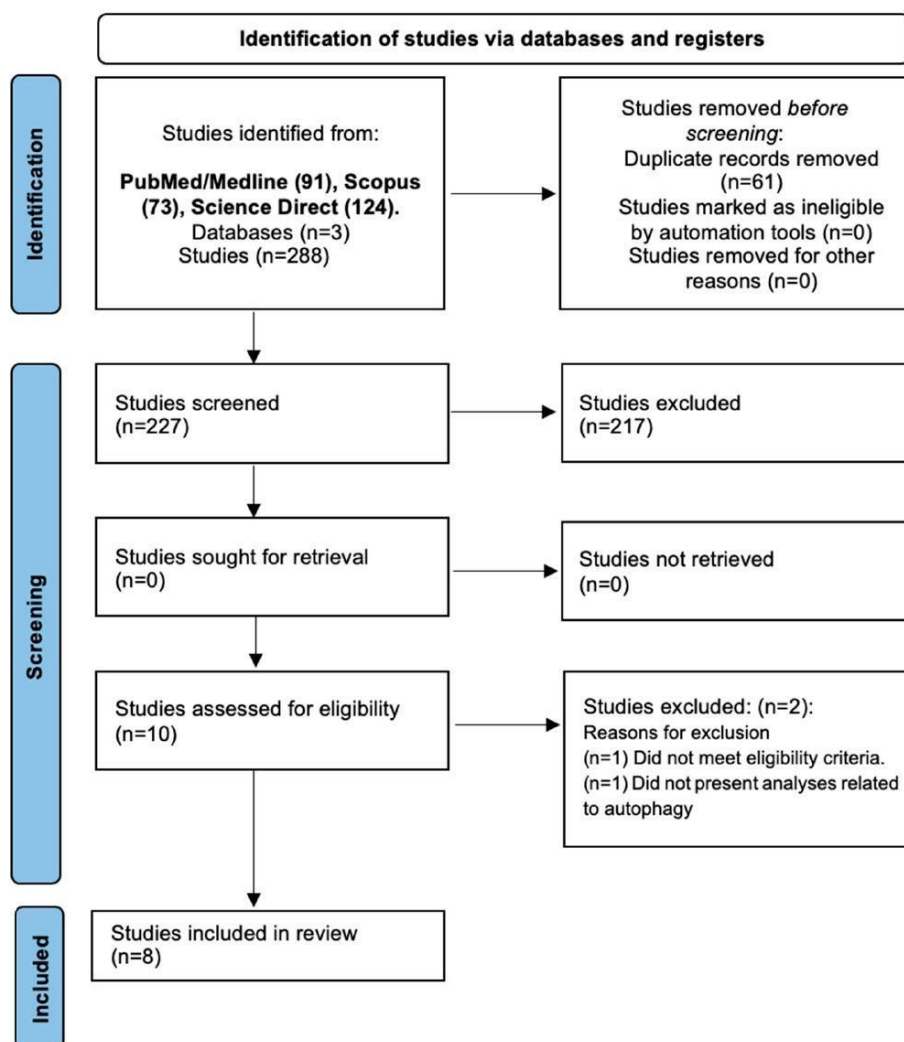


Figure 1. PRISMA 2020 flow diagram for new systematic reviews, which included searches of databases and registers only. We considered, if feasible, reporting the number of records identified from each database or register searched (rather than the total number across all databases/register).

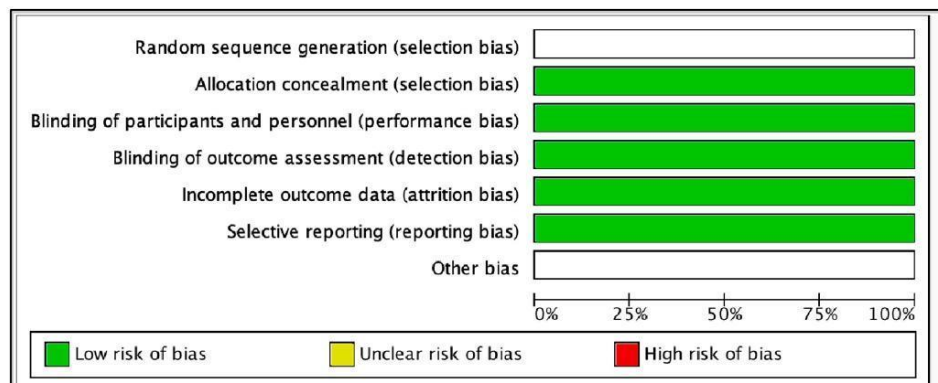


Figure 2. Risk of bias graph: a review of authors' judgments about each risk of bias item presented as percentages across all included studies.

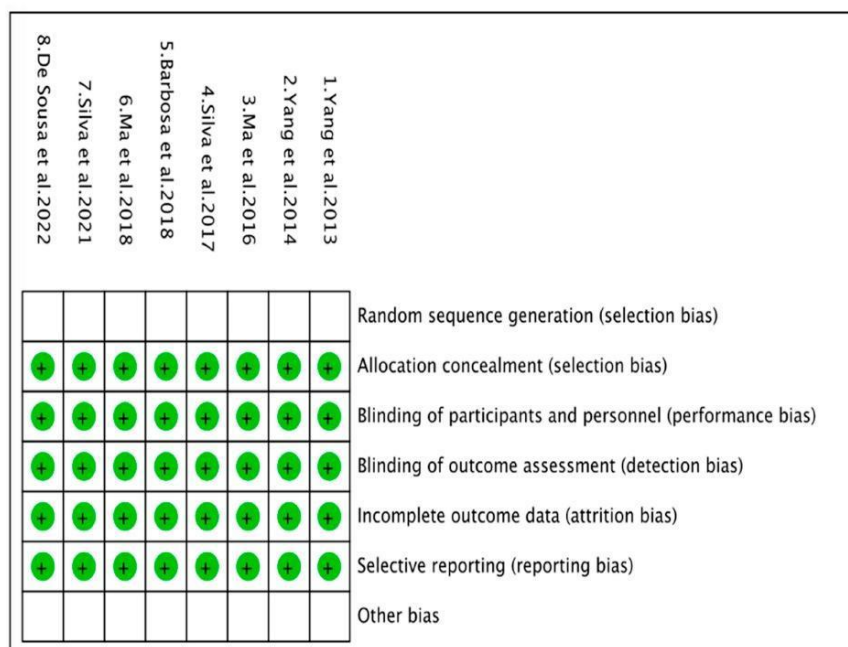


Figure 3. Risk of bias summary: a review of authors' judgments about each risk of bias item for each included study [5,19–25].

3. Results

3.1. Search Results

A total of 288 studies were identified between searches in the databases PubMed/Medline (n = 91), Scopus (n = 73), and ScienceDirect (n = 124). After the removal of duplicates (n = 61), 227 articles were screened for the inclusion process. Then, 217 publications were excluded after observing the title/abstract, and the remaining 10 studies were selected for reading the full text. Finally, eight studies were included in the present systematic review. The process of search, selection, and inclusion of studies was summarized in the flow diagram of the PRISMA statement (Figure 1).

3.2. Study Characteristics

3.2.1. Characteristics of the Studies Included in Humans

As detailed in Table 2, we observed that the included studies were published between 2014 and 2022. Six studies were carried out in humans, of which, four studies were carried out in Brazil [5,21–23] and two in China [24,25]. Four studies utilized cross-sectional methods [5,22,24,25], one study had both cross-sectional and cohort designs [22], and one study used cohort design only [21]. The total number of participants ranged from 22 to 844 subjects, divided according to the different clinical forms of leprosy. In the studies included, there was a heterogeneity of clinical forms of leprosy, including without reaction (WR), type 1 reaction (T1R), indeterminate leprosy (II), tuberculoid leprosy (TT), borderline tuberculoid (BT), borderline lepromatous (BL), lepromatous leprosy (LL), paucibacillary leprosy (PB), and multibacillary leprosy (MB) [5,20–24]. The LL form was the most prevalent, being found in five included studies [5,20–22,24]. Five studies used both sexes [5,21,23–25]; however, in one included study, sex was not reported [22]. The average age of leprosy patients ranged from 42.9 to 56.8 years old. Three included studies evaluated the bacillary index (BI) and logarithmic bacillary index of skin lesion (LBI). Average BI values ranged from 0 to 4.33. Furthermore, mean LBI values were 0–5.23 among leprosy patients [5,21,23]. Finally, among the six studies, only two presented the treatment status of leprosy patients. One study presented patients only in pretreatment and one study presented patients in pretreatment and on treatment [5,21].

3.2.2. In Vitro Studies

Table 3 shows seven included studies that were performed in vitro [5,19,21,23–26]. The presented studies were published between 2014 and 2021. Different cell lines were used in the included studies. All seven included studies used isolated PBMC cells [5,19,21,23–26], two studies used the THP-1 monocytes cells [5,23], one study used isolated CD4⁺ T lymphocyte cells [25], and five studies used isolated *M. leprae* strains [19,21,24–26]. We observed a diversity in cell donors in the included studies, although the cell lines were collected from healthy donors in all seven studies [5,19,21,23–26]. Two studies also included human cells obtained from the American Type Culture Collection [5,23]. And, finally, in three studies, the cells were also donated by patients with different clinical forms of leprosy [5,21,23].

3.3. Xenophagy Parameters in Leprosy Patients

3.3.1. Skin Lesion from Leprosy Patients

Table 4 shows a summary of data related to autophagy/xenophagy and leprosy reactions. In studies [5,21–23], which analyzed skin lesion samples, tuberculoid patients (TT or T-lep) present an increased expression of autophagy-related proteins Beclin-1, GPM3, ATG14, APOL1, and TPR, in addition to high LC3-II levels. While in lepromatous patients (LL or L-lep), there is a greater expression of FasL, Caspase-1, 3, and 8, RIP1, and RIP3, MLKL, and BAX, but low levels of LC3-II and high BCL2 expression. In patients who develop a type 1 reaction, the study [21] shows a decrease in LC3 mRNA and several autophagic genes, associated with an increase in TLR2, MLST8, NR1P3, CASP1 and IL1B mRNA, and serum IL-1 β . Studies [5,23] indicate an increase in IFN- γ and restored xenophagy and an increase in IL-15 and 13 common autophagic genes, respectively.

Table 2. Basic characteristics of participants included in the human studies.

Author, Year [Ref.]	Country	Study Design	Group	n	Clinical Form of Leprosy	Sex (Male/Female)	Age, Mean (Range)	BI, Mean (Range)	LB, Mean (Range)	Leprosy Treatment Status
Barbosa et al., 2018 [21]	Brazil	Cohort	WR	10	2 BL/8 LL	5/5	42.9 (25–65)	4.19 (1.75–5.85)	4.84 (3.5–5.85)	Pretreatment (24-month follow-up)
			TIR	12	6 BL/6 LL	8/4	44.8 (28–66)	3.67 (1–5.50)	4.68 (3.5–5.95)	Pretreatment (24-month follow-up)
de Souza et al., 2022 [22]	Brazil	Cross-sectional	II	10	10 II	-	-	-	-	-
			TT	10	10 TT	-	-	-	-	-
			LL	10	10 LL	-	-	-	-	-
Silva et al., 2017 [5]	Brazil	Cross-sectional	T-lep	26	26 BT	14/12	51 (20–69)	0 (0–0)	0 (0–0)	26 Pretreatment
			L-lep	28	3 BL/25 LL	22/6	45.71 (21–73)	4.33 (0.50–5.85)	5.23 (2.70–5.90)	28 Pretreatment
			TIR	11	11 BL	7/4	53 (26–70)	1.45 (0–3.75)	2.35 (0–3.80)	2 Pretreatment/9 on treatment
Silva et al., 2021 [23]	Brazil	Cross-sectional and cohort	PB	14	14 BT	6/8	54.5 (8–92)	0 (0–0)	0 (0–0)	-
			MB	8	4 BL/4 LL	7/1	53.37 (34–65)	2.15 (1.50–5.50)	4.38 (2.85–5.95)	-
			No Progression	7	4 BL/3 LL	5/2	45.14 (32–69)	2.98 (0.50–4.67)	4.6 (2.7–5.95)	-
			MB Progression	12	9 BL/3 LL	9/3	49.16 (17–66)	2.66 (0.75–5.85)	2.06 (0–3.8)	-
Yang et al., 2014a [24]	China	Cross-sectional	Healthy Control	432	-	302/163	57.1 ± 7.2	-	-	-
			Leprosy Cases	412	79 PB/333 MB	291/141	56.8 ± 6.8	-	-	-
Yang et al., 2014b [25]	China	Cross-sectional	Healthy Control	46	9 TT/25 BT/28 BL/16 LL	30/16	-	-	-	-
			Leprosy Cases	78	-	52/26	-	-	-	-

BI, bacillary index; LB, logarithmic bacillary index of skin lesion; WR, without reaction; TIR, type 1 reaction; BL, borderline lepromatous; LL, lepromatous leprosy; II, indeterminate leprosy; TT, tuberculoid leprosy; T-lep, tuberculoid leprosy; L-lep, lepromatous leprosy; BT, borderline tuberculoid; PB, paucibacillary; MB, multibacillary; MB No Progression, MB patients diagnosed with TIR during the clinical follow-up.

Table 3. Basic characteristics of samples included in in vitro studies.

Author, Year [Ref.]	Sample	Characteristics
Barbosa et al., 2018 [21]	Skin Lesion Macrophages Isolated PBMCs and Monocyte Cultures	MB patients Healthy donors (+ armadillo g-irradiated <i>M. leprae</i>)
Ma et al., 2017 [19]	Isolated PBMCs and Monocyte Cultures	Healthy donors (6 males) + live or killed Thai53- strain <i>M. leprae</i>
Ma et al., 2018 [26]	Isolated PBMCs and Monocyte Cultures	Healthy donor (1 female) + live or killed <i>M. leprae</i> strain from 2 T-lep and 6 L-lep patients
Silva et al., 2017 [5]	Skin Lesion Macrophages Differentiated Macrophages	T-lep, L-lep, and TIR patients Human monocytic cell line THP-1 obtained from the American Type Culture Collection
	Isolated PBMCs and Monocyte Cultures	Healthy donors
Silva et al., 2021 [23]	Skin Biopsies Differentiated Macrophages	PB, MB, and TIR patients Human monocytic cell line THP-1 obtained from the American Type Culture Collection
	Isolated PBMCs and Monocyte Cultures	Healthy donors
Yang et al., 2014a [24]	Isolated PBMCs	Healthy donors + heat-killed T-58-strain <i>M. leprae</i>
Yang et al., 2014b [25]	Isolated PBMCs and CD4+ T Cells, Monocytes and Macrophages Cultures	Healthy donors + heat-killed T-58-strain <i>M. leprae</i>

MB, multibacillary leprosy; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; T-lep, tuberculoid leprosy; L-lep, lepromatous leprosy; TIR, type 1 reaction; PB, paucibacillary leprosy.

Table 4. Xenophagy parameters in leprosy patients.

Author, Year [Ref.]	Leprosy Patients	Cell Type	Autophagy Outcomes
Barbosa et al., 2018 [21]	Multibacillary with reversal reaction (24-month follow-up)	Skin lesion cells and PBMCs	↓ LC3 mRNA and several autophagic process-related genes associated with ↑ <i>TLR2</i> and <i>MLST8</i> . ↑ <i>NLRP3</i> , <i>CASP1</i> , and <i>IL18</i> mRNA levels, and ↑ IL-1β serum concentration.
de Sousa et al., 2022 [22]	Indeterminate (II), tuberculoid (TT), and lepromatous (LL)	Skin lesion samples	↑ FasL, caspase-8, RIP1 and RIP3, MLKL, BAX, caspase-3, and caspase-1 in the LL form. ↓ Beclin-1 in the LL and II forms, ↑ in the TT form.
Ma et al., 2017 [19]	In vitro Cell cultures + live or killed <i>M. leprae</i> stimuli	Monocytes and T lymphocytes from PBMCs	Killed <i>M. leprae</i> infection induced production of proinflammatory IL-1β, IL-6, IL-12 and TNF-α, which ↑ xenophagy.
			Live <i>M. leprae</i> infection also ↑ xenophagy, primed anti-inflammatory T cell responses by ↑ IL-10 which ↓ xenophagy.

Table 4. Cont.

Author, Year [Ref.]	Leprosy Patients	Cell Type	Autophagy Outcomes
Ma et al., 2018 [26]	In vitro Cell cultures + live or killed <i>M. leprae</i> strains from Tuberculoid (T-lep) and Lepromatous (L-lep) leprosy patients	Monocytes and T lymphocytes from PBMCs	↑ IRGM and IL-12 expression in macrophages treated by killed <i>M. leprae</i> strains, which ↑ xenophagy. ↓ IRGM, MHC-II expression, and caspase-3 and caspase-9 activity in macrophages treated with both live <i>M. leprae</i> strains, which ↓ xenophagy and apoptosis.
Silva et al., 2017 [5]	Tuberculoid (T-lep) and lepromatous (L-lep) leprosy patients and type 1 reaction (T1R) patients	Skin lesion cells, human monocytic cell line THP-1, and PBMCs	↑ LC3-II levels via immunofluorescence and BECN1, GPM3, ATG14, APOL1 e TPR gene expression in T-lep patients. ↑ LC3-I levels in L-lep patients by immunofluorescence, and ↑ BCL2 expression which ↓ xenophagy. ↑ IFN-γ and restored xenophagy levels in L-lep patients who developed the reversal reaction.
Silva et al., 2021 [23]	Paucibacillary (PB), multibacillary (MB) and type 1 reaction (T1R) patients (24-month follow-up)	Skin biopsies, human monocytic cell line THP-1, and PBMCs	↑ autophagic process-related genes: <i>RPTOR</i> , <i>ULK2</i> , <i>ATG16L2</i> , <i>ATG10</i> , <i>ATG7</i> , <i>FKBP15</i> , <i>GPM1</i> , <i>GPM2</i> , <i>SEC23B</i> , <i>SQSTM1</i> , and <i>LAMP2</i> in <i>M. leprae</i> -stimulated THP-1 cells in the presence of IFN-γ, and ↑ IL-15 secretion. ↑ <i>IL15</i> mRNA levels in T1R lesions compared to PB and MB groups. Presence of 13 common autophagic genes (<i>FRS3</i> , <i>GF11B</i> , <i>GNAI3</i> , <i>GPM1</i> , <i>GPM2</i> , <i>LETM2</i> , <i>RASD1</i> , <i>RPTOR</i> , <i>SEC23B</i> , <i>SEC24A</i> , <i>TPR</i> , <i>UVRAG</i> , and <i>BECN2</i>) between T1R skin biopsies and stimulated THP-1 cells with <i>M. leprae</i> and IFN-γ.
Yang et al., 2014a [24]	Paucibacillary and multibacillary	PBMCs	IRGM polymorphism (rs13361189TC and CC genotypes) is associated with ↑ susceptibility to leprosy, and rs13361189CC genotype ↑ leprosy complications. ↑ IFN-γ and IL-4 in <i>M. leprae</i> -infected PBMC with rs13361189CC genotype. No differences in the distribution of rs13361189 SNP between paucibacillary and multibacillary forms.
Yang et al., 2014b [25]	Lepromatous lepromatous (LL), borderline lepromatous (BL), borderline tuberculoid (BT), and tuberculoid (TT)	CD4+ T cells, monocytes, and monocyte-derived macrophages from PBMCs	↑ IRGM protein and mRNA levels in monocytes and macrophages upon stimulation with <i>M. leprae</i> . ↑ IRGM in monocytes from TT type, then BT type, BL type, and followed by LL type, showing inverse correlation with the severity of the disease.

PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; TLR2, Toll-like receptor 2; MLST8, MTOR-associated protein LST8 homolog; NLRP3, NLR family pyrin domain containing 3; CASP1, caspase 1; IL-, interleukin; FasL, factor-related apoptosis ligand; RIP1 and RIP3, receptor-interacting protein; MLKL, mixed lineage kinase domain-like pseudokinase; BAX, Bcl-2-associated X-protein; TNF-α, tumor necrosis factor alpha; IRGM, immunity-related GTPaseM; MHC-II, major histocompatibility complex class II; BECN1, beclin-1; GPM, G-protein-signaling modulator; ATG, autophagy-related genes; APOL1, apolipoprotein LI; TPR, translocated promoter region; BCL2, B-cell lymphoma 2; IFN-γ, interferon-gamma; RPTOR, regulatory-associated protein of MTOR complex 1; ULK2, unc-51-like autophagy-activating kinase 2; FKBP15, FKBP prolyl isomerase family member 15; SEC23B, SEC23 homolog B; SQSTM1, sequestosome 1; LAMP2, lysosome-associated membrane protein; FRS3, fibroblast growth factor receptor substrate 3; GF11B, growth factor independence 1B; GNAI3, G protein subunit alpha I3; LETM2, leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 2; RASD1, ras-related dexamethasone-induced 1; UVRAG, UV radiation resistance-associated; BECN2, beclin-2; SNP, single-nucleotide polymorphism.

3.3.2. *M. leprae*-Stimulated Human Monocytic Cell Line THP-1

Studies [5,23] also analyzed in vitro differentiated macrophages from human monocytic cell line THP-1 (Table 4). While study [5] demonstrated that dead but not viable *M. leprae* induced xenophagy in THP-1 cells, but not in a multiplicity of infection (MOI)-dependent manner, in study [23], high autophagic process-related gene expression (RPTOR, ULK2, ATG16L2, ATG10, ATG7, FKBP15, GPSM1, GPSM2, SEC23B, SQSTM1 and LAMP2) was observed in the presence of IFN- γ , as well as high IL-15 secretion.

3.3.3. Monocyte-Derived Macrophages from Healthy Donors upon Stimulation with *M. leprae*

In Table 4, studies [19,24–26] analyzed in vitro cells from healthy donors stimulated with live or heat-killed *M. leprae*. Using *M. leprae* Thai-53 or T-58 strains, as well as strains from T-lep or L-lep patients, it was observed that regardless of the patients' clinical form, killed *M. leprae* induces xenophagy with the production of proinflammatory IL-1 β , IL-6, IL-12, and TNF- α , in addition to high immunity-related GTPaseM (IRGM) and IL-12 expression. On the other hand, live *M. leprae* initially induces xenophagy, primed anti-inflammatory T cell responses via high IL-10 production, in addition to decreasing IRGM, MHC-II, and caspases 3 and 9 expression, which blocked xenophagy and apoptosis.

4. Discussion

Leprosy reactions are the most common source of persistent neuropathy, deformity and disability induced by *M. leprae* infection. They are characterized by an inflammatory immune response to degraded components of the bacillus that mostly appear with treatment [27]. Therefore, the identification of biomarkers that can predict the T1R or T2R development in individuals with leprosy is extremely important, contributing to better decisions on treatment strategies and control of irreversible complications [28]. As xenophagy is widely related to the immune response and intracellular pathogen elimination, understanding its relationship with type 1 and type 2 leprosy reactions presents advances in the search for markers for a better prognosis and sequelae prevention.

When multibacillary (MB) patients were followed up for 24 months and classified according to the occurrence or not of reversal reaction (T1R), it was observed that MB patients who developed reversal reactional episodes in the future presented xenophagy blockade and increased inflammasome activation. The xenophagy impairment in the T1R group was associated with an increased expression of the NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3), caspase-1 (p10), and IL-1 β production, with IL-1 β secretion already being observed at a diagnosis time point, 2–20 months before the reactional episode occurrence [20]. The same results previously observed with another mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), showed that blocking xenophagy inhibited tumor necrosis factor- α (TNF- α) while enhancing IL-1 β production in peripheral blood mononuclear cells stimulated with MTB [29].

The investigation into the processes involved in autophagy/xenophagy and cell death mechanisms, including apoptosis, necroptosis, and pyroptosis, in the cutaneous lesions of patients with leprosy, and the possible relationship of these mechanisms with leprosy and its clinical progression showed that *M. leprae* can adapt and modulate immune evasion strategies, facilitating its proliferation and reducing immunological surveillance [22]. The results indicated that apoptotic and necrotic marker (FasL, Casp8, RIP1, RIP3, MLKL, BAX, and Casp3) expressions were higher in the lepromatous (LL) than in the tuberculoid (TT) and indeterminate (II) forms. On the other hand, when the xenophagy marker Beclin-1 was analyzed, protein expression was found to be increased in the TT but decreased in the LL form [30]. Suggesting that in severe forms of the disease, the action of cytokines that strongly inhibit macrophage activity, such as IL-10, inhibit the formation of autophagolysosomes, corroborating the results obtained in T1R patients in which impaired xenophagy is directly related to inflammasome activation.

When analyzing the treatment of macrophages with live or killed *M. leprae* stimuli, a difference in xenophagy induction was observed. While killed *M. leprae* preferentially induced proinflammatory cytokines, live *M. leprae* resulted in anti-inflammatory T cell responses, characterized by high IL-10 production, which suppressed xenophagy in a negative feedback loop and allowed the persistence of *M. leprae* [19]. In a second study using live or killed *M. leprae* strains isolated from tuberculoid leprosy (T-lep) and lepromatous leprosy (L-lep) patients, the authors found that live *M. leprae* (regardless of the patient's clinical form) promotes M2 macrophage differentiation. This skewing was associated with a downregulated IRGM expression, an organizer of the core xenophagy machinery, and reduced autophagosome formation, with lower caspase 3 and caspase 9 activity [26]. Studies showed that IRGM polymorphism was associated with the increased susceptibility to leprosy by affecting inflammatory cytokines, with T-lep patients showing the highest expression, whereas L-lep had the lowest expression of IRGM [24,25]. Moreover, live *M. leprae*-infected macrophages prevented efficient phagocytosis, suppressed inflammation, and inhibited xenophagy and apoptosis [26].

Although live *M. leprae* isolated from T-lep or L-lep patients are able to downregulate the autophagic machinery, when analyzing the autophagic mechanisms in these two groups (T-lep and L-lep), large differences are observed that must be much more related to the cytokines produced and M1–M2 macrophage polarization. For example, levels of IFN- γ are significantly raised in paucibacillary T-lep when compared with multibacillary L-lep patients. IFN- γ primes macrophages for inflammatory activation and induces the xenophagy antimicrobial mechanism. LC3-positive autophagosomes and autophagic gene expression were predominantly observed in T-lep when compared with L-lep lesions and skin-derived macrophages. In L-lep skin lesion cells, high expression of *BCL2* (a hindrance to autophagy) was observed together with an inhibition of the autophagic flux. Furthermore, an upregulation of autophagic genes (*TPR*, *GF11B* and *GNAI3*) as well as LC3 levels was observed in cells of L-lep patients that developed RT1 episodes, an acute inflammatory condition associated with increased IFN- γ levels [5]. This supports previous studies which found that the xenophagy inhibiting IL-10 cytokine is predominant in multibacillary leprosy (MB) compared to high levels of IL-26, IFN- γ , and TNF- α (xenophagy-inducing cytokines) found during paucibacillary tuberculoid leprosy (PB) [31,32].

The ability of activated human macrophages to eliminate intracellular mycobacteria involves the induction of both vitamin D-dependent and -independent antimicrobial responses [33]. Activation of the vitamin D pathway leads to the induction of xenophagy and antimicrobial peptides such as cathelicidin and β -defensin 2, culminating in the bacteria elimination [34]. T-lep lesions are characterized by the expression of antimicrobial genes and the presence of cells undergoing xenophagy [34]. In contrast, in L-lep lesions *M. leprae* induces type I interferons and subsequently IL-10, which results in IFN- γ and vitamin D-dependent antimicrobial responses in macrophage inhibition, contributing to bacterial persistence [34]. This corroborates the findings of previous studies that IFN- γ plays a central role in activating the autophagic pathway, especially in tuberculoid leprosy, leading to a more self-limited form.

Despite the fact that a previous study shows that multibacillary (MB) patients who develop T1R during treatment exhibit an xenophagy blockade in skin cells, which results in increased inflammasome activation [21], more recent results from the same research group show that MB patients who progress to T1R had increased levels of IL-15 even before the beginning of the reaction, leading them to hypothesize that IL-15 binds to the IL-15R on CD4+ T cells and contributes to IFN- γ production. Once established, IL-15 production is reduced and IFN- γ acts on host cells by inducing xenophagy [23].

Regarding the type 2 reaction (T2R), we were unable to find publications in our search relating to xenophagy and erythema nodosum leprosum (ENL). Study using qPCR to screen a panel of 90 genes related to the immune response in leprosy in RNA-derived peripheral leukocytes of patients with (n = 94) and without leprosy reactions (n = 57) observed that there is a marked signature for type 1 (reversal reactions) in the blood,

comprising genes mostly related to the innate immune responses, including type I IFN components, autophagy/xenophagy, and Parkin and Toll like receptors. On the other hand, only Parkin was differentially expressed in the T2R (ENL) group [35].

In order to enhance its persistence within the host and evade the immune response, *M. leprae* promotes the polarization of macrophages toward an M2 phenotype, leading to the inhibition of xenophagy [8]. This phenomenon is particularly characteristic of patients with multibacillary (MB) forms of leprosy, where there is a reduced control over bacillary replication. However, for patients who develop T1R, the data remain uncertain and appear to be more closely associated with the cytokine profile, macrophage polarization, and CD4+ T cell responses than with bacillary death. These findings suggest that xenophagy plays a role in the development of the less severe forms of leprosy and leprosy reactions. Nonetheless, further studies are required to establish a clearer understanding of the relationship between the autophagic process and type 1 leprosy reactions. As for the occurrence of T2R (ENL), our search did not yield any data regarding its association with the autophagic process.

5. Conclusions and Future Perspectives

Our search results showed a dichotomy in the development of type 1 leprosy reactions and their relationship with xenophagy, with some data showing that MB patients who developed reversal reactional episodes in the future presented xenophagy blockade and increased inflammasome activation, with IL-1 β secretion 2–20 months before the reactional episode occurrence. More recent data, noteworthy from the same research group, show that MB patients who progress to T1R had increased levels of IL-15 even before the reaction began, suggesting that IL-15 binds to the IL-15R on CD4+ T cells and contributes to IFN- γ production and induces xenophagy. As the other data presented suggest a better prognosis in patients where the xenophagy system is activated, would patients with stronger IL-15 production have a better outcome from T1R than those who previously produce IL-1 β ?

Our study demonstrated that although there are good publications on the type 1 reaction, they remain few and diverse. New studies on the relationship between xenophagy and leprosy reactions are necessary, especially when considering the type 2 reaction (erythema nodosum leprosum).

Author Contributions: Conceived the study idea and design: P.d.A.S., F.O.S., M.S.d.S.F. and D.D.N.C. Performed the search in database: M.S.d.S.F. and D.D.N.C. Conducted data extraction: P.d.A.S., M.S.d.S.F., D.D.N.C., A.L.S.P., A.E.C.d.C. and T.J.d.S. Methodological quality analysis: M.S.d.S.F. Wrote the manuscript with review, editing, and final approval from all authors: P.d.A.S., F.O.S., M.S.d.S.F. and D.D.N.C. Performed the graphical abstract: A.L.S.P., A.E.C.d.C. and T.J.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding for its realization.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data from the articles used in this systematic review are available in the references.

Acknowledgments: We thank all authors for their fundamental contribution to the preparation of this study. We appreciate the support of FACEPE and CNPq.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mungroo, M.R.; Khan, N.A.; Siddiqui, R. *Mycobacterium leprae*: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Microb. Pathog.* **2020**, *149*, 104475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Mi, Z.; Liu, H.; Zhang, F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 567. [[CrossRef](#)]
3. Abebe, G.; Bonsa, W.K.Z. Treatment Outcomes and Associated Factors in Tuberculosis Patients at Jimma University Medical Center: A 5-Year Retrospective Study Gemed. *Int. J. Mycobacteriology* **2017**, *6*, 239–245. [[CrossRef](#)]

4. Ridley, D.S.; Jopling, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* **1966**, *34*, 255–273. [\[PubMed\]](#)
5. Silva, B.J.d.A.; Barbosa, M.G.d.M.; Andrade, P.R.; Ferreira, H.; Nery, J.A.d.C.; Côrte-Real, S.; da Silva, G.M.S.; Rosa, P.S.; Fabri, M.; Sarno, E.N.; et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, 1006103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Pinheiro, R.O.; de Souza Salles, J.; Sarno, E.N.; Sampaio, E.P. *Mycobacterium leprae*—Host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: An overview. *Future Microbiol.* **2011**, *6*, 217–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Eichelmann, K.; González, S.E.G.; Salas-Alanis, J.C.; Ocampo-Candiani, J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermo-Sifiliográficas (Engl. Ed.)* **2013**, *104*, 554–563. [\[CrossRef\]](#)
8. Hooij, A.; Geluk, A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Immunol. Rev.* **2021**, *301*, 175–192. [\[CrossRef\]](#)
9. White, C.; Franco-Paredes, C. Leprosy in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 80–94. [\[CrossRef\]](#)
10. Froes, L.A.R.; Trindade, M.A.B.; Sotto, M.N. Immunology of leprosy. *Int. Rev. Immunol.* **2022**, *41*, 72–83. [\[CrossRef\]](#)
11. Deretic, V.; Saitoh, T.; Akira, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 722–737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Yuk, J.M.; Yoshimori, T.; Jo, E.K. Autophagy and bacterial infectious diseases. *Exp. Mol. Med.* **2012**, *44*, 99–108. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Mizushima, N.; Levine, B. Autophagy in Human Diseases. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1564–1576. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Zheng, L.; Wei, F.; Li, G. The crosstalk between bacteria and host autophagy: Host defense or bacteria offense. *J. Microbiol.* **2022**, *60*, 451–460. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Guo, H.J.; Rahimi, N.; Tadi, P. *Biochemistry, Ubiquitination*; StatPearls: Treasure Island, FL, USA, 2023.
16. Hu, W.; Chan, H.; Lu, L.; Wong, K.T.; Wong, S.H.; Li, M.X.; Xiao, Z.G.; Cho, C.H.; Gin, T.; Chan, M.T.V.; et al. Autophagy in intracellular bacterial infection. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *101*, 41–50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Tanida, I.; Ueno, T.; Kominami, E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol. Biol.* **2008**, *445*, 77–88. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Pinheiro, R.O.; Schmitz, V.; Silva, B.J.d.A.; Dias, A.A.; de Souza, B.J.; Barbosa, M.G.d.M.; Esquenazi, D.d.A.; Pessolani, M.C.V.; Sarno, E.N. Innate Immune Responses in Leprosy. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 518. [\[CrossRef\]](#)
19. Ma, Y.; Zhang, L.; Lu, J.; Shui, T.; Chen, J.; Yang, J.; Yuan, J.; Liu, Y.; Yang, D.; Chen, D.; et al. A negative feedback loop between autophagy and immune responses in *Mycobacterium leprae* infection. *DNA Cell Biol.* **2017**, *36*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
20. Higgins, J.P.T.; Green, S. (Eds.) *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008; p. 538. [\[CrossRef\]](#)
21. Barbosa, M.G.d.M.; Silva, B.J.d.A.; Assis, T.Q.; Prata, R.B.d.S.; Ferreira, H.; Andrade, P.R.; Oliveira, J.A.d.P.d.; da Silva, G.M.S.; Nery, J.A.d.C.; Sarno, E.N.; et al. Autophagy Impairment Is Associated With Increased Inflammasome Activation and Reversal Reaction Development in Multibacillary Leprosy. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1223. [\[CrossRef\]](#)
22. de Sousa, J.R.; Falcão, L.F.M.; Virgolino, G.L.; Cruz, M.F.S.; Teixeira, V.F.; Aarão, T.L.d.S.; Furlaneto, I.P.; Carneiro, F.R.O.; Amin, G.; Fuzii, H.T.; et al. Different cell death mechanisms are involved in leprosy pathogenesis. *Microb. Pathog.* **2022**, *166*, 105511. [\[CrossRef\]](#)
23. Silva, B.J.d.A.; Bittencourt, T.L.; Leal-Calvo, T.; Mendes, M.A.; Prata, R.B.d.S.; Barbosa, M.G.d.M.; Andrade, P.R.; Côrte-Real, S.; da Silva, G.M.S.; Moraes, M.O.; et al. Autophagy-associated IL-15 production is involved in the pathogenesis of leprosy type 1 reaction. *Cells* **2021**, *10*, 2215. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Yang, D.; Chen, J.; Shi, C.; Jing, Z.; Song, N. Autophagy Gene Polymorphism is Associated with Susceptibility to Leprosy by Affecting Inflammatory Cytokines. *Inflammation* **2014**, *37*, 593–598. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Yang, D.; Chen, J.; Zhang, L.; Cha, Z.; Han, S.; Shi, W.; Ding, R.; Ma, L.; Xiao, H.; Shi, C.; et al. *Mycobacterium leprae* Upregulates IRGM Expression in Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages. *Inflammation* **2014**, *37*, 1028–1034. [\[CrossRef\]](#)
26. Ma, Y.; Pei, Q.; Zhang, L.; Lu, J.; Shui, T.; Chen, J.; Shi, C.; Yang, J.; Smith, M.; Liu, Y.; et al. Live *Mycobacterium leprae* inhibits autophagy and apoptosis of infected macrophages and prevents engulfment of host cell by phagocytes. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 2929–2939. [\[PubMed\]](#)
27. Sugawara-Mikami, M.; Tanigawa, K.; Kawashima, A.; Kiriya, M.; Nakamura, Y.; Fujiwara, Y.; Suzuki, K. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence* **2022**, *13*, 1985–2011. [\[CrossRef\]](#)
28. Luo, Y.; Kiriya, M.; Tanigawa, K.; Kawashima, A.; Nakamura, Y.; Ishii, N.; Suzuki, K. Host-Related Laboratory Parameters for Leprosy Reactions. *Front. Med.* **2021**, *8*, 694376. [\[CrossRef\]](#)
29. Kleinnijenhuis, J.; Oosting, M.; Plantinga, T.S.; van der Meer, J.W.; Joosten, L.A.; Crevel, R.V.; Netea, M.G. Autophagy modulates the *Mycobacterium tuberculosis*-induced cytokine response. *Immunology* **2011**, *134*, 341–348. [\[CrossRef\]](#)
30. de Sousa, J.R.; Neto, F.D.L.; Sotto, M.N.; Quaresma, J.A.S. Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 576. [\[CrossRef\]](#)
31. Strong, E.J.; Lee, S. Targeting Autophagy as a Strategy for Developing New Vaccines and Host-Directed Therapeutics Against Mycobacteria. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 614313. [\[CrossRef\]](#)
32. Dang, A.T.; Teles, R.M.; Weiss, D.I.; Parvatiyar, K.; Sarno, E.N.; Ochoa, M.T.; Cheng, G.; Gilliet, M.; Bloom, B.R.; Modlin, R.L. IL-26 contributes to host defense against intracellular bacteria. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 1926–1939. [\[CrossRef\]](#)

33. Andrade, P.R.; Mehta, M.; Lu, J.; Teles, R.M.B.; Montoya, D.; Scumpia, P.O.; Sarno, E.N.; Ochoa, M.T.; Ma, F.; Pellegrini, M.; et al. The cell fate regulator NUPR1 is induced by *Mycobacterium leprae* via type I interferon in human leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Montoya, D.; Cruz, D.; Teles, R.M.; Lee, D.J.; Ochoa, M.T.; Krutzik, S.R.; Chun, R.; Schenk, M.; Zhang, X.; Ferguson, B.G.; et al. Divergence of Macrophage Phagocytic and Antimicrobial Programs in Leprosy. *Cell Host Microbe* **2009**, *6*, 343–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rêgo, J.L.; Santana, N.d.L.; Machado, P.R.L.; Ribeiro-Alves, M.; de Toledo-Pinto, T.G.; Castellucci, L.C.; Moraes, M.O. Whole blood profiling of leprosy type 1(reversal) reactions highlights prominence of innate immune response genes. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ANEXO A- Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UFPE.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil Imunológico, Estratégias de Diagnóstico e Melhoria nos Cuidados aos Pacientes Hansenícos nos Municípios de Caruaru e Cabo de Santo Agostinho - PE

Pesquisador: PATRICIA D EMERY ALVES SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50480121.0.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.962.188

Apresentação do Projeto:

O projeto trata de uma pesquisa intitulada "Perfil Imunológico, Estratégias de Diagnóstico e Melhoria nos Cuidados aos Pacientes Hansenícos nos Municípios de Caruaru e Cabo de Santo Agostinho - PE", à qual será desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. A responsável principal é a doutora Patrícia dEmery Alves Santos, que será supervisionada pelo Professor Fabrício Oliveira Souto e terá como colaboradores as Professoras Valdênia Maria Oliveira de Souza, Vláudia Maria Assis Costa, Virgínia Maria Barros de Lorena, Michelle Christiane da Silva Rabello e o médico dermatologista Francisco Bezerra de Almeida Neto.

O projeto foi idealizado com base na hipótese de que a "implementação in loco dos testes de ELISA e qPCR para Hanseníase, além da avaliação da relação de resistência terapêutica com a presença do Mycobacterium lepromatosis e a correlação Hanseníase x COVID-19, podem trazer melhorias nos cuidados aos pacientes hansenícos nos municípios de Caruaru e Cabo de Santo Agostinho – PE.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Implementar in loco os testes diagnósticos para Hanseníase, além de avaliar em pacientes

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

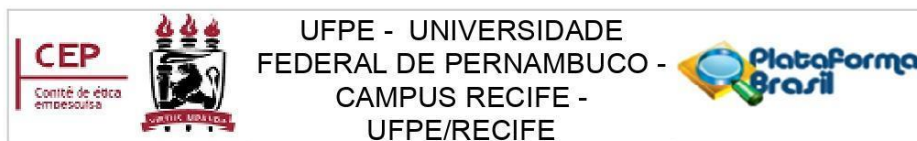
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.962.188

hansênicos, nos municípios de Caruaru e Cabo de Santo Agostinho – PE, a relação de resistência terapêutica com a presença do *Mycobacterium lepromatosis* e a correlação Hanseníase x COVID-19.

Objetivo Secundário:

1. Padronizar os testes diagnósticos de ELISA e qPCR in loco, objetivando diminuir o tempo de espera de até 8 meses dos resultados, usando como comparativo os resultados emitidos pelos Centros de Referência Nacional para Hanseníase;
2. Identificar por PCR a presença ou não do *Mycobacterium lepromatosis* em amostras de pacientes hansênicos nos municípios de Caruaru e Cabo de Santo Agostinho - PE, buscando correlacionar sua presença com os casos de resistência ao tratamento;
3. Estabelecer um perfil imunológico nos pacientes hansênicos co-infectados pelo SARS-CoV-2, através da quantificação das citocinas pró- e anti-inflamatórias e presença dos neutrófilos, associando ao desfecho favorável ou negativo (morte) observado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

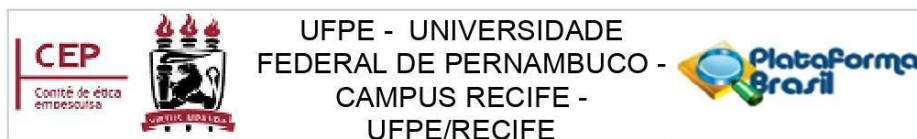
Riscos:

Os riscos diretos da sua participação na pesquisa estão relacionados às coletas das amostras, podendo aparecer um hematoma (mancha arroxeadada) no local da coleta do sangue ou um leve sangramento no momento da biópsia, porém todas as etapas serão realizadas por profissionais qualificados minimizando as chances de acontecer qualquer problema. Indiretamente, o fato de que serão coletadas informações suas através do seu prontuário médico, pode lhe causar um certo receio de que você seja identificado em algum momento. Porém, seus dados serão tratados de maneira confidencial, com padrões profissionais de sigilo e precaução por parte de todos os envolvidos neste estudo. Esse trabalho segue as normas éticas das resoluções 466/12 do CNS.

Benefícios:

Os benefícios poderão ser diretos e indiretos, caso consigamos implementar os testes diagnósticos no nosso estado Pernambuco, o que acelerará a liberação dos resultados e início dos tratamentos, muito importantes no caso da hanseníase, uma vez que o diagnóstico inadequado ou tardio geralmente leva a complicações graves. Nossos resultados também identificarão se existe a presença do *M. lepromatosis* (outro agente causador da hanseníase, mais recém-descoberto)

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.962.188

circulando na nossa região e se ele poderia ser responsável pelos casos de pacientes que não respondem bem ao tratamento, o que direta ou indiretamente ajudará todos os pacientes com hanseníase uma vez que poderemos estabelecer melhores estratégias de tratamentos com base nos resultados que serão obtidos. Além de estudarmos a relação da hanseníase com a COVID-19, duas doenças importantes que precisamos entender melhor, para garantir melhor tratamento e qualidade de vida a você e aos outros pacientes hansenícos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizado um estudo epidemiológico de corte transversal. Para a validação dos testes diagnósticos de ELISA e qPCR, os pacientes do estudo serão submetidos a dois exames diagnósticos, o que está em estudo neste projeto e o padrão-ouro realizado pelos Serviços de Referência para Hanseníase.

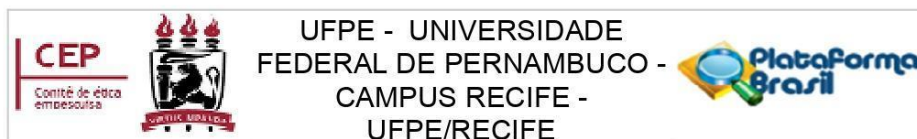
O desenho do estudo também permitirá identificar a presença ou não do *Mycobacterium lepromatosis* nas amostras dos pacientes, bem como esclarecer a associação entre a exposição (infecção pelo SARS-CoV-2) e a ocorrência do evento (alteração no perfil de citocinas pró-inflamatórias e neutrófilos) nos paciente hansenícosco-infectados.

O estudo será realizado no município de Caruaru-PE. Com população atual de 365.278 habitantes, Caruaru apresenta uma taxa de detecção média de 7,7 casos de hanseníase por 100.000 habitantes, sendo importante registrar a ocorrência de casos em menores de 15 anos, fato que sinaliza uma elevada endemicidade no município. Ainda, será realizado no Cabo de Santo Agostinho, município localizado na região Metropolitana do Recife. Com população de 208.944 habitantes, o Cabo de Santo Agostinho tem taxa de detecção média de 50,3 casos por 100.000 habitantes, e em 2018 registrou a alta ocorrência de 10 casos em menores de 15 anos. Todos os pacientes serão recrutados nos Serviços de Referência para Hanseníase dos municípios de Caruaru (Centro de Saúde Amélia de Pontes) e Cabo de Santo Agostinho (Centro de Referência em Hanseníase e Tuberculose Prof. Nilda Buarque)– PE.

Para os testes diagnósticos e para a identificação do *M. lepromatosis*, considerando nível de confiança de 80% e erro de 5%, será selecionado um "n" de 165 pacientes que necessitem de confirmação diagnóstica de todas as formas clínicas, bem como pacientes com resistência ao tratamento.

Para as dosagens de citocinas pró- e anti-inflamatórias e caracterização dos neutrófilos, serão analisados os pacientes co-infectados (Hanseníase x COVID-19), independente do "n" amostral.

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.962.188

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

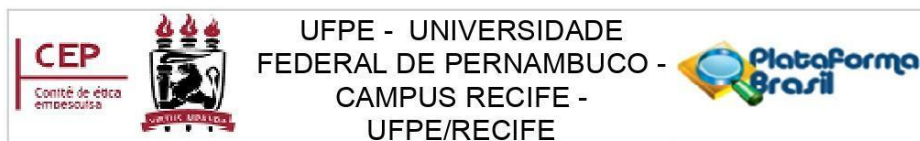
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.962.188

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1800600.pdf	02/09/2021 18:22:28		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_Resposta_ao_CEP_UFPE.pdf	02/09/2021 18:21:50	PATRICIA D EMERY ALVES SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	5_Projeto.docx	03/08/2021 13:21:04	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Folha de Rosto	1_Folha_de_Rosto.pdf	02/08/2021 19:26:52	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	7_Declaracao_de_Vinculo.pdf	02/08/2021 16:35:05	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	6_Termo_Confidencialidade.pdf	02/08/2021 16:34:50	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4c_TALE_Menores_10_a_18.docx	02/08/2021 16:33:21	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4b_TCLE_Responsaveis_Menores_10_a_18.docx	02/08/2021 16:33:09	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	4a_TCLE_Maiores_18.docx	02/08/2021 16:32:58	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3g_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Michelle_Christiane_da_Silva_Rabello.pdf	02/08/2021 16:32:37	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3f_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Virginia_Maria_Barrois_de_Lorena.pdf	02/08/2021 16:32:23	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3e_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Vlaurdia_Maria_Assis_Costa.pdf	02/08/2021 16:31:53	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3d_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Valdenia_Maria_Oliveira_de_Souza.pdf	02/08/2021 16:31:41	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3c_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Francisco_Bezerra_de_Almeida_Neto.pdf	02/08/2021 16:31:30	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3b_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Fabricao_Oliveira_Souto.pdf	02/08/2021 16:31:15	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3a_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Patricia_dEmery_Alves_Santos.pdf	02/08/2021 16:31:04	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

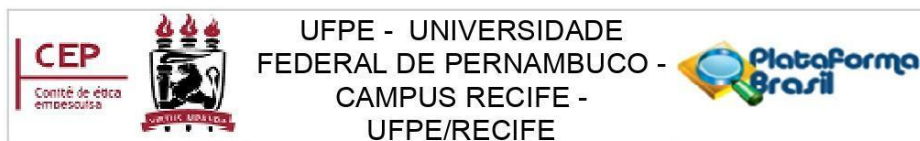
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 4.962.188

Outros	2b_Carta_de_Anuencia_Cabo.jpg	02/08/2021 16:25:24	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Outros	2a_Carta_de_Anuencia_Caruaru.pdf	02/08/2021 16:23:45	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

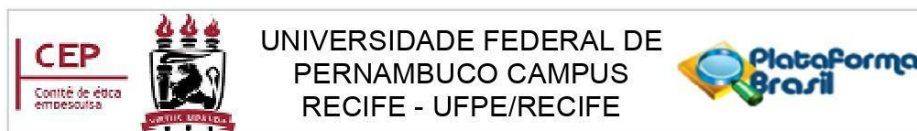
Não

RECIFE, 10 de Setembro de 2021

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B- Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da UFPE com inclusão do Hospital das Clínicas.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Perfil Imunológico, Estratégias de Diagnóstico e Melhoria nos Cuidados aos Pacientes Hansenícos nos Municípios de Caruaru, Cabo de Santo Agostinho e Recife - PE

Pesquisador: PATRICIA D EMERY ALVES SANTOS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 50480121.0.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.415.605

Apresentação do Projeto:

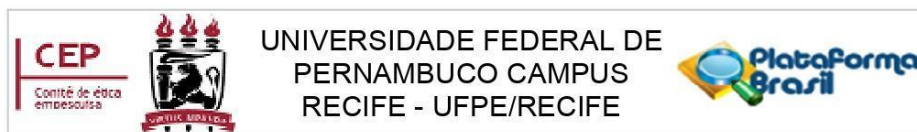
Trata-se de Emenda para a inclusão da cidade do Recife, Hospital das Clínicas - UFPE, a Unidade Sentinela de Referência para Resistência à Multidrogaterapia em Hanseníase do Estado, localizada no Núcleo de Ciências da Vida – CAA/UFPE em Caruaru. Houve também a inclusão de novos pesquisadores bem como uma solicitação para prorrogação do cronograma de coleta de amostras para março de 2024. Solicita também a inclusão de marcadores da via da autofagia para a análise dos neutrófilos.

O projeto trata de uma pesquisa intitulada Perfil Imunológico, Estratégias de Diagnóstico e Melhoria nos Cuidados aos Pacientes Hansenícos nos Municípios de Caruaru, Cabo de Santo Agostinho e Recife - PE ", à qual será desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. A responsável principal é a doutora Patrícia dEmery Alves Santos, que será supervisionada pelo Professor Fabrício Oliveira Souto e terá como colaboradores as Professoras Valdênia Maria Oliveira de Souza, Vláudia Maria Assis Costa,

Virgínia Maria Barros de Lorena, Michelle Christiane da Silva Rabello e os médicos dermatologistas Francisco Bezerra de Almeida Neto, Mecciene Mendes Rodrigues, Maria de Fátima de Medeiros Brito, Márcia Helena de Oliveira e dra. Aline Mendonça Galvão de Carvalho Aguiar.

O projeto foi idealizado com base na hipótese de que a "implementação in loco dos testes de ELISA

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.415.605

e qPCR para Hanseníase, além da avaliação da relação de resistência terapêutica com a presença do *Mycobacterium lepromatosis* e a correlação Hanseníase x COVID-19, podem trazer melhorias nos cuidados aos pacientes hansênicos nos municípios de Caruaru, Cabo de Santo Agostinho e Recife – PE.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Implementar in loco os testes diagnósticos para Hanseníase, além de avaliar em pacientes hansênicos, nos municípios de Caruaru, Cabo de Santo Agostinho e Recife – PE, a relação de resistência terapêutica com a presença do *Mycobacterium lepromatosis* e a correlação Hanseníase x COVID-19.

Objetivo Secundário:

1. Padronizar os testes diagnósticos de ELISA e qPCR in loco, objetivando diminuir o tempo de espera de até 8 meses dos resultados, usando como comparativo os resultados emitidos pelos Centros de Referência Nacional para Hanseníase;
2. Identificar por PCR a presença ou não do *Mycobacterium lepromatosis* em amostras de pacientes hansênicos nos municípios de Caruaru, Cabo de Santo Agostinho e Recife - PE, buscando correlacionar sua presença com os casos de resistência ao tratamento;
3. Estabelecer um perfil imunológico nos pacientes hansênicos co-infectados pelo SARS-CoV-2, através da quantificação das citocinas pró- e anti-inflamatórias e presença dos neutrófilos, associando ao desfecho favorável ou negativo (morte) observado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

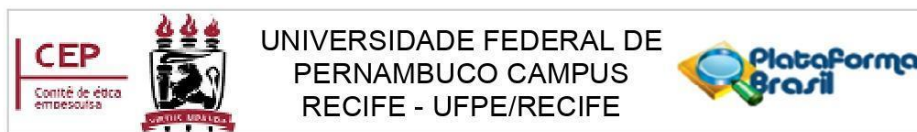
"Riscos:

Os riscos diretos da sua participação na pesquisa estão relacionados às coletas das amostras, podendo aparecer um hematoma (mancha arroxeada) no local da coleta do sangue ou um leve sangramento no momento da biópsia, porém todas as etapas serão realizadas por profissionais qualificados minimizando as chances de acontecer qualquer problema. Indiretamente, o fato de que serão coletadas informações suas através do seu prontuário médico, pode lhe causar um certo receio de que você seja identificado em algum momento. Porém, seus dados serão tratados de maneira confidencial, com padrões profissionais de sigilo e precaução por parte de todos os envolvidos neste estudo. Esse trabalho segue as normas éticas das resoluções 466/12 do CNS.

Benefícios:

Os benefícios poderão ser diretos e indiretos, caso consigamos implementar os testes

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.415.605

diagnósticos no nosso estado Pernambuco, o que acelerará a liberação dos resultados e início dos tratamentos, muito importantes no caso da hanseníase, uma vez que o diagnóstico inadequado ou tardio geralmente leva a complicações graves. Nossos resultados também identificarão se existe a presença do M. lepromatosis (outro agente causador da hanseníase, mais recém-descoberto) circulando na nossa região e se ele poderia ser responsável pelos casos de pacientes que não respondem bem ao tratamento, o que direta ou indiretamente ajudará todos os pacientes com hanseníase uma vez que poderemos estabelecer melhores estratégias de tratamentos com base nos resultados que serão obtidos. Além de estudarmos a relação da hanseníase com a COVID-19, duas doenças importantes que precisamos entender melhor, para garantir melhor tratamento e qualidade de vida a você e aos outros pacientes hansênicos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizado um estudo epidemiológico de corte transversal. Para a validação dos testes diagnósticos de ELISA e qPCR, os pacientes do estudo serão submetidos a dois exames diagnósticos, o que está em estudo neste projeto e o padrão-ouro realizado pelos Serviços de Referência para Hanseníase. O desenho do estudo também permitirá identificar a presença ou não do Mycobacterium lepromatosis nas amostras dos pacientes, bem como esclarecer a associação entre a exposição (infecção pelo SARS-CoV-2) e a ocorrência do evento (alteração no perfil de citocinas pró-inflamatórias e neutrófilos) nos paciente hansênicosco-infectados. O estudo será realizado nos municípios de Caruaru, Jaboatão dos Guararapes e Recife-PE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Sem Recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

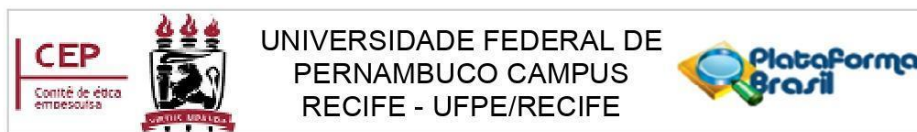
Pendência:

- Incluir o Hospital das Clínicas como Instituição Coparticipante do projeto na Plataforma Brasil;
- Corrigir o endereço do local de armazenamento dos dados, uma vez que o endereço citado corresponde ao endereço da Reitoria da UFPE.

Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada pelo colegiado do CEP e encontra-se PENDENTE para atendimento às exigências. A solicitação de Emenda está em PENDÊNCIA. O (A) pesquisador (a) deverá atender as

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 6.415.605

Declaração de Pesquisadores	3e_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Vludia_Maria_Assis_Costa.pdf	02/08/2021 16:31:53	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3d_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Valdenia_Maria_Oliveira_de_Souza.pdf	02/08/2021 16:31:41	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3c_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Francisco_Bezerra_de_Almeida_Neto.pdf	02/08/2021 16:31:30	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3b_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Fabricao_Oliveira_Souto.pdf	02/08/2021 16:31:15	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3a_Curriculo_do_Sistema_de_Curriculos_Lattes_Patricia_dEmery_Alves_Santos.pdf	02/08/2021 16:31:04	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Outros	2b_Carta_de_Anuencia_Cabo.jpg	02/08/2021 16:25:24	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito
Outros	2a_Carta_de_Anuencia_Caruaru.pdf	02/08/2021 16:23:45	Patrícia dEmery Alves Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 09 de Outubro de 2023

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br