

**ASSOCIAÇÃO DE SNPS NO GENE P2RX7 COM A HANSENÍASE E  
IMPACTO DESTES RECEPTOR NOS EFEITOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DOS  
MACRÓFAGOS ESTIMULADOS PELO *Mycobacterium leprae***

**REBEKA DA CONCEIÇÃO SOUZA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO –  
UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
AGOSTO DE 2022**

ASSOCIAÇÃO DE SNPS NO GENE P2RX7 COM A HANSENÍASE E  
IMPACTO DESTE RECEPTOR NOS EFEITOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DOS  
MACRÓFAGOS ESTIMULADOS PELO *Mycobacterium leprae*

**REBEKA DA CONCEIÇÃO SOUZA**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Alba Lucínia Peixoto Rangel  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Elena Lassounskaia

Campos dos Goytacazes  
Agosto de 2022

ASSOCIAÇÃO DE SNPS NO GENE P2RX7 COM A HANSENÍASE E  
IMPACTO DESTE RECEPTOR NOS EFEITOS PRÓ-INFLAMATÓRIOS DOS  
MACRÓFAGOS ESTIMULADOS PELO *Mycobacterium leprae*

**REBEKA DA CONCEIÇÃO SOUZA**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e  
Biotecnologia – CBB, da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense, como parte das  
exigências para obtenção do título de Doutor  
em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 31 de agosto de 2022.

Banca Examinadora:

---

Dr<sup>a</sup>. Alba Lucínia Peixoto Rangel – LBR/UENF (Orientadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Elena Lassounskaia – LBR/UENF (Coorientadora)

---

Dr. Milton Masahiko Kanashiro – LBR/UENF

---

Dr. Arnaldo Rocha Façanha - LBCT/UENF

---

Dr<sup>a</sup> Márcia de Bêrredo Pinho Moreira - LMC/FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

Chegar ao final do doutorado não seria possível sem a ajuda de muitas pessoas. Seja de forma direta ou indireta. Agradeço imensamente a cada um.

À Deus, que me guarda e sustenta a cada dia.

Aos meus pais (Luciano e Milva) por todo amor, cuidado e apoio. Meus irmãos (Júnior e Jô), minha cunhada Dayara e meus sobrinhos (Sophia, Daniele, Júlia, Darlei e Danilo) que são minhas alegrias.

A todos os meus familiares, por todo apoio e incentivo.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia e a CAPES pela bolsa concedida.

À Prof<sup>a</sup> Alba pela amizade e orientação no desenvolvimento deste trabalho e ao longo dos anos, quando me recebeu no laboratório desde a iniciação científica. Além da pesquisa, me apresentou a extensão, a qual tenho imenso carinho.

À Prof<sup>a</sup> Elena pela coorientação e apoio para que fosse possível a manutenção da cepa de *M. leprae*.

À Dr<sup>a</sup>. Thaís Louvain pela revisão deste trabalho e todo o auxílio durante a execução dos experimentos apresentados no capítulo 1.

À Dr<sup>a</sup>. Márcia Bêrredo, ao Dr<sup>a</sup> Arnaldo Façanha e ao Dr. Milton Kanashiro por aceitarem fazer parte da banca examinadora deste trabalho.

Ao Dr. Edilbert Pellegrini pela colaboração com o diagnóstico clínico dos pacientes com hanseníase.

À enfermeira Jô, do Centro de Referência da Hanseníase, por todo auxílio com os pacientes.

À todos os voluntários que aceitaram participar da pesquisa e doaram amostra de sangue.

Às Dr<sup>a</sup> Patrícia Samarco Rosa por gentilmente ceder a cepa de *M. leprae* para cultura em camundongos nudes, também a Daniele Bertoluci por todo treinamento quando estive em Baurú e todo auxílio via whatsapp.

À prof<sup>a</sup> Maria Regina e Igor Santiago por gentilmente ceder os fêmures dos camundongos P2X7<sup>-/-</sup> e a estrutura para realização dos experimentos.

Ao prof<sup>o</sup> Enrique Medina por me receber em seu laboratório para a realização da parte genética do trabalho.

Aos amigos que conheci no NUDIM e se tornaram especiais, Juliana, Douglas, Diego, Cynthia, Juan, Felipe, Cleiton e Thiago.

Aos amigos Letícia, Yuri, Laissa e Rosana pela parceria no Projeto Hanseníase. Aos amigos Cristina e Gabriel pela parceria na publicação do artigo.

Aos demais amigos do LBR, Fernandinha, Juliana, Bárbara, Vinícius, Sanderson, Milena, Jessany, pela agradável convivência no laboratório. Laura, por me ensinar com uma ótima didática a usar o Mendeley e pelos nossos cafés. Nina, pela amizade fortalecida nessa fase final.

À minha amiga/irmã, sócia e afilhada Luiza, quem eu conheci na primeira semana do doutorado e acabamos virando amigas de infância, por todo apoio, projetos compartilhados, boa conversa e amizade.

À minha amiga/irmã Karol, que mesmo distante, sempre me incentiva e coloca pra cima.

Aos amigos Antonio, Giliane e em especial a Fabrício, que foi um essencial colaborador para o desenvolvimento do capítulo 2 desse trabalho, pelo carinho e boas conversas.

À Marcela Boechat e Fernanda Santanna pela oportunidade no projeto Catalisa Sebrae e por todo apoio no período de escrita deste trabalho.

Aos técnicos do LBR, Juliana, Liliane, Verônica, Núbia, Rita e Fernando por todo auxílio para o desenvolvimento desse trabalho.

À Bia e Marlene, secretárias da pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, que sempre me auxiliaram quando era necessário.

Aos amigos no NEBBIO por toda parceria e amizade durante a gestão 2019-2021.

A todos o meu sincero agradecimento!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELA.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 - <i>Mycobacterium leprae</i> .....	21
2.2 - Histórico.....	22
2.3 - Epidemiologia.....	22
2.4 – Diagnóstico.....	24
2.5 - Classificação.....	25
2.6 - Transmissão e Tratamento.....	26
2.7 - Resposta imune ao <i>Mycobacterium leprae</i> .....	27
2.8 – Gene <i>P2RX7</i> e o receptor purinérgico P2X7.....	30
2.9 - Macrófagos Derivados da Medula Óssea.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 – Objetivo geral.....	36
4.2 – Objetivos específicos.....	36
5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	37
5.1 Capítulo 1: Associação de polimorfismo no gene P2X7 e Hanseníase em humanos - Artigo publicado na revista <i>Frontiers in Genetics</i>	37
5.2 Capítulo 2: Papel da sinalização purinérgica, via receptor P2X7, em macrófagos murinos nocautes pra P2X7 frente ao estímulo com bacilo de <i>Mycobacterium leprae</i> irradiado.....	48

5.2.1	Métodos.....	48
5.2.1.1	Camundongos C57Bl/6 (WT e P2X7 <sup>-/-</sup> ) e NUDE (background Balb/c).....	48
5.2.1.2	Cultivo de <i>Mycobacterium leprae</i> Thai-53 na almofada da pata de camundongo nude .....	48
5.2.1.3	Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO).....	49
5.2.1.4	Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação da responsividade de MDMO sob estímulo de <i>M. leprae</i> irradiado e tratamentos pelo ATP, bzATP e oATP.....	50
5.2.1.5	Avaliação da produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) em sobrenadantes de cultura por ELISA.....	51
5.2.1.6	- Avaliação da produção de óxido nítrico .....	52
5.2.1.7	Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio por Citometria de Fluxo .....	52
5.2.1.8	Análises Estatísticas .....	52
5.2.2	Resultados .....	54
5.2.2.1	Implementação da cultura de camundongos nudes infectados com a cepa Thai-53 de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	54
5.2.2.2	Viabilidade celular .....	54
5.2.2.3	Produção de citocinas.....	56
5.2.2.4	Produção de NO .....	59
5.2.2.5	Produção de ROS.....	60
5.2.3	Discussão.....	62
6	DISCUSSÃO GERAL.....	68
7	CONCLUSÃO .....	71
8	REFERÊNCIAS .....	73
	ANEXOS.....	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no ano de 2020. Extraída de WHO, 2021. ....	23
<b>Figura 2:</b> Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes segundo região de residência. Brasil, 2011 a 2020. Extraída de (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022) .....	24
<b>Figura 3:</b> Correlação das formas clínicas na classificação de Madri com a classificação operacional usada pela OMS.....	26
<b>Figura 4:</b> Ativação do receptor P2X7 por ATP induz (1) formação de ROS, (2) fusão lisossomal, (3) ativação do inflamassoma e ativação de caspase-1, (4) liberação de IL-1 $\beta$ maduro. Extraída de Sávio et al., 2019.....	32
<b>Figura 5:</b> Avaliação da viabilidade celular. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 P2X7 <sup>-/-</sup> no período de 24h (A e B, respectivamente) e 48h (C e D, respectivamente) estimulados ou não com <i>Mycobacterium leprae</i> irradiada (10ug/mL) e tratadas ou não com ATP, bzATP, oATP. O gráfico representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. MDMO: Macrófagos derivados da medula óssea. ML: <i>Mycobacterium leprae</i> .....	55
<b>Figura 6:</b> Produção da citocina TNF- $\alpha$ no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7 <sup>-/-</sup> (B) no período de 24h e 48h. * p<0,05; ** p<0,01. O gráfico representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. MDMO: Macrófagos derivados da medula óssea. ML: <i>Mycobacterium leprae</i> .....	56
<b>Figura 7:</b> Produção da citocina IL-6 no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7 <sup>-/-</sup> (B). * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001. O gráfico representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados independentemente.....	57
<b>Figura 8:</b> Produção da citocina IL-10 no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7 <sup>-/-</sup> (B). O gráfico representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. ....	58
<b>Figura 9:</b> Produção da citocina IL-1 $\beta$ no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7 <sup>-/-</sup> (B), * p<0,05; ** p<0,01. O gráfico representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos realizados independentemente.....	59



**Figura 10:** Tempo de incubação de 24h e 48h \*\*\*  $p < 0,001$ . Os gráficos representam a média + desvio padrão de três experimentos independentes. . 60

**Figura 11:** Produção de ROS por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 WT (A e C) e P2X7<sup>-/-</sup> (B e D). As figuras A e B representam as intensidades de fluorescência de DCFDA representativas de um experimento. As figuras C e D representam a média + desvio padrão das medianas da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes.

..... 61

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase (Extraída de Souza, 1997).....	26
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenosina

aC – antes de Cristo

APC - Células apresentadoras de antígenos

ASC - Proteína associada a apoptose contendo um domínio

ATP – Adenosina Trifosfato

B - Forma borderline

BB - Borderline-borderline

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

BL - Borderline-lepromatoso

BSA – Albumina sérica bovina

BT - Borderline-tuberculóide

bzATP - Benzoil-ATP

C – Citosina

C57BL/6 – Camundongos isogênico

Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio

Casp1 - procaspase-1

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

D – Dimorfa

DCFDA – 2',7'- Diacetato diclorodihidrofluoresceína

DMEM-F12 – Meio de cultivo celular *Dulbecco Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*

eATP – ATP extracelular

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

ENL - Eritema nodoso leproso

HSP18 - proteína de choque térmico 18

I - Indeterminada

IFN-γ – Interferon-gamma

IL – Interleucina

K<sup>+</sup> - Íon potássio

kDa – Quilodalton

L – lepromatoso

L929 – Linhagem de fibroblasto murino

LID-1 – Diagnóstico de hanseníase IDRI 1  
LL - lepromatoso-lepromatoso  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MDMO - Macrófagos derivados de medula óssea  
mL - Mililitros  
*M. leprae* - *Mycobacterium leprae*  
MLMA - Fração da membrana de *M. leprae*  
MLSA - Fração do citosol de *M. leprae*  
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade  
mM – Mili molar  
MSCs - Células-tronco mesenquimais  
MTT - 3-(4,5-dimeThyl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide  
Na<sup>+</sup> - Íon sódio  
NAC - N-acetilcisteína  
NFkB – Fator nuclear kappa B  
NLRP3 - Domínio pirina da família NLR  
nm - Nanômetro  
NO – Óxido nítrico  
oATP – ATP oxidado  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PAMP - Padrão molecular associado a patógenos  
PBS – Phosphate-Buffered Saline  
PGL-1 – Glicolipídeo-fenólico-1  
PQT – Poliquimioterapia  
PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões  
*P2RX7* – Gene Receptor de P2X7  
RR - Reação de reversão  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
Rpm – Rotações por minuto  
SFB – Soro fetal bovino  
SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único  
TT - Tuberculóide-tuberculóide  
T - Tuberculóide  
Th – Linfócito T auxiliar

TLR - Toll-like receptors

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

UENF – Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro

USP – Universidade de São Paulo

ug – Microgramas

$\mu$ L - Microlitro

uM – Micro molar

V - Virchoviano

## RESUMO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, é uma doença com amplo espectro clínico que acomete pele, mucosa e nervos periféricos. Apenas a exposição à *M. leprae* não é suficiente para desencadear a doença, o que pode ser explicado por fatores imunológicos e genéticos do hospedeiro para determinar resistência e susceptibilidade. O receptor P2X7 desempenha um papel crucial na imunidade e está associado a várias doenças infecciosas. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar a associação de polimorfismos no gene *P2RX7* com a hanseníase, bem como entender como alterações funcionais neste receptor poderiam influenciar na responsividade de macrófagos murinos nocautes (*P2X7<sup>-/-</sup>*) frente a infecção por *M. leprae*. Inicialmente foram realizadas análises de RNA-seq do gene *PR2X7* em pele de indivíduo saudável e doente. Os SNPs de *P2RX7* relevantes nessas análises foram contemplados no estudo de associação genética do tipo caso-controle, contendo 140 amostras casos e 151 amostras controles processadas pela técnica de minissequenciamento de nucleotídeo único. Então, a responsividade de macrófagos murinos nocautes *P2X7<sup>-/-</sup>*, foram estudadas *in vitro* em culturas sob estímulo de *M. leprae* irradiada e tratadas com ATP, bzATP e oATP para ativação, superativação e bloqueio de P2X7, respectivamente. A expressão de *P2RX7*, *in silico*, foi encontrada significativamente *upregulated* em macrófagos de pacientes em comparação com controles, principalmente em macrófagos de pacientes virchowianos. Além disso, a expressão alelo-específica para polimorfismos de nucleotídeo único do gene *P2RX7* apontou que as variantes genéticas rs3751143 e rs1718119 eram uma das mais frequentes nas amostras estudadas, as quais conferem perda e ganho de função do receptor, respectivamente. No estudo caso controle foi observado um risco significativo para a hanseníase associado ao polimorfismo rs3751143 C em homozigose, como mostra o modelo recessivo (CCxAC+AA p= 0,01; OR= 2,5; IC95%= 1,2–5,2), mas não no modelo dominante (CC+ACxAA p= 0,47 OR= 1,21 IC95%= 0,76–1,93). Ao contrário, o alelo polimórfico A de rs1718119 foi associado à proteção para o desenvolvimento da hanseníase, como observado no modelo dominante (AA+AGxGG p= 0,002; OR= 0,03; IC95%= 0,18-0,68). Foi observado que ATP diminui a viabilidade celular nos macrófagos WT, mas não nos macrófagos *P2X7<sup>-/-</sup>*. Ao comparar as citocinas produzidas, a partir da ativação

de P2X7 via ATP e bzATP sob estímulo de *M. leprae*, foi observado que MDMO P2X7<sup>-/-</sup> tiveram níveis de TNF- $\alpha$  superiores nas células estimuladas com *M. leprae*, tratadas ou não com ATP e bzATP. Foi observada maior produção de IL-6 nas células P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas e tratadas com ATP e bzATP no período de 24h em relação as células não estimuladas e tratadas com ATP e bzATP. *M. leprae* induziu secreção de IL-1 $\beta$  em MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup> independente do tratamento, mas com diferença estatística significativa apenas em MDMO P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas com *M. leprae*. *M. leprae* foi capaz de induzir produção de ROS em MDMO WT de forma significativa, mas não foi capaz de induzir produção de NO em MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup>. Esses achados sugerem que na ausência de P2X7 outros receptores possam ser requeridos na produção de fatores pró-inflamatórios por macrófagos sob estímulo de *M. leprae*.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium leprae*, P2RX7, SNP, macrófagos, sinalização purinérgica

## ABSTRACT

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, is a disease with a broad clinical spectrum that affects the skin, mucosa, and peripheral nerves. Exposure to *M. leprae* alone is not enough to trigger the disease, which can be explained by immunological and genetic factors of the host to determine resistance and susceptibility. The P2X7 receptor plays a crucial role in immunity and is associated with several infectious diseases. In this sense, this study aimed to evaluate the association of polymorphisms in the *P2RX7* gene with leprosy, as well as to understand how functional changes in this receptor could influence the responsiveness of knockout murine macrophages (*P2X7<sup>-/-</sup>*) to *M. leprae* infection. Initially, RNA-seq analyzes of the *PR2X7* gene were performed in healthy and diseased skin. The relevant *P2RX7* SNPs in these analyzes were included in the case-control genetic association study, containing 140 case samples and 151 control samples processed by the single nucleotide minisequencing technique. Then, the responsiveness of *P2X7<sup>-/-</sup>* knockout murine macrophages were studied in vitro in cultures under stimulation of irradiated *M. leprae* and treated with ATP, bzATP and oATP for activation, overactivation and blockade of P2X7, respectively. The expression of *P2RX7*, in silico, was found to be significantly upregulated in macrophages from patients compared to controls, mainly in macrophages from Virchowian patients. In addition, the allele-specific expression for single nucleotide polymorphisms of the *P2RX7* gene indicated that the genetic variants rs3751143 and rs1718119 were one of the most frequent in the studied samples, which confer loss and gain of receptor function, respectively. In case-control study observed a significant risk for leprosy associated with the homozygous rs3751143 C polymorphism, as shown by the recessive model (CCxAC+AA p=0.01; OR= 2.5; 95%CI= 1.2–5,2), but not in the dominant model (CC+ACxAA p= 0.47 OR= 1.21 95%CI= 0.76–1.93). In contrast, the polymorphic A allele of rs1718119 was associated with protection for the development of leprosy, as observed in the dominant model (AA+AGxGG p= 0.002; OR= 0.03; 95%CI= 0.18-0.68). Was observed decrease cell viability in WT macrophages treated with ATP, but not in *P2X7<sup>-/-</sup>* macrophages. When comparing the cytokines produced from the activation of P2X7 via ATP and bzATP under *M. leprae* stimulation, it was observed that MDMO *P2X7<sup>-/-</sup>* had higher levels of TNF- $\alpha$  in



cells stimulated with *M. leprae*, treated or not with ATP and bzATP. Higher production of IL-6 was observed in P2X7<sup>-/-</sup> cells stimulated and treated with ATP and bzATP in the 24h period compared to cells not stimulated and treated with ATP and bzATP. *M. leprae* induced IL-1 $\beta$  secretion in WT and P2X7<sup>-/-</sup> MDMO regardless of treatment, but with a statistically significant difference only in *M. leprae* stimulated P2X7<sup>-/-</sup> MDMO. *M. leprae* was able to significantly induce ROS production in MDMO WT, but was not able to induce NO production in MDMO WT and P2X7<sup>-/-</sup>. These findings suggest that in the absence of P2X7 other receptors may be required in the production of pro-inflammatory factors by macrophages under *M. leprae* stimulation.

**Keywords:** *Mycobacterium leprae*, P2RX7, SNP, macrophages, purinergic signaling

## 1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae* e acomete pele e nervos periféricos. Sua classificação se baseia na diversificação no curso clínico da infecção, variando de uma doença paucibacilar, na qual poucos bacilos estão presentes, a uma doença multibacilar, na qual uma grande carga bacilar está presente nas lesões (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). *M. leprae* é um bacilo intracelular obrigatório e infecta, preferencialmente, macrófagos e células de Schwann (PREVEDELLO; MIRA, 2007). Somente a exposição à micobactéria não é suficiente para desencadear a doença, o que pode ser explicado pela dependência de fatores genéticos e imunológicos para determinar resistência e susceptibilidade. O envolvimento de mecanismos imunológicos na infecção por *M. leprae* ainda não é totalmente elucidado.

O receptor P2X7 tem sido implicado em processos fisiológicos e patológicos na morte de patógenos intracelulares por macrófagos (CORRÊA et al., 2010b; LEES et al., 2010; MOREIRA-SOUZA et al., 2017; SHEMON et al., 2006) e estímulos de ativação e proliferação celular (ADINOLFI et al., 2005). Esse receptor é altamente expresso em células de origem hematopoiética, incluindo macrófagos, células dendríticas, mastócitos e células linfoides de todos os subtipos (COLLO et al., 1997; SURPRENANT et al., 1996). A expressão de P2X7 na membrana da superfície celular é regulada positivamente pelo *IFN-γ* e sua ativação ocorre através de trifosfato de adenosina (ATP), fazendo com que ocorra uma abertura imediata de um canal seletivo de cátions, o que permite o influxo de  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  e o efluxo de  $K^+$ . Este processo resulta na indução da cascata de caspase, ativação de fosfolipase D e apoptose. A fosfolipase D promove a fusão do fagossomalissossoma e provoca a morte micobacteriana (BAHARI et al., 2013). O ATP extracelular pode induzir a atividade bactericida de macrófagos em direção a micobactérias.

Além disso, o estímulo do receptor P2X7 também induz a ativação do inflamassoma, sendo essencial para liberar IL-1 $\beta$  para o meio extracelular, não apenas um gatilho para seu processamento (DI VIRGILIO, 2007). Dessa forma, P2X7 se apresenta como um dos ativadores mais potentes de inflamassoma NLRP3. A ativação do inflamassoma canônico NLRP3 é desencadeada por condições de estresse citosólico, como efluxo de  $K^+$ , vazamento de componentes de lisossoma, dano mitocondrial e produção de ROS. No receptor

P2X7 a abertura do canal iônico ou a formação do poro causa uma modificação que recruta componentes do inflamassoma e facilita sua montagem. A ativação do receptor P2X7 envolvida na eliminação de diferentes parasitas intracelulares, induz a maioria dessas condições de estresse e, portanto, é capaz de ativar o inflamassoma NLRP3 (MOREIRA-SOUZA et al., 2017). Além disso, em macrófagos peritoneais e derivados de medula óssea de camundongos *knockout* para componentes do inflamassoma (NLRP3<sup>-/-</sup>, Caspase-1/11<sup>-/-</sup>, Caspase11<sup>-/-</sup>), mostrou que o controle da infecção por *T. gondii* via ativação do receptor P2X7 pelo ATP extracelular (eATP) depende de caspase-1, efetor de inflamassoma canônico, mas não da caspase-11 (um efetor de inflamassoma não-canônico). A eliminação de parasitas via receptor P2X7 e a ativação do inflamassoma também foram dependentes da geração de ROS e do canal de panexina-1. O tratamento com eATP aumentou a secreção de IL-1 $\beta$  de macrófagos infectados, e este efeito foi dependente do inflamassoma canônico NLRP3.

O gene *P2RX7* é altamente polimórfico, com vários polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) que afetam a função deste receptor (BAHARI et al., 2013). Um exemplo é polimorfismo de perda de função, rs2230911 C>G, que macrófagos infectados por micobactéria (BCG) e exposição breve ao ATP deu um aumento de 24% na porcentagem de macrófagos apoptóticos em indivíduos portadores do alelo ancestral C. Em indivíduos heterozigotos para esse polimorfismo esse valor de apoptose induzida por ATP foi reduzido para metade e para um quarto desse valor para o indivíduo homozigoto para rs2230911 G. A comparação destes valores revela uma forte associação entre a ativação do receptor e os efeitos a jusante sobre a morte apoptótica da célula (SHEMON et al., 2006). Efeito semelhante também acontece com outro polimorfismo de perda de função, rs3751143 A>C, em que macrófagos de pessoas com esse polimorfismo são menos efetivos na morte de *Toxoplasma gondii* intracelular após exposição a ATP em comparação com macrófagos de pessoas com o alelo de tipo selvagem. Macrófagos de camundongos noucautes para P2X7 não foram capazes de matar *T. gondii* tão efetivamente quando comparado aos macrófagos de camundongos selvagens (LEES et al., 2010). Significativamente, esse mesmo polimorfismo reduz a capacidade *in vitro* de macrófagos humanos para controlar *Mycobacterium tuberculosis* (PLACIDO et al., 2006). Além disso, a herança do SNP rs3751143 C foi associada à suscetibilidade à tuberculose

extrapulmonar em humanos (FERNANDO et al., 2007; NIÑO-MORENO et al., 2007).

O envolvimento de P2X7 na imunopatologia da hanseníase e infecção por *Mycobacterium leprae* ainda não está esclarecido. Por isso, este trabalho abordou, no capítulo 1, a expressão diferenciada de P2X7 em amostras de pele em análise de RNAseq e a associação genética de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *P2RX7* em um estudo caso controle em uma população de Campos dos Goytacazes/RJ, tendo sido o primeiro relato da associação deste gene com a hanseníase. Além disso, no capítulo 2, este trabalho avaliou a importância da via de sinalização do receptor purinérgico P2X7 para controle da infecção por *M. leprae*, por meio da responsividade de macrófagos murinos nocautes para este receptor em culturas estimuladas com *M. leprae* irradiada.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - *Mycobacterium leprae*

*Mycobacterium leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente quando submetido a coloração de Ziehl-Neelsen e intracelular obrigatório que infecta preferencialmente células de Schwann e macrófagos (CHAVARRO-PORTILLO; SOTO; GUERRERO, 2019). *M. leprae* pertence ao gênero *Mycobacterium*, único gênero da família *Mycobacteriaceae*, na ordem *Actinomycetales*. Mede aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro e tem o tempo de geração de 12 a 14 dias e cresce melhor em torno de 30°C e, portanto, prefere as áreas mais frias do corpo humano (KATOCH, V. M., & SHARMA, 2000; SASAKI et al., 2001). *M. leprae* sofreu uma evolução redutiva resultando em baixa variabilidade genética, o que sugere que a diversidade dos fenótipos da doença é atribuível às respostas do hospedeiro (LEAL-CALVO et al., 2021).

Antígenos de interesse de *M. leprae* vem sendo estudados quanto sua interação com as células do hospedeiro. Sua parede celular é rica em peptídeoglicanos, ácidos micólicos e lipopolissacarídeos como a lipoarabinomanana (LAM) um potente imunomodulador, enquanto a capsula bacilar é composta pelo PGL-1 (SIBLEY et al., 1988; SPENCER et al., 2011).

O antígeno PGL-1 é sem dúvidas o mais estudado, representa um importante antígeno específico de *M. leprae* para a sorologia da hanseníase (TELES et al., 2020). Níveis elevados de IgM anti-PGL-1 é encontrado em indivíduos não tratados, que desenvolveram reação hansênica ou que apresentaram resistência medicamentosa, enquanto níveis mais baixos são encontrados nos indivíduos paucibacilares ou naqueles tratados (LYON et al., 2008). PGL-1 também é conhecido por desencadear um mecanismo de escape que favorece a persistência do bacilo dentro do macrófago por inibir ânions superóxido (THANGARAJ et al., 1990).

Outros antígenos, como o HSP18, um antígeno de 18 KDa, é uma pequena proteína de choque térmico cuja função molecular ajuda no crescimento e sobrevivência do patógeno (NANDI et al., 2020). Além disso, frações de membrana de *M. leprae* também são utilizados na pesquisa pelo seu poder imunogênico, como MLMA (Fração da membrana de *M. leprae*) e MLSA (Fração do citosol de *M. leprae*) (OLIVEIRA et al., 2021).

As dificuldades de cultivo *in vitro* de *Mycobacterium leprae* limitam as pesquisas relacionadas à imunopatologia da hanseníase. No entanto, é possível obter sucesso no cultivo *in vivo* de *M. leprae* na almofada da pata de camundongos nude (MCDERMOTT-LANCASTER et al., 1988; TROMBONE et al., 2014).

## 2.2 - Histórico

A hanseníase é uma das doenças infectocontagiosas descritas mais antigas. Acredita-se que a Índia, juntamente com o continente africano, seja o foco inicial da doença, sendo os primeiros casos a referência mais antiga, datada de 600 aC (LASTÓRIA et al., 2003). No ano de 583, em um Concílio, a Igreja estabeleceu regras para a profilaxia da doença, que consistiam em isolar o doente da população sadia. O doente também era obrigado a usar roupas características e fazer soar um sino para avisar os sadios de sua aproximação (EIDT, 2004). Há evidências de que os primeiros casos da doença no Brasil notificados datam do ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (EIDT, 2004). No Brasil, até meados do século XX, os doentes eram obrigados a se isolar em leprosários e tinham seus pertences queimados. Essa conduta tinha o intuito de separar os doentes e não um tratamento efetivo. Apenas em 1962, deixou de ser obrigatório a internação dos doentes (CAVALIERE, 2021).

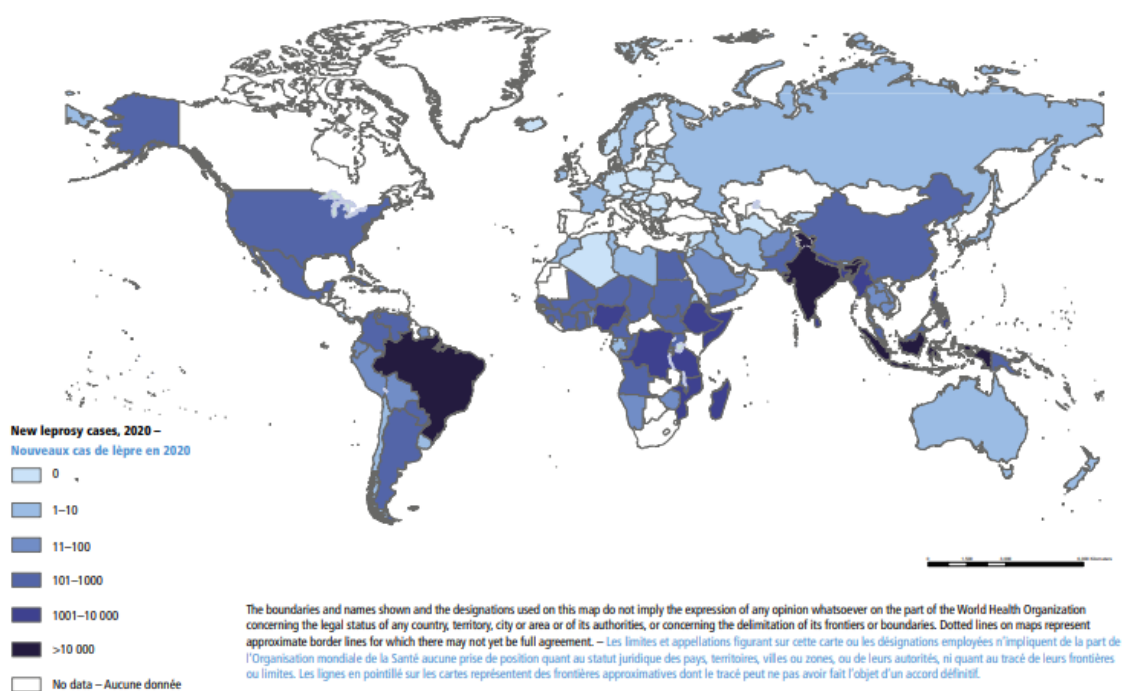
O médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, renomado pesquisador no assunto, identificou o bacilo lepra como causador da hanseníase em 1873 (EIDT, 2004). No Brasil, o nome da doença foi alterado para hanseníase pela sanção da Lei Federal nº N°9.010 no dia 29 de março de 1995 no governo do Presidente da República Fernando Henrique Cardoso, na qual através do artigo 1º que diz: “O termo “lepra” e seus derivados não poderão ser utilizados na linguagem empregada nos documentos oficiais da Administração centralizada e descentralizada da União e dos Estados-membros” (BRASIL, 1998).

## 2.3 - Epidemiologia

O Brasil ocupa o segundo lugar entre os países com maior número de casos no mundo, onde o primeiro país em número de casos é a Índia. Em 2020,

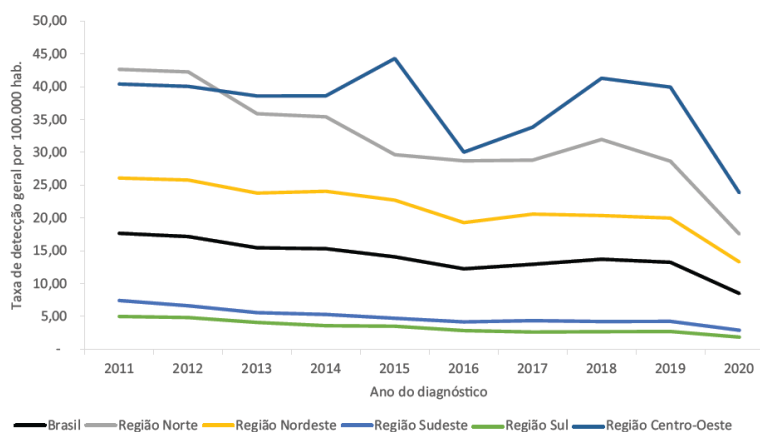
127.396 casos novos da doença foram reportados no mundo. Desses, 19.195 (15,1%) ocorreram nas Américas e 17.979 foram notificados no Brasil, o que corresponde a 93,6% do número de casos novos do continente (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021).

A hanseníase é considerada um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. Em uma década (2011 a 2020), foram diagnosticados no nosso país 284.723 casos novos de hanseníase. Neste período, foi observada uma redução na taxa de detecção geral de casos novos, passando de 17,65 em 2011 para 8,49 casos por 100.000 habitantes em 2020 (**Figura 2**). Esses índices representam uma mudança de risco alto para risco médio, mas pode ser mascarado pela pandemia de COVID-19, onde antes da pandemia a taxa de detecção geral era de 13,26 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022)



**Figura 1:** Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase no ano de 2020. Extraída de WHO, 2021.

Mesmo assim, o Brasil não atingiu a meta de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública (definido pela prevalência inferior a 1 caso novo por 10.000 habitantes), sendo responsável pela endemia no continente americano. Em 2020 a taxa de prevalência no Brasil foi de 1,08 casos por 10.000 habitantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021).



**Figura 2:** Taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes segundo região de residência. Brasil, 2011 a 2020. Extraída de (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022)

No estado do Rio de Janeiro o total de novos casos no período de 2016 a 2020 foi de 4112. No ano de 2020 foram 579 novos casos e a taxa de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes de 3,33. Esse valor é considerado risco médio e é usado para medir a força de morbidade, a magnitude e a tendência da endemia. Em 2021 os dados, apesar de preliminares, já apontam 568 novos casos (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Na cidade de Campos dos Goytacazes, a taxa de detecção geral no ano de 2020 foi de 4,11, no ano anterior, que compreende o período antes da pandemia de COVID-19, foi de 9,85. A taxa de prevalência no ano de 2020 foi de 0,33 e vem caindo nos últimos 10 anos, onde no ano de 2012 era de 1,4. A taxa de prevalência serve para medir a magnitude da endemia (SINAN, 2021).

## 2.4 – Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é feito pelo exame dermatoneurológico, através do achado de lesões de pele com alteração da sensibilidade. A sensibilidade nas lesões pode estar diminuída (hipoestesia), ausente (anestesia) ou, em menor frequência, aumentada (hiperestesia) (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2019). Em alguns casos, a confirmação do diagnóstico requer o uso de exames laboratoriais complementares. Neste caso, a baciloscopia e a histopatologia são os testes mais utilizados. Há ainda outra forma de avaliar a exposição à *M. leprae*, que é através da detecção de anticorpos contra PGL-1 e LID-1 por ELISA (HUNGRIA et al., 2012). Os níveis de produção de anticorpos



contra PGL-1 e LID-1 indicam exposição à *M. leprae* e mostram correlação positiva com a baciloscopia em pacientes multibacilares. Porém, pacientes paucibacilares geralmente são negativos em testes de detecção de anticorpos (BOVOLINI; SILVA; SOUZA, 2019; BRASIL et al., 2003; DE MOURA et al., 2008). Dessa forma, esse ensaio pode contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na classificação dos pacientes e, ainda, no monitoramento da eficácia do tratamento (DE MOURA et al., 2008).

## 2.5 - Classificação

A classificação da forma clínica da hanseníase é intimamente ligada a resposta imune estabelecida pelo hospedeiro. As formas intermediárias são estabelecidas com a proximidade de cada polo. Atualmente, a classificação mais usada foi criada por Ridley e Jopling (NATH; SAINI; VALLURI, 2015). A classificação de Ridley e Jopling (1966) adota subgrupos dentro do espectro, que obedece, critérios clínicos e bacteriológicos, e enfatiza os aspectos imunológicos e histopatológicos. Siglas são utilizadas para indicar as duas formas polares tuberculóide-tuberculóide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL) e os três subgrupos: borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL). Uma segunda classificação de Madri (1953) adota critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença, que foram acrescidos pelos aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definindo os grupos polares, tuberculóide (T) e virchoviano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, a forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, a forma borderline (B) ou dimorfa (D). Em 1982, um Comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma terceira classificação simplificada e operacional, indicada para o trabalho de campo, baseada na provável população bacilar, que, por sua vez, relaciona-se às formas clínicas. De acordo com a pesquisa de bacilos no esfregaço de linfa, a baciloscopia, realizada em vários pontos definidos, como lóbulos de orelhas, cotovelos, joelhos e lesões, associada aos critérios clínicos da classificação de Madri (1953), podendo agrupar os pacientes em paucibacilares e multibacilares, e indicar dois diferentes tipos de tratamento (SOUZA, 1997). As diferentes classificações podem ser correlacionadas como mostra a Tabela 1 e a figura 3.

**Tabela 1:** Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase (Extraída de Souza, 1997).

MADRI	Indeterminada (I)	Tuberculóide (T)	Borderline (B)	Virchowiana V
Ridley & Jopling		TT	BT* BB BL	LL
OMS	PAUCIBACILARES		MULTIBACILARES	

**TT:** Tuberculóide-tuberculóide; **\*BT:** *Borderline-tuberculóide*, embora apresente características da forma paucibacilar, operacionalmente tem sido classificada como multibacilar; **BB:** *Borderline-borderline*; *Borderline-lepromatoso* e **LL:** *Lepromatoso-lepromatoso*.



**Figura 3:** Correlação das formas clínicas na classificação de Madri com a classificação operacional usada pela OMS.

Nas lesões tuberculóides, predomina resposta do tipo *Th1* e citocinas deste padrão, tais como interleucina (IL) 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre outras. Essas moléculas estão entre as citocinas mais estudadas e ambas podem agir sinergicamente impedindo a proliferação bacilar, mas também podem se tornar lesivas ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais, na ausência de fatores regulatórios (SAMPAIO; SARNO, 1998). Nas lesões virchowianas, por outro lado, o padrão de resposta se direciona ao perfil *Th2* e citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10. As formas dimorfas, por sua vez, representam um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária, sendo que as citocinas secretadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* podem não estar relacionadas a nenhum padrão já descrito (COSTA et al., 2008).

## 2.6 - Transmissão e Tratamento

A transmissão da hanseníase ocorre por vias aéreas entre pacientes com a doença não tratada para indivíduos susceptíveis. Pacientes que apresentam em seu organismo muitos bacilos, chamados multibacilares, são a principal fonte

de infecção, sendo os seus contatos domiciliares, independente do gênero, os maiores susceptíveis ao contágio (NICCHIO et al., 2016; SALES et al., 2001). Esses pacientes abrigam grande quantidade de bacilos, tanto nas fossas nasais quanto na pele, e permanecem como fonte de transmissão da doença até que seja instituído o tratamento adequado (GROSSI ARAÚJO, 2003; LOCKWOOD; SUNNETHA, 2005). A infecção causada por este patógeno apresenta um longo período de latência, o período de incubação entre a exposição e a manifestação clínica da doença pode levar aproximadamente 4 anos em pacientes do polo tuberculóide e de até 10 anos para os do polo lepromatoso (MISCH et al., 2010). Considera-se o Homem como reservatório do bacilo e fonte de transmissão. No entanto, já se tem relatos de transmissão zoonótica de *Mycobacterium leprae* por tatus, através do consumo da carne (DA SILVA et al., 2018).

A hanseníase manteve-se sem tratamento até o ano de 1940, quando o primeiro medicamento foi desenvolvido, a dapsona, uma droga capaz de curar a doença. Hoje, o tratamento da hanseníase se dá através da Multidrogaterapia Única (MDT-U), que contém rifampicina, dapsona e clofazimina, utilizando um esquema único de tratamento para todos os pacientes de hanseníase. A classificação clínica e operacional mantém-se para fins de acompanhamento clínico do caso e da tendência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL), 2018). A duração do tratamento é de 6 e 12 meses para os pacientes paucibacilares e multibacilares, respectivamente. Essa combinação elimina os bacilos, impedindo o paciente de transmitir a hanseníase logo no início do tratamento, garantindo a cura da doença caso o esquema terapêutico seja administrado de forma correta. Caso não seja diagnosticada e tratada no início pode causar incapacidades e deformidades físicas (CUNHA et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1982).

## 2.7 - Resposta imune ao *Mycobacterium leprae*

A polarização da resposta imune específica à *M. leprae* é importante na determinação da forma clínica. Ambas as respostas imunes, inata e adquirida estão envolvidas na defesa contra *M. leprae*. E é a interação inicial entre a

micobactéria e a resposta imune inata do hospedeiro que afeta o crescimento inicial e o estabelecimento da infecção, potencialmente influenciando o tipo de resposta imune adaptativa induzida contra a infecção (FONSECA et al., 2017; NATH; SAINI; VALLURI, 2015). A primeira interação entre *M. leprae* e o Homem é mediada por receptores de superfície, os Toll-like receptors (TLR), que são indispensáveis para o reconhecimento de antígenos pelas células dendríticas e macrófagos (BRIGHTBILL et al., 1999; FONSECA et al., 2017; MENDONÇA et al., 2008). Dos TLRs que já foram identificados, os heterodímeros TLR2-TLR1, os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes para o reconhecimento de micobactérias, especialmente o TLR-2, que são ativados por lipoproteínas do *M. leprae* (MENDONÇA et al., 2008). Após a ativação inicial pelos peptídeos imunogênicos apresentados no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) por células apresentadoras de antígenos (APC), os linfócitos T *helper* podem se diferenciar em duas grandes populações de células fenotipicamente distintas, *Th1* e *Th2* (BIEDERMANN; RÖCKEN; CARBALLIDO, 2004; FONSECA et al., 2017).

IL-12 é produzida pelos macrófagos ativados e células dendríticas e estimula a produção de *IFN-γ* e induz a diferenciação de células *Th* para se tornarem células *Th1* que induz os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo, controlando assim a evolução da doença. As células *Th1* produzem caracteristicamente Interleucina-2 (IL-2) e Interferon-gamma (*IFN-γ* que induzem a ativação dos macrófagos; e são muito efetivas no controle da infecção contra patógenos intracelulares (BIEDERMANN; RÖCKEN; CARBALLIDO, 2004). Em alguns estudos realizados com o *M. tuberculosis*, os TLRs têm sido apontados como necessários para a produção de IL-12, citocina pró-inflamatória responsável pela indução da imunidade celular (*Th1*), assim como de TNF- $\alpha$ , citocina envolvida na ativação celular e formação do granuloma, que também está relacionada com a destruição tecidual associada aos surtos reacionais da hanseníase (MENDONÇA et al., 2008).

As formas clínicas da hanseníase são de acordo com o padrão de resposta estabelecido, resposta imune resistente com predominância de mecanismos de defesa, ou suscetível, com disseminação da doença (GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). Células T do tipo *Th1* produzem IL-2 e *IFN-γ*, aumentam a imunidade mediada por células. *IFN-γ* ativa macrófago e IL-

2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais branda ou cura. Os pacientes com a forma tuberculóide da doença apresentam forte resposta imune celular contra *M. leprae*, com poucas lesões e estas bem delimitadas (SILVA et al., 2015). Nesta forma da doença, citocinas como *IFN-γ*, IL-2, linfotóxina- $\alpha$  e TNF- $\alpha$  são secretadas nas lesões, resultando em intensa atividade fagocítica. *IFN-γ* tem capacidade de estimular macrófagos a matar ou restringir a proliferação de micobactérias (NATHAN et al., 2009). IL-2 atua na defesa do hospedeiro, pois tem capacidade de induzir a expansão clonal de células T ativadas e aumentar a produção de *IFN-γ* (KASAHARA et al., 1983). TNF- $\alpha$ , outra citocina comum do padrão de resposta *Th1* é capaz de ativar macrófagos para destruição do patógeno intracelular e aumentar os efeitos de *IFN-γ* (BERMUDEZ; YOUNG, 1988; KINDLER et al., 1989; SOUZA; PEREIRA, 2007). Macrófagos sofrem influência dessas citocinas e também de linfócitos e formam granulomas bem definido (ROACH et al., 2002). Os linfócitos TCD4+ e TCD8+ são encontrados nas áreas mais interna e externa respectivamente (MODLIN, 1994).

Em contraste, as células *Th2*, predominância do tipo de resposta imune em pacientes do polo lepromatoso, secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 como citocinas chave e aumentam a resposta humoral (BIEDERMANN; RÖCKEN; CARBALLIDO, 2004; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002; MODLIN, 1994). Esta forma clínica é caracterizada por pouca formação de granuloma (LOCKWOOD; SUNNETHA, 2005; MENDONÇA et al., 2008). Consequentemente, ocorre proliferação do bacilo, com a ocorrência de muitas lesões e infiltrações disseminadas na pele e nos nervos (SILVA et al., 2015). Este padrão de resposta contribui para a falha na imunidade celular e na ativação de macrófagos (SIELING; MODLIN, 1992). Na pele destes pacientes, encontra-se macrófagos infectados com muitas bactérias, mas poucos linfócitos TCD4+ e TCD8+, e nenhum granuloma organizado (MODLIN, 1994; SIELING; MODLIN, 1994). A IL-4 pode induzir proliferação bacteriana, pois bloqueia a proliferação de células T estimuladas por IL-2, inibe a ativação de monócitos mediada por *IFN-γ* e também a produção de TNF- $\alpha$  (SIELING; MODLIN, 1994). Outra citocina característica do padrão de resposta *Th2*, a IL-10, também é reconhecidamente uma citocina imunossupressora (YAMAMURA et al., 1991).

Células *Th1*, ao contrário de células *Th2*, podem orquestrar respostas imunes efetivas contra bactérias intracelulares. Portanto, apenas as células *Th1* medeiam respostas imunes que podem controlar a hanseníase (BIEDERMANN; RÖCKEN; CARBALLIDO, 2004). Cursos progressivos ou mesmo fatais de doenças infecciosas provocadas por parasitas intracelulares estão associados com uma resposta imunitária dominada pelas células *Th2*, tanto em humanos como em murinos (YAMAMURA et al., 1991). O equilíbrio das respostas *Th1/Th2* sozinho, no entanto, não pode explicar completamente a resposta na hanseníase. Outros subconjuntos de células T, como células T reguladoras e *Th17*, foram identificados como tendo papéis importantes na determinação da imunidade do hospedeiro (FONSECA et al., 2017). *Th17* aumenta a resposta de células *Th1* e tem sido associado a um efeito protetor a patógenos intracelulares (SANTOS et al., 2017; TARIQUE et al., 2017).

Em torno de 30-50% dos pacientes podem ocorrer reações no curso da doença. Essas reações são classificadas em dois tipos, reações de Tipo I, também conhecidas como reação de reversão (RR) e reação de Tipo II, conhecida como eritema nodoso leproso (ENL) (FONSECA et al., 2017). Na RR ocorre uma resposta inflamatória súbita, geralmente no início do tratamento. A ENL, geralmente, é iniciada por deposição de complexos imunes e ativação da cascata do complemento, resultando em vasculite ou uma reação de hipersensibilidade tipo III.

## 2.8 – Gene *P2RX7* e o receptor purinérgico P2X7

O gene *P2RX7* está localizado no cromossomo 12 (q240), na posição 121,570,622-121,624,354 (KENT et al., 2002). Esse gene codifica o receptor P2X7 que é expresso em células hematopoiéticas, mesenquimais, epiteliais e linhagens neurais, que tem um papel crucial na imunidade, inflamação, função neurológica, homeostase óssea, e neoplasia. O gene do receptor purinérgico P2X7 é altamente polimórfico, com vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que afetam a função desse receptor (BAHARI et al., 2013). Vários estudos relataram SNPs de *P2RX7* que resultaram em perda ou redução da função do receptor (TEKIN et al., 2010). O SNP rs3751143 do gene *P2RX7* é um polimorfismo missense onde ocorre a troca do nucleotídeo adenosina (A) para

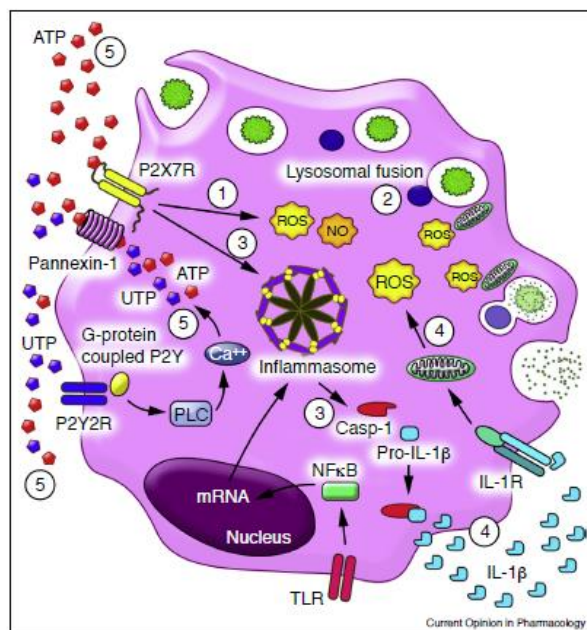
citossina (C), rs3751143 A>C. Essa troca modifica o aminoácido na proteína final (p.Glu496Ala) e gera um receptor não funcional (GU et al., 2001). Os monócitos de indivíduos homocigotos para o alelo C expressam receptores não funcionais, enquanto os heterocigotos expressam metade da funcionalidade de P2X7 comparada com os homocigotos A (GU et al., 2001). Polimorfismos de perda funcional levam com a redução da função P2X7 ao comprometimento da função induzida por ATP na morte micobacteriana dentro de macrófagos (SUN et al., 2010). Este polimorfismo foi associado à suscetibilidade à tuberculose em um estudo de coorte em uma população chinesa (WU et al., 2015) e em população iraniana (AMIRI et al., 2018), além de outras doenças, como febre Q crônica (JANSEN et al., 2019) e osteoporose em mulheres na pós-menopausa (WANG et al., 2018; XU et al., 2017).

Outro polimorfismo no gene *P2RX7*, rs1718119, onde o alelo G muda para o alelo A, confere ganho de função (ROGER et al., 2010). rs1718119 G>A modifica o aminoácido na proteína codificada (p.*Thr348Ala*). O alelo G foi associado a sinais clínicos de toxoplasmose em uma população norte-americana (JAMIESON et al., 2010). Por outro lado, o alelo A foi associada à retinocoroidite em uma população brasileira, onde foi fortemente protetor (JAMIESON et al., 2010). Em uma população chinesa, o alelo A foi associado a um risco reduzido de tuberculose (ZHENG et al., 2017).

P2X7 pertence a uma família de receptores purinérgicos P2. Os receptores P2 se dividem em P2X, os ionotrópicos e os P2Y, acoplados a proteína G (EBERHARDT et al., 2022). Os receptores P2X são ativados principalmente por ATP, enquanto os receptores P2Y são ativados de maneiras diferentes, por exemplo ADP, UDP e UTP, enquanto aqueles ativados por ATP são os P2Y2 e P2Y11 (COUTINHO-SILVA; SAVIO, 2021). ATP no espaço extracelular pode estimular os receptores P2X ou P2Y para desencadear uma resposta inflamatória (EBERHARDT et al., 2022).

O receptor P2X7 tem múltiplas respostas inflamatórias e imunológicas e suas propriedades conhecidas são a formação de poros e a abertura do canal catiônico. A ativação de P2X7 por trifosfato de adenosina (ATP) faz com que ocorra uma abertura imediata de um canal seletivo de cátions, o que permite o influxo de  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{Na}^+$  e o efluxo de  $\text{K}^+$ . Este processo resulta na ativação de inflamassoma, indução da cascata de caspase e secreção de IL-1 $\beta$  e (**Figura 4**)

(DI VIRGILIO et al., 2017). O receptor P2X7 detecta ATP liberado durante estresse ou morte celular e ativa o inflamassoma NLRP3, levando à secreção de IL-1 $\beta$  e IL-18 e morte celular por piroptose. Notavelmente, estímulos prolongados do receptor P2X7 induzem a morte celular necrótica devido à formação de grandes poros na membrana celular (ADINOLFI et al., 2005).



**Figura 4:** Ativação do receptor P2X7 por ATP induz (1) formação de ROS, (2) fusão lisossomal, (3) ativação do inflamassoma e ativação de caspase-1, (4) liberação de IL-1 $\beta$  maduro. Extraída de Sávio et al., 2019.

A interleucina-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória primária cujos níveis locais e circulantes são fortemente regulados para prevenir a ativação aberrante de vias que podem levar a doenças inflamatórias crônicas. Em resposta a várias moléculas de padrão molecular associado a patógenos (PAMP) que têm como alvo TLR, IL-1 $\beta$  produzida e se acumula como uma procitocina de 33 kDa biologicamente inativa (pró-IL-1 $\beta$ ) no citoplasma de monócitos e macrófagos. A conversão para a forma biologicamente ativa de 17 kDa requer maturação proteolítica pela caspase-1, que por sua vez é regulada pela montagem de complexos multiproteicos denominados inflamassomas (MOREIRA-SOUZA et al., 2017).

Os inflamassomas são complexos de proteínas multiméricas que produzem caspase-1 ativada por clivagem de procaspase-1 expressa no citoplasma, e cuja ativação desencadeia a maturação de IL-1 $\beta$  / IL-18. O inflamassoma NLRP3 é formado por domínio de ligação a nucleotídeos e



proteínas contendo repetição de leucina (NLR), uma proteína espectral associada à apoptose contendo um adaptador de proteína de domínio de caspase de recrutamento (ASC) e um zimógeno inativo, procaspase-1 (Casp1). Em camundongos, a ativação do inflamassoma NLRP3 se dá pelo reconhecimento de um padrão molecular associado ao patógeno por moléculas de superfície celular conhecidas como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e leva à transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Em seguida, a ativação dos PRRs citosólicos resulta na oligomerização de componentes inflamassomáticos e clivagem da procaspase-1 para caspase-1 ativa. A caspase-1 ativa cliva as citocinas pró-inflamatórias da família IL-1 em suas formas bioativas IL-1 $\beta$  / IL-18 e induz a piroptose. Os inflamassomas envolvidos na ativação da caspase-1 são conhecidos como inflamassomas canônicos, enquanto aqueles relacionados à caspase-11 (em camundongos) ou caspase-4/5 (em humanos) são conhecidos como inflamassomas não canônicos (MOREIRA-SOUZA et al., 2017).

Estudos mostraram que a ativação de P2X7 potencializou morte de patógenos intracelulares, como micobactérias (MOLLOY; LAOCHUMROONVORAPONG; KAPLAN, 1994), clamídia (COUTINHO-SILVA et al., 2003), *Toxoplasma* (CORRÊA et al., 2010a; LEES et al., 2010), e *Leishmania* (CHAVES et al., 2009) principalmente através da facilitação da fusão e formação do fagolisossoma e aceleração da acidificação do vacúolo parasitóforo, levando à eliminação microbiana (MORANDINI; SAVIO; COUTINHO-SILVA, 2014). Um estudo recente de SALLES et al., (2017) também demonstrou um papel fundamental do P2X7 na resposta contra o parasita *Plasmodium chabaudi*, mostrando que camundongos nulos *P2RX7* são mais suscetíveis à infecção por malária devido à alteração da diferenciação *Th1*.

## 2.9 - Macrófagos Derivados da Medula Óssea

Macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) são macrófagos primários obtidos por diferenciação *in vitro* de células de medula óssea na presença de fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (ASSOUVIE; DALEY-BAUER; ROUSSELET, 2018). A medula óssea contém diferentes conjuntos de células-tronco pluripotentes que dá origem as células-tronco

hematopoiéticas, que podem se diferenciar em mielóides e linfóides, e as menos abundantes, células-tronco mesenquimais não hematopoiéticas (MSCs) (ARNER; RYDÉN, 2017). Entre as células da linhagem mielóide, os macrófagos são as células mais diferenciadas e foram amplamente estudadas em termos de fenótipo e função modificada pelo sistema purinérgico (EBERHARDT et al., 2022).

Os macrófagos são caracterizados por suas atividades fagocitárias e secretoras para manter a integridade ou realizar o reparo dos tecidos danificados. São células imunes inatas que desempenham um papel proeminente na defesa do hospedeiro em virtude de sua capacidade de reconhecer, fagocitar e matar rapidamente patógenos e eliminar células apoptóticas, realizando as funções criticamente necessárias para a manutenção da homeostase. A maioria dos macrófagos teciduais são derivados de precursores monocíticos do sangue, que na sua vez estão sendo formados na medula óssea (REN et al., 2021)

### 3 JUSTIFICATIVA

O receptor P2X7 é altamente expresso na superfície de macrófagos e tem sido implicado em processos fisiológicos e patológicos relacionados na eliminação de patógenos intracelulares. Conseqüentemente, polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que diminuem a função do receptor, reduzem também a capacidade de macrófagos humanos de matar micobactérias patogênicas, como *Mycobacterium tuberculosis*. O papel da sinalização purinérgica através do receptor P2X7 na hanseníase ainda não foi elucidado. Este trabalho visa estudar a associação de polimorfismo no gene *P2RX7* e hanseníase em pacientes humanos e avaliar impacto de sinalização via receptor P2X7 nos processos pró-inflamatórios mediados pelos macrófagos estimulados pelo *Mycobacterium leprae*. Este receptor tem importante função para outras doenças infecciosas e carecia saber a relevância dele também no contexto da hanseníase.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 – Objetivo geral

Avaliar a associação de polimorfismos no gene P2X7 com a hanseníase, bem como entender como alterações funcionais neste receptor poderiam influenciar na responsividade de macrófagos murinos nocautes para P2X7 frente a infecção por *M. leprae*.

### 4.2 – Objetivos específicos

1 - Avaliar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único no gene *P2RX7* com a hanseníase;

2- Determinar a presença da associação a partir de modelos de análises multivariadas, ajustado para idade, sexo e formas clínicas da doença usando Graph Pad Prism;

3- Avaliar efeitos pro-inflamatórios de estimulação dos macrófagos, que expressam receptor P2X7 funcional (C57Bl/6 WT) ou não funcional (C57Bl/6 P2X7<sup>-/-</sup>), pelo *M. leprae* irradiado, medindo produção de citocinas, NO e ROS;

4 - Avaliar impacto de modulação da sinalização através de receptor P2X7 por tratamento pelos agonistas e inibidor na produção de mediadores pro-inflamatórios pelos macrófagos.

## 5 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### 5.1 Capítulo 1: Associação de polimorfismo no gene P2X7 e Hanseníase em humanos - Artigo publicado na revista *Frontiers in Genetics*

SOUZA, R. DA C. et al. Associations Between the Purinergic Receptor P2X7 and Leprosy Disease. *Frontiers in Genetics*, v. 12, p. 1767, 2 nov. 2021.



# Associations Between the Purinergic Receptor P2X7 and Leprosy Disease

Rebeka da Conceição Souza<sup>1</sup>, Thaís Louvain de Souza<sup>2,3</sup>,  
Cristina dos Santos Ferreira<sup>3,4</sup>, Leticia Silva Nascimento<sup>1</sup>, Edilbert Pellegrini Nahn Jr.<sup>2</sup>  
and Alba Lucinia Peixoto-Rangel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil, <sup>2</sup> Faculdade de Medicina de Campos, Campos dos Goytacazes, Brazil, <sup>3</sup> Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular, Laboratório de Biotecnologia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil, <sup>4</sup> Laboratório de Bioinformática, Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Massimo Zeviani,  
University of Padua, Italy

### Reviewed by:

Rupendra Jadhav,  
The Institute of Science, Mumbai,  
India

Nora Cardona-Castro,  
Colombian Institute of Tropical  
Medicine (ICMT), Colombia

### \*Correspondence:

Alba Lucinia Peixoto-Rangel  
alba@uenf.br

### Specialty section:

This article was submitted to  
Genetics of Common and Rare  
Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

Received: 25 June 2021

Accepted: 30 August 2021

Published: 02 November 2021

### Citation:

Souza RdC, Louvain de Souza T,  
Ferreira CdS, Nascimento LS,  
Nahn Jr EP and Peixoto-Rangel AL  
(2021) Associations Between  
the Purinergic Receptor P2X7  
and Leprosy Disease.  
Front. Genet. 12:730991.  
doi: 10.3389/fgene.2021.730991

Leprosy is an infectious disease still highly prevalent in Brazil, having been detected around 27,863 new cases in 2019. Exposure to *Mycobacterium leprae* may not be sufficient to trigger the disease, which seems to be influenced by host immunogenetics to determine resistance or susceptibility. The purinergic receptor P2X7 plays a crucial role in immunity, inflammation, neurological function, bone homeostasis, and neoplasia and is associated with several infectious and non-infectious diseases. Here, we first compare the *P2RX7* expression in RNA-seq experiments from 16 leprosy cases and 16 healthy controls to establish the magnitude of allele-specific expression for single-nucleotide polymorphisms of the gene *P2RX7* and to determine the level of gene expression in healthy and diseased skin. In addition, we also evaluated the association of two *P2RX7* single-nucleotide polymorphisms (c.1513A>C/rs3751143 and c.1068A>G/rs1718119) with leprosy risk. The expression of *P2RX7* was found significantly upregulated at macrophage cells from leprosy patients compared with healthy controls, mainly in macrophages from lepromatous patients. Significant risk for leprosy disease was associated with loss function of rs3751143 homozygous mutant CC [CC vs. AA:  $p = 0.001$ ; odds ratio (OR) = 1.676, 95% CI = 1.251–2.247] but not with heterozygous AC (AC vs. AA:  $p = 0.001$ ; OR = 1.429, 95% CI = 1.260–1.621). Contrary, the polymorphic A allele from the gain function of rs1718119 was associated with protection for the development of leprosy, as observed in the dominant model (AA + AG × GG  $p = 0.0028$ ; OR = 0.03516; CI = 0.1801–0.6864). So, our results suggest that the functional P2X7 purinergic receptor may exert a key role in the *Mycobacterium* death inside macrophages and inflammatory response, which is necessary to control the disease.

**Keywords:** leprosy, *P2RX7*, c.1513A>C, rs3751143, c.1068A>G, rs1718119, RNA-seq

**Abbreviations:** ASE, allele-specific expression; ATP, adenosine triphosphate; DEG, differentially expressed genes; LL, lepromatous leprosy; MB, multibacillary; *P2RX7*, purinergic receptor P2X7 gene; P2X7, purinergic receptor P2X7 protein; PB, paucibacillary; SNP, single-nucleotide polymorphism; *Th1*, T helper 1; *Th2*, T helper 2; TL, tuberculoid leprosy.

## INTRODUCTION

Leprosy, caused by *Mycobacterium leprae*, is a disease that affects the mucosa, skin, and peripheral nerves. It is highly prevalent in Brazil and represents a public health problem, with 27,863 new cases in 2019. The country ranks second in the global incidence of leprosy, behind India [World Health Organization [WHO], 2020]. The disease is classified by diversification into the clinical course of the infection, ranging from a paucibacillary disease, in which few bacilli are present, to a multibacillary disease, in which a large bacillary load is present in lesions (Goulart et al., 2002). *M. leprae* is an obligatory intracellular bacillus and preferably infects macrophages and Schwann cells (Rambukkana, 2001).

Based on the natural history of the disease, it is observed that there is a form of partial resistance to *M. leprae* infection, tuberculoid leprosy (TL), in which the manifestations are related to the exacerbation of the cellular immune response (Th1), well-defined granuloma formation, limitation of lesions, and complete destruction of bacilli. At the other pole is the high susceptibility form, lepromatous leprosy (LL), which is characterized by a deficiency of cellular immune response and consequent polarization of the immune response to the humoral pattern (Th2), with excessive bacillary multiplication and dissemination of the disease for viscera and nervous tissue. It is a form of epidemiological importance because bacilli are massively present in skin lesions (Foss, 1997). Among these two polar forms are the unstable forms of the disease (dimorphic and indeterminate), with a broad spectrum of clinical manifestations, depending on the potentiality of the host cellular immune response to the parasite (Foss, 1997).

The susceptibility phenotype to *M. leprae* infection is complex and influenced by host and parasite factors, as well as environmental factors; however, some studies have suggested human genetic factors as being important in the acquisition of leprosy and the clinical course of the disease (Cardoso et al., 2010). Genetic changes can modify the transcription levels of a gene, and polymorphisms can occur not only in a protein-coding region (exon) but also in non-coding regions (intron and promoter region of the gene) and, therefore, influence the amount or composition of the protein produced by the gene (Santos et al., 2002; Moraes et al., 2004). Several genes have been associated with leprosy and are involved in susceptibility to leprosy in two different stages: leprosy *per se* and the development of different clinical forms (Sapkota et al., 2010; Silva et al., 2015; Tarique et al., 2015; Singh et al., 2018).

The purinergic receptor P2X7 (*P2RX7*) gene is located on the human chromosome 12 (q24O) at position 121,132,819–121,186,551 (GRCh38/hg38). This gene encodes the P2X7 receptor expressed in hematopoietic, mesenchymal, epithelial, and neural lineage cells. It plays a crucial role in immunity, inflammation, neurological function, bone homeostasis, and neoplasia (Wu et al., 2015). Activation of P2X7 by adenosine triphosphate (ATP) causes an immediate opening of a selective cation channel, allowing  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  influx

and  $\text{K}^{+}$  efflux to occur. This process results in induction of the caspase cascade, apoptosis, and activation of phospholipase D. Phospholipase D promotes phagosome–lysosome fusion and causes mycobacterial death (Bahari et al., 2013; Yi et al., 2014).

Purinergic receptor P2X7 gene is highly polymorphic, with several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting the function of this receptor (Bahari et al., 2013). Several studies have reported *P2RX7* SNPs that resulted in loss or reduction of receptor function (Tekin et al., 2010). The SNP rs3751143 of the *P2RX7* gene is an exon polymorphism where the adenosine (A) changes to the cytosine (C). This exchange modifies the amino acid in the encoded protein (p.Glu496Ala) and generates a non-functional receptor (Gu et al., 2001). It was observed that monocytes from individual homozygous for the polymorphic C allele expressed non-functional receptors, whereas heterozygous individuals presented half of the *P2RX7* expression compared with functional protein (Gu et al., 2001). Functional loss polymorphisms lead not only to the reduction of P2X7 function but also to the impairment of ATP-induced mycobacterial death inside macrophages (Sun et al., 2010). This polymorphism was associated with susceptibility to tuberculosis in a cohort study of a Chinese population (Wu et al., 2015) and an Iran population (Amiri et al., 2018), in addition to other diseases, such as chronic Q fever (Jansen et al., 2019) and osteoporosis in postmenopausal women (Xu et al., 2017; Wang et al., 2018).

Another *P2RX7* polymorphism, rs1718119, confers function gain (Roger et al., 2010). It is a polymorphism where the guanosine (G) allele changes to the A allele. This exchange modifies the amino acid in the encoded protein (p.Thr348Ala). The G allele was associated with clinical signs of toxoplasmosis in a North American population. On the other hand, the allele A was associated with retinochoroiditis in a Brazilian population, where it was strongly protective (Jamieson et al., 2010). In a Chinese population, allele A was associated with a reduced risk for active tuberculosis (Zheng et al., 2017).

Early experiments showed that P2X7 activation potentiated killing of intracellular pathogens such as mycobacteria (Molloy et al., 1994), *Chlamydia* (Coutinho-Silva et al., 2003), *Toxoplasma* (Corrêa et al., 2010; Lees et al., 2010), and *Leishmania* (Chaves et al., 2009) mainly through facilitation of phagolysosome fusion and acceleration of acidification of parasitophorous vacuole, thus leading to the elimination of the microbial load (Morandini et al., 2014). A recent study by Salles et al. (2017) also demonstrated a key role of P2X7 in the response against the parasite *Plasmodium chabaudi*, showing that *P2RX7* null mice are more susceptible to malaria infection due to altered Th1 differentiation. Despite reports strongly suggesting that P2X7 is necessary for the development of cell-mediated acquired immunity for other infectious diseases (Corrêa et al., 2010; Lees et al., 2010; Salles et al., 2017), the type of immunity that is protective against *M. leprae*, there are no studies on the genetic association between leprosy and SNPs of *P2RX7*. In this work, we intend to fill this gap by investigating *P2RX7* polymorphisms and P2X7 messenger RNA expression levels (*in silico*) in Brazilian leprosy patients.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects and Samples

Patients and healthy controls were recruited in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, southeast Brazil (21°45'15"S and 41°19'28"W, 13 m above sea level). A total of 334 subjects were included in this study: 171 (51.2%) patients and 163 (48.8%) healthy controls (**Supplementary Table 1**). Leprosy patients were grouped according to the WHO classification (Pardillo et al., 2007) in multibacillary (MB) or paucibacillary (PB) leprosy and Madrid classification (Davison et al., 1960) in LL, dimorph leprosy, indeterminate leprosy, and TL for the analysis, selected from Hansen Health Program from Campos dos Goytacazes Health Secretariat, which acts as a reference center. Healthy controls were unrelated individuals (volunteers) recruited from the local blood bank (hemocenter). All participants were clinically diagnosed according to the Brazilian's Ministry of Health Guidelines, and the patient's diagnosis was complemented with a bacilloscopy of suspected tissue lesions. Blood samples were collected by vacuum venipuncture in a tube containing citrate for genomic DNA extraction.

### Allele-Specific Expression Analysis

We used primary (unprocessed) RNA sequence data from the Sequence Read Archive public experiments. The biological samples included: primary healthy skin (**Supplementary Dataset 1**) (GEO BioProject PRJNA301173) from the study by Gupta et al. (2016) and skin patient lesions infected with *M. leprae* (**Supplementary Dataset 1**) from the study by Montoya et al. (2019) (GEO BioProject PRJNA518047). The second samples with lesions include de LL and TL. To estimate the extent and magnitude of allele-specific expression (ASE), we implemented PipASE (da Silva Francisco Junior et al., 2019) computational pipeline to identify, quantify, and sort out ASE sites in the transcriptome data. PipASE scans genome-wide for expressed single nucleotide variants in high-quality, aligned reads. They processed the RNA-seq data according to the best practice guidance using the ASEReadCounter tool from the open-source Genome Analysis Toolkit (GATK, v3.8), instrumented for variant discovery in high-throughput sequencing data (McKenna et al., 2010; DePristo et al., 2011; Van der Auwera et al., 2013). For the assessment of ASE, the read counts from the replicas were amalgamated, and Q1 values across each informative expressed single nucleotide variant site were calculated for all biosamples. The ASE across imputed heterozygous SNP sites was calculated as the difference of RNA-seq read counts between the two alleles, using the equation  $ASE = |0.5 - \text{Ref\_allele\_read count} / (\text{Ref\_allele\_read count} + \text{Alt\_allele\_read count})|$ . The allelic expression imbalance value per site (ranging between 0 and 0.5) is, therefore, a measure of departure from the expected Mendelian 1:1 allelic expression ratio. The ASE is then sorted like monoallelic expression, biallelic expression, or imbalance.

### Data Processing of Differentially Expressed Genes

Based on the finding of Montoya et al. (2019), we explored the differentially expressed genes (DEGs) in *M. leprae*-infected

patients (GEO BioProject PRJNA518047) in comparison with healthy controls (GEO BioProject PRJNA301173). Significant values for DEGs in the three comparison groups, LL vs. Ctrl, TL vs. Ctrl, and TL vs. LL, were analyzed with DESeq2 (Love et al., 2014). The adjusted *p*-values were used to decrease the false-positive rate using Benjamini and Hochberg's (BH) false discovery rate (FDR) method by default. Subsequently, log<sub>2</sub>(fold change) was calculated. An adjusted *p*-value < 0.05 was selected as a threshold value for DEG screening. The downregulated DEG signatures are modules of molecular identity to the infection success, as predicted by functional and literature enrichment analysis using gProfiler (Raudvere et al., 2019). The gene ontology analysis of unambiguous gene terms revealed DEG enrichment (significance threshold BH correction FDR *p* < 0.02) in cellular components and bioprocesses.

### Single-Nucleotide Polymorphism Selection

The selection of SNPs was based on the analysis of RNA-seq variants. After identifying the most frequent SNPs of the *P2RX7* gene, those associated with the infectious disease were selected. Another criterion for selecting the SNP was the minor allele frequency greater than 0.10 available in the dbSNP.<sup>1</sup> For that, they were used as references as European populations (Central European University) and Africans (Yoruba in Ibadan, Nigeria) due to being the main genetic contributors of the population of the North of Rio de Janeiro. Full details of these SNPs are in **Supplementary Table 2**.

We interrogated the deleterious profiles for the SNPs shared between the two conditions (lesions and control). The variant pathogenicity was predicted using computational tools such as Sorting Intolerant from Tolerant (Ng and Henikoff, 2003) and Polymorphism Phenotyping (Adzhubei et al., 2013) according to the Ensembl Variant Effect Predictor database (McLaren et al., 2016).

### DNA Extraction

Genomic DNAs were prepared from blood samples using a commercial Illustra blood genomic Prep Mini Spin kit (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. Genomic DNA was quantified using a *NanoDrop* 2000c Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) and kept frozen at -20 C until used. The genomic DNAs were used for multiplex polymerase chain reaction (PCR) experiments and SNP genotyping.

### Multiplex Polymerase Chain Reaction and Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping

All oligonucleotide primers used in this study are listed in **Supplementary Table 3**. The SNP rs3751143 A>C and SNP rs1718119 G>A were genotyped by SNaPshot Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States). Amplification (multiplex PCR) was performed with the following concentration

<sup>1</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>



of reagents to a final volume of 12.5  $\mu$ l: 2-mM magnesium chloride; 0.2-mM deoxyribonucleotide triphosphates, 15-mM Tris-hydrochloride, 50-mM potassium chloride; 10 pM of primer pair rs1718119, 40 pM of primer pair rs3751143, and 30 ng/ $\mu$ l of genomic DNA. Multiplex PCR was carried out using the following parameters: initial denaturation of 5 min at 95°C followed by 35 cycles of denaturation of 95°C for 30 s, annealing at 70°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, and a final polymerization at 72°C for 10 min. The reactions were processed in the GeneAmp® 9700 or Veriti® 96-Well VeriFlex thermocycler (Applied Biosystems).

The amplification products were purified using a mixture of 0.4 U of exonuclease I and 1 U of shrimp alkaline phosphatase. For each 3- $\mu$ l aliquot of the amplified products, 1.5  $\mu$ l of the enzyme mixture and 0.5  $\mu$ l of the buffer solution were used. The reactions were carried out under the following conditions: 37°C for 1 h and 75°C for 15 min in the GeneAmp® 9700 thermal cycler.

Sequencing by extension of a single nucleotide was performed using the SNaPshot multiplex kit (Applied Biosystems) in a final volume of 5  $\mu$ l containing 2  $\mu$ l of purified multiplex PCR product, 0.5  $\mu$ l mixture of mini-sequencing primers (2 pM each), and 2.5  $\mu$ l of SNaPshot multiplex ready reaction mix containing fluorescent dideoxynucleotides triphosphates. The reactions were carried out in the GeneAmp® 9700 thermal cycler under the following conditions: 25 cycles of 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 30 s.

Single nucleotide extension sequencing products were purified using 0.3 U of the shrimp alkaline phosphatase enzyme. The reactions were carried out in the GeneAmp® 9700 thermal cycler under the following conditions: 37°C for 30 min and 75°C for 15 min.

After purification, 0.54- $\mu$ l aliquots of the products were added to a mixture of 9.45- $\mu$ l formamide (Hi-Di Formamide) (Applied Biosystems) and 0.1  $\mu$ l of GeneScan 120LIZ Size Standard (Applied Biosystems) and subjected to capillary electrophoresis using ABI 310 Applied Biosystems platform (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) calibrated with the Standard Set DS-02 Applied Biosystems Matrix.

The data analysis was performed using GeneScan® Analysis and Genotyper® software version 3.7 packages and GeneMapper® ID version 3.2 (Applied Biosystems from Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States).

## Statistical Analysis

The Student and  $\chi^2$  tests were used to compare the age and sex among patients and control subjects, respectively. The genotype and allele frequencies were determined using Power Stat v.12. The  $\chi^2$  test was applied for each population (leprosy patients and control subjects) to investigate the Hardy-Weinberg equilibrium.  $\chi^2$  test was used for comparison of the genotype and allele frequencies, respectively, between leprosy patients and control subjects and also between the PB and MB patients. The odds ratio (OR) and  $p$ -values were calculated at GraphPad Prism 5.0 software, considering  $p$ -values less than 0.05 as significant.

## RESULTS

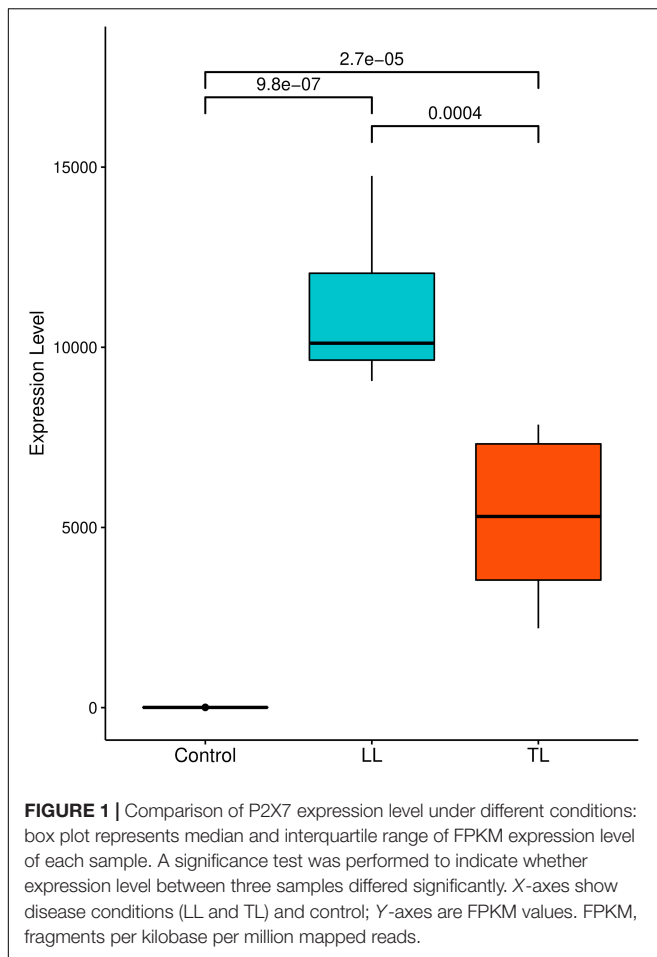
### Differentially Expression Analysis

The genes that were consistently different from normal tissue (paired  $t$ -test,  $p < 0.05$ ) were selected as DEG (**Supplementary Table 4**). As a result, 1,937 DEGs were chosen as genes that were upregulated in the *M. leprae*-infected tissue ( $\log_2$ FoldChange  $> 1$  and  $p$ -value  $< 0.01$ ), whereas 1,444 DEGs were chosen as genes that were downregulated ( $\log_2$ FoldChange  $< -1$  and  $p$ -value  $< 0.01$ ) (**Supplementary Table 4**). Among the upregulated genes were seven keratin-associated protein genes (KRTAP1-3, KRTAP3-2, KRTAP16-1, KRTAP19-1, KRTAP1-5, KRTAP5-8, and KRTAP5-7). The downregulated genes in *M. leprae*-infected tissue had cellular component relation with lysosomal membrane ( $p$ -value adj. 9.520590742324365e-21), lytic vacuole membrane ( $p$ -value adj. 9.520590742324365e-21), and lysosome ( $p$ -value adj. 7.675649093017353e-37), whereas the bioprocesses are related to immune system process ( $p$ -value adj. 4.05502263334811e-96), leukocyte mediated immunity ( $p$ -value adj. 8.673466507834307e-96) (**Supplementary Table 5**), indicating the interference of *M. leprae* in immune processes that leads to the establishment of the infection.

### Expression Profile of Purinergic Receptor P2X7 in Mycobacterium leprae-Infected Tissue

The expression of *P2RX7* calculated by the relative abundance of each transcript reported as fragments per kilobase per million mapped reads was more evident in the lesions than in the control samples. The comparison of conditions shows a significant difference between expression in the control and disease conditions with  $p$ -value  $< 9.8e-07$  for LL and  $p$ -value  $< 2.7e-05$  for TL. The expression between lesions is also evident with a higher level of expression for skin lesion LL with  $p$ -value = 0.0004 (**Figure 1**).

The *in silico* analysis using the PipASE identified 61 SNPs in the *P2RX7* gene. Of which, nine were expressed in lesions and control samples, 41 were expressed exclusively in control samples, and 11 are expressed exclusively in lesion samples. The more frequent SNPs identified in our analysis were rs1621388 (expressed in five patients with a skin lesion and three controls), rs1718119 (five patients with a skin lesion and seven control individuals), rs1718106 (four patients in skin lesion and eight individual controls), rs2230911 (only in a patient with lesion and four control individuals), rs7958311 (four patients with a skin lesion and seven control individuals), rs208294 (four patients in skin lesion and 10 control individuals), and SNP rs3751143 expressed in three patients with a skin lesion and one control individual (**Supplementary Table 6**). For SNP rs3751143, the expression profile of the patients ( $n = 3$ ) presented monoallelic expression for the reference allele A, whereas, for the control ( $n = 1$ ), the profile was monoallelic for the alternative allele C. This result is not to be compared with genotype data, until the C allele is a risk to leprosy development. For SNP rs1718119, all the control samples ( $n = 7$ ) were monoallelic in the transcriptome for the alternative allele A, whereas in the



skin lesion, the presence of both profiles [monoallelic for the alternative allele A ( $n = 2$ ) and biallelic ( $n = 3$ )] in the patients for both lesions (**Supplementary Table 7**). This result can be associated with the genotype assay until the AA genotype was strongly associated with protection for leprosy development. A larger sample of transcriptome data is needed to allow a positive association between genotyping and expression profiles of rs3751143 and rs1718119. The pathogenicity prediction of the Ensembl Variant Effect Predictor database allowed us to identify six SNPs expressed by *P2RX7* in the control and lesion samples, predictably pathogenic in the Polymorphism Phenotyping and/or Sorting Intolerant from Tolerant database. For SNP rs3751143, the allele C was considered associated with the variant risk allele (**Supplementary Table 7**).

## Subjects and Samples

The average age differs between patients and controls ( $p < 0.0001$ ). Of the patients, 110 are male, comprising 64.3% of the total value of individuals with the disease, whereas 61 are female, corresponding to 35.7%. According to the Madrid classification, the lepromatous and dimorphic clinical forms were most frequently diagnosed, with 35 and 39%, respectively (**Table 1**).

**TABLE 1 |** Characteristics of the study population.

	Patients ( $n = 171$ )	Controls ( $n = 163$ )
<b>Age (years)</b>		
Mean	$47.6 \pm 19.3$	$36.2 \pm 10.1$
<b>Sex</b>	$n$ (%)	$n$ (%)
Male	110 (64.3)	105 (64.4)
Female	61 (35.7)	58 (35.6)
<b>Operational classification</b>	$n$ (%)	
MB	126 (74)	–
PB	45 (26)	–
<b>Madrid classification</b>	$n$ (%)	
Indeterminate	9 (5)	–
Tuberculoid	36 (21)	–
Lepromatous	60 (35)	–
Dimorphic	66 (39)	–

PB, paucibacillary; MB, multibacillary; Student test for age between patients and control subjects,  $p < 0.0001$ ;  $\chi^2$  test for sex between patients and control subjects,  $p = 1$ .

Of the total samples collected from the recruited individuals, 297 of 334 were successful in the amplification and genotyping for the rs3751143, 140 in the case group and 157 in the control group. The 139 individuals in the case group were diagnosed in the clinical forms; one individual was not diagnosed in the clinical form. The 151 samples were genotyped for the rs1718119, 80 (53%) from the case group and 71 (47%) from the control group. One patient in the case group did not have the clinical form diagnosed. No deviations from Hardy–Weinberg equilibrium were observed in control groups in each polymorphism. In this study, assuming an alpha value of more than 0.05 was 0.07 for rs3751143 and 0.103 for rs1718119.

## Homozygosis of Purinergic Receptor P2X7 Gene rs3751143-C Allele Is a Risk Factor for Leprosy

The allele and genotype frequencies of the SNP rs3751143 in the *P2RX7* gene in leprosy patients and controls are shown in **Table 2**. No statistical difference was found in allele frequency between the case and control groups. However, in relation to the genotype frequency, it was observed that the CC genotype was strongly associated with leprosy development compared with the AC ( $p = 0.0271$ ; OR = 2.686; CI = 1.183–6.096) and AA genotypes ( $p = 0.0274$ ; OR = 2.42; CI = 1.140–5.138). This increased susceptibility was associated only with the C allele in homozygosis, seen in the recessive model (CC  $\times$  AC + AA  $p = 0.0132$ ; OR = 2.5; CI = 1.199–5.213), and no significance was observed considering the dominant model (CC + AC  $\times$  AA).

Considering the WHO classification, no association was found in comparing genotypes and allele frequencies between MB and PB leprosy for polymorphisms rs3751143 A > C (**Table 3**).

**TABLE 2** | Allele and genotype distribution of polymorphisms rs3751143 in the *P2RX7* gene in patients with leprosy and controls.

	Patients (140)	Control (157)	OR	95% CI	<i>p</i>
C	83	71	1.442	0.9976–2.084	0.0605
A	197	243			
CC	24	12			
AC	35	47	2.686	1.183–6.096	<b>0.0271</b>
AA	81	98	2.42	1.140–5.138	<b>0.0274</b>
CC	24	12	2.5	1.199–5.213	<b>0.0132</b>
AC + AA	116	145			
CC + AC	59	59	1.21	0.7594–1.928	0.4763
AA	81	98			

OR, Odds ratio; CI, confidence interval;  $\chi^2$  for comparison of genotype and allele frequencies between leprosy patients and control subjects and also between leprosy patients and controls subjects. The bold values represent statistical significance.

**TABLE 3** | Allele and genotype distribution of polymorphisms rs3751143 in the *P2RX7* gene between multibacillary and paucibacillary leprosy.

	MB (105)	PB (34)	OR	95% CI	<i>p</i>
C	63	20	1.12	0.6138–2.044	0.7632
A	135	48			
CC	17	6			
AC	29	6	0.5025	0.1448–1.744	0.3438
AA	58	20	0.9623	0.3487–2.656	1
CC	17	7	0.7997	0.2995–2.135	0.6166
AC + AA	82	27			
CC + AC	46	13	1.402	0.6321–3.110	0.4309
AA	53	21			

PB, paucibacillary; MB, multibacillary; OR, odds ratio; CI, confidence interval;  $\chi^2$  for comparison of genotype and allele frequencies between the PB and MB patients.

**TABLE 4** | Allele and genotype distribution of polymorphisms rs1718119 in the *P2RX7* gene in patients with leprosy and controls.

	Patients (80)	Control (71)	OR	95% CI	<i>p</i>
A	28	48	0.4154	0.2430–0.7100	<b>0.0014</b>
G	132	94			
AA	4	9			
AG	20	30	0.6667	0.1804–2.463	0.7502
GG	56	32	0.2540	0.07235–0.8914	<b>0.034</b>
AA	4	9	0.3626	0.1065–1.234	0.1446
AG + GG	76	62			
AA + AG	24	39	0.3516	0.1801–0.6864	<b>0.0028</b>
GG	56	32			

OR, odds ratio; CI, confidence interval;  $\chi^2$  for comparison of genotype and allele frequencies between leprosy patients and control subjects and also between leprosy patients and controls subjects. The bold values represent statistical significance.

**TABLE 5** | Allele and genotype distribution of polymorphisms rs1718119 in the *P2RX7* gene between multibacillary and paucibacillary leprosy.

	MB (60)	PB (19)	OR	95% CI	<i>p</i>
A	20	8	0.75	0.3001–1.875	0.6262
G	100	30			
AA	4	0			
AG	12	8	3.462	0.3437–34.86	0.3746
GG	44	11	1.333	0.1419–12.52	1.0
AA	4	0	1.754	0.1930–15.95	1.0
AG + GG	56	19			
AA + AG	16	8	0.5	0.1705–1.466	0.2548
GG	44	11			

PB, paucibacillary; MB, multibacillary; OR, odds ratio; CI, confidence interval;  $\chi^2$  for comparison of the genotype and allele frequencies between the PB and MB patients.

## rs1718119-A Allele of the Purinergic Receptor P2X7 Gene Is a Protective Factor for the Development of Leprosy

The allele and genotype frequencies of the SNP rs1718119 in the *P2RX7* gene in leprosy patients and controls are shown in **Table 4**. Statistical difference was found in allele frequency between the case and control groups. Data show that there is a protection factor associated with the polymorphic allele A ( $p = 0.0014$ ; OR = 0.4154; CI = 0.2430–0.7100). In relation to the genotype frequency, it can be observed that the AA genotype was strongly associated with protection for leprosy development compared with the GG ( $p = 0.034$ ; OR = 0.2540; CI = 0.07235–0.8914) but were not compared with the AG genotypes ( $p = 0.7502$ ; OR = 0.6667; CI = 0.1804–2.463). This protective factor is associated with the presence of allele A, as evidenced when we consider the dominant model (AA + AG  $\times$  GG  $p = 0.0028$ ; OR = 0.3516; CI = 0.1801–0.6864) but not with the recessive model (AA  $\times$  AG + GG).

Considering the WHO classification, no association was found in comparing genotypes and allele frequencies between MB and PB leprosy for polymorphisms rs1718119 G > A (**Table 5**).

## DISCUSSION

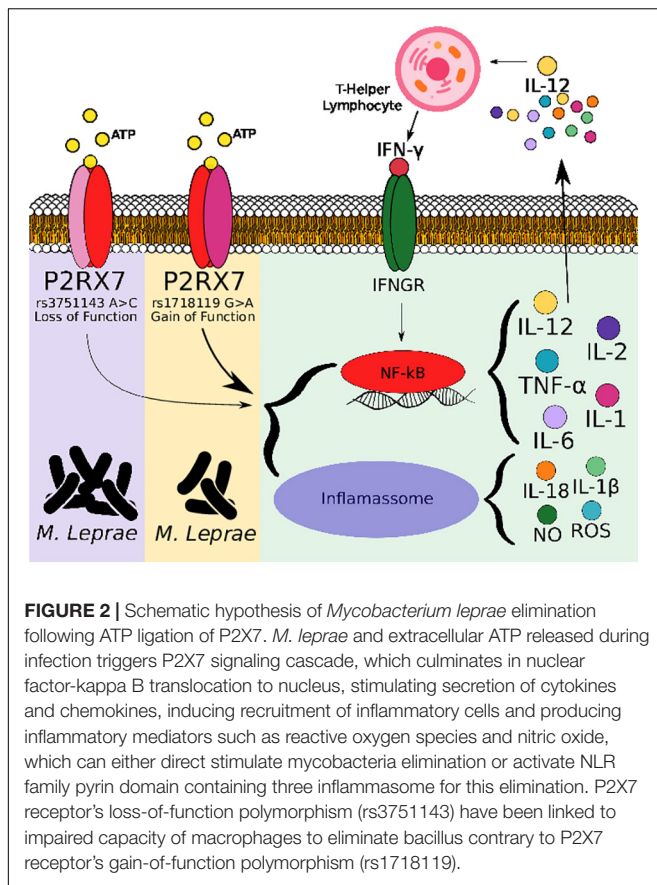
Genetic studies of the association are fundamental to elucidate the mechanisms inherent in diseases in general, whether infectious or not. The occurrence of these diseases is controlled by a genetic component associated with environmental, socioeconomic, and cultural factors, among others, resulting in integrated actions that might modify the expression of a varied number of genes. Montoya et al. (2019) have established that the transcriptional profiles of some immune genes linked to antibody expression in infected patients may reflect the variation of clinical disease manifestations (Montoya et al., 2019). Based on their finding, we further explored the DEGs in *M. leprae*-infected patients, which differed from healthy controls. One of the genes that have its expression modified is the *P2RX7*, present in studies of RNA-seq with higher expression level in lesion tissue than in control samples (**Figure 1**); this evidence indicates that the infection modulates the expression of various kinds of genes. The gene *P2RX7* was considerably pathogenic and may be related to gain or loss of pathogenicity, according to Landrum et al. (2016) and Kaminsky et al. (2011) analyzed in integration with the ClinVar and ClinGen CNV browsers.

*In silico* analysis of variants using studies of RNA-seq, the polymorphism rs1718119 was seen in patients and control; however, all the control samples were monoallelic in the transcriptome for the alternative allele A. These data are similar to this study, where individuals with allele A were less likely to develop leprosy. On the other hand, the polymorphism rs3751143 showed contrasting results, with the allele C in monoallelic status in control individuals and allele A (monoallelic) in patients with leprosy. However, some factors need to be considered with this result. The analysis considered the transcriptome, not the genotype, as shown in *in vitro* analysis in this study, where the allele of risk was related with leprosy patients. In addition, a limited number of patients (three) and control (one) were found in *in silico* studies, whereas more than 100 were tested *in vitro* for genotype, which demonstrates that the results obtained *in silico* are not significant. To corroborate the *in vitro* analysis, the browser for risk variants was consulted, showing the allele of the risk C in rs3751143.

Association studies are based on comparing the allelic frequencies of a genetic marker between affected and unaffected individuals. Certain alleles are considered to be associated with the phenotype studied when it occurs with a different frequency between affected individuals compared with control individuals. In the context of leprosy, some immune response genes have already been investigated in genetic association studies, such as *IL18R1*, a gene that encodes the cytokine receptor interleukin (IL)-18, which has been associated as a risk factor for leprosy in a Chinese population (Liu et al., 2012). IL-18 can promote Th1 responses to *M. leprae*. Also, in the Th1 profile, the *TNFA* gene rs1800629 polymorphism was studied in leprosy in several ethnic groups, and through a meta-analysis, this polymorphism was associated with a protective effect against the risk of leprosy in the Latin American population (Areeshi et al., 2017). This is the first study to associate the genetic variants c.1513A>C and c.1068G>A of *P2RX7* with leprosy. The presence of the CC genotype of the rs3751143 polymorphism is associated with an increase, about twice as much, of susceptibility to the development of leprosy compared with the presence of the AC and AA genotypes. Increased susceptibility associated with the C allele was shown to be recessive. These data corroborate the findings regarding other intracellular pathogens, such as *Mycobacterium tuberculosis*. In this sense, a case-control study demonstrated that the rs3751143-C allele increases the susceptibility to extrapulmonary tuberculosis (Fernando et al., 2007; Nino-Moreno et al., 2007; Ben-Selma et al., 2011). In addition, ATP-mediated mycobacterial death was ablated in macrophages of homozygous individuals for the rs3751143-C allele and significantly decreased bacterial replication inside macrophages of heterozygous individuals (Fernando et al., 2007). Similarly, macrophages from individuals with the rs3751143-C polymorphism are less effective in killing intracellular *Toxoplasma gondii* after exposure to ATP compared with macrophages of persons with reference allele rs3751143-A. Supporting a specific effect of *P2X7* on *T. gondii*, macrophages from *P2RX7* knockout mice are unable to kill *T. gondii* as effectively as wild-type mouse macrophages (Lees et al., 2010).

This polymorphism was also associated with the development of chronic Q fever, which is a persistent infection, mostly of aortic aneurysms, vascular prostheses, or damaged heart valves, caused by the intracellular bacterium *Coxiella burnetii* (Jansen et al., 2019). Regarding the rs1718119 polymorphism, we found a protective association between the polymorphic allele and the development of leprosy. This same allele also provided protection in other studies with infectious diseases, such as toxoplasmosis (Jamieson et al., 2010) and tuberculosis (Zheng et al., 2017).

One polymorphism of loss of function and another of gain of function of the *P2RX7* gene, associated with susceptibility and protection, respectively, both found here in this study, suggests the involvement of *P2X7* in the leprosy immunopathology. The loss of function polymorphism is located in the cytoplasmic tail of the carboxyl-terminal (Gu et al., 2001). This region of the receptor is involved in the formation of pores induced by ATP, one of the functional properties of the receptor (Surprenant et al., 1996); it is known that the formation of pores in the cell membrane *via* *P2X7*/ATP is involved in cell lysis; therefore, the alteration of this receptor functionality on the surface of macrophages, host cell of *M. leprae*, may influence the response to the bacillus. The genetic study associating the loss of function polymorphism and leprosy showed susceptibility to infection, demonstrating that the resistance to the development of the disease is impaired, and we hypothesize that the polymorphism may influence the immune response to *M. leprae*. Thus, like the function loss polymorphism, the function gain polymorphisms also influence the response *via* the receptor. The function gain polymorphism studied here is present in the transmembrane domain 2 of the receptor, close to the region believed to control the permeability pathway (Stokes et al., 2010). Ursu et al. (2014) observed that rs1718119 was expressed at higher levels in transfected HEK 293 cells, as well as rs3751143 and another loss of function polymorphism showed lower levels than the control, but they did not observe an effect different from the gain polymorphism function in relation to the functions of *P2X7*, pore formation, and channel opening. Stokes et al. (2010) observed a higher secretion of IL-1 $\beta$  from monocytes of homozygous individuals for the function gain polymorphism, and the secretion was completely decreased when using a *P2X7* antagonist. In this sense, *P2X7* is considered one of the most potent activators of the NLR family pyrin domain containing three inflammasome, where extracellular ATP is a strong stimulus for the release of IL-1 $\beta$ , through the K<sup>+</sup> efflux in caspase-1 activation and IL-1 $\beta$  processing (Grassi, 2020). Extracellular ATP can induce the bactericidal activity of macrophages toward mycobacteria. Macrophages produce various chemokines (RANTES and MCP-1) and cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) after mycobacterial infection, and these effector immune molecules are necessary for the recruitment and activation of leukocytes and the subsequent control of mycobacterial infection (Flynn and Chan, 2001) and other intracellular pathogens (Grassi, 2020). The control of infection in the context of leprosy is seen in PB clinical forms, considered a profile of resistance to infection. Although we did not observe an association between the rs1718119



polymorphism in the severity of the disease, a protective factor was observed in the development of the disease *per se*. It is not possible to determine whether the polymorphism and the effect caused on the receptor are involved in the response generated in the infection by *M. leprae*; therefore, further studies are necessary, as well as for the interaction with loss of function polymorphisms.

In addition, our findings in the *in silico* study show increased P2X7 expression in individuals with the tuberculoid and lepromatous clinical forms compared with the control. Similarly, our association data suggest functional P2X7 seems to be important for an effective immune response against *M. leprae*. The involvement of P2X7 in the immunopathology of leprosy is not yet known; however, P2X7 exerts important regulation in the infection caused by *M. tuberculosis* and other intracellular pathogens, suggesting that anti-mycobacterial mechanisms can be genetically regulated for this receptor in *M. leprae* too (Figure 2). In addition, P2X7 is also involved in differentiating T cells to a Th1 profile, where Salles et al. (2017) demonstrated that P2X7 promotes differentiation of Th1 instead of Thf in the infection with *P. chabaudi*, a protozoan that causes malaria in rodent mammals. P2RX7 knockout mice were more susceptible to infection and had an impaired Th1 response differentiation. In the *in vitro* assay, treatment with a P2X7 antagonist inhibited the proliferation

of TCD4 cells and the production of interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ), confirming the involvement of ATP and P2X7 (Salles et al., 2017). An inadequate induction of the Th1/Th2 response differentiation determines a clinical manifestation of resistance or susceptibility. IFN- $\gamma$  is a crucial cytokine for protection against mycobacteria; it is known that an effective cellular immune response is important in the clinical manifestation of resistance in leprosy. Upadhyay et al. (2019) demonstrated a higher production of IFN- $\gamma$  in the peripheral blood mononuclear cell culture supernatant of patients with the tuberculoid clinical form than in patients with the lepromatous form after stimulation with *M. leprae* antigens. P2X7 is a receptor that is part of innate immunity; this fact highlights the findings of genetic association, considering that the resulting association was observed in the manifestation of the disease and not in severity when we correlated as MB and PB forms, as is seen in this study. In addition, the degree of disability, another parameter of severity, was not associated with the different genotypes of the studied polymorphisms (data not shown).

Our study brings new information about P2X7 in the context of leprosy in the studied population; however, other genetic studies in different populations are needed to predict these polymorphisms as genetic markers for leprosy. Immunological studies are also needed to determine the involvement of this receptor and its expression modified by polymorphisms present in the P2RX7 gene in the death of *M. leprae*.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository and accession number(s) can be found below: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ss.cgi?ss=5314585658](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?ss=5314585658) and [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ss.cgi?ss=2137544277](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?ss=2137544277).

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Faculdade de Medicina de Campos/Fundação Benedito Pereira Nunes. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RS performed the data collection, experimental assays, data analyses, and manuscript preparation. TL performed the experimental tests and data analyses. CF performed *in silico* analyses and writing. LN performed the data collection and sample processing. EN performed the clinical diagnostics. AP-R performed the study design and manuscript preparation. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## FUNDING

This project has been supported by the Foundation Carlos Chagas Filho Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ)—APQ-1 E-26/111.196/2014. This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Hansen Health Program and the Blood Bank (Hemocenter) of Campos dos Goytacazes for assisting patients at the recruiting facilities. We would like to thank Enrique Medina-Acosta for providing his facilities for the experiments. We thank so much Gabriel Araújo for helping us with the figure building and submission of our data in dbSNP.

## REFERENCES

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., and Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 7, 1–52. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
- Amiri, A., Sabooteh, T., Ahmadi, S. A. Y., Azargoon, A., and Shahsavari, F. (2018). Association of P2X7 gene common polymorphisms with pulmonary tuberculosis in Lur population of Iran. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* 9, 231–234. doi: 10.1016/j.ejmhg.2017.12.002
- Areeshi, M. Y., Mandal, R. K., Dar, S. A., Jawed, A., Wahid, M., Lohani, M., et al. (2017). Impact of TNF-308 G>A. (rs1800629) gene polymorphism in modulation of leprosy risk: a reappraise meta-analysis of 14 case-control studies. *Biosci Rep.* 37:BSR20170806. doi: 10.1042/BSR20170806
- Bahari, G., Hashemi, M., Taheri, M., Naderi, M., Moazeni-Roodi, A., Kouhpayeh, H. R., et al. (2013). Association of P2X7 gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan. *Southeast Iran. GMR* 12, 160–166. doi: 10.4238/2013.January.24.8
- Ben-Selma, W., Ben-Kahla, I., Boukadida, J., and Harizi, H. (2011). Contribution of the P2X7 1513A/C loss-of-function polymorphism to extrapulmonary tuberculosis susceptibility in Tunisian populations. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 63, 65–72.
- Cardoso, C. C., Pereira, A. C., Brito-de-Souza, V. N., Dias-Baptista, I. M., Maniero, V. C., Venturini, J., et al. (2010). IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum. Genet.* 128, 481–490. doi: 10.1007/s00439-010-0872-x
- Chaves, S. P., Torres-Santos, E. C., Marques, C., Figliuolo, V. R., Persechini, P. M., Coutinho-Silva, R., et al. (2009). Modulation of P2X(7) purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. *Microbes Infect.* 11, 842–849. doi: 10.1016/j.micinf.2009.05.001
- Corrêa, G., Marques da Silva, C., de Abreu Moreira-Souza, A. C., Vommaro, R. C., and Coutinho-Silva, R. (2010). Activation of the P2X(7) receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. *Microbes Infect.* 12, 497–504. doi: 10.1016/j.micinf.2010.03.004
- Coutinho-Silva, R., Stahl, L., Raymond, M. N., Jungas, T., Verbeke, P., Burnstock, G., et al. (2003). Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. *Immunity* 19, 403–412.
- da Silva Francisco Junior, R., Dos Santos Ferreira, C., Santos, E., Silva, J. C., Terra Machado, D., Côrtes Martins, Y., et al. (2019). Pervasive inter-individual variation in allele-specific expression in monozygotic twins. *Front. Genet.* 10:1178. doi: 10.3389/fgene.2019.01178
- Davison, A. R., Kooij, R., and Wainwright, J. (1960). Classification of leprosy. 1. Application of the madrid classification of various forms of leprosy. *Int. J. Lepr.* 28, 113–125.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.730991/full#supplementary-material>

**Supplementary Table 1** | Genotyped samples.

**Supplementary Table 2** | Details of the genotyped SNPs in this study.

**Supplementary Table 3** | List of oligonucleotides used in this study.

**Supplementary Table 4** | Differentially expressed genes.

**Supplementary Table 5** | Functional Analysis of Gene Ontology for DEG genes.

**Supplementary Table 6** | SNPs for P2RX7.

**Supplementary Table 7** | Clinical variant information.

**Supplementary Dataset 1** | Samples.

- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* 43, 491–498. doi: 10.1038/ng.806
- Fernando, S. L., Saunders, B. M., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Goldberg, H., Marks, G. B., et al. (2007). A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175, 360–366. doi: 10.1164/rccm.200607-970OC
- Flynn, J. L., and Chan, J. (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 93–129. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.93
- Foss, N. T. (1997). “Imunopatologia,” in *Hansenologia*, 3rd Edn, eds S. Talhari and R. G. Neves (Manaus, AM: Gráfica Tropical), 97–102.
- Goulart, I. M. B., Penna, G. O., and Cunha, G. (2002). Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 365–375. doi: 10.1590/S0037-86822002000400014
- Grassi, F. (2020). The P2X7 receptor as regulator of T cell development and function. *Front. Immunol.* 11:1179. doi: 10.3389/fimmu.2020.01179
- Gu, B. J., Zhang, W., Worthington, R. A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., et al. (2001). A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 11135–11142. doi: 10.1074/jbc.M010353200
- Gupta, R., Ahn, R., Lai, K., Mullins, E., Debbaneh, M., Dimon, M., et al. (2016). Landscape of long noncoding RNAs in psoriatic and healthy skin. *J. invest. Dermatol.* 136, 603–609. doi: 10.1016/j.jid.2015.12.009
- Jamieson, S. E., Peixoto-Rangel, A. L., Hargrave, A. C., Roubaix, L. A., Mui, E. J., Boulter, N. R., et al. (2010). Evidence for associations between the purinergic receptor P2X(7) (P2RX7) and toxoplasmosis. *Genes Immun.* 11, 374–383. doi: 10.1038/gene.2010.31
- Jansen, A., Schoffelen, T., Bleeker-Rovers, C. P., Wever, P. C., Jaeger, M., Oosting, M., et al. (2019). Genetic variations in innate immunity genes affect response to *Coxiella burnetii* and are associated with susceptibility to chronic Q fever. *Clin. Microbiol. Infect.* 25, 631.e11–e631.e15. doi: 10.1016/j.cmi.2018.08.011
- Kaminsky, E. B., Kaul, V., Paschall, J., Church, D. M., Bunke, B., Kunig, D., et al. (2011). An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet. Med.* 13, 777–784. doi: 10.1097/GIM.0b013e31822c79f9
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., et al. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 44, D862–D868.
- Lees, M. P., Fuller, S. J., McLeod, R., Boulter, N. R., Miller, C. M., Zakrzewski, A. M., et al. (2010). P2X7 receptor-mediated killing of an intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, by human and murine macrophages. *J. Immunol.* 184, 7040–7046. doi: 10.4049/jimmunol.1000012
- Liu, H., Irwanto, A., Tian, H., Fu, X., Yu, Y., Yu, G., et al. (2012). Identification of IL18RAP/IL18R1 and IL12B as leprosy risk genes demonstrates shared

- pathogenesis between inflammation and infectious diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 935–941. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.09.010
- Love, M. L., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytksy, A., et al. (2010). The genome analysis toolkit: a mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 20, 1297–1303. doi: 10.1101/gr.107524.110
- McLaren, W., Gil, L., Hunt, S. E., Riat, H. S., Ritchie, G. R. S., Thormann, A., et al. (2016). The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* 17:122. doi: 10.1186/s13059-016-0974-4
- Molloy, U., Laochumroonvorapong, P., and Kaplan, G. (1994). Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J. Exp. Med.* 180, 1499–1509. doi: 10.1084/jem.180.4.1499
- Montoya, D. J., Andrade, P., Silva, B., Teles, R., Ma, F., Bryson, B., et al. (2019). Dual RNA-seq of human leprosy lesions identifies bacterial determinants linked to host immune response. *Cell Rep.* 26, 3574.e3–3585.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.109
- Moraes, M., Pacheco, A., Schonkeren, J., Vanderborcht, P. R., Nery, J. A. C., Santos, A. R., et al. (2004). Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun.* 5, 592–595. doi: 10.1038/sj.gene.6364122
- Morandini, A. C., Savio, L. E., and Coutinho-Silva, R. (2014). The role of P2X7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. *Biomed. J.* 37, 169–177. doi: 10.4103/2319-4170.127803
- Ng, P. C., and Henikoff, S. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* 31, 3812–3814. doi: 10.1093/nar/gkg509
- Nino-Moreno, P., Portales-Perez, D., Hernandez-Castro, B., PortalesCervantes, L., Flores-Meraz, V., Baranda, L., et al. (2007). P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo subjects with pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 148, 469–477.
- Pardillo, F. E., Fajardo, T. T., Abalos, R. M., Scollard, D., and Gelber, R. H. (2007). Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. *Clin. Infect. Dis.* 44, 1096–1099. doi: 10.1086/512809
- Rambukkana, A. (2001). Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 21–27. doi: 10.1016/s1369-5274(00)00159-4
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., et al. (2019). Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res.* 47, W191–W198. doi: 10.1093/nar/gkz369
- Roger, S., Mei, Z. Z., Baldwin, J. M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. A., et al. (2010). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J. Psychiatr. Res.* 44, 347–355. doi: 10.1016/j.jpsychires.2009.10.005
- Salles, É.M., Menezes, M. N., Siqueira, R., Borges da Silva, H., Amaral, E. P., and Castillo-Méndez, S. I. (2017). P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against *Plasmodium chabaudi* malaria. *PLoS Pathog.* 13:e1006595. doi: 10.1371/journal.ppat.1006595
- Santos, A. R., Suffys, P. N., Vanderborcht, P. R., Moraes, M. O., Vieira, L. M., Cabello, P. H., et al. (2002). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J. Infect. Dis.* 186, 1687–1691. doi: 10.1086/345366
- Sapkota, B. R., Macdonald, M., Berrington, W. R., Misch, E. A., Ranjit, C., Siddiqui, M. R., et al. (2010). Association of TNF, MBL, and VDR polymorphisms with leprosy phenotypes. *Hum. Immunol.* 71, 992–998. doi: 10.1016/j.humimm.2010.07.001
- Silva, G. A. V., Ramasawmy, R., Boechat, A. L., Morais, A. C., Carvalho, B. K. S., Sousa, K. B. A., et al. (2015). Association of TNF -1031 C/C as a potential protection marker for leprosy development in Amazonas state patients, Brazil. *Hum. Immunol.* 76, 137–141. doi: 10.1016/j.humimm.2015.01.011
- Singh, I., Lavania, M., Pathak, V. K., Ahuja, M., Turankar, R. P., Singh, V., et al. (2018). VDR polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12:e0006823.
- Stokes, L., Fuller, S. J., Sluyter, R., Skarratt, K. K., Gu, B. J., and Wiley, J. S. (2010). Two haplotypes of the P2X(7) receptor containing the Ala-348 to Thr polymorphism exhibit a gain-of-function effect and enhanced interleukin-1 $\beta$  secretion. *FASEB J.* 24, 2916–2927. doi: 10.1096/fj.09-150862
- Sun, C., Chu, J., Singh, S., and Salter, R. D. (2010). Identification and characterization of a novel variant of the human P2X(7) receptor resulting in gain of function. *Purinergic Signal.* 6, 31–45. doi: 10.1007/s11302-009-9168-9
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735–738. doi: 10.1126/science.272.5262.735
- Tarique, M., Naqvi, R. A., Santosh, K. V., Kamal, V. K., Khanna, N., and Rao, D. N. (2015). Association of TNF- $\alpha$ (-308(GG)), IL-10(-819(TT)), IL-10(-1082(GG)) and IL-1R1(+1970(CC)) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population. *Cytokine* 73, 61–65. doi: 10.1016/j.cyto.2015.01.014
- Tekin, D., Kayaalti, Z., Dalgic, N., Cakir, E., Soylemezoglu, T., Isin Kutlubay, B., et al. (2010). Polymorphism in the p2x7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 29, 779–782. doi: 10.1097/INF.0b013e3181d9932e
- Upadhyay, R., Dua, B., Sharma, B., Natrajan, M., Jain, A. K., Kithiganahalli Narayanaswamy, B., et al. (2019). Transcription factors STAT-4, STAT-6 and CREB regulate Th1/Th2 response in leprosy patients: effect of M. leprae antigens. *BMC Infect Dis.* 19:52. doi: 10.1186/s12879-018-3601-z
- Ursu, D., Ebert, P., Langron, E., Ruble, C., Munsie, L., Zou, W., et al. (2014). Gain and loss of function of P2X7 receptors: mechanisms, pharmacology and relevance to diabetic neuropathic pain. *Mol. Pain.* 10:37. doi: 10.1186/1744-8069-10-37
- Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., Del Angel, G., Levy-Moonshine, A., et al. (2013). From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinformatics* 43, 11.10.1–11.10.33. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43
- Wang, H., Gong, C., Liu, X., Rao, S., Li, T., He, L., et al. (2018). Genetic interaction of purinergic P2X7 receptor and ER- $\alpha$  polymorphisms in susceptibility to osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *J. Bone Miner. Metab.* 36, 488–497. doi: 10.1007/s00774-017-0862-3
- World Health Organization [WHO] (2020). Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Weekly Epidemiol. Rec.* 95, 417–440.
- Wu, J., Lu, L., Zhang, L., Ding, Y., Wu, F., Zuo, W., et al. (2015). Single nucleotide polymorphisms in P2X7 gene are associated with serum immunoglobulin G responses to *Mycobacterium tuberculosis* in tuberculosis patients. *Dis. Markers* 2015:671272. doi: 10.1155/2015/671272
- Xu, H., Gong, C., He, L., Rao, S., Liu, X., Nie, Y., et al. (2017). Purinergic P2X7 receptor functional genetic polymorphisms are associated with the susceptibility to osteoporosis in Chinese postmenopausal women. *Purinergic Signal.* 13, 339–346. doi: 10.1007/s11302-017-9566-3
- Yi, L., Cheng, D., Shi, H., Huo, X., Zhang, K., and Zhen, G. (2014). A meta-analysis of P2X7 gene-762T/C polymorphism and pulmonary tuberculosis susceptibility. *PLoS One* 9:e96359. doi: 10.1371/journal.pone.0096359
- Zheng, X., Li, T., Chen, Y., Pan, H., Zhang, Z., Dai, Y., et al. (2017). Genetic polymorphisms of the P2X7 gene associated with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis. *Infect. Genet. Evol.* 53, 24–29. doi: 10.1016/j.meegid.2017.05.003

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Souza, Louvain de Souza, Ferreira, Nascimento, Nahn Jr and Peixoto-Rangel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 5.2 Capítulo 2: Papel da sinalização purinérgica, via receptor P2X7, em macrófagos murinos nocautes pra P2X7 frente ao estímulo com bacilo de *Mycobacterium leprae* irradiado

### 5.2.1 Métodos

#### 5.2.1.1 Camundongos C57Bl/6 (WT e P2X7<sup>-/-</sup>) e NUDE (background Balb/c)

Para obtenção das células dos camundongos WT e P2X7<sup>-/-</sup> foi estabelecido uma colaboração com grupo da Dra. Profa. Maria Regina D'Império Lima do Laboratório Imunologia das Infecções, ICB-USP, que ofereceu animais e infraestrutura adequada para obter células da medula óssea destes animais (Certificado 5611150818 - 136/2017 CEUA USP).

Camundongos nudes foram utilizados para a manutenção da cepa Thai-53 de *Mycobacterium leprae*. Os camundongos nudes infectados com *M. leprae* foram mantidos no Laboratório de Biologia do Reconhecer NB3 (Certificado nº 341 CEUA UENF).

#### 5.2.1.2 Cultivo de *Mycobacterium leprae* Thai-53 na almofada da pata de camundongo nude

A cepa *Mycobacterium leprae* Thai-53, doada pelo Instituto Lauro de Souza Lima, foi usada para infectar camundongos nude atímicos em condições livres de germes com 10<sup>4</sup> bacilos em cada pata posterior. Foram realizadas passagens seriadas da suspensão bacilar para novos camundongos nudes, seguindo os passos do protocolo (TROMBONE et al., 2014) a seguir: os camundongos nudes foram sacrificados por aplicação intraperitoneal de dose letal de Cetamina (300mg/kg) e Xilazina (30mg/kg). Os animais foram transferidos para a câmara de fluxo laminar, previamente desinfetada e montada para a excisão dos coxins. Os animais foram imobilizados com o auxílio de duas agulhas e com o auxílio de gaze estéril e pinça reta, as patas foram embebidas em polvidine 2%, seguido de álcool 70%, finalizando com solução fisiológica. Com o auxílio das pinças hemostáticas foi imobilizada a perna logo abaixo do joelho e os três dedos internos do animal. Com bisturi e pinça de dissecação, foi retirado todo o tecido dos coxins removendo os ossos dos dedos laterais. O tecido dos coxins foi colocado dentro de uma placa de Petri estéril para a retirada da epiderme; os coxins foram picotados com uma tesoura ou bisturi. Com o



auxílio da tesoura ou pinça, o material foi transferido para um tubo de hemólise contendo 1 ml de solução de Hank's para trituração e homogeneização. A suspensão foi passada pelo filtro celular, previamente encaixado sobre o tubo Falcon de 50ml, com o objetivo de retirar o excesso de tecido de pele. O filtro celular foi lavado, e será adicionado ao tubo solução salina balanceada de Hank's até completar o volume para 9 ml. Após foi adicionado 1 mL de tripsina 0,5%. Foi incubado à 37°C/60 min. Após esse tempo, foi adicionado solução de Hank's até 40 mL. Centrifugação à 4000rpm por 30 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado de 1 a 3ml de soro fisiológico (volume variável, depende do pellet formado no fundo do tubo). A suspensão foi separada em microtubos conforme a seguir: 600µl para inoculação em coxim plantar de camundongos da linhagem nude, 30µl da suspensão ( $10^4$  bacilos) em cada pata; 200µl para viabilidade: 200µl para controle biológico; 35µl para coloração de Ziehl Nielsen – 30µl para contagem sem diluir e 5µl/45µl para diluição 1:10 e 1:100. Foram 3 círculos/lâmina, em cada círculo foi adicionado 5µl de fenol soro, acrescentado 10µl da suspensão e espalhado com o auxílio da ponteira. Ainda dentro da câmara de fluxo, as lâminas foram dispostas sobre a superfície reta para secar; após secagem dos esfregaços, foi fixado e corado pelo método de Ziehl Neelsen.

#### 5.2.1.3 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)

Células derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e P2X7<sup>-/-</sup> foram coletadas assepticamente de ambos os fêmures com auxílio de seringa, agulha, tesoura e pinça e colocadas em 10mL de meio DMEM-F12 acrescido de 10% SFB e 1% de Penicilina/estreptomomicina. A cultura foi mantida em frasco 75 cm<sup>2</sup> *overnight* na estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, para depleção das células já diferenciadas (que ficaram aderidas). No dia seguinte foi coletado o sobrenadante, contendo os precursores da medula, e centrifugado a 500G por 5 min para sedimentar as células e retirar o meio contendo gentamicina. O *pellet* foi ressuspensionado em 5mL de meio de cultura (DMEM-F12 suplementado com 10% SFB) acrescido de 20% de meio condicionado da cultura da linhagem de fibroblastos L929 como fonte de M-CSF, previamente coletado, centrifugado e

armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A cultura, contendo o fator de diferenciação, foi incubada na estufa à  $37^{\circ}\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ .

Após 3 dias de incubação foram acrescentados 5mL de meio de cultura suplementado com sobrenadante de L929 e novamente incubadas. No sétimo dia de diferenciação os macrófagos foram colocados em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB para execução do experimento. Para os experimentos, os macrófagos foram plaqueados ( $5 \times 10^5/\text{mL}$ ) em placas de 24 poços, 24 horas antes do estímulo.

#### 5.2.1.4 Ensaio *in vitro* para avaliação da responsividade de MDMO sob estímulo de *M. leprae* irradiado e tratamentos pelo ATP, bzATP e oATP

Os macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) plaqueados foram estimulados com *Mycobacterium leprae* irradiado doados pelo *BEI Resources (Mycobacterium leprae, Strain NHDP, Gamma-Irradiated Whole Cells (lyophilized), NR-19326)* na concentração de 10ug/mL (OLIVEIRA et al., 2021). Para a modulação de sinalização celular mediada pelo receptor P2X7, as células estimuladas e não estimuladas foram tratadas com ATP (3mM), bzATP (150uM) e oATP (150uM). Poços sem tratamento e sem estímulo foram usados como controle negativo. A resposta de MDMO aos tratamentos foi avaliada através de quantificação de citocinas e óxido nítrico (NO) secretado pelos macrófagos no meio de cultura e monitoramento de viabilidade celular no período de 24h e 48h de cultura. Os sobrenadantes das culturas tratados pelo LPS de *E. coli* (100 ug/ml) foram utilizados como controle positivo para produção de NO. Para o ensaio de avaliação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), alguns poços foram previamente tratados com N-acetilcisteína 10mM (NAC) e estimulados ou não com *M. leprae* irradiado. Antes da análise utilizando a sonda DCFDA, (dicloro-fluoresceindiacetate) por Citometria de Fluxo, foi realizado um pulso de ATP (5mM) e bzATP (150uM) por 10min e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1mM) por 5 min, utilizado como controle positivo.

##### 5.2.1.4.1 Avaliação da viabilidade celular

As células não estimuladas e estimuladas com *M. leprae*, tratadas ou não com ATP, bzATP e oATP foram avaliadas quanto sua viabilidade pelo método

MTT (3-(4,5-dime *Thyl*)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide). Macrófagos derivados da medula óssea foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL e estimuladas com *M. leprae* (10ug/mL), tratadas com ATP (1mM), bzATP (150uM) e oATP (150uM) e mantidas em cultura em estufa de 5% CO<sub>2</sub> à 37°C por 24h e 48h. O reagente 3-(4,5-dimetil-2-tiazil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (concentração final de 1 mg/mL) foi adicionado em cada poço e incubado por 3 horas. O sobrenadante foi removido e os cristais de formazan foram dissolvidos em isopropanol ácido, logo após a absorbância foi determinada a 570 nm usando um leitor de microplacas (Thermo Lab systems Multiskan, modelo 352).

#### 5.2.1.5 Avaliação da produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) em sobrenadantes de cultura por ELISA

As células foram tratadas como descrito no item 5.2.1.3, e os sobrenadantes de culturas foram coletados para quantificação de citocinas (TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) através de kits de ELISA específicos, seguindo especificações do fabricante (R&D Systems). Brevemente, o anticorpo de captura foi diluído em PBS para a concentração de trabalho e foi adicionado 100uL em cada poço da placa de ELISA e foi incubada *overnight*. No dia seguinte, verteu-se a placa e lavou-se com *Wash Buffer* (PBS + 0,05% de *Tween*), três lavagens no total. O líquido foi removido completamente em cada etapa de lavagem. Os poços da placa foram bloqueados com a solução diluente (PBS + 1% de BSA) e incubados por 1 hora. Após o bloqueio os poços foram lavados novamente. As amostras foram colocadas nos respectivos poços e incubadas por 2 horas. Além disso, foi adicionado o padrão para a curva de diluição (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ : 31,2-2000pg/ml; IL-10 e IL-6: 15,6-1000pg/ml). Após a incubação os poços foram lavados novamente. 100uL do anticorpo de detecção foi adicionado e incubados por 2 horas. Após a incubação foi adicionado Estreptavidina e incubados por 20min protegido da luz. Novamente o processo de lavagem e após foi adicionado o substrato (mistura de 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Tetrametilbenzidina) e incubados por 20 min. Foi adicionado 50ul da solução de parada (2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e foi realizada a leitura da

placa em 450 nm e 570 nm e para análise de cada poço foi realizada a subtração da leitura de 570 da leitura em 450nm.

#### 5.2.1.6 - Avaliação da produção de óxido nítrico

As células foram tratadas como descrito no item 5.2.1.3, e os sobrenadantes de culturas foram coletados para quantificação indireta de NO por meio de ensaio colorimétrico de Griess. Inicialmente, em uma placa de 96 poços, de microtitulação, foi adicionado 50uL do sobrenadante de cada poço do ensaio de estímulo e tratamento (Item 5.2.1.3) e 50uL da solução de Griess (25uL da solução A + 25uL da solução B). Para garantir a precisão da quantificação de NO, a curva de referência foi preparada com o nitrito padrão para cada ensaio. A absorbância foi medida após 30 min em um leitor de placas em 550nm (BIO-TEK, PowerwaveXS). Solução A: 2,5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> + 0,5g de sulfanilamida + 47 mL H<sub>2</sub>O destilada. Solução B: 0,05g N1naftilenodiamina + 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

#### 5.2.1.7 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio por Citometria de Fluxo

Após o plaqueamento, as células foram incubadas com 10mM de N-acetilcisteína (NAC) por 2 horas a 37°C e então estimuladas ou não com o bacilo de *M. leprae* irradiado e deixadas em cultura por 24h. As células foram soltas gentilmente com *cell scraper*, transferidas para *eppendorf* e centrifugadas por 5min na velocidade 500G. Após isso, foram ressuspensas em 1:1000 DCFDA (concentração final de 2 uM) em 37° C durante 30 minutos. Antes da análise, as células foram incubadas com 5 mM de ATP por 10 min ou 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5 min a 37 °C e depois foi medida imediatamente a produção de ROS. A fluorescência das células foi analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BectonDickinson) usando o método de coloração e analisada em parâmetro FL-1 (comprimento de onda de  $\cong$  530).

#### 5.2.1.8 Análises Estatísticas

Um teste t bicaudal foi usado para comparações de dois grupos quando as variáveis contínuas apresentavam distribuição normal, enquanto

comparações múltiplas foram realizadas por ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando Graph Pad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA), considerando-se valores de  $p$  menores que 0,05 como significativos.

## 5.2.2 Resultados

### 5.2.2.1 Implementação da cultura de camundongos nudes infectados com a cepa Thai-53 de *Mycobacterium leprae*

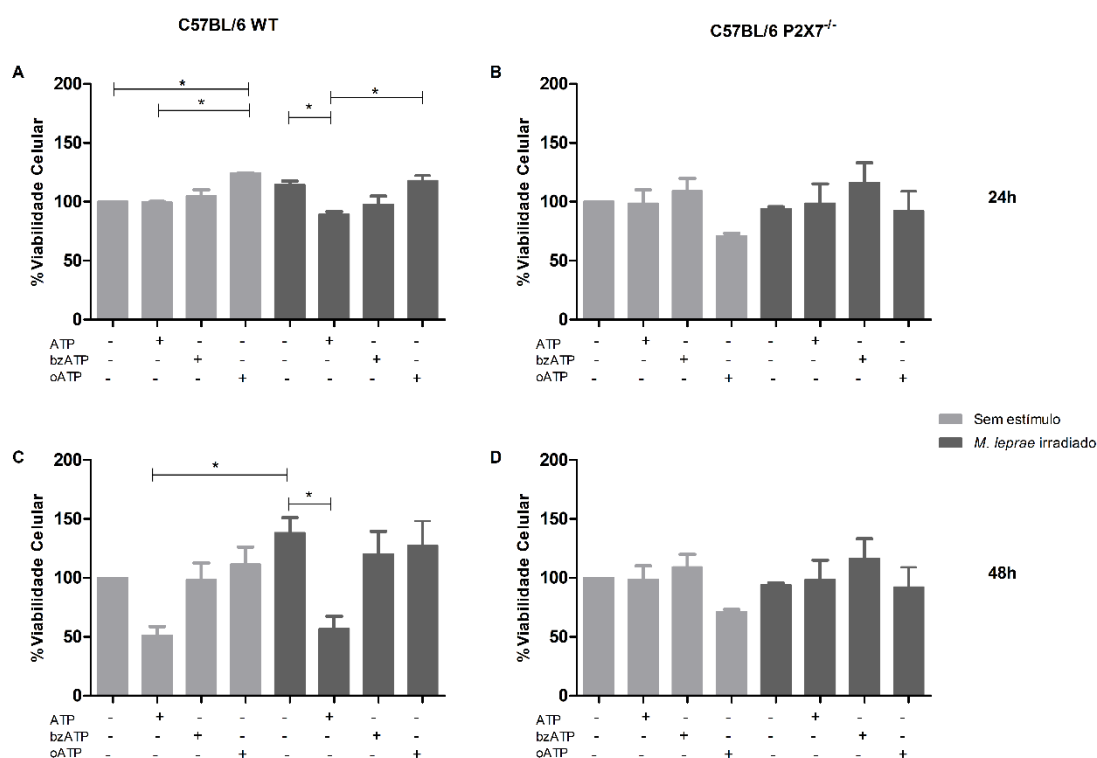
No intuito de obter bacilos vivos para experimentação *in vitro* foi implementado cultura de camundongos nudes infectados com a cepa Thai-53 de *M. leprae*. Através da colaboração com a Dr<sup>a</sup> Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, por intermédio do professor Flávio Alves Lara da Fiocruz-RJ, obtivemos a suspensão bacilar para inoculação na almofada da pata do camundongo nude. Camundongos nudes foram infectados e até o momento temos 20 camundongos infectados. Enfrentamos algumas dificuldades em passagens anteriores, o que permitiu por enquanto utilizar somente bacilos de *M. leprae* irradiados doados pelo *BEI Resources*. No entanto, esperamos conseguir aumentar o número de camundongos infectados para permitir quantidades suficientes de bacilos para pesquisa.

### 5.2.2.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular após estímulo ou não com *Mycobacterium leprae* irradiado (10ug/mL) e tratamento com ATP (3mM), bzATP (150uM) e oATP (150uM) foi determinada utilizando o ensaio de MTT. Os dados de absorbância obtidos no espectrofotômetro dos diferentes tratamentos foram transformados em porcentagem tendo como parâmetro o controle de cada grupo, a saber WT 24h, P2X7<sup>-/-</sup> 24h, WT 48h, P2X7<sup>-/-</sup> 48h. Observou-se uma viabilidade de MDMO de camundongos C57BL/6 WT aumentada, no período de 24h (**Figura 5A**), nas células tratadas com oATP e sem estímulo em relação as células sem tratamento e sem estímulo ( $p < 0,05$ ), assim como em relação as células tratadas com ATP e sem estímulo ( $p < 0,5$ ). Em relação as células estimuladas com *M. leprae* irradiado, podemos observar uma viabilidade celular diminuída nas células tratadas com ATP comparadas às células sob estímulo e sem tratamento algum ( $p < 0,05$ ) e também as células estimuladas e tratadas com oATP ( $p < 0,05$ ). No período de 48h de incubação (**Figura 5C**) é possível observar o mesmo perfil de viabilidade diminuída nas células estimuladas com *M. leprae* e tratadas com ATP em relação àquelas apenas estimuladas com o bacilo ( $p < 0,05$ ). Da mesma

forma, foi observada uma viabilidade diminuída nas células tratadas com ATP em relação às células estimuladas com *M. leprae* e tratadas com oATP ( $p < 0,05$ ).

Não foi observada diferença significativa na viabilidade de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) de camundongos C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> com ou sem estímulo de *M. leprae* sob os diferentes tratamentos no período de 24h (Figura 5B) e 48h (Figura 5D).

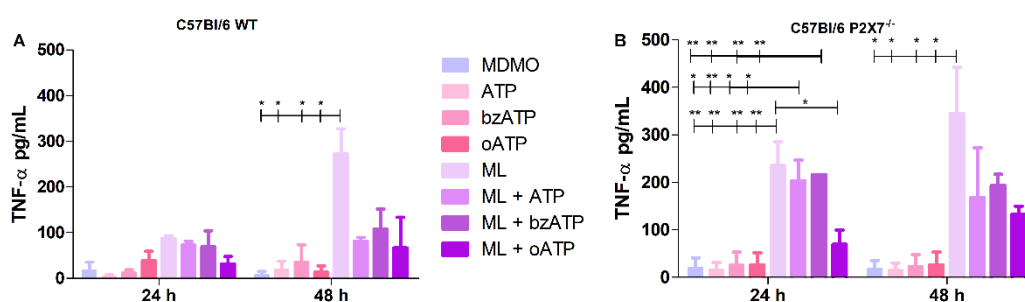


**Figura 5:** Avaliação da viabilidade celular. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> no período de 24h (A e B, respectivamente) e 48h (C e D, respectivamente) estimulados ou não com *Mycobacterium leprae* irradiada (10ug/mL) e tratadas ou não com ATP, bzATP, oATP. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. MDMO: Macrófagos derivados da medula óssea. ML: *Mycobacterium leprae*

Os resultados mostram, comparados com o controle, que em camundongos WT, o ATP diminui a viabilidade de MDMO nas 24h apenas nos estimulados com *M. leprae*. E que após 48h a redução na viabilidade é mais drástica e independente do estímulo com *M. leprae*. Já os MDMOs de camundongos P2X7<sup>-/-</sup> parecem insensíveis a ação de ATP em reduzir a viabilidade.

### 5.2.2.3 Produção de citocinas

As concentrações das citocinas nos sobrenadantes de cultura de MDMO de camundongos C57Bl/6 WT e P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas com *M. leprae* irradiado (10ug/mL) por 24 h e 48 h foram avaliadas por ELISA. Para avaliar a capacidade de *M. leprae* irradiado de produzir as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 e a citocina anti-inflamatória IL-10, via P2X7, foram usados camundongos WT e P2X7<sup>-/-</sup> tratados por ATP, bzATP e oATP. Na figura 6 é possível observar a produção da citocina TNF- $\alpha$ . Nas culturas de MDMO de WT, no período de 24 horas, não há produção significativa após estímulo com *M. leprae* ou tratamento com ATP, bzATP e oATP. No entanto, é possível observar uma produção significativa após estímulo com *M. leprae* em relação as células sem estímulo de *M. leprae* tratadas ou não com ATP, bzATP e oATP ( $p < 0,05$ ) no período de 48h (Figura 6A). Em relação a cultura de MDMO de P2X7<sup>-/-</sup>, no período de 24h já é

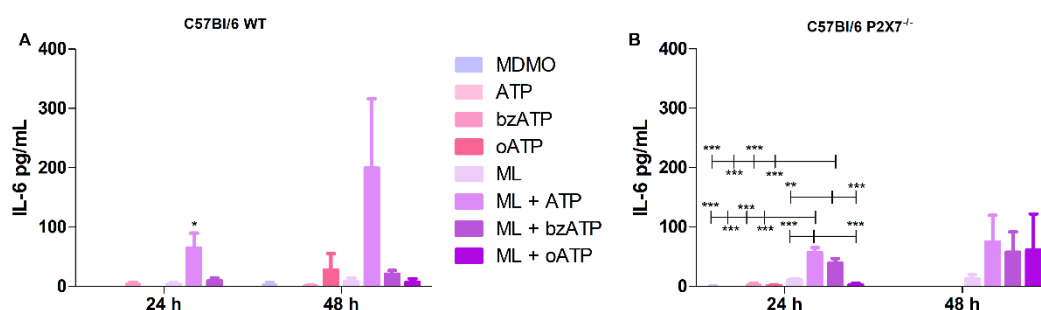


**Figura 6:** Produção da citocina TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7<sup>-/-</sup> (B) no período de 24h e 48h. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados independentemente. MDMO: Macrófagos derivados da medula óssea. ML: *Mycobacterium leprae*

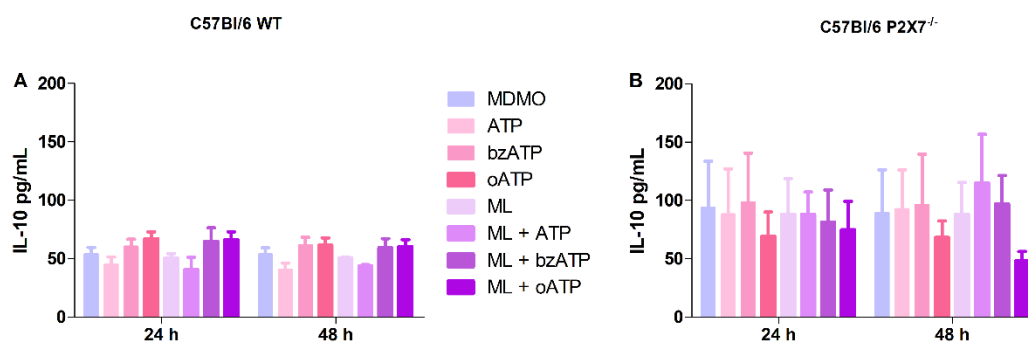
possível observar um aumento da produção de TNF- $\alpha$  nas células estimuladas com *M. leprae* e a produção é significativamente maior quando comparadas as células não estimuladas, tratadas ou não com ATP, bzATP e oATP ( $p < 0,01$ ) e com aquelas estimuladas e tratadas com oATP ( $p < 0,05$ ). As células estimuladas com *M. leprae* e tratadas com ATP e bzATP também apresentaram produção de TNF- $\alpha$  maior quando comparadas as células não estimuladas e tratadas ou não com ATP, bzATP e oATP. No período de 48h, apenas a produção aumentada das células estimuladas com *M. leprae* se manteve significativamente elevadas ( $p < 0,05$ ). Estímulo de *M. leprae* é capaz de induzir produção de TNF- $\alpha$  e os dados indicam ser independente de P2X7.



É possível observar produção de IL-6 apenas nas células WT (**Figura 7A**) estimuladas com *M. leprae* e tratadas com ATP no período de 24 horas. Essa produção teve diferença significativa em relação as células não estimuladas e não tratadas ( $p < 0,01$ ) e não estimuladas e tratadas com ATP, bzATP e oATP ( $p < 0,01$ ). Além disso, teve maior produção quando comparadas com as células estimuladas e não tratadas ( $p < 0,01$ ), assim como as células estimuladas e tratadas com bzATP ( $p < 0,05$ ) e oATP ( $p < 0,01$ ). No período de 48h não foi possível observar diferença estatística entre os diferentes tratamentos com ou sem estímulo de *M. leprae*, apesar de ser possível observar um aumento da produção de IL-6 nas células estimuladas com *M. leprae* e tratadas com ATP, esse aumento não foi significativo na análise. Nas células P2X7<sup>-/-</sup> (**Figura 7B**) é possível observar uma maior produção nas células estimuladas e tratadas com ATP e bzATP no período de 24h em relação as células não estimuladas e tratadas com ATP, bzATP e oATP, assim como em relação as células estimuladas e não tratadas e estimuladas e tratadas com oATP. Todas as células WT e P2X7<sup>-/-</sup> produziram a mesma quantidade de IL-10, sem diferença significativa em relação ao tempo, tratamento ou estímulo (**Figura 8**).

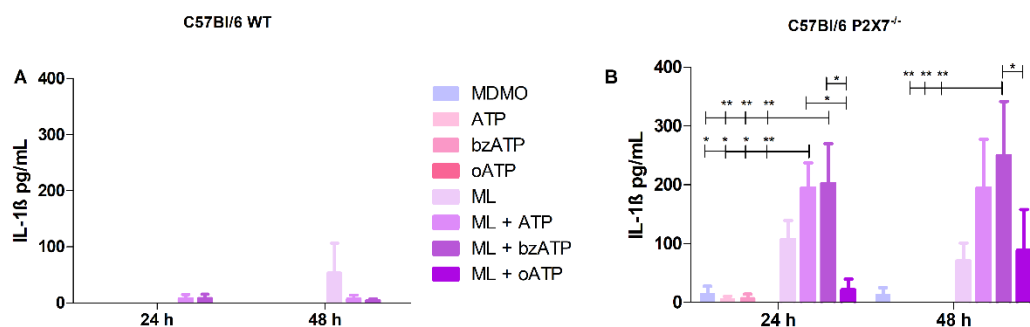


**Figura 7:** Produção da citocina IL-6 no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7<sup>-/-</sup> (B). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados independentemente.



**Figura 8:** Produção da citocina IL-10 no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7<sup>-/-</sup> (B). O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados independentemente.

Para avaliar se IL-1 $\beta$  é produzida sob estímulo de *M. leprae* e ativação de P2X7, tratamos cultura de MDMO de camundongos c57Bl/6 WT e P2X7<sup>-/-</sup> com ATP, bzATP e oATP. A quantificação do sobrenadante da cultura no período de 24 e 48 horas em células WT (**Figura 9A**) mostrou que não houve produção significativa da citocina IL-1 $\beta$  sob estímulo ou não de *M. leprae* nos diferentes tratamentos. Curiosamente, as células P2X7<sup>-/-</sup>, produziram IL-1 $\beta$  frente ao estímulo de *M. leprae*, tanto nas células sem tratamento, quanto nas células tratadas com ATP, bzATP e oATP (**Figura 9B**). Foi observada, no período de 24h, uma produção significativamente maior nas células sob estímulo e tratadas com ATP em comparação as células sob estímulo e tratadas com oATP ( $p < 0,05$ ), também em relação as células sem estímulo e sem tratamento ( $p < 0,05$ ), sem estímulo e tratadas com ATP ( $p < 0,05$ ), bzATP ( $p < 0,05$ ) e oATP ( $p < 0,01$ ). As células sob estímulo e tratadas com bzATP apresentaram diferença estatística significativa na produção de IL-1 $\beta$  em relação as células sob estímulo e tratadas com oATP ( $p < 0,05$ ), também em relação as células sem estímulo e sem tratamento ( $p < 0,01$ ), sem estímulo e tratadas com ATP ( $p < 0,01$ ), bzATP ( $p < 0,01$ ) e oATP ( $p < 0,01$ ). No período de 48h, apesar da alta produção da citocina pelas células estimuladas com *M. leprae*, apenas as células estimuladas e tratadas com bzATP apresentaram diferença estatística significativa em relação as células sob estímulo e tratadas com oATP ( $p < 0,05$ ), também em relação as células sem estímulo e tratadas com ATP ( $p < 0,01$ ), bzATP ( $p < 0,01$ ) e oATP ( $p < 0,01$ ).

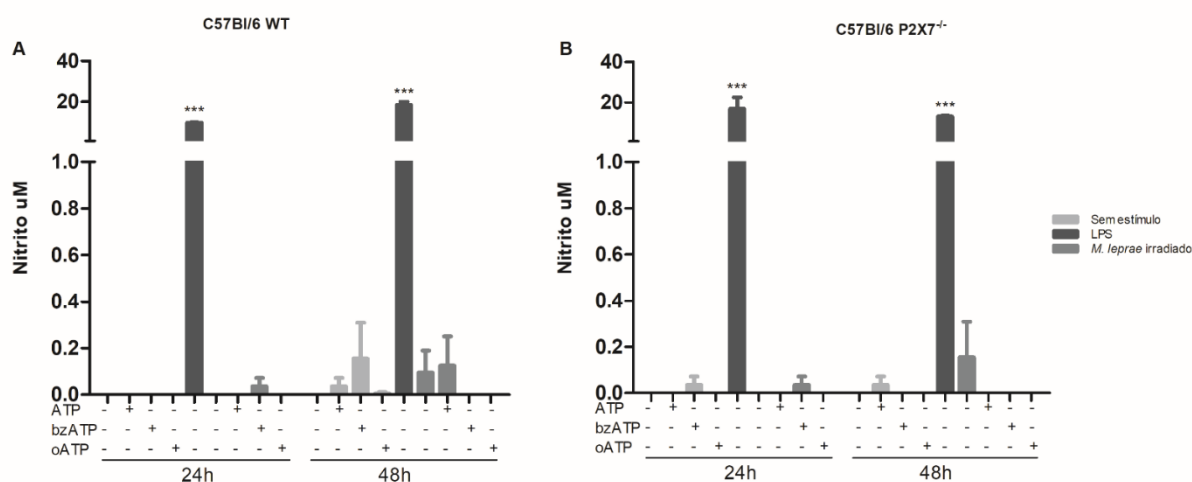


**Figura 9:** Produção da citocina IL-1 $\beta$  no sobrenadante das culturas de MDMO WT (A) e P2X7 $^{-/-}$  (B), \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados independentemente.

#### 5.2.2.4 Produção de NO

Para avaliar se a via de ativação de P2X7 é capaz de induzir a produção de Óxido nítrico, MDMO foram tratados com ATP, bzATP e oATP. É possível observar na **figura 10A** que as células de camundongos WT sem estímulo de *M. leprae* e tratadas com ATP, bzATP e oATP não produziram NO no período de 24 horas, tendo sido observada alta produção apenas sob estímulo de LPS ( $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p < 0,0001$ ). Além disso, não foi observada produção de NO nas células estimuladas com *M. leprae* sem tratamento ou naquelas estimuladas com o bacilo e tratadas com ATP, no entanto, foi observada uma pequena produção nas células estimuladas com *M. leprae* irradiado ( $10\mu\text{g/mL}$ ) e tratadas com bzATP nesse período, mas não apresentaram produção significativa. Já no período de 48h é possível observar uma pequena produção de NO nas células não estimuladas e estimuladas tratadas com ATP e bzATP, porém não significativa. Além disso, houve uma produção significativamente maior nas células estimuladas com LPS no período de 48h. Logo, não foi observado diferença estatística na produção de NO sob os diferentes tratamentos nas

células oriundas de camundongo estimuladas ou não com *M. leprae* irradiado, apenas naquelas estimuladas com LPS.



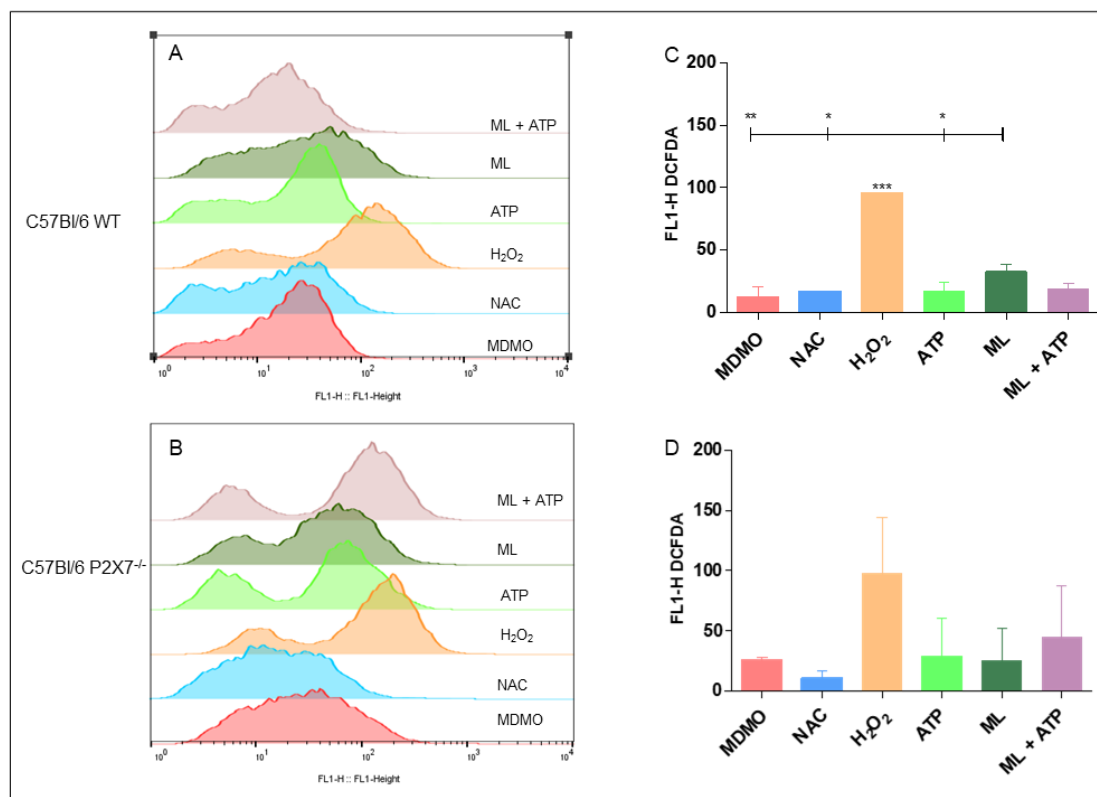
**Figura 10:** Tempo de incubação de 24h e 48h \*\*\*  $p < 0,001$ . Os gráficos representam a média + desvio padrão de três experimentos independentes.

Nas células obtidas dos camundongos P2X7<sup>-/-</sup> é possível observar uma pequena produção de NO, porém estatisticamente não significativa, nas células tratadas com bzATP não estimuladas e estimuladas com *M. leprae* no período de 24h. Além disso, houve uma grande produção de NO nas células estimuladas com LPS ( $p < 0,001$ ) nesse mesmo tempo de incubação. No período de 48h de incubação houve uma pequena produção nas células não estimuladas e tratadas com ATP e nas células apenas estimuladas com *M. leprae* irradiado, porém estatisticamente não significativo. Assim como no período de 24h, houve uma grande produção de NO nas células estimuladas com LPS ( $p < 0,001$ ), sendo o único estímulo a apresentar elevação de NO, tanto em células WT, quanto nas oriundas de camundongos P2X7<sup>-/-</sup> nas 24h e 48h (**Figura 10B**).

#### 5.2.2.5 Produção de ROS

Para avaliar se a produção de ROS, marca registrada do inflamassoma NLRP3, sob estímulo de *M. leprae* é pela via P2X7, estimulamos MDMO com *M. leprae* irradiado, alguns poços foram tratados com N-Acetilcisteína (NAC), um conhecido antioxidante. *M. leprae* é capaz de induzir a produção de ROS em macrófagos de camundongos C57Bl/6 WT, como pode ser observado na figura

10A e 10C, que foi um maior indutor de ROS do que as células tratadas com ATP ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística significativa na indução da produção de ROS nas células P2X7<sup>-/-</sup> (**Figuras 11B e 11C**).



**Figura 11:** Produção de ROS por macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57Bl/6 WT (A e C) e P2X7<sup>-/-</sup> (B e D). As figuras A e B representam as intensidades de fluorescência de DCFDA representativas de um experimento. As figuras C e D representam a média + desvio padrão das medianas da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes.

### 5.2.3 Discussão

Os canais iônicos P2X e os receptores acoplados à proteína G P2Y estão envolvidos na ativação dos mecanismos de defesa imune inata do hospedeiro, fagocitose, fusão fagolisossomal, produção de espécies reativas, acidificação de vacúolos parasitóforos, ativação do inflamassoma e liberação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (COUTINHO-SILVA; SAVIO, 2021).

O sistema purinérgico compreende a ação de nucleotídeos de purina (ATP – adenosina trifosfato; ADP – adenosina difosfato; e adenosina) como mensageiros extracelulares, que ocorre através da ativação de receptores ionotrópicos P2X e metabotrópicos P2Y, e de receptores metabotrópicos P1 (ou receptores de adenosina) (BURNSTOCK, 1980). O ATP é produzido por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, podendo ser liberado no espaço extracelular após estímulos patogênicos através de exocitose vesicular, transporte por canais transmembrânicos (canais de panexina, conexinas e hemicanais) ou até mesmo apoptose celular (FUJII, 2004). Uma vez no espaço extracelular o ATP pode interagir com os receptores P2Y (metabotrópicos) ou P2X (ionotrópicos) (BURNSTOCK, 1980).

A sinalização mediada por nucleotídeos é considerada uma via comum para a resposta imune do hospedeiro contra patógenos intracelulares. Enquanto as vias de sinalização por P2X7 em respostas a outros microorganismos, como *Toxoplasma gondii* (CORRÊA et al., 2010a; LEES et al., 2010; MOREIRA-SOUZA et al., 2017), *Mycobacterium tuberculosis* (AMARAL et al., 2014; BOMFIM et al., 2017; SANTIAGO-CARVALHO et al., 2021), *Leishmania amazonensis*, (CHAVES et al., 2009) e *Plasmodium chabaudi* (SALLES et al., 2017), parecem ser melhor compreendidas, há uma lacuna em relação a *Mycobacterium leprae*.

Neste trabalho, nós utilizamos estímulos de ATP e bzATP para avaliar a viabilidade celular após o tratamento e estímulos com *M. leprae*. Nós observamos que o tratamento com ATP diminuiu a viabilidade celular no período de 24 horas de MDMO de camundongos WT, mas não de P2X7<sup>-/-</sup>, estimulados com *M. leprae*. Após 48h a redução na viabilidade é mais drástica e independente do estímulo com *M. leprae*. Já MDMOs de camundongos P2X7<sup>-/-</sup> parecem insensíveis a ação de ATP em reduzir a viabilidade.

A exposição a eventos estressores, tais como o estímulo patogênico, é capaz de causar um aumento na liberação de ATP, ativando os receptores P2X7. Essa ativação permite o influxo de  $\text{Ca}_2^+$  e  $\text{Na}^+$ , bem como o efluxo de  $\text{K}^+$ , sendo a diminuição deste último íon no microambiente citosólico um gatilho para ativação do inflamassoma NLRP3 que culmina na liberação das citocinas pró-inflamatórias (CISNEROS-MEJORADO et al., 2015).

Corroborando esta hipótese de ativação de NLRP3, que requer, em um primeiro sinal de ativação, o reconhecimento de PAMPs por Receptores de reconhecimento de padrão e a ativação desses receptores leva a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, avaliamos se a produção das citocinas TNF- $\alpha$  (**Figura 6**), IL-6 (**Figura 7**) e IL-10 (**Figura 8**) era dependente da ativação de P2X7 frente ao estímulo de *M. leprae*, observamos que a produção de TNF- $\alpha$  foi maior apenas quando estimuladas com *M. leprae*, mas quando as células WT estimuladas com *M. leprae* foram tratadas com ATP e bzATP reduziu os níveis da citocina, apesar de não ter diferença estatística significativa. Na ausência de P2X7 (**Figura 6B**), os níveis de TNF- $\alpha$  foram superiores nas células estimuladas com *M. leprae*, tratadas ou não com ATP e bzATP, sugerindo que na ausência de P2X7 outros receptores possam ser requeridos para produção de TNF- $\alpha$ . Fato que pode ser observado quando os níveis de TNF- $\alpha$  diminuem quando tratados com oATP, um antagonista seletivo de P2X7. A pré-incubação de fagócitos mononucleares com este inibidor leva à atenuação de várias respostas pró-inflamatórias desencadeadas pelo ATP extracelular, bem como por alguns agonistas não nucleotídeos. No entanto, alguns dados mostram que o oATP reduz a ativação de NF $\kappa$ B e a liberação de IL-8 em células sem P2X7, sugerindo assim que alguns efeitos anti-inflamatórios do oATP podem não ser devidos ao bloqueio do P2X7 (VIRGILIO, 2003).

A produção de IL-6 em células estimuladas com *M. leprae* e tratadas com ATP aumentou no período de 24h. Entretanto, *M. leprae* sozinho não foi capaz de induzir a secreção de IL-6, assim como apenas o tratamento com ATP e bzATP em células sem estímulo. Esses achados não foram semelhantes àqueles apresentados por Shieh et al., (2014), que relataram que os receptores

P2X7 medeiam a síntese de TNF- $\alpha$  e IL-6 induzida por ATP em micróglia sem estímulo adicional.

Rastogi e colaboradores (2019) demonstraram em teste *in vitro* que o antígeno ML1899 influenciou no aumento da produção de ROS/NO e citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas reguladas positivamente, incluindo TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-8 em macrófagos. Nesse estudo, *M. leprae* sozinho induziu a produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , mas não da citocina IL-6 que, no entanto, teve produção quando tratada com ATP. Da mesma forma, quando tratada com ATP, MDMO estimulados com *M. leprae* produziu TNF- $\alpha$ .

Braga e colaboradores (2015) observou níveis maiores de TNF- $\alpha$  em células dendríticas estimuladas com *M. leprae* sonicado (10ug/mL) em comparação com células dendríticas imaturas que não receberam estímulo de pacientes com hanseníase e indivíduos controles. De forma semelhante, em cultura de PBMC de pacientes, foi demonstrado que *M. leprae* induziu níveis significativamente mais altos de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  entre pacientes com recidiva da doença (ESQUENAZI et al., 2015).

Os patógenos devem expressar um padrão molecular associado ao patógeno capaz de conduzir a síntese de citocinas e serem vistos como potencialmente perigosos para o organismo hospedeiro, para que IL-1 $\beta$  e IL-18 maduros sejam secretados de forma eficiente. A sobrevivência do hospedeiro depende de sua capacidade de montar uma resposta antimicrobiana protetora eficiente para realizar a eliminação de patógenos, ao mesmo tempo em que previne a lesão tecidual, mantendo sob controle o processo inflamatório excessivo.

A IL-1 $\beta$  é uma das principais citocinas envolvidas na ativação e persistência da inflamação (MORTAZ et al., 2012). Estudos sugerem que a abertura do P2X7 causa uma mudança drástica na homeostase do K<sup>+</sup>, que tem um papel importante na maturação da IL-1 $\beta$ . No entanto, é provável que este processo seja mais complexo, uma vez que a liberação de IL-1 $\beta$  é desencadeada por outros íons intracelulares, por exemplo, Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> (MORTAZ et al., 2012).

IL-1 $\beta$  e IL-18 desempenham um papel como iniciadores da resposta imune específica, desencadeando a liberação de um subconjunto adicional de citocinas das células do tecido. É através da liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 que os inflamassomas iniciam a inflamação e estimulam a resposta imune específica.



Essa combinação de IL-1 $\beta$ , IL-18 e citocinas específicas de tecido direcionará a diferenciação de células T auxiliares (MARTYNOVA et al., 2022).

Para avaliar a contribuição de efeitos pró-inflamatórios e também produto da ativação do inflamassoma a partir da modulação de P2X7 em macrófagos de camundongos C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> e C57BL/6 WT estimulados com *M. leprae*, nós dosamos a produção de IL-1 $\beta$  no sobrenadante da cultura de MDMO P2X7<sup>-/-</sup> e WT. Nós demonstramos que *M. leprae* irradiado foi capaz de induzir secreção de IL-1 $\beta$  em 48h de cultura dos MDMO de C57BL/6 WT, mas que não teve diferença estatística significativa (**Figura 9A**). Também demonstramos que MDMO de C57BL/6 P2X7<sup>-/-</sup> também teve secreção de IL-1 $\beta$  frente ao estímulo de *M. leprae* no período de 24h e 48h, tanto nas células sem tratamento, quanto nas células tratadas com ATP, bzATP e oATP (**Figura 9B**). Esses dados são sugestivos de que *M. leprae* induz a maturação de IL-1 $\beta$  para sua secreção independente da via de ativação de P2X7. Corroborando a isso, não observamos produção dessa citocina por MDMO P2X7<sup>-/-</sup> sem estímulo quando tratados com ATP ou bzATP. A sinalização P2RX7 pode afetar negativamente o resultado da TB grave, induzindo a produção de IL-1 $\beta$  e exacerbando o influxo pulmonar de monócitos e macrófagos permissivos ao patógeno (AMARAL et al., 2014). Aqui, a falta de P2X7 parece exercer um efeito pró-inflamatório sob estímulo de *M. leprae*, que deve ser mais bem estudado.

Kanellopoulos e colaboradores (2021), demonstraram que macrófagos estimulados por LPS de camundongos de tipo selvagem e deficientes em P2X7 foram estimulados com 10  $\mu$ M de ATP ou com 10  $\mu$ M de ATP mais 1-3  $\mu$ M de ivermectina, um potencializador positivo alostérico de P2X4, e a liberação de IL-1 $\beta$  madura foi observada nos sobrenadantes de macrófagos de camundongos deficientes em P2X7 estimulados apenas com ATP mais ivermectina. Esses resultados demonstram que P2X4 também pode desencadear essa via bioquímica na ausência de P2X7 (KANELLOPOULOS et al., 2021). Dessa forma, a comunicação intercelular baseada em ATP é mediada pelos receptores P2X4 e P2X7 e é uma característica dos macrófagos pró-inflamatórios (ZUMERLE et al., 2019). Os genes que codificam para esses dois receptores estão geneticamente localizados em proximidade, e provavelmente se originam do mesmo gene ancestral como resultado de uma duplicação de genes e foram sugeridos para complementar um ao outro (ELLEGAARD et al., 2021).

Além disso, um *crosstalk* entre P2RY2 e P2RX7 é evidenciado pelo fato de que ambos os receptores cooperam para desencadear uma potente resposta protetora contra a infecção por *L. amazonensis*. No entanto, foi proposto outro papel protetor para P2X7, uma vez que camundongos deficientes em P2RX7 infectados apresentam aumento da produção de *IFN-γ* e redução da produção de TGF- $\beta$ , sugerindo que uma resposta pró-inflamatória exacerbada poderia aumentar a suscetibilidade à infecção (EBERHARDT et al., 2022).

Outras vias de secreção de IL-1 $\beta$  podem estar envolvidas. A sinalização do inflamassoma e a secreção celular de IL-1 $\beta$  madura são frequentemente acompanhadas de piroptose. Em circunstâncias específicas, no entanto, as células liberam IL-1 $\beta$  enquanto mantêm a viabilidade, como já foi demonstrado em neutrófilos expostos a *Salmonella* ou flagelina intracelular, monócitos estimulados com LPS extracelular e células dendríticas expostas a fosfolípidios oxidados (CHAN; SCHRODER, 2020). Essa capacidade da sinalização do inflamassoma provocar apenas um pequeno número de poros GSDMD, substrato clivado pela caspase-1, onde a carga de poros é inferior para induzir piroptose, mas suficiente para facilitar a secreção de IL-1 parecer ser devido a uma hiperatividade celular. A secreção de IL-1 $\beta$  se dá através desses poros antes que as membranas sejam reparadas. Em nossos experimentos, podemos observar uma maior viabilidade celular durante o período analisado nas células que não receberam tratamento com ATP (**Figura 5**) bem como uma produção aumentada de IL-1 $\beta$  (**Figura 9**).

Além disso, os receptores P2X7 localizados em macrófagos precisam ser co-ativados com o receptor 4 do tipo toll-like sensível ao lipopolissacarídeo (TLR-4) para induzir a formação do inflamassoma 3 (NLRP3), que então ativa a pró-interleucina-1 $\beta$  (pró-IL -1 $\beta$ ) degradando caspase-1 para levar à liberação de IL-1 $\beta$  na forma ativa (REN et al., 2021). Ainda não está claro se *M. leprae* possui ligantes para TLR-4, todavia estudos de associação genética em populações humanas sugerem que pessoas com polimorfismos no gene que codifica TLR4 podem estar protegidas contra a hanseníase (POLYCARPOU et al., 2016). Pois, até o momento, estudos se concentram em TLR-1 e TLR-2, como é possível observar no estudo proposto por Oliveira *et al.*, (2021), na qual demonstraram que *M. leprae* irradiada e suas frações antigênicas são capazes de modular

diferencialmente a atividade e funcionalidade de IDO-1 em mDCs por uma via que envolve TLR2.

O *Mycobacterium leprae* é conhecido por sua habilidade de combater o estresse redox gerado por espécies reativas de oxigênio (ROS) durante sua sobrevivência dentro dos macrófagos do hospedeiro (NANDI et al., 2020). A produção de ROS é um dos mecanismos microbicidas mais potentes contra patógenos intracelulares e, neste estudo, utilizamos a sonda DCFDA para avaliar ROS. Pudemos observar que em MDMO WT *M. leprae* irradiada foi capaz de induzir produção de ROS maior que o tratamento com ATP, enquanto em MDMO P2X7<sup>-/-</sup> a indução de ROS por *M. leprae* foi reduzida.

Observamos que o *M. leprae* irradiado não foi capaz de induzir alta produção de NO de MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup>. Andrade e colaboradores (2012) observou que células infectadas com a cepa hipervirulenta MP287/03 de *Mycobacterium bovis* expressaram altos níveis de Arg-1 que competia com iNOS pelo substrato comum L-arginina, levando a níveis mais baixos de produção de NO (ANDRADE et al., 2012) em comparação com outras cepas de *M. bovis* de menor virulência. Isso demonstra que cepas de micobactérias mais virulentas são capazes de inibir a síntese de NO aumentando a atividade da Arginase 1 com um mecanismo de sobrevivência. Os mesmos mecanismos parecem ser usados por *M. leprae* para aumentar sua sobrevivência na célula hospedeira.

Nós estudamos a responsividade de macrófagos derivados da medula óssea frente ao estímulo de *M. leprae* sob tratamento de ATP, bzATP e oATP. Esses achados, apesar de preliminares, sugerem que na ausência de P2X7 outras vias possam ser requeridas na ativação do inflamassoma e na responsividade de macrófagos sob estímulo de *M. leprae*.

## 6 DISCUSSÃO GERAL

No capítulo 1 nós evidenciamos a associação do receptor P2X7 na hanseníase. Primeiro nós mostramos, *in silico*, que a expressão de *P2RX7* é aumentada nas amostras de pele de pacientes com hanseníase comparado aos controles. E quando comparado entre as lesões das formas clínicas virchowiana e tuberculóide, é ainda mais expresso nas lesões da forma clínica virchowiana. Em análise de RNA-seq nós demonstramos os SNP mais frequentes no gene *P2RX7*, comparando a expressão em amostras saudáveis e de lesões. Dos sete SNP mais frequentes, nós seguimos para análise de associação genética em estudo caso controle de dois SNP, rs3751143 A>C e rs1718119 G>A. No estudo de associação genética nós demonstramos uma associação significativa de susceptibilidade do alelo polimórfico C\_rs3751143 para o desenvolvimento da hanseníase. Nós também demonstramos uma associação significativa de proteção do alelo polimórfico A\_rs1718119 na hanseníase. Os SNPs rs3751143 A>C e rs1718119 G>A conferem perda de função e ganho de função, respectivamente, do receptor P2X7. Esses dados apontaram que o receptor P2X7 funcional parece ser importante para uma resposta imune eficaz contra *M. leprae*. O envolvimento do P2X7 na imunopatologia da hanseníase ainda não é conhecido; entretanto, P2X7 exerce importante regulação na infecção causada por *M. tuberculosis* e outros patógenos intracelulares, sugerindo que mecanismos antibacterianos também podem ser regulados geneticamente para este receptor em *M. leprae* (SOUZA et al., 2021). *M. leprae* geralmente apresenta baixa variabilidade e a maioria dos indivíduos é naturalmente resistente à infecção. Portanto, o histórico genético e imunológico do hospedeiro é relevante para o desfecho da doença (BRAGA et al., 2015).

É importante ressaltar que esse foi o primeiro trabalho associando o gene *P2RX7* com a hanseníase. No estudo genético nós evidenciamos um papel protetor de P2X7 para o desenvolvimento da doença. Nós não evidenciamos que SNPs de *P2RX7* tenha uma associação com a gravidade da doença, por isso, é necessário ampliar as amostras dentro das formas clínicas MB e PB, de forma pareada. Dessa forma, poderemos inferir com um poder estatístico aumentado se de fato SNPs de *P2RX7* não tem associação com a gravidade da doença. Além disso, a ampliação da genotipagem em outras populações podem confirmar os SNPs de *P2RX7* como marcador biológico na hanseníase.

Nós hipotetizamos que P2X7 funcional pode agir como potencial mediador na morte de *M. leprae* por macrófagos. Por isso, no capítulo 2, nós avaliamos o papel da sinalização purinérgica, via receptor P2X7, em macrófagos murinos nocautes pra P2X7 frente ao estímulo com bacilo de *Mycobacterium leprae* irradiado. Foi observado que ATP diminui a viabilidade celular nos macrófagos WT, mas não nos macrófagos P2X7<sup>-/-</sup>. Ao comparar as citocinas produzidas, a partir da ativação de P2X7 via ATP e bzATP sob estímulo de *M. leprae*, podemos observar que MDMO P2X7<sup>-/-</sup> tiveram níveis de TNF- $\alpha$  superiores nas células estimuladas com *M. leprae*, tratadas ou não com ATP e bzATP. Foi observada maior produção de IL-6 nas células P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas e tratadas com ATP e bzATP no período de 24h em relação as células não estimuladas e tratadas com ATP e bzATP. Não houve diferença na produção de IL-10 nos MDMO WT e P2X7. *M. leprae* induziu secreção de IL-1 $\beta$  em MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup> independente do tratamento, mas com diferença estatística significativa apenas em MDMO P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas. *M. leprae* foi capaz de induzir produção de ROS em MDMO WT de forma significativa, mas não foi capaz de induzir produção de NO em MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup>. Esses achados sugerem que na ausência de P2X7 outras vias possam ser requeridas para produção de efeitos inflamatórios na responsividade de macrófagos sob estímulo de *M. leprae*.

No estudo realizado no capítulo 2, apesar de preliminar, encontramos algumas limitações, como o uso da bactéria viva. Por isso, é uma questão a ser considerada, a avaliação da taxa de infecção com a bactéria viva, através de microscopia, que proporcionará entender a capacidade e o tipo de morte por macrófagos murinos deficientes para o receptor P2X7. Os eventos imunológicos iniciais envolvidos na progressão da doença da hanseníase são provavelmente desencadeados pela interação macrófago - *M. leprae* (LEAL-CALVO et al., 2021). Leal-Calvo et al., (2021) observaram uma expressão de perfil de imunidade celular em macrófagos derivados de monócitos infectados com *M. leprae* a uma baixa multiplicidade de infecção (10:1) por 48h. Eles consideraram que uma multiplicidade de infecção reduzido poderia ter um resultado diferente quando comparado com uma multiplicidade maior. Por isso, eles compararam o perfil de expressão obtido com dados públicos de expressão de células dendríticas após uma maior multiplicidade de infecção (100:1) por 48h e

observaram ter um padrão de ativação distinto, com genes associados à biossíntese lipídica e consistente com um perfil de eliminação e fagocitário. Diferentes estímulos podem induzir respostas diferentes. Por essa razão, continuamos com os esforços para obter quantidade de bacilos na almofada da pata de camundongos nus suficiente para o ensaio de infecção e assim contribuir de forma mais aprofundada com a interação via P2X7. A possibilidade de obtenção de grandes quantidades de bacilos, na sua maioria viável, faz desta linhagem um meio de cultura *in vivo*. Além disso, a implementação dessa colônia no LBR é uma conquista para o laboratório e para todo o Estado do Rio de Janeiro, pois o sucesso dessa implementação permitirá um apoio a outros grupos de pesquisas do Estado, que utilizam o bacilo vivo nas suas pesquisas e obtém do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) em Bauru, São Paulo.

Outro ponto a ser considerado é a concentração usada neste estudo para o uso de bzATP, pois não encontramos diferença significativa entre esse agonista específico para P2X7 e o ATP, que pode ativar outros receptores P2X. A exemplo disso, Munoz et al., (2020) utilizaram em seu estudo uma concentração de bzATP de 300uM, o dobro do usado neste estudo. Eles encontraram produção aumentada de ROS em astrócitos espinhais através do tratamento do agonista bzATP. Além disso, eles encontraram produção de IL-6 dependente da produção de ROS.

Além disso, é necessário aprofundar o estudo da interação de P2X7 e outros receptores P2 com *Mycobacterium leprae*. O uso de agonistas e antagonistas para os outros receptores P2 poderá contribuir para a compreensão da interação de *M. leprae* na sinalização purinérgica.

## 7 CONCLUSÃO

- Em análise *in silico* foi demonstrado aumento da expressão do receptor P2X7 em amostras de pele de indivíduos com hanseníase comparadas com amostras controles, e dentre as formas clínicas, a forma virchowiana apresentou maior expressão;
- Foi encontrada associação de risco para o desenvolvimento da hanseníase e SNP rs1751143\_C em homozigose no gene *P2RX7*;
- Foi encontrada associação de efeito protetor para o desenvolvimento da hanseníase e SNP rs1718119\_A no gene *P2RX7*;
- Em MDMO de camundongos WT, o ATP diminuiu a viabilidade celular nas 24h apenas nos estimulados com *M. leprae* comparados com o controle. Após 48h a redução na viabilidade foi mais drástica e independente do estímulo com *M. leprae*. Já os MDMOs de camundongos P2X7<sup>-/-</sup> pareceram insensíveis a ação de ATP em reduzir a viabilidade;
- O estímulo de *M. leprae* induziu secreção de TNF- $\alpha$  estatisticamente significativa já no período de 24h pelos MDMO P2X7<sup>-/-</sup>, enquanto MDMO WT teve produção significativa apenas em 48h. Foi observada uma menor produção de TNF- $\alpha$  das células P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas com *M. leprae* e tratadas com oATP em relação as células estimuladas sem tratamento em 24h;
- Apenas o estímulo de *M. leprae* não foi capaz de induzir produção de IL-6 pelos MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup>. Apenas as células WT estimuladas com *M. leprae* e tratadas com ATP produziram IL-6 em 24h, com aumento da produção em 48h. Células P2X7<sup>-/-</sup> estimuladas e tratadas com ATP e bzATP produziram IL-6 em 24h e 48h;
- Não houve produção significativamente diferente da produção de IL-10 pelos MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup> em relação ao estímulo, tempo e aos diferentes tratamentos;
- *M. Leprae* induziu pequena secreção de IL1- $\beta$  pelos MDMO WT no período de 48h, no entanto, não foi estatisticamente significativo. Teve uma maior secreção da citocina pelas células P2X7<sup>-/-</sup> em 24h e 48h, mas também não foi

estatisticamente significativo. O tratamento com os agonistas e antagonista de P2X7 não induziu secreção de IL1- $\beta$  pelos MDMO WT. Mas, ATP e bzATP induziu secreção de IL1- $\beta$  pelos MDMO P2X7<sup>-/-</sup> sob estímulo de *M. leprae*;

- *M. leprae* induziu pequena produção de NO em 48h pelos MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup>, mas não foi estatisticamente significativo;

- *M. leprae* induziu produção significativamente maior de ROS por macrófagos WT em relação ao controle. Mas, não teve diferença estatística da produção de ROS pelos macrófagos P2X7<sup>-/-</sup> estimulados com *M. leprae*. O tratamento com ATP não foi capaz de induzir produção aumentada de ROS pelos MDMO WT e P2X7<sup>-/-</sup>.



## 8 REFERÊNCIAS

ADINOLFI, E. et al. Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 7, p. 3260–3272, 18 jul. 2005.

AMARAL, E. P. et al. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004188, 2014.

AMIRI, A. et al. Association of P2X7 gene common polymorphisms with pulmonary tuberculosis in Lur population of Iran. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 19, n. 3, p. 231–234, 1 jul. 2018.

ANDRADE, M. R. M. et al. Pathogenic Mycobacterium bovis strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 3 ago. 2012.

ARNER, P.; RYDÉN, M. The contribution of bone marrow-derived cells to the human adipocyte pool. **Adipocyte**, v. 6, n. 3, p. 187, 3 jul. 2017.

ASSOUVIE, A.; DALEY-BAUER, L. P.; ROUSSELET, G. Growing Murine Bone Marrow-Derived Macrophages. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1784, p. 29–33, 2018.

BAHARI, G. et al. Association of P2X7 gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeast Iran. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 160–166, 24 jan. 2013.

BERMUDEZ, L. E.; YOUNG, L. S. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of Mycobacterium avium complex. **The Journal of Immunology**, v. 140, n. 9, 1988.

BIEDERMANN, T.; RÖCKEN, M.; CARBALLIDO, J. M. TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell-Mediated Immune Responses of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 9, n. 1, p. 5–14, 1 jan. 2004.

BOMFIM, C. C. B. et al. P2X7 receptor in bone marrow-derived cells aggravates tuberculosis caused by hypervirulent Mycobacterium bovis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. APR, p. 435, 13 abr. 2017.

BOVOLINI, G. M.; SILVA, E. A.; SOUZA, V. N. B. DE. Desempenho dos antígenos PGL-1, LID-1 e NDO-LID para diagnóstico sorológico de hanseníase em pacientes e contatos domiciliares. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 44, p. 1–14, 2019.

BRAGA, A. F. et al. Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: in vitro stimulation by sonicated *Mycobacterium leprae* induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 655–661, 24 jul. 2015.

BRASIL. **Lei Nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998. Altera, atualiza, e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências... Brasília, DF, 2015. In: MinC. Legislação de direitos autorais. Brasília, 2015. [s.l: s.n.].**

BRASIL, M. T. L. R. F. et al. Sorologia Anti PGL-1 e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 3, p. 262–271, set. 2003.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732–736, 30 jul. 1999.

BURNSTOCK, G. Purinergic nerves and receptors. **Progress in Biochemical Pharmacology**, v. 16, p. 141–154, 1 jan. 1980.

CAVALIERE, I. **Hanseníase na história - Invivo**. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/historia/hanseniase-na-historia/>>. Acesso em: 24 ago. 2022.

CHAN, A. H.; SCHRODER, K. Cytokines Focus: Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 1, 1 jan. 2020.

CHAVARRO-PORTILLO, B.; SOTO, C. Y.; GUERRERO, M. I. *Mycobacterium leprae*'s evolution and environmental adaptation. **Acta tropica**, v. 197, 1 set. 2019.

CHAVES, S. P. et al. Modulation of P2X7 purinergic receptor in macrophages by *Leishmania amazonensis* and its role in parasite elimination. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 10–11, p. 842–849, set. 2009.

CISNEROS-MEJORADO, A. et al. ATP Signaling in Brain: Release,

Excitotoxicity and Potential Therapeutic Targets. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2015.

COLLO, G. et al. Tissue distribution of the P2X7 receptor. **Neuropharmacology**, v. 36, n. 9, p. 1277–1283, 1 set. 1997.

CORRÊA, G. et al. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 6, p. 497–504, jun. 2010a.

CORRÊA, G. et al. Activation of the P2X7 receptor triggers the elimination of *Toxoplasma gondii* tachyzoites from infected macrophages. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 6, p. 497–504, 1 jun. 2010b.

COSTA, R. D. et al. Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 99–103, 2008.

COUTINHO-SILVA, R. et al. Inhibition of chlamydial infectious activity due to P2X7R-dependent phospholipase D activation. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 403–412, 1 set. 2003.

COUTINHO-SILVA, R.; SAVIO, L. E. B. Purinergic signalling in host innate immune defence against intracellular pathogens. **Biochemical Pharmacology**, v. 187, p. 114405, 1 maio 2021.

CUNHA, M. D. G. S. et al. OFLOXACIN multicentre trial in MB leprosy FUAM-Manaus and ILSL-Bauru, Brazil. **Leprosy Review**, v. 83, n. 3, p. 261–268, 1 set. 2012.

DA SILVA, M. B. et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006532, 1 jun. 2018.

DE MOURA, R. S. et al. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 11–18, 2008.

DI VIRGILIO, F. Liaisons dangereuses: P2X7 and the inflammasome. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 465–472, 1 set. 2007.

DI VIRGILIO, F. et al. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 15–31, 18 jul. 2017.

EBERHARDT, N. et al. Purinergic modulation of the immune response to

infections. **Purinergic Signalling** **2022** **18:1**, v. 18, n. 1, p. 93–113, 8 jan. 2022.

EIDT, L. M. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. **Saúde e Sociedade**, v. 13, n. 2, p. 76–88, ago. 2004.

ELLEGAARD, M. et al. Bone phenotype of P2X4 receptor knockout mice: implication of a P2X7 receptor mutation? **Purinergic Signalling**, v. 17, n. 2, p. 241–246, 1 jun. 2021.

ESQUENAZI, D. et al. Correlation between Central Memory T Cell Expression and Proinflammatory Cytokine Production with Clinical Presentation of Multibacillary Leprosy Relapse. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127416, 19 maio 2015.

FERNANDO, S. L. et al. A polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 175, n. 4, p. 360–366, 15 fev. 2007.

FONSECA, A. B. DE L. et al. The influence of innate and adaptive immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, 6 fev. 2017.

FUJII, S. ATP- and Adenosine-Mediated Signaling in the Central Nervous System: The Role of Extracellular ATP in Hippocampal Long-Term Potentiation. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. 2, p. 103–106, 1 jan. 2004.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 363–375, ago. 2002.

GROSSI ARAÚJO, M. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373–382, 2003.

GU, B. J. et al. A Glu-496 to Ala Polymorphism Leads to Loss of Function of the Human P2X7 Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11135–11142, 6 abr. 2001.

HUNGRIA, E. M. et al. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. SUPPL.1, p. 104–111, dez. 2012.

JAMIESON, S. E. et al. Evidence for associations between the purinergic receptor P2X 7 (P2RX7) and toxoplasmosis. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 5,

p. 374–383, jul. 2010.

JANSEN, A. F. M. et al. Genetic variations in innate immunity genes affect response to *Coxiella burnetii* and are associated with susceptibility to chronic Q fever. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 5, p. 631.e11-631.e15, 1 maio 2019.

KANELLOPOULOS, J. M. et al. Structural and Functional Features of the P2X4 Receptor: An Immunological Perspective. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 852, 25 mar. 2021.

KASAHARA, T. et al. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. **The Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, 1983.

KATOCH, V. M., & SHARMA, V. D. Recent advances in the microbiology of leprosy. **Indian journal of leprosy**, v. 72, n. 3, p. 363–379, 2000.

KENT, W. J. et al. The Human Genome Browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, n. 6, p. 996–1006, 1 jun. 2002.

KINDLER, V. et al. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 731–740, 10 mar. 1989.

LASTÓRIA, J. C. et al. Leprosy: reality of the clinical diagnosis. **Hansenologia Internationals**, v. 28, n. 1, p. 53–58, 2003.

LEAL-CALVO, T. et al. Large-Scale Gene Expression Signatures Reveal a Microbicidal Pattern of Activation in *Mycobacterium leprae*-Infected Monocyte-Derived Macrophages With Low Multiplicity of Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1310, 16 abr. 2021.

LEES, M. P. et al. P2X 7 Receptor-Mediated Killing of an Intracellular Parasite, *Toxoplasma gondii*, by Human and Murine Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7040–7046, 15 jun. 2010.

LOCKWOOD, D. N. J.; SUNNETHA, S. Hanseníase: uma doença muito complexa para um paradigma simples de eliminação. **Boletim da Organização Mundial da Saúde**, v. 3, p. 1–10, 2005.

LYON, S. et al. Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 23–26, 2008.

MARTYNOVA, E. et al. Inflammasome Contribution to the Activation of

Th1, Th2, and Th17 Immune Responses. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 851835, 17 mar. 2022.

MCDERMOTT-LANCASTER, R. D. et al. Multiplication of Mycobacterium leprae in the nude mouse, and some applications of nude mice to experimental leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 55, n. 4 SUPPL., p. 889–895, 1988.

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p. 343–350, jul. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Proposta de esquema terapêutico para o tratamento da hanseníase.**

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla. 2019.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the Human Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 74, n. 4, p. 589, dez. 2010.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 828–832, 1 jun. 1994.

MOLLOY, A.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus calmette-guérin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1499–1509, 1 out. 1994.

MORANDINI, A.; SAVIO, L.; COUTINHO-SILVA, R. The role of p2x7 receptor in infectious inflammatory diseases and the influence of ectonucleotidases. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 4, p. 169–177, 2014.

MOREIRA-SOUZA, A. C. A. et al. The P2X7 receptor mediates Toxoplasma gondii Control in Macrophages through canonical NLRP3 inflammasome activation and reactive oxygen species production. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. OCT, 12 out. 2017.

MORTAZ, E. et al. Role of P2X7 Receptors in Release of IL-1 $\beta$ : A Possible Mediator of Pulmonary Inflammation. **Tanaffos**, v. 11, n. 2, p. 6, 2012.

MUNOZ, F. M. et al. Reactive oxygen species play a role in P2X7 receptor-mediated IL-6 production in spinal astrocytes. **Purinergic Signalling**, v. 16, n. 1, p. 97–107, 1 mar. 2020.

NANDI, S. K. et al. M. leprae HSP18 suppresses copper (II) mediated ROS

generation: Effect of redox stress on its structure and function. **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 648–660, 1 mar. 2020.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90–98, 1 jan. 2015.

NATHAN, C. F. et al. Local and Systemic Effects of Intradermal Recombinant Interferon- $\gamma$  in Patients with Lepromatous Leprosy. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198607033150102>, v. 315, n. 1, p. 6–15, 16 nov. 2009.

NICCHIO, M. V. C. et al. Spatial and temporal epidemiology of Mycobacterium leprae infection among leprosy patients and household contacts of an endemic region in Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 163, p. 38–45, 1 nov. 2016.

NIÑO-MORENO, P. et al. P2X7 and NRAMP1/SLC11 A1 gene polymorphisms in Mexican mestizo patients with pulmonary tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 148, n. 3, p. 469–477, 15 mar. 2007.

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

PLACIDO, R. et al. P2X7 purinergic receptors and extracellular ATP mediate apoptosis of human monocytes/macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis reducing the intracellular bacterial viability. **Cellular Immunology**, v. 244, n. 1, p. 10–18, 1 nov. 2006.

POLYCARPOU, A. et al. Mycobacterium leprae Activates Toll-Like Receptor-4 Signaling and Expression on Macrophages Depending on Previous Bacillus Calmette-Guerin Vaccination. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. JUL, 8 jul. 2016.

PREVEDELLO, F. C.; MIRA, M. T. Hanseníase: uma doença genética? **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 5, p. 451–459, 2007.

RASTOGI, R. et al. Molecular characterization and immunogenic function of ML1899 (LipG) of Mycobacterium leprae. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 1629–1640, 1 nov. 2019.

REN, W. et al. Inherent P2X7 Receptors Regulate Macrophage Functions during Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 232**, v. 23, n. 1, p. 232, 26 dez. 2021.

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. 255–273, 1966.

ROACH, D. R. et al. TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4620–4627, 1 maio 2002.

ROGER, S. et al. Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. **Journal of Psychiatric Research**, v. 44, n. 6, p. 347–355, abr. 2010.

SALES, M. P. U. et al. Genetic diversity among mycobacterium bovis isolates: A preliminary study of strains from animal and human sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4558–4562, 2001.

SALLES, É. M. DE et al. P2X7 receptor drives Th1 cell differentiation and controls the follicular helper T cell population to protect against Plasmodium chabaudi malaria. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2017.

SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 69–76, 1998.

SANTIAGO-CARVALHO, I. et al. P2x7 Receptor Signaling Blockade Reduces Lung Inflammation and Necrosis During Severe Experimental Tuberculosis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 385, 5 maio 2021.

SANTOS, M. B. et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 40–49, 1 jul. 2017.

SASAKI, S. et al. Mycobacterium leprae and leprosy: a compendium. **Microbiology and immunology**, v. 45, n. 11, p. 729–736, 2001.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Hanseníase 2022. **Boletim Epidemiológico**, v. Janeiro, n. Número especial, p. 54, 2022.

SHEMON, A. N. et al. A Thr357 to Ser Polymorphism in Homozygous and Compound Heterozygous Subjects Causes Absent or Reduced P2X7 Function



and Impairs ATP-induced Mycobacterial Killing by Macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 2079–2086, 27 jan. 2006.

SHIEH, C. H. et al. P2X7-dependent, but differentially regulated release of IL-6, CCL2, and TNF- $\alpha$  in cultured mouse microglia. **Glia**, v. 62, n. 4, p. 592–607, abr. 2014.

SIBLEY, L. D. et al. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 5, p. 1232, 1988.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. **Springer Seminars in Immunopathology 1992 13:3**, v. 13, n. 3, p. 413–426, jul. 1992.

SIELING, P. A.; MODLIN, R. L. Cytokine Patterns at the Site of Mycobacterial Infection. **Immunobiology**, v. 191, n. 4–5, p. 378–387, 1 jan. 1994.

SILVA, L. M. et al. Immunohistochemical analysis of the expression of cellular transcription NF $\kappa$ B (p65), AP-1 (c-Fos and c-Jun), and JAK/STAT in leprosy. **Human Pathology**, v. 46, n. 5, p. 746–752, 12 fev. 2015.

SINAN, M. **Indicadores Hanseníase - DCCI**. Disponível em: <<http://indicadoreshanseniaze.aids.gov.br/>>. Acesso em: 16 ago. 2022.

SOUZA, C. S. HANSENÍASE: FORMAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 30, p. 325–334, 1997.

SOUZA, V. N. B. DE; PEREIRA, A. C. Genética humana na susceptibilidade à hanseníase. **Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas**, v. 32, n. 1, p. 81–93, 30 jun. 2007.

SOUZA, R. DA C. et al. Associations Between the Purinergic Receptor P2X7 and Leprosy Disease. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 1767, 2 nov. 2021.

SPENCER, J. S. et al. Analysis of Antibody Responses to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins To Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 18, n. 2, p. 260, fev. 2011.

SUN, C. et al. Identification and characterization of a novel variant of the human P2X7 receptor resulting in gain of function. **Purinergic Signalling**, v. 6, n. 1, p. 31–45, mar. 2010.

SURPRENANT, A. et al. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science**, v. 272, n. 5262, p. 735–738, 3

maio 1996.

TARIQUE, M. et al. Fate of T Cells and their Secretary Proteins During the Progression of Leprosy. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, n. 9, p. 889–899, 5 set. 2017.

TEKIN, D. et al. Polymorphism in the P2X7 gene increases susceptibility to extrapulmonary tuberculosis in Turkish children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 29, n. 8, p. 779–782, ago. 2010.

TELES, S. F. et al. Association between NDO-LID and PGL-1 for leprosy and class I and II human leukocyte antigen alleles in an indigenous community in Southwest Amazon. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 296–303, 1 jul. 2020.

THANGARAJ, H. S. et al. Identification, sequencing, and expression of Mycobacterium leprae superoxide dismutase, a major antigen. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1937, 1990.

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

VIRGILIO, F. DI. Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X 7 receptor is not the only target. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 441–443, 2003.

WANG, H. et al. Genetic interaction of purinergic P2X7 receptor and ER- $\alpha$  polymorphisms in susceptibility to osteoporosis in Chinese postmenopausal women. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 36, n. 4, p. 488–497, 1 jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chemotherapy of leprosy for control programmes : report of a WHO study group [meeting held in Geneva from 12 to 16 October 1981]. 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. **Weekly epidemiological record**, v. 96, n. 36, p. 421–444, 2021.

WU, J. et al. Single nucleotide polymorphisms in p2x7 gene are associated with serum immunoglobulin g responses to mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients. **Disease Markers**, v. 2015, 2015.

XU, H. et al. Purinergic P2X7 receptor functional genetic polymorphisms

are associated with the susceptibility to osteoporosis in Chinese postmenopausal women. **Purinergic Signalling**, v. 13, n. 3, p. 339–346, 1 set. 2017.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277–279, 11 out. 1991.

ZHENG, X. et al. Genetic polymorphisms of the P2X7 gene associated with susceptibility to and prognosis of pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 53, p. 24–29, 1 set. 2017.

ZUMERLE, S. et al. Intercellular Calcium Signaling Induced by ATP Potentiates Macrophage Phagocytosis. **Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 1- 10.e4, 2 abr. 2019.

ANEXOS

**Aprovação CEUA**



GOVERNO DO ESTADO  
**RIO DE JANEIRO**

Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**REITORIA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CI CEUA n° 032/2020

Campos dos Goytacazes, 29 de abril de 2020.

Para: Prof. Alba Lucínia Peixoto Rangel

LBR/CBB/UENF

De: Dr. Clóvis de Paula Santos

Presidente da CEUA

Assunto: Parecer

Prezado pesquisador,

Venho informar que o projeto submetido à CEUA protocolo 431 foi aprovado, conforme documento anexo. Obrigado por submeter seu projeto a CEUA.

Atenciosamente,  
Clóvis de Paula Santos  
Presidente da CEUA

Clóvis de Paula Santos  
Presidente CEUA/UENF



GOVERNO DO ESTADO  
**RIO DE JANEIRO**

Secretaria de Estado de Ciência, Tecnologia e Inovação  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**REITORIA**  
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 431, intitulado "CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS MOLECULARES DE MORTE DE Mycobacterium leprae MEDIADOS PELO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 EM MACRÓFAGOS" sob a responsabilidade da Dra. Alba Lucínia Peixoto Rangel, Centro de Bociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 28/04/2020. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 28/04/2024.

Campos dos Goytacazes, 28 de abril de 2020.

Clovis de Paula Santos

Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

**Clovis de Paula Santos**  
Presidente CEUA/UENF



Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602  
Tel.: (22) 2739-4178 - (22) - 2739-7180 correio eletrônico: [adrianafaria@uenf.br](mailto:adrianafaria@uenf.br)