

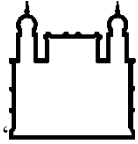
**MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

O TECIDO ADIPOSEO COMO SÍTIO DE INFECÇÃO POR
Mycobacterium leprae

SABRINA ALVES DOS REIS

Rio de Janeiro
Julho de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

SABRINA ALVES DOS REIS

O tecido adiposo como sítio de infecção por *Mycobacterium leprae*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadores:

Prof. Dr. Flávio Alves Lara

Profa. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO

Julho de 2016

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

R375 Reis, Sabrina Alves dos

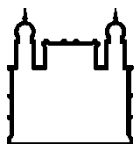
O tecido adiposo como sítio de infecção por *Mycobacterium leprae* /
Sabrina Alves dos Reis. – Rio de Janeiro, 2016.
xvi, 102 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 73-85

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. Adipócitos. 4. Células
3T3-L1. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: SABRINA ALVES DOS REIS

O TECIDO ADIPOSEO COMO SÍTIO DE INFECÇÃO POR *Mycobacterium leprae*

ORIENTADORES: Prof. Dr. Flávio Alves Lara

Profa. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 29/07/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro - **Revisora**

Prof. Dra. Danuza de Almeida Esquenazi- **Presidente**

Prof. Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes - **Membro**

Prof. Dra. Giselle de Almeida Oliveira - **Membro**

Prof. Dra. Cristiana Santos de Macedo- **Suplente**

Prof. Dra. Cecília Jacques Gonçalves de Almeida - **Suplente**

Rio de Janeiro, 29 de Julho de 2016.

À todos que apoiaram e contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Finalmente, mais um passo dado. Os dias passam, e com eles as dificuldades decorrentes de toda caminhada árdua que nos faz pensar que nunca chegaríamos até aqui. Mas percebemos, neste momento final, o quanto passou rápido e valeu a pena todo esforço! Eis o momento de agradecer a todos que de alguma forma apoiaram e estimularam a todo momento para a realização de mais uma conquista.

Primeiramente agradecer Àquele que nos dá toda oportunidade nesta vida, quem começa com as primeiras palavras, mas que nos dá o livre arbítrio de escolhermos como terminar essa misteriosa história. Agradeço a Deus por me permitir mais um capítulo importante na minha vida profissional, pelas oportunidades que tem me concedido, as quais tenho me empenhado da melhor maneira possível.

Obrigada a minha família que está sempre ali com pensamento positivo para que eu alcance meus objetivos, mesmo não entendendo absolutamente nada do que estou fazendo da vida (rs), sei que é complicado entender essa loucura de pesquisa científica sem estar nesse mundo abstrato... Obrigada mãe e avó, por terem sempre me guiado no melhor caminho e agora sigo com minhas próprias pernas os caminhos que tenho escolhido, podendo contar com vocês a qualquer momento.

Um agradecimento especial também ao meu fiel companheiro, quem atura e entende todas as lamentações do meu dia a dia! Muito obrigada Marcus Paulo, por ser estrutura essencial para me manter de pé frente a minha caminhada, não só profissional mas principalmente pessoal. Amo você! Agradeço também todo apoio de sua família, que me acolheu em sua casa vários dias, preocupados porque eu passava tanto tempo no computador. Agora poderei justificar o porque!

Agradeço ao Flávio, por confiar a mim o desenvolvimento deste projeto desde a iniciação científica e por toda orientação (e nos fazer enlouquecer às vezes) que foi e será sempre essencial para nosso amadurecimento como alunos e pesquisadores. Apesar de reclamar com você algumas vezes, na verdade agradeço muito a oportunidade de poder me aprofundar cada vez mais neste projeto que acredito que nos trará muitos bons frutos pela frente. Também à Dra. Cristina por toda contribuição experiente, por acreditar no nosso potencial e apoiar o desenvolvimento de nosso trabalho.

Obrigada toda equipe LAMICEL, como somos muitos não me atreverei em citar os nomes e correr o risco de esquecer alguém, mas saibam que são minha família científica, que cada um de vocês teve um papel importante nesta caminhada.

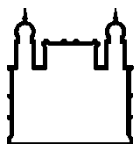
Do time LAMICEL destaco Karina e Arthur, o *team* UEZO, fiéis escudeiros desde a faculdade, Débora, a co-orientadora de todos, Jéssica, a desorientadora de todos, Sueyde, amizade da vida religiosa pra científica, Diego e Tiago. Obrigada ‘flavetes’ e ‘flavitos’ pelo companheirismo e por fazerem os dias no laboratório mais divertidos!

À revisora Dra. Roberta Olmo e aos componentes da banca, Dra. Danuza Esquenazi, Dr. Sérgio Antunes, Dra. Giselle Oliveira, Dra. Cristiana Macedo e Dra. Cecília Jacques de Almeida por aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

Obrigada ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo aprimoramento profissional e intelectual que obtive durante o mestrado.

À CAPES pelo suporte financeiro importante para a execução deste trabalho.

*“Quero dizer-lhes o segredo que me levou a alcançar meus objetivos:
Minha força reside unicamente em minha persistência”
- Louis Pasteur*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

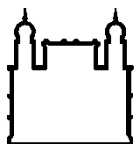
O TECIDO ADIPOSEO COMO SÍTIO DE INFECÇÃO POR *Mycobacterium leprae*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Sabrina Alves dos Reis

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta principalmente a pele e nervos periféricos devido a predileção do agente causador, o patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*, por macrófagos e células de Schwann. Descrever as possíveis interações entre adipócitos e *M. leprae* nos permite identificar um sítio potencial de infecção e persistência da micobactéria ainda não investigado, revelando assim um papel importante e até então desconhecido do tecido adiposo sobre na patologia da hanseníase. No presente estudo, fibroblastos murinos da linhagem 3T3-L1 diferenciados a adipócitos foram utilizados como modelo experimental *in vitro* para descrever a modulação lipídica de adipócitos infectados e investigar a modulação imune destas células em resposta à infecção. Fragmentos de tecido adiposo subcutâneo de pacientes multibacilares foram processados para detecção do bacilo e investigação da mobilização das gotículas lipídicas por microscopia confocal. Os soros dos pacientes e os sobrenadantes celulares foram utilizados para análise de adipocinas pela tecnologia Luminex. Os resultados demonstraram mobilização lipídica em adipócitos infectados 24 horas pelo *M. leprae in vitro*. Exames histopatológicos evidenciaram a presença da micobactéria no tecido adiposo subcutâneo de pacientes multibacilares, indicando que o tecido é um alvo de infecção *in vivo*. Além disso, foram observados diferentes níveis de produção de adipocinas entres as formas clínicas da doença, no entanto, as adipocinas não foram detectadas no modelo celular. Este trabalho sugere que o tecido adiposo pode atuar como um sítio de infecção pelo *M. leprae* até então desconhecido, e contribui para descrições sobre a complexa regulação imune que ocorre na doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ADIPOSE TISSUE AS SITE FOR *Mycobacterium leprae* INFECTION

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Sabrina Alves dos Reis

Leprosy is a chronic infectious disease that mainly affects the skin and peripheral nerves due to the predilection of its causative agent, the obligate intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*, to infect macrophages and Schwann cells. The investigation of the possible interaction between adipocytes and *M. leprae* may allow us to identify a potential novel site of bacterial infection and persistence, revealing important and unknown roles of adipose tissue on leprosy pathogenesis. In this study, the murine fibroblasts 3T3-L1 lineage was differentiated into adipocytes and used as an *in vitro* experimental model to investigate lipid and immune modulation in response to *M. leprae* infection. Subcutaneous adipose tissue biopsies from multibacillary patients were processed for detection of bacillus and mobilization of lipid droplets by confocal microscopy. Serum samples of leprosy patients and cell culture supernatants were used for measurements of adipokines by Luminex technology. The results show lipid mobilization in *in vitro* infected adipocytes after 24 hours of infection. Histopathological examination showed the presence of mycobacteria in the subcutaneous adipose tissue of multibacillary patients, suggesting that this tissue may be a target during *in vivo* infection. Moreover, different adipokines serum levels were detected among the clinical forms of the disease. However, the induction of adipokines by *M. leprae* was not observed in the cellular model. This study suggests that adipose tissue can act as a novel site for *M. leprae* infection, and contributes to uncover the complex immune regulation that occurs in leprosy.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase	1
1.1.1 Hitórico do mal de Hansen	1
1.1.2 O agente etiológico	4
1.1.3 Epidemiologia	7
1.1.4 Patogênese	11
1.1.5 Diagnóstico e tratamento	14
1.2 Tecido Adiposo	16
1.2.1 Biologia dos adipócitos – adipócitos brancos, marrons e bege	17
1.2.2 Adipogênese	19
1.2.3 Função endócrina do tecido adiposo	23
1.2.4 Adipocinas	24
1.2.4.1 Leptina	25
1.2.4.2 Adiponectina	26
1.2.4.3 Resitina	27
1.3 Células de Linhagem 3T3-L1	28
1.4 Lipólise de Corpúsculos Lipídicos de Adipócitos	29
1.5 Tecido Adiposo e Doenças Infecciosas	32
1.6 Modulação do Metabolismo Lipídico na Infecção por <i>Mycobacterium leprae</i>	34
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVO GERAL	39
3.1 Objetivos Específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Grupo de Estudo	41
4.2 Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i>	41

4.3	Cultura de Células de Linhagem 3T3-L1	42
4.4	Purificação de Ácidos Nucleicos	42
4.4.1	Extração e purificação de RNA e DNA	42
4.4.2	Tratamento do RNA com DNase	43
4.4.3	Síntese de cDNA – RT-PCR	44
4.4.4	PCR em tempo real para determinação da viabilidade micobacteriana	44
4.4.5	Análise dos dados obtidos a partir do PCR em tempo real.....	44
4.5	Microscopia de Fluorescência	45
4.6	Detecção Histopatológica de <i>M. leprae</i> em Fragmentos de Tecido Adiposo de Pacientes Lepromatosos.....	46
4.7	Extração de Lipídios e Cromatografia de Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC)	46
4.8	Ensaio de Lipólise	47
4.9	Análise da Produção de Adipocinas	47
4.10	Análises Estatísticas	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Modelo <i>in vitro</i> de Infecção do <i>M. leprae</i> em Adipócitos	49
5.2	Análise de Modulação Lipídica em Culturas Infectadas por <i>M. leprae</i>	52
5.3	Confirmação de Acesso da Micobactéria ao Tecido Adiposo <i>in vivo</i>	54
5.4	Contribuição Endócrina do Tecido Adiposo durante a Infecção por <i>M. leprae</i>	57
6.	PERSPECTIVAS	70
7.	CONCLUSÕES	71
8.	REFERÊNCIAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Ilustração do estigma da doença.	1
Figura 1.2	Ilustração das folhas, fruto e semente da planta chaulmoogra, da espécie <i>Hydnocarpus anthelmintica</i>	3
Figura 1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura de bacilos de <i>M. leprae</i>	4
Figura 1.4	Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i>	5
Figura 1.5	Cultivo de <i>M. leprae</i> em coxim plantar de camundongo nude.	6
Figura 1.6	Taxas de prevalência de Hanseníase no mundo no ano de 2014	8
Figura 1.7	Coeficiente de prevalência e detecção em hanseníase no Brasil entre 2005 e 2014.	9
Figura 1.8	Coeficiente de detecção de hanseníase por municípios do Brasil	10
Figura 1.9	Classificações clínicas da hanseníase e perfil de resposta imunológica do hospedeiro.	12
Figura 1.10	Características clínicas na hanseníase.	14
Figura 1.11	Representação esquemática dos adipócitos branco e marrom	18
Figura 1.12	Ontogenia de adipócitos branco, marrom, bege e miócitos.	22
Figura 1.13	Tecido adiposo branco: efeitos sobre o metabolismo e inflamação	23
Figura 1.14	Fatores inflamatórios e anti-inflamatórios secretados por adipócitos.....	24
Figura 1.15	Estrutura tridimensional da leptina.	25
Figura 1.16	Estrutura da adiponectina.	27
Figura 1.17	Acúmulo de lipídios durante a diferenciação de células de linhagem 3T3-L1.	29
Figura 1.18	Representação esquemática da composição do corpúsculo lipídico.....	30
Figura 1.19	Regulação da lipólise em adipócitos.	32
Figura 5.1	Viabilidade do <i>Mycobacterium leprae</i> em culturas de adipócitos 3T3-L1.....	49
Figura 5.2	Avaliação da modulação lipídica durante a infecção de adipócitos 3T3-L1 por <i>M. leprae</i>	51
Figura 5.3	Extração lipídica de cultura de adipócitos 3T3-L1.	52
Figura 5.4	Análise de lipólise.	53

Figura 5.5	Exame histopatológico de fragmentos de tecido subcutâneo de paciente com hanseníase multibacilar.	55
Figura 5.6	Presença de antígenos de <i>M. leprae</i> em fragmentos de tecido subcutâneo de paciente com hanseníase multibacilar	57
Figura 5.7	Níveis séricos de leptina em pacientes com hanseníase e controles sadios.	59
Figura 5.8	Níveis séricos de adiponectina em pacientes com hanseníase e controles sadios.	62
Figura 5.9	Níveis séricos de resistina em pacientes com hanseníase e controles sadios.	65
Figura 5.10	Níveis séricos de MCP-1 em pacientes com hanseníase e controles sadios.	66
Figura 5.11	Ensaio de curva temporal da produção de adipocinas em sobrenadantes de adipócitos da linhagem 3T3-L1 infectados <i>in vitro</i>	67
Figura 5.12	Análise da produção de adipocinas por adipócitos <i>in vitro</i> em resposta a infecção por <i>M. leprae</i>	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase	13
Tabela 1.2	Esquemas recomendados de poliquimioterapia.....	15

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ADRP	Proteína relacionada à diferenciação do adipócito
AG	Ácidos graxos
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATGL	Adipócito triglicerídeo lipase
ATP	Adenosina trifosfato
BAAR	Bacilo álcool-acido resistente
BB	<i>Borderline-borderline</i>
BL	<i>Borderline-lepromatoso</i>
BMP	Proteína morfogênica óssea
BSA	Albumina do soro bovino
BT	<i>borderline-tuberculoide</i>
C/EBP	Proteína intensificadora de ligação CCAAT
CD	Grupamentode diferenciação
Ct	Limiar de ciclo
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4'6-diamidino-2-phenilindol
DEMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DGAT	Diacilglicerol aciltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ENL	Eritema nodoso leproso
FAS	Ácido graxo sintase
FOXN1	<i>Forkhead Box N1</i>
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alta performance
HSL	Lipase hormônio sensível
IBMX	3-isobutil-metilxantina
IFN-γ	Interferão gama
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal

LAM	Lipoarabinomanana
LL	Lepromatoso-lepromatoso
LM	Lipomanana
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MKK3	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno 3
MOI	Multiplicidade de infecção
MYF5	Fator miogênico 5
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NRF1	Fator respiratório nuclear 1
OMS	Organização mundial de saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio 1
PB	Paucibacilar
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE3B	Fosfodiesterase 3B
PDIM	Dimicocerosato de ftiocerol
PIM	Manosídeo de fosfatidilinositol
PGL	Glicolipídio fenólico
PKA	Proteína quinase A
PL	Fosfolipídeo
PPARγ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma gama
PQT	Poliquimioterapia
PRDM16	Proteína 16 com domínio PR
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RR	Reação reversa
RXRα	Receptor de retinoide X alfa
SB	Soro bovino

SCD1	Estearoil-CoA dessaturase
SER	Elemento de resposta do esterol
SFB	Soro fetal bovino
SREBP1	Fator de transcrição de ligação do elemento regulatório de esterol 1
TB	Tuberculose
TAG	Triacilglicerol
TAK1	Fator de transformação do crescimento beta quinase ativada 1
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial A
TGF β	Fator de transformação do crescimento beta
TIP47	Proteína de interação de cauda de 47 kDa
TMM	Monomicolato de trealose
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TT	Tuberculoide-tuberculoide
UCP-1	Proteína desacopladora 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

Doença crônica, sistêmica e infectocontagiosa, que acomete a pele e nervos periféricos dos indivíduos, podendo levar a incapacidades físicas.

A hanseníase é uma doença que afeta principalmente regiões mais carentes no mundo. Atualmente o Brasil é um dos países líderes no ranking de prevalência da doença, e mesmo com queda neste percentual ao longo das décadas, é um dos países comprometidos com a meta de eliminação da doença, e concentra mais casos novos registrados a cada ano, persistindo ainda hoje como um problema de saúde pública⁽¹⁾.

1.1.1 Histórico do mal de Hansen

A Hanseníase, ou Mal de Hansen, historicamente conhecida como ‘lepra’, tem como agente etiológico o mais antigo patógeno descrito como causador de uma doença humana, o *Mycobacterium leprae*. Além de citações na Bíblia cristã, relacionando a doença ao pecado e impureza da alma de seus portadores (Figura 1.1), há referências mais remotas que datam de 600 a.C. e procedem da Ásia. Um estudo comparativo de genomas de isolados clínicos de *M. leprae* demonstrou que a mesma desenvolveu-se junto com a espécie humana, desde sua origem na Etiópia^(2,3).



Figura 1.1: Ilustração do estigma da doença. Os doentes eram isolados da sociedade, e considerados pecadores impuros devido às marcas na pele. Fonte: Revista Ciência Hoje (2012)⁽⁴⁾.

O desenvolvimento da doença, quando não tratada, pode levar a estágios extremamente deformantes, como mãos em garra e afundamento da face, e no passado gerava uma imagem aterrorizante de mutilação, rejeição aos portadores e exclusão da sociedade. Por muitos anos os doentes foram isolados da população sadia, sendo obrigados a usar vestimentas características, carregando sinos para alertar a população sobre sua aproximação. A prevenção à doença se limitava ao isolamento em leprosários e assistência precária aos doentes, e se perdurou até meados do século XX⁽⁵⁾.

Após muitos anos estigmatizantes aos portadores devido ao preconceito, seu agente etiológico foi descoberto por Gerhard Hansen, médico bacteriologista e dermatologista norueguês, em 1873⁽⁶⁾, ficando claro ser um fenômeno natural causado por um microrganismo, iniciando-se então a busca pelo tratamento. Na década de 1960, o pesquisador Abraão Rotberg, visando diminuir o estigma aos portadores, introduziu a substituição do termo 'lepra' por hanseníase, em referência ao descobridor do agente causador da doença, que então teve seu nome modificado no Brasil a partir da aprovação do decreto nº 165, de 14 de maio de 1976⁽⁷⁾.

Ao final do século XIX e começo do século XX, a hanseníase foi alvo de maior atenção, principalmente na cidade do Rio de Janeiro e em São Paulo. Houveram várias tentativas de tratamento da doença, com uma população de incapacitados e pobres. Muitos experimentos, com o uso de várias drogas, causava-lhes em geral muito mais danos que benefícios. Muitas das tentativas surgiram a partir da imaginação de médicos, como por exemplo a inoculação de microrganismos de outras doenças, como a erisipela, doença de pele causada por estreptococos, até mesmo a tentativa de utilizar a mordida de cobras venenosas⁽⁸⁾.

Até a década de 1940, o óleo de chaulmoogra foi um importante elemento na prática terapêutica da doença. Era um óleo extraído das sementes encontradas nos frutos das árvores indianas chamadas de Chaulmoogra (Figura 1.2) e foi apropriado pela medicina ocidental no final do século XIX, a partir da observação de seu uso pela população indiana para o tratamento de doenças de pele. Poucas décadas após, no Hospital dos Lázaros no Rio de Janeiro, esse medicamento passou a ser visto como específico para a lepra, sendo um tratamento de uso interno e externo, que provocava reações fortes nos pacientes, tais como gastralgia, vômitos e diarreia. Apesar de ter sido universalmente aceito como benéfico ao tratamento, não há nenhum indício de sua eficácia. Outra forma de tratamento utilizada era a eletrocauterização das lesões

cutâneas. De modo geral, os tratamentos disponíveis nesta época eram verdadeiras torturas para o paciente sem alguma eficiência contra a doença⁽⁵⁾.



Figura 1.2: Ilustração das folhas, fruto e semente da planta chaulmoogra, da espécie *Hydnocarpus anthelmintica*. As plantas conhecidas pela designação de chaulmoogras pertencem à família das Flacourtiáceas, e seus óleos contêm os ácidos hidnocárpico e chaulmúgrico, que são considerados os responsáveis pela ação terapêutica nos casos de lepra. Essas plantas tropicais são angiospermas (possuem flores e frutos) e crescem, normalmente, até a altura de um arbusto ou árvore mediana. Os gêneros dessa família conhecidos como chaulmoogras são: *Hydnocarpus*, *Carpotroche*, *Caloncoba*, *Oncoba*, *Lindackeria* e *Mayna*, tendo sido, estes dois últimos, pouco empregados no tratamento da lepra. Fonte: <http://www.nzdl.org/>.⁽⁹⁾ Acesso em Junho de 2016.

Com os avanços científicos, o tratamento para a Hanseníase apareceu no final dos anos 1940 com a introdução de dapsona e seus derivados. A dapsona firmou-se então como a principal droga anti-hansênica e estratégica para o controle da doença na década de 1950. Posteriormente, a partir de 1962, a clofazimina testada por Browne & Hogerzeil⁽¹⁰⁾ e a rifampicina, por Opromolla⁽¹¹⁾, também começaram a ser utilizadas no tratamento da hanseníase. No entanto, a monoterapia apresentava-se como a causa mais frequente de desenvolvimento da resistência ao medicamento e a utilização de, no mínimo, duas drogas potentes ajudariam a superar esse problema. Tendo conhecimento desse fato, a OMS introduziu a quimioterapia conhecida como poliquimioterapia (PQT/OMS), que consiste no uso destas três drogas combinadas.

Com o desenvolvimento da PQT indicada pela OMS a partir de 1981, porém implementada no Brasil somente a partir de 1985 pelo Ministério da Saúde, houve modificações significantes do quadro da hanseníase, que atualmente tem tratamento eficiente e cura, tendo sido erradicada em diversos países, trazendo a esperança do fim de uma doença milenar^(1,3,6).

1.1.2 O agente etiológico

O *M. leprae* é um parasito intracelular obrigatório tendo como alvo principal de infecção os macrófagos e células de Schwann, sendo a única bactéria capaz de infectar nervos periféricos, apresentando predileção por regiões mais frias do corpo⁽⁶⁾. É uma micobactéria aeróbica, não esporulada, imóvel em forma de bacilo com extremidades arredondadas, levemente curvada, medindo cerca de 1 a 8µm de comprimento por 0,2 a 0,5µm de largura, que multiplica-se lentamente por divisão binária, com tempo de geração entre 11 a 13 dias (Figura 1.3)^(12,13).

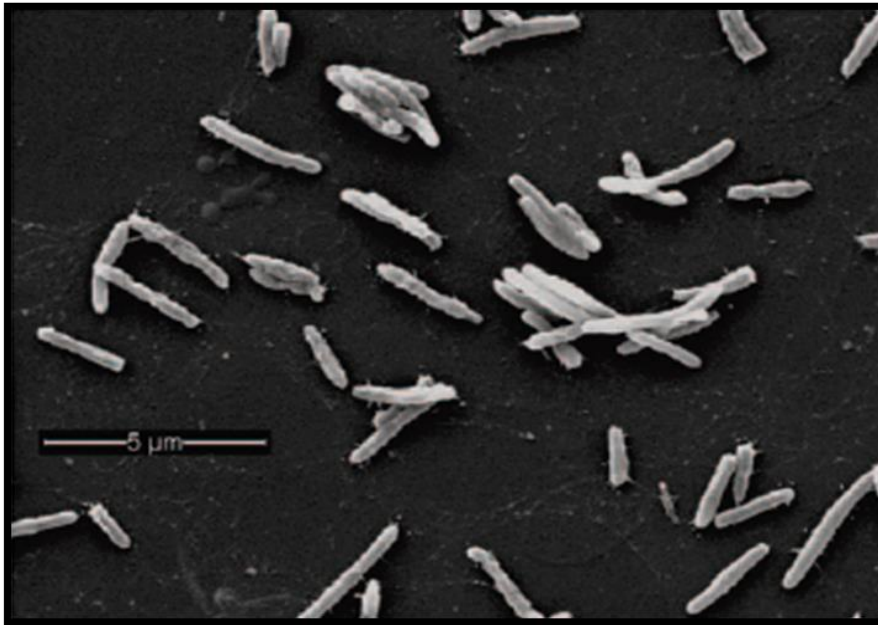


Figura 1.3: Microscopia Eletrônica de Varredura de bacilos de *M. leprae*. Fonte: Scollard et al. (2006)⁽⁶⁾.

Descrito como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), sua parede celular compara-se com a das outras micobactérias, contendo um envoltório celular extremamente rico em lipídios complexos, que as difere das outras bactérias, conferindo sua resistência a fármacos, a esterilização química e a defesa do hospedeiro. A parede celular contém peptidoglicanos, compostos de cadeias alternadas de N-acetilglicosamina e N-glicolilmuramato conectadas por pontes cruzadas de peptídeos. Sobre o peptidoglicano se encontra covalentemente ligado a arabinogalactana, um polímero constituído de cadeias de galactose (galactanas) das quais emergem ramificações de cadeias de arabinose (arabinanas). A arabinogalactana juntamente com a camada de peptidoglicano, formam uma zona eletro-densa em torno do *M. leprae*. Os ácidos micólicos são ligados a cadeias terminais de arabinanas para formar um folheto

interno de uma pseudobicamada lipídica. O outro folheto externo é composto por uma rica variedade de ácidos graxos como os ácidos micólicos que compõem os monomicolatos de trealose (TMM) e os ácidos micoserósicos que compõem o dimicocerosato de fitiocerol (PDIM) e os glicolipídios fenólicos (PGLs), formando a zona eletrônica-lúcida (Figura 1.4). No caso do *M. leprae*, a camada mais externa contém grande abundância de um lipídeo não encontrado em outras micobactérias, o glicolipídio fenólico-1 (PGL-1), conferindo sua especificidade imunológica. Estudos sugerem que o PGL-1 está envolvido na interação do *M. leprae* com a laminina presente nas células de Schwann, sugerindo ser esta a origem molecular da especificidade da infecção nos nervos periféricos⁽¹⁴⁾.

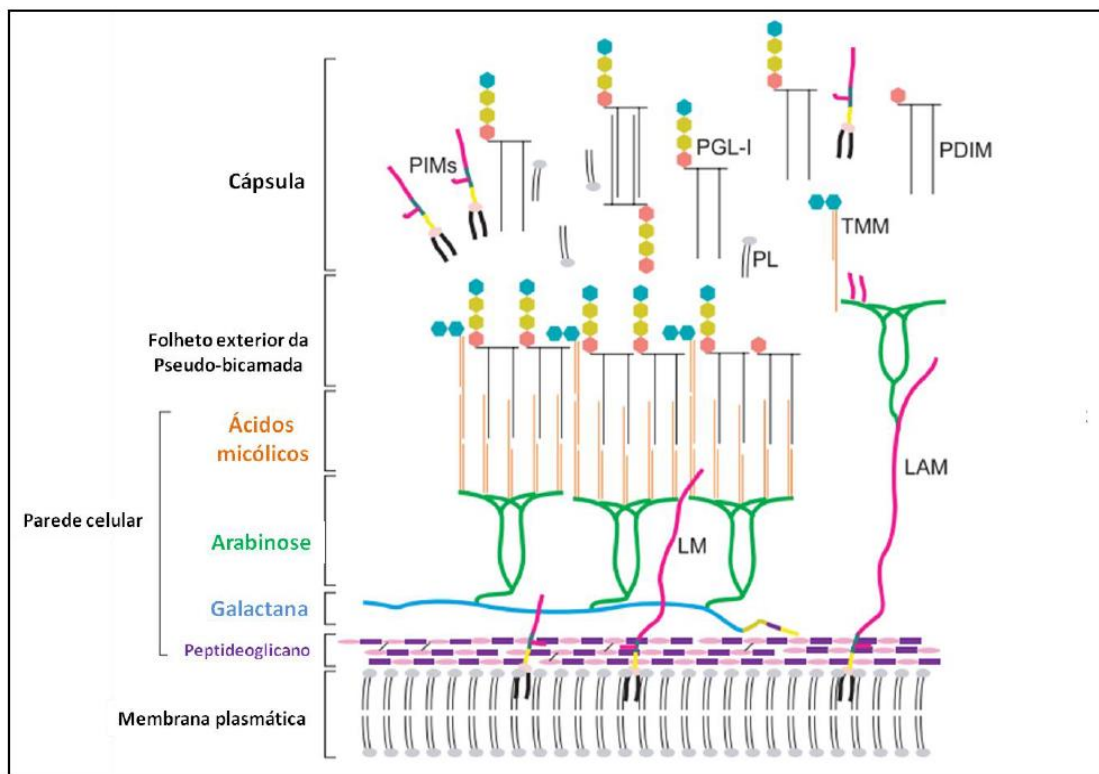


Figura 1.4: Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae*. A membrana plasmática do *M. leprae* é envolvida por uma parede celular composta de peptidoglicano ligada covalentemente a arabinogalactana. Nesse arranjo pode ser encontrado componentes como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Os ácidos micólicos estão ligados a resíduos terminais de arabinose da arabinogalactana. Na porção mais externa do envelope celular é encontrado monomicolato de trealose (TMM), glicolipídio fenólico 1 (PGL-I), manosídeos de fosfatidilinositol (PIMs), dimicocerosato de fitiocerol (PDIM) e fosfolipídios (PL). Adaptado de Vissa & Brennan (2011)⁽¹⁵⁾.

Estudos mostram que durante a evolução do *M. leprae*, houve a redução do seu genoma, composto por aproximadamente 50% de pseudogenes, genes que perderam sua função devido ao acúmulo de mutações, o que sugere sua dependência e adaptação à célula hospedeira e sua lenta multiplicação^(2,16). Apesar de todas as principais vias anabólicas estarem relativamente intactas, pode se observar, por exemplo, uma grande perda genética das vias responsável pelo anabolismo lipídico. Do mesmo modo, certas vias centrais do metabolismo energético do *M. leprae* foram perdidas, tendo implicações negativas no uso de fontes comuns de carbono, como acetato e galactose, além da deficiência de se gerar ATP a partir da oxidação de NADH⁽¹⁷⁾.

Embora tenha sido o primeiro agente descrito como causador de uma doença humana, ainda há muitos mistérios acerca dos mecanismos de sobrevivência intracelular, modulação da resposta imune do hospedeiro e transmissão da micobactéria, devido ao fato do bacilo não ser cultivável em meio de cultura, dificultando diversos avanços nos estudos⁽⁶⁾. Experimentos *in vivo* permitiram o cultivo da micobactéria. O bacilo *M. leprae* foi cultivado pela primeira vez por Shepard (1960)⁽¹⁸⁾ que inoculou bacilos em coxim plantar de pata de camundongos de linhagem BALB/c, e obteve sua multiplicação localizada, permitindo novos estudos e evidências sobre o patógeno. O bacilo é atualmente cultivável em camundongos atímicos *Foxn1^{nu/nu}* (nude) que são incapazes de gerar resposta imune celular (Figura 1.5)⁽¹⁹⁾, e também em tatus (*Dasypus novemcintus*), que são naturalmente susceptíveis à infecção pelo *M. leprae*⁽²⁰⁾.



Figura 1.5: Cultivo de *M. leprae* em coxim plantar de camundongo nude. Coxim plantar 6 meses após infecção com 5×10^7 de *M. leprae* vivo. Fonte: Scollard *et al.* (2006)⁽⁶⁾.

1.1.3 Epidemiologia

É interessante ressaltar alguns marcos históricos que incluíram a meta estipulada internacionalmente para eliminação da endemia como problema de Saúde Pública a partir do ano 2000, durante a 44ª Assembleia Mundial de Saúde (AMS) em 1986, em grande parte devido a euforia causada pelo sucesso da poliquimioterapia. A meta, 16 anos depois, ainda encontra-se longe de ser atingida. O uso de medicamentos e casos de resistência aos mesmos datam desde 1943. Em 1991 foi incluído à meta o *Addendum* “como problema de Saúde Pública”, e definida uma nova meta de menos de 1 caso por 10 mil habitantes até 2015, em compromisso assumido pelos 122 países mais endêmicos durante a 49ª AMS⁽²¹⁾.

Nos últimos vinte anos, mais de 14 milhões de pacientes de hanseníase foram curados, dos quais cerca de 4 milhões após o ano 2000. Houve redução drástica da carga global da doença após introdução da poliquimioterapia como tratamento, de 5 milhões de casos em 1985 para 805 mil em 1995, 753 mil em 1999, 299 mil em 2005, 228 mil em 2010 quando 119 países alcançaram a meta de eliminação em nível nacional. O número de novos casos detectados durante 2010 foi de 228.474, caindo para 213.899 casos em 121 países no ano de 2014. Dados mais recentes demonstram que 210.758 novos casos foram detectados no ano de 2015. As regiões atualmente com maior prevalência da doença no mundo são as Américas, com o Brasil em destaque com cerca de 92% do total de novos casos detectados nesta área em 2014, e a África, com a Libéria em destaque, assim como o Sul da Ásia, como ilustrado no mapa (Figura 1.6)^(22,23).

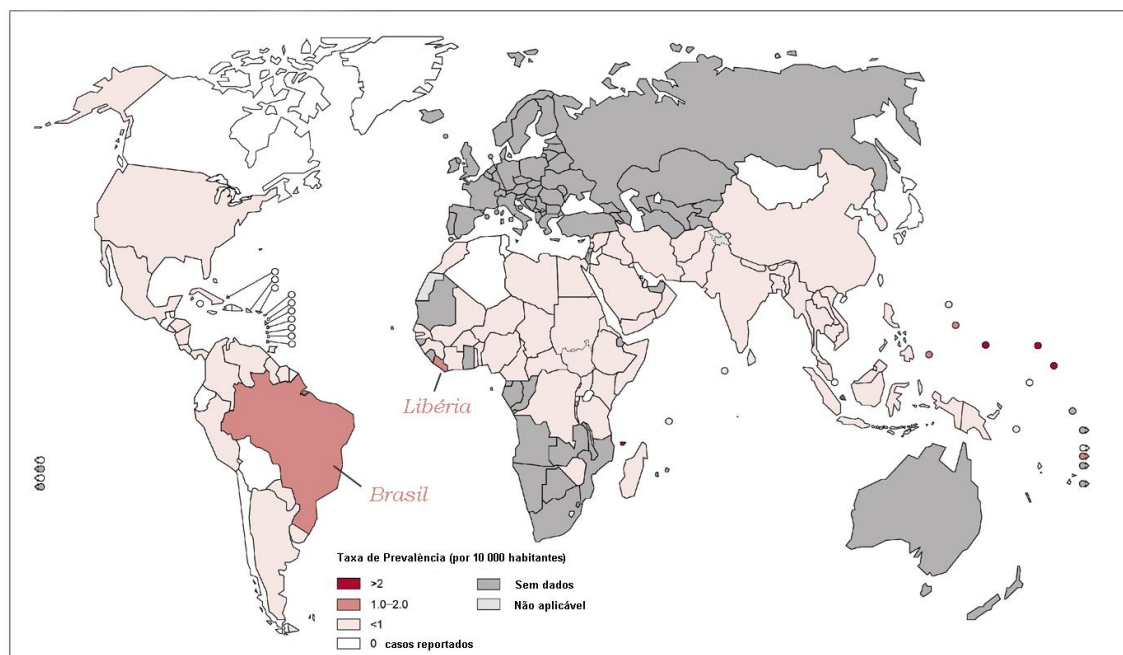


Figura 1.6: Taxas de prevalência de Hanseníase no mundo no ano de 2014. As taxas de prevalência correspondem a cada 10 mil habitantes. Os países em destaque representam o Brasil (América do Sul) e a Libéria (África). Adaptado de WHO (2016)⁽¹⁾. Acesso em Junho de 2016.

Em 2012, o coeficiente de prevalência de hanseníase do Brasil era de 1,51 casos/10 mil habitantes, o que representa uma redução de 12% em relação ao valor do coeficiente no ano de 2004 (1,71 caso/10 mil habitantes), ano em que o país fez a readequação do cálculo desse indicador para que fosse possível fazer comparações com outros países-membros da OMS⁽²⁴⁾. Dados mais atuais demonstram a queda do coeficiente de prevalência para 1,27/10 mil habitantes no país em 2014. O coeficiente de detecção de hanseníase no Brasil nos últimos anos (Figura 1.7) confirma que tem ocorrido diminuição na detecção de casos no país⁽²⁵⁾.

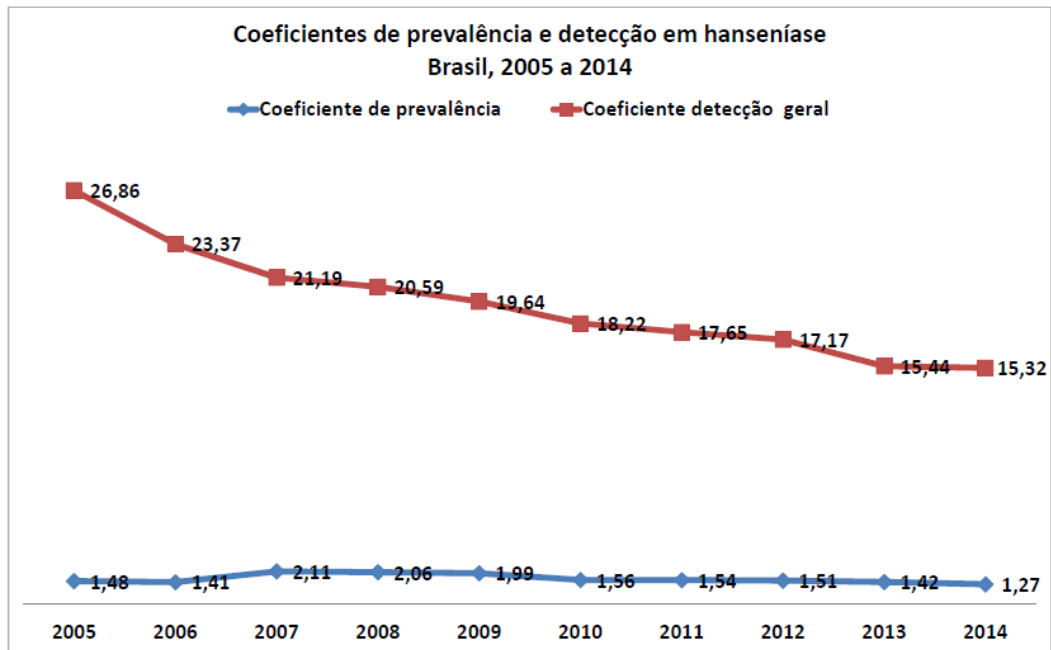


Figura 1.7: Coeficiente de prevalência e detecção em Hanseníase no Brasil entre 2005 e 2014. Prevalência – 10 mil habitantes; Detecção – 100 mil habitantes. Fonte: Ministério da Saúde (2015)⁽²⁵⁾.

Os estados de Mato Grosso, Maranhão e Tocantins apresentaram coeficiente de prevalência alto (prevalência 10,19; 4,26 e 4,53 por 10 mil habitantes respectivamente), enquanto todos os estados da região Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo na região Sudeste, somados ao Rio Grande do Norte e Alagoas no Nordeste, foram as áreas brasileiras que já alcançaram a meta de eliminação da Hanseníase, com coeficiente de prevalência menor que 1/ 10 mil habitantes⁽²⁶⁾.

Podemos observar também um padrão espacial de concentração da detecção de casos de Hanseníase por municípios (Figura 1.8). Aqueles de endemicidade mais elevada estão localizados no entorno da Amazônia brasileira, especialmente em Rondônia, Mato Grosso, oeste de Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Tocantins e sudoeste do Pará. Por outro lado, parte da região Nordeste e a maioria dos municípios das regiões Sul e Sudeste apresentam baixa endemicidade. Em detecção de novos casos, Fortaleza, Recife, São Luís, Teresina e Rio de Janeiro foram os municípios que mais diagnosticaram casos de Hanseníase no ano de 2014⁽²⁶⁾.

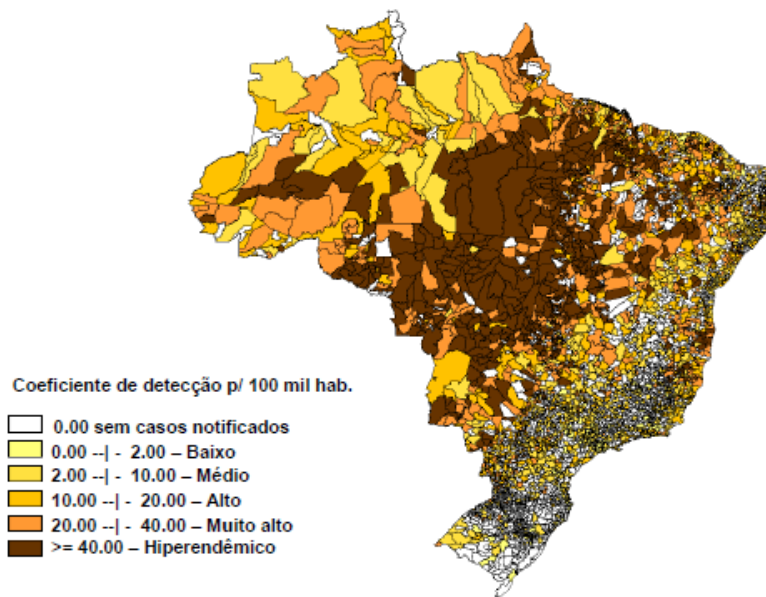


Figura 1.8: Coeficiente de detecção de hanseníase por municípios do Brasil. Coeficiente de detecção de casosa cada 100 mil habitantes. Fonte: Ministério da Saúde (2015)⁽²⁵⁾.

Em 2014, foram diagnosticados 31.064 novos casos no país, e o coeficiente geral de detecção (15,32/100 mil habitantes) ainda é considerado alto. Segundo os parâmetros de referência deste indicador⁽²⁶⁾, os estados de Mato Grosso, Tocantins, Maranhão, Rondônia, Pará e Mato Grosso do Sul foram classificados como hiperendêmicos, com coeficiente de detecção de casos maior que 40 por 100 mil habitantes (82,03; 69,88; 53,02; 41,23; 42,34 e 40,58 respectivamente) enquanto que o Rio Grande do Sul é o único estado com baixa endemicidade, com coeficiente menor que 2 casos por 100 mil habitantes (1,25) em 2014. Os outros Estados apresentam endemicidade entre média, alta ou muito alta. Ressaltando a região Sudeste, o coeficiente geral de detecção é de 5,30 por 100 mil habitantes, tendo o Estado do Rio de Janeiro com coeficiente de 7,36/100 mil habitantes no ano de 2014.

Há aspectos que ajudam no processo de eliminação da doença no Brasil, como algumas decisões políticas para eliminação da Hanseníase e sua inserção em todas as pactuações do Sistema Único de Saúde (SUS); a capacidade de unidades básicas de saúde diagnosticar e tratar a doença e fornecer um acompanhamento dos casos; parcerias com organizações não governamentais (ONGs); e também pesquisadores nacionais a fim de descobrir aspectos da doença ainda obscuros. Por outro lado, apresentam muitos aspectos negativos como a dificuldade de regiões carentes ao acesso a serviços de saúde eficientes, principalmente nas áreas mais endêmicas; atrasos na adoção de estratégias essenciais ao processo de eliminação; fragilidade nas ações de

vigilância; perfil epidemiológico no que se refere à forma clínica, apresentando metade dos casos paucibacilares, de diagnóstico mais difícil, assim como elevado coeficiente de detecção em crianças (coeficiente de 4,88 por 100 mil habitantes, sendo 2.341 novos casos detectados em menores de 15 anos no Brasil em 2014), indicando intensa circulação do *M. leprae*; insuficiente comprometimento político de gestores em algumas áreas de importância epidemiológica, associado ao desconhecimento da magnitude da endemia; reduzido número de profissionais da rede básica, especialmente médicos, que garantam o diagnóstico e tratamento^(26,22).

No Brasil, apesar da existência de diferenças regionais importantes na carga da hanseníase, com concentração de casos nas regiões Norte e Centro-Oeste, a redução contínua da endemia no Brasil na última década é notável. Tal redução tem sido verificada pela diminuição do número de doentes em tratamento, pela queda do número de casos diagnosticados em adultos e crianças, bem como pela redução do número de casos diagnosticados com lesões incapacitantes⁽²²⁾. Para maior efetividade no diagnóstico e tratamento, é necessário intensificar as ações de vigilância da hanseníase especialmente nas regiões que apresentam maior concentração dos casos da doença.

1.1.4 Patogênese

A infecção do bacilo *M. leprae* em macrófagos e células de Schwann pode provocar lesões na pele e neuropatia periférica, podendo chegar a estágios deformantes e incapacidade dos nervos periféricos em suas complicações, tornando-se assim uma doença deformante e por isso, estigmatizante. O exato mecanismo de transmissão da doença é desconhecido, mas sugere-se que a principal forma de transmissão do *M. leprae* se dá pelas vias aéreas, por meio de secreções expelidas (boca e nariz) pelo doente multibacilar. A maioria das pessoas expostas ao bacilo não desenvolvem a doença, mas fatores genéticos e condições socioeconômicas influenciam nessa susceptibilidade. O período de incubação da doença varia de 1 a 10 anos^(27,28). As manifestações clínicas da doença estão relacionadas às respostas do sistema imunológico do hospedeiro ao bacilo. Alguns sistemas são utilizados para classificar os pacientes acometidos pela hanseníase, como o sistema Ridley-Joplin⁽²⁹⁾, a classificação de Madrid⁽³⁰⁾ e a classificação operacional da OMS⁽³¹⁾.

A classificação de Ridley-Jopling se divide nas formas: tuberculoide-tuberculoide (TT), *borderline*-tuberculoide (BT), *borderline-boderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL), lepromatoso-lepromatoso (LL) e indeterminado (I).

Quanto aos aspectos histopatológicos, as lesões de pele de pacientes tuberculoídes são caracterizadas por infiltrados inflamatórios localizados, contendo granulomas bem formados com macrófagos diferenciados, células epitelioides e gigantes, com predominância de células T CD4⁺ na lesão, com poucas ou nenhuma bactéria. Os pacientes apresentam uma resposta imune celular específica e vigorosa para *M. leprae*, produção de IFN- γ , e teste dermatológico da lepromina positivo (teste realizado pela injeção de uma pequena amostra de *M. leprae* inativado por via subcutânea, analisado três dias após injeção para verificar se houve reação à bactéria - reação Mitsuda)⁽⁶⁾. No outro polo, os pacientes lepromatosos apresentam lesões múltiplas e difusas na pele com presença principalmente de células T CD8⁺, com resposta Th2 predominante, ausência de granulomas, com presença de muitos bacilos em infiltrados de pele, que apresenta a epiderme achatada^(28,32). Os pacientes tem uma resposta humoral predominante com altos níveis de anticorpos contra o patógeno, com presença de macrófagos espumosos nas lesões. A imunidade celular contra o *M. leprae* é baixa ou ausente, caracterizada pelo teste dermatológico negativo e proliferação de linfócitos diminuída (Figura 1.9)⁽³³⁾. Pacientes com a forma indeterminada podem evoluir para as outras formas, regredir ou permanecer na forma indeterminada por um longo período de tempo⁽²⁹⁾.

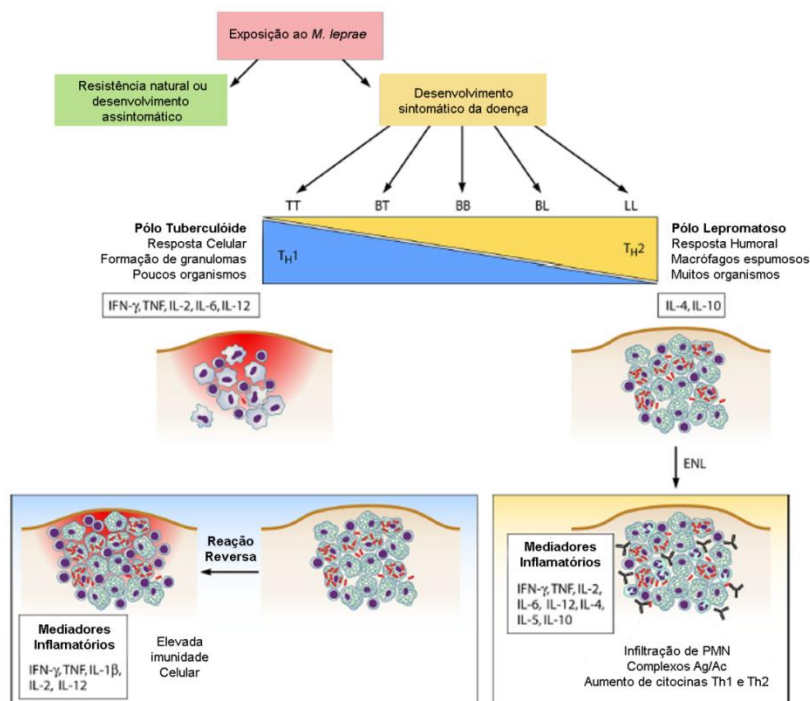


Figura 1.9: Classificações clínicas da hanseníase e perfil de resposta imunológica do hospedeiro. BB: *borderline-borderline*; BL: *borderline-lepromatoso*; BT: *borderline-tuberculoide*; LL: lepromatoso-lepromatoso; TT: tuberculoide-tuberculoide; Th1: linfócito T *helper* 1, Th2: linfócito T *helper* 2, PMN: Polimorfonucleares, Ag/Ac: antígeno/anticorpo. Adaptado de Misch et al. (2010)⁽³⁴⁾.

A classificação de Madri de 1953 adotou critérios de polaridade, baseados nas características clínicas da doença, que junto com os aspectos bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, definiu os grupos polares em tuberculoide (T) e virchoviano (V) ou lepromatoso (L); o grupo transitório e inicial da doença, na forma indeterminada (I); e o instável e intermediário, em borderline (B) ou dimorfa (D). Para fins operacionais e terapêuticos, a classificação é simplificada nas formas paucibacilar (PB), onde há poucas lesões (menos ou igual a cinco) e poucos bacilos, e multibacilar (MB), com muitas lesões (mais de cinco) e muitos bacilos⁽³⁵⁾. A classificação de Madri, no entanto, não é utilizada na pesquisa científica.

Tabela 1.1: Correlação entre as classificações de Madri (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982) adotadas para a hanseníase.

Madri	Indeterminada (I)	Tuberculoide (T)	Borderline (B)	Virchoviana (V)
Ridley & Jopling		TT	BT*, BB, BL	LL
OMS	Paucibacilares		Multibacilares	

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

Na Hanseníase podem ocorrer episódios reacionais, que são episódios agudos de inflamações que ocorrem durante o curso da doença. São problemáticos, pois causam grande morbidade devido a danos nos nervos, mesmo após o tratamento. São classificadas como Tipo 1 (Reações Reversas – RR) e Tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico – ENH ou Eritema Nodoso Leproso - ENL), onde o Tipo 1 ocorre geralmente em pacientes *borderlines* (BT, BB e BL) podendo ocorrer em uma pequena porcentagem de pacientes sub-polares tratados, e é caracterizado pelo aparecimento de novas lesões dermatológicas (manchas ou placas), infiltração, alterações de cor e edema nas lesões antigas, com ou sem espessamento e dor nos nervos periféricos (neurite); enquanto o Tipo 2 ocorre principalmente nas formas BL e LL, caracterizada por nódulos subcutâneos dolorosos em pele aparentemente normal, e é frequentemente acompanhada por sintomas sistêmicos como febre, mal estar, aumento dos gânglios linfáticos, anorexia, perda de peso, artralgia e edema, com ou sem espessamento e dor nos nervos periféricos (neurite)^(28,36,37).

Acredita-se que todos os tipos de reações na hanseníase sejam imunologicamente mediados, mas os mecanismos responsáveis por cada tipo de reação ainda não foram bem descritos. Embora as reações de tipo 1 e 2 afetem em conjunto 40 a 50% de todos os pacientes pelo menos uma vez no decorrer de sua doença, nenhum teste clínico ou laboratorial pode prever com precisão quem tem maior probabilidade de desenvolver uma reação ou quando ela pode ocorrer.

- Reação tipo 1 (reversa): algumas evidências indicam que as reações tipo 1 são resultado do aumento espontâneo da imunidade celular e da hipersensibilidade retardada a antígenos de *M. leprae*, no entanto as causas e mecanismos ainda não foram elucidados. Estudos com linfócitos demonstraram aumento de sua proliferação em resposta a antígenos da micobactéria *in vitro* durante reações do tipo 1⁽³⁸⁾. Trabalhos de imunofenotipagem revelaram que o número de células T CD4+ estão aumentados em lesões cutâneas de pacientes reacionais^(39,40). Ao analisar o soro de pacientes em reação reversa, foi demonstrado altos níveis da citocina IL-12 antes do tratamento, e seus níveis diminuíram durante o tratamento destes indivíduos⁽⁴¹⁾. Durante a reação, ocorre aumento na expressão de diversos genes de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF, onde esta ativação está presente localmente, nas lesões cutâneas, e sistemicamente, no soro e nos leucócitos circulantes. Esse padrão de expressão de citocinas sugeriu aos pesquisadores o perfil de resposta TH1 aumentada nos pacientes em reação reversa⁽⁶⁾.

- Reação tipo 2 (eritema nodoso hansênico): as reações tipo 2 ocorrem em pacientes com fraca imunidade celular contra o *M. leprae*, abundante presença de bacilos em lesões cutâneas e de nervos periféricos e uma forte resposta de anticorpos policlonais com níveis elevados de imunoglobulinas circulantes. Estudos identificaram possíveis evidências da ativação da resposta imune celular na reação tipo 2, incluindo o aumento de IFN- γ , TNF e IL-12 circulantes⁽⁴²⁾. O aumento dos níveis de RNAm destas proteínas também foram observadas em lesões cutâneas, indicando que a resposta imune celular ocorre localmente. Em contraste, o aumento da expressão de IL-6, IL-8 e IL-10 e expressão contínua de IL-4 e IL-5, todas citocinas associadas com a quimiotaxia de neutrófilos, produção de anticorpos e redução da imunidade celular foram observadas em lesões ENH. Os fatores que desencadeiam a reação tipo 2 ainda são mal compreendidos. Outras infecções ou doenças virais, febre, imunização e estresse psicológico foram todos indicados, mas não há evidências convincentes para qualquer um destes de fato desencadear a reação. A gravidez parece ter um efeito inibitório sobre

as reações de tipo 2, no entanto a reação pode aparecer severamente no pós-parto em mulheres multibacilares⁽⁴³⁾.

1.1.5 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da Hanseníase continua sendo clínico e epidemiológico, baseado na análise da história e condições de vida do paciente, do exame dermatoneurológico para identificar lesões na pele com definida perda sensorial, espessamento dos nervos, a demonstração de *M. leprae* em esfregaços de pele ou diagnóstico da histologia de tecidos (pele ou nervos). Pode ser feito exame baciloscópico, utilizando esfregaço intradérmico, como exame complementar para a classificação dos casos em PB (paucibacilar) ou MB (multibacilar). A baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independente do número de lesões, porém o resultado negativo não exclui o diagnóstico de hanseníase. Já exames histopatológicos são indicados como suporte na elucidação diagnóstica e em pesquisas^(27,44).

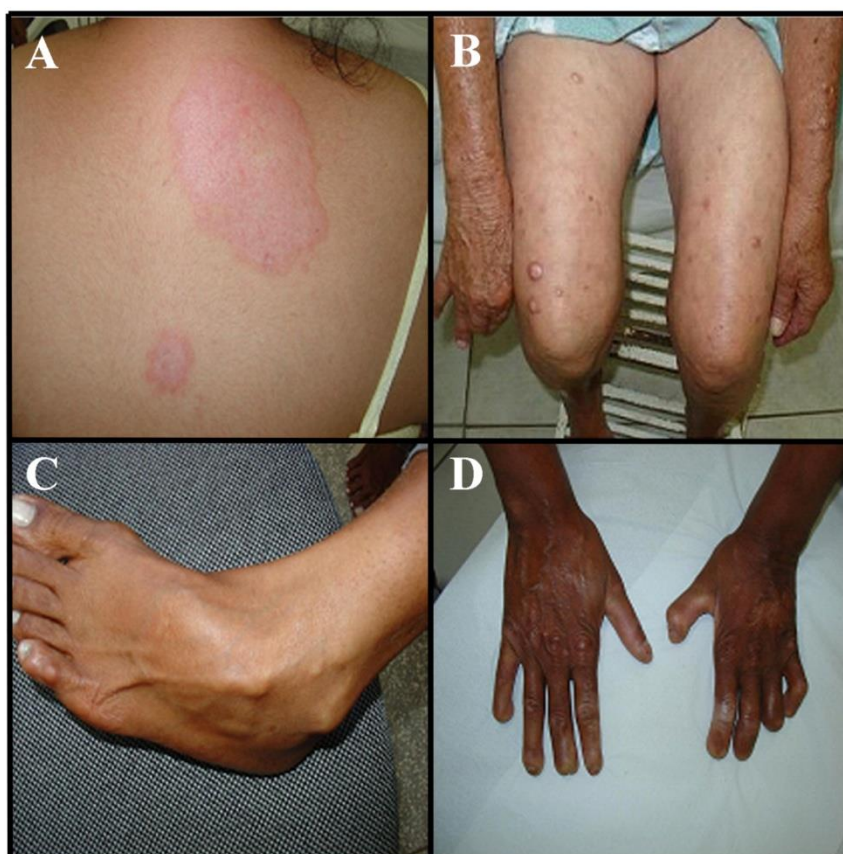


Figura 1.10 :Características clínicas na hanseníase. A- Placas Eritematosas; B- Eritema Nodoso Leproso; C- Abscesso de nervo fibular; D- Neurite. Fonte: <http://www.dahwmt.org.br>⁽⁴⁵⁾. Acesso em Dezembro de 2013.

O tratamento é eminentemente ambulatorial, utilizando esquemas terapêuticos padronizados. Nos serviços básicos de saúde, administra-se uma associação de medicamentos, a PQT, que mata o bacilo e evita a evolução da doença, prevenindo as incapacidades e deformidades por ela causadas, levando à cura e rompendo a cadeia epidemiológica da doença. Assim sendo, logo no início do tratamento a transmissão da doença é interrompida e, se realizado de forma completa e correta, garante a cura clínica. A PQT é constituída pelo conjunto dos medicamentos rifampicina, dapsona e clofazimina, com administração associada. Em casos onde o paciente é paucibacilar com lesão única, pode-se recomendar o esquema conhecido como ROM, que é a associação dos medicamentos rifampicina, ofloxacina e minociclina. A associação medicamentosa evita a resistência do bacilo, que ocorre com frequência quando se utiliza apenas um medicamento, impossibilitando a cura da doença. A medicação é administrada através de esquema padrão, de acordo com a classificação operacional do doente em PB e MB⁽⁴⁴⁾.

Tabela 1.2: Esquemas recomendados de poliquimioterapia.

Formas Clínicas/Medicamento	Paucibacilar (PB)	Multibacilar (MB)	PB Lesão Única sem envolvimento de nervos periféricos*
Rifampicina	600 mg, 1 vez por mês supervisionada	600 mg, 1 vez por mês, supervisionada	600 mg, em dose única, supervisionada
Dapsona	100 mg/dia autoadministrada	100 mg/dia autoadministrada	
Clofazimina	-	300 mg, 1 vez por mês, supervisionada + 100 mg em dias alternados ou 50 mg/dia auto-administrada	
Minociclina	-		100 mg, em dose única, supervisionada
Ofloxacina	-		400 mg, em dose única, supervisionada

*Este esquema é conhecido como ROM (Rifampicina, Ofloxacina e Minociclina) e deve ser usado exclusivamente para tratar pacientes PB com lesão única, sem envolvimento de nervos periféricos. Esse esquema é recomendado somente para uso em centros de referência.

Duas drogas são efetivas nos casos de reações: o corticosteroide, que pode ser usado tanto na reação tipo 1, quanto tipo 2; e a talidomida que é efetiva apenas na reação tipo 2. Na reação tipo 1, o corticosteroide é a droga usada, e esta deve ser indicada, quando a reação é acompanhada de neurite. Se a reação é apenas cutânea, é preferível tratá-lo apenas sintomaticamente, com fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais ou analgésicos. Às vezes pelo aspecto inestético que as lesões cutâneas eritematosas causam, justifica-se o uso do corticosteroide, principalmente em lesões na face⁽⁴⁶⁾. Após discussão sobre os aspectos epidemiológicos, clínicos e imunopatológicos da reação de ENL, foi discutida a recomendação brasileira do uso da talidomida como droga de eleição no tratamento desses casos. O TNF tem sido implicado no mecanismo de patogênese do dano neural na hanseníase⁽⁴⁷⁾ e na ação anti-inflamatória da talidomida, envolvendo a inibição da expressão gênica seletiva do TNF e, conseqüentemente, de suas funções⁽⁴⁸⁾. Assim, na reação tipo 2, a talidomida é a droga de escolha. No entanto, devidos aos seus efeitos teratogênicos, não deve ser usada em mulheres no período fértil então, nestes casos, os corticosteroides são alternativas possíveis apesar de controlarem com maior dificuldade os episódios reacionais e os índices de recorrência⁽⁴⁶⁾.

1.2 Tecido Adiposo

As clássicas funções do tecido adiposo são o armazenamento de energia em forma de triacilglicerol (TG) e isolamento térmico. Em pessoas de peso normal, o tecido adiposo constitui 20 a 25% do peso corporal na mulher e 15 a 20% no homem, sendo o maior depósito corporal de energia sob a forma de triglicerídeo⁽⁴⁹⁾.

Os adipócitos representam aproximadamente de 35 a 70% da massa do tecido adiposo, que contém outros tipos celulares, encontrados na chamada fração vascular estromal, que incluem pré-adipócitos, células tronco mesenquimais, macrófagos e outras células do sistema imune, células endoteliais, musculares lisas, dentre outras⁽⁵⁰⁾.

Também tem se tornado mais evidente a contribuição da função endócrina do tecido adiposo, com participação na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo imunidade e inflamação^(51,52). Desde a identificação da leptina em 1994⁽⁵³⁾, o

tecido adiposo emergiu como um órgão endócrino extremamente ativo que secreta uma variedade de moléculas que não influenciam somente na adipobiologia e função de adipócitos de maneira autócrina ou parácrina, mas também são liberadas na corrente sanguínea, regulando diversos processos, agindo de forma endócrina.

Há duas variedades de tecido adiposo, que apresentam diferentes distribuições, estrutura e papel fisiológico. Uma é o tecido adiposo comum, branco ou unilocular, cujas células adiposas quando maduras contém apenas uma gotícula lipídica que ocupa quase todo o citoplasma, com a principal função de acúmulo lipídico em humanos adultos, sendo um local crítico para homeostase energética, sinalização de insulina e ação endócrina. A outra variedade é o tecido adiposo pardo, marrom ou multilocular, formado por adipócitos que contém numerosas gotículas de gordura e muitas mitocôndrias, predominantemente responsável pela função termogênica, além de representarem um importante depósito de gordura em recém nascidos e em uma variedade de mamíferos^(49,54).

1.2.1 Biologia dos adipócitos - adipócitos brancos, marrons e bege

Além dos adipócitos brancos e marrons, o esquema de classificação corrente inclui uma terceira categoria de adipócitos, chamados bege ou 'brite' (*brown-in-white*), que podem ser consideradas células induzidas a adipócitos marrons, com propriedades termogênicas⁽⁵⁵⁾.

Adipócitos brancos são geralmente células grandes e arredondadas, com diâmetro que varia entre 25 a 200µm, contendo uma única grande gotícula lipídica envolta com uma fina camada de citoplasma, com poucas mitocôndrias e núcleo achatado localizado na periferia. As principais funções dos adipócitos brancos são armazenamento de energia na forma de gordura, lipólise e secreção de adipocinas⁽⁵⁰⁾.

Os adipócitos marrons são células de forma poligonal, citoplasma normal, com gotículas lipídicas multiloculares. Apresentam seu núcleo redondo e centralizado junto com uma grande quantidade de mitocôndrias⁽⁵⁶⁾. Sua principal função biológica é a termogênese, podendo também estocar energia na forma de gordura e secretar adipocinas, porém em menor extensão que os adipócitos brancos⁽⁵⁰⁾. Sua habilidade termogênica deriva da presença de proteínas desacopladoras 1 (UCP-1), proteína mitocondrial que induz a produção de calor pelo desacoplamento da respiração na síntese de ATP. Em recém nascidos, a gordura marrom é abundante no pescoço e na região interescapular (costas) para prevenir hipotermia. Acreditava-se que adultos

continham apenas vestígios deste tecido, como consequência da sua involução durante a infância, no entanto estudos revelaram que adultos contém gordura marrom ativa em algumas partes do corpo, como no pescoço⁽⁵⁷⁾.

Os adipócitos brancos e marrons derivam da mesma célula tronco mesenquimal, no entanto, durante a gastrulação, células tronco mesenquimais do mesoderma paraxial expressam o fator miogênico *Myf5*, e as do mesoderma lateral não expressam este fator de transcrição. Células expressando *Myf5* se diferenciam em adipócitos marrons ou miócitos, enquanto que células *Myf5* negativas se tornam adipócitos brancos ou pericitos, células associadas a vasos sanguíneos⁽⁵⁰⁾.

Recentes estudos revelaram a presença de células *brown-like* no tecido adiposo, chamadas bege ou 'brite' (do inglês *brown-in-white*)⁽⁵⁵⁾. Os adipócitos bege são células *Myf5* negativas, que parecem ser originárias de células endoteliais ou perivasculares dentro do tecido adiposo branco, com uma única assinatura genética que é diferente das de adipócitos brancos ou marrons. Sob condições basais, adipócitos bege expressam baixos níveis de UCP-1, mas sob estímulo β -adrenérgico induzido por exposição ao frio ou exercícios, estes adipócitos produzem altas quantidades de UCP-1 e demonstram propriedades termogênicas^(50,55). Como os adipócitos bege ainda são uma categoria enigmática, que precisam ser mais investigados, não será um assunto tratado profundamente neste trabalho.

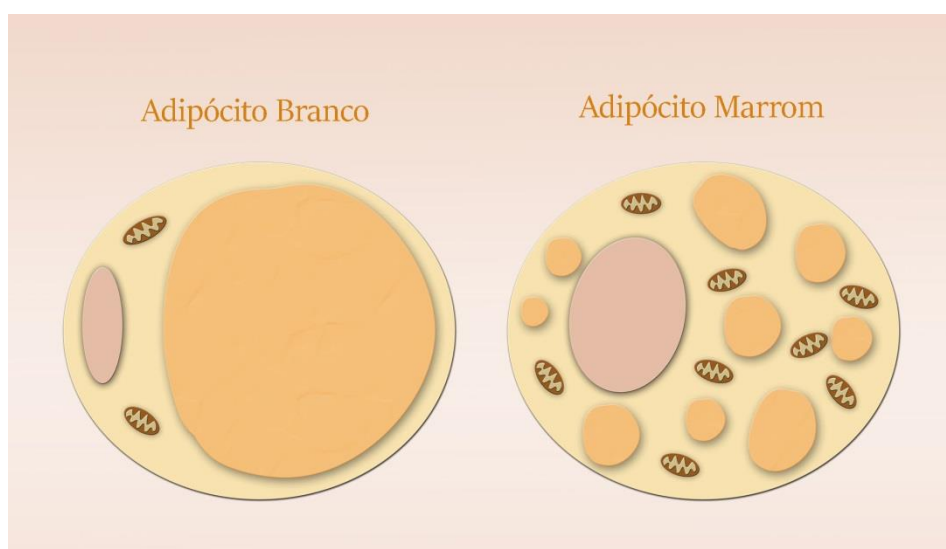


Figura 1.11: Representação esquemática dos adipócitos branco e marrom. Adipócito branco com sua característica gotícula lipídica unilocular com seu núcleo achatado na periferia, enquanto o adipócito marrom possui gotículas lipídicas multiloculares, núcleo arredondado e presença de numerosas mitocôndrias.

Os adipócitos derivam de células-tronco mesenquimais multipotentes. Não são descritas formas intermediárias no desenvolvimento até adipócitos maduros, então sua adipogênese (diferenciação de pré-adipócitos a adipócitos) é geralmente descrita em duas fases: a primeira, de determinação, envolve o compromisso de uma célula tronco pluripotente a linhagem de adipócito. Resulta na conversão da célula mesenquimal a um pré-adipócito, que ainda não é distinguível de sua célula precursora, mas que já perdeu seu potencial em se diferenciar em outros tipos celulares. Na segunda fase, a diferenciação terminal, o pré-adipócito assume características de adipócito maduro, com a maquinaria necessária para transporte e síntese de lipídios, sensibilidade à insulina e secreção de suas proteínas específicas⁽⁵⁰⁾.

1.2.2 Adipogênese

O tecido adiposo, branco ou marrom, exige importantes fatores de transcrição necessários para promover a diferenciação de pré-adipócitos a adipócitos maduros. Uma variedade de modelos celulares são utilizados para estudar as vias moleculares da adipogênese e as funções dos adipócitos *in vitro*. Células de linhagem 3T3-L1, derivada de camundongos suíços prematuros⁽⁵⁸⁾ são as mais bem caracterizadas, sendo necessário utilizar um coquetel estimulante constituído por insulina, dexametasona, metilisobutilxantina e soro fetal bovino para desencadear o processo de adipogênese nestas células.

A adipogênese é um processo altamente controlado onde células tronco mesenquimais são diferenciadas em adipócitos maduros⁽⁵⁹⁾. Duas principais etapas estão envolvidas: 1- *Determinação*: o compromisso de uma célula tronco mesenquimal pluripotente em se tornar um pré-adipócito unipotente que é morfologicamente idêntica a célula tronco precursora, mas que já perdeu seu potencial de se diferenciar em outros tipos celulares; 2- *Terminal*: processo onde os pré-adipócitos adquirem o fenótipo e características funcionais de adipócitos maduros.

Adipócitos brancos: O processo biológico da adipogênese é complexo e regulado por múltiplos fatores. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) são potentes fatores de crescimento da superfamília de TGF β (fator de transformação do crescimento beta), que estão envolvidas na determinação das células pluripotentes a linhagem de adipócitos, condrócitos ou osteoblastos⁽⁶⁰⁾. As proteínas BMP interagem

com receptores específicos de superfície celular, BMPR1 e BMPR2. A ligação de BMPs com o complexo BMPR1 e BMPR2 induz a fosforilação de SMAD1, -5 e -8, que formam um complexo com SMAD4 que transloca-se para o núcleo e regula a expressão gênica. A ativação do complexo BMPR1:2 também estimula as vias MKK3/p38 MAPK e TAK1, ativando a expressão de genes alvo. A determinação de adipócitos brancos é positivamente regulada por BMP2 e BMP4⁽⁶¹⁾. No entanto muitos fatores de transcrição reprimem a adipogênese, incluindo membros da família GATA e sinalização por Notch e Wnt, assim como fatores *Kruppel-like 2* e *7* (KFL2 e KFL7)⁽⁵⁹⁾.

A transcrição de PPAR γ , proteínas C/EBP e SREBP1 são a chave para a fase terminal de diferenciação de adipócitos. São encontrados níveis baixos ou nulos destes fatores em pré-adipócitos, mas sua expressão aumenta durante a diferenciação. A ligação destes fatores de transcrição com promotores de genes adiposos específicos resulta no aumento da expressão de marcadores de diferenciação de adipócitos. O PPAR γ é um membro da superfamília de receptores nucleares e é considerado o principal regulador da adipogênese, pois todos os fatores adipogênicos precisam de sua presença para promover o processo. PPAR γ heterodimeriza com outro receptor nuclear, o RXE α , para se ligar ao DNA e promover a transcrição de genes específicos de adipócitos como leptina, adiponectina, proteína de ligação de ácidos graxos 4 (FABP4) ou perilipina, dentre outros⁽⁶²⁾.

O fator C/EBP pertence à classe de fatores de transcrição do tipo ‘zíper de leucina’ e possui seis isoformas que estão envolvidas no início da indução de diferenciação. O aumento de AMP cíclico intracelular leva a ativação de uma cascata de sinalização que gera a translocação de C/EBP para o núcleo, promovendo a transcrição de diversos genes específicos envolvidos na criação do fenótipo dos adipócitos⁽⁶³⁾.

O terceiro fator chave da adipogênese, SREBP1 (formalmente conhecido como fator de determinação e diferenciação do adipócito 1 – ADD1) pertence à família ‘helix-volta-helix’ de fatores de transcrição⁽⁶²⁾. Durante a diferenciação, SREBP1 é ativado e translocado para o núcleo, onde reconhece elementos de resposta a esterol (SRE) e induz a expressão de enzimas lipogênicas, incluindo acetil-CoA carboxilase (ACC), ácido graxo sintetase (FAS), lipoproteína lipase (LPL) e estearoil-CoA desaturase 1 (SCD1), assim como um desconhecido ativador de PPAR γ ^(64,65).

Adipócito Marrom: Os fatores BMP7 e PRDM16 tem papel chave na determinação de adipócitos marrons. O estímulo de células tronco mesenquimais

progenitoras com BMP7 induz o compromisso do adipócito marrom aos seguintes mecanismos: 1- bloqueio de inibidores adipogênicos como Pref-1, Wnt10a ou nectina; 2- indução de marcadores adipogênicos, que são comuns entre os adipócitos marrons e brancos, como PPAR γ ou C/EBP α ; 3- superexpressão de marcadores específicos de adipócitos marrons como PRDM16, PPAR coativador 1 α/β (PGC-1 α/β) e UCP-1; e 4- indução de biogênese mitocondrial pelo aumento de componentes mitocondriais como TFAM, citocromo c ou NRF1⁽⁶⁶⁾.

O PRDM16 é um fator de transcrição do tipo 'dedo de zinco' que controla o interruptor bidirecional de células *Myf5* positivas em adipócitos marrons ao invés de mioblastos⁽⁶⁷⁾. PRDM16 estimula adipócitos marrons pela ligação entre PPAR γ e PGC-1 α , ativando sua função transcricional⁽⁶⁸⁾. Por outro lado, PRDM16 reprime a expressão de genes de adipócitos brancos e miogênicos pela ligação com correpressores CTBP1/2 e EHMT1. Além disso, PRDM16 se liga a PPAR γ e PGC-1 α/β pelos seus 'dedos de zinco', estimulando a transcrição de genes seletivos a adipócitos marrons^(69,70). O PGC-1 é um coativador transcricional extremamente importante na indução da expressão de genes de marcadores específicos de adipócitos marrons (UCP1 e UCP3) e também para a promoção de biogênese mitocondrial. Três membros da família PGC-1 foram descritos: PGC-1 α/β e PGC relacionado a coativação. Conseqüentemente, PGC-1 α coativa o heterodímero PPAR γ -RXR α , promovendo a expressão dos genes termogênicos UCP1 e UCP3, ligando-se também ao homodímero NRF1 e NRF2 que estão envolvidos na replicação de DNA mitocondrial⁽⁷¹⁾.

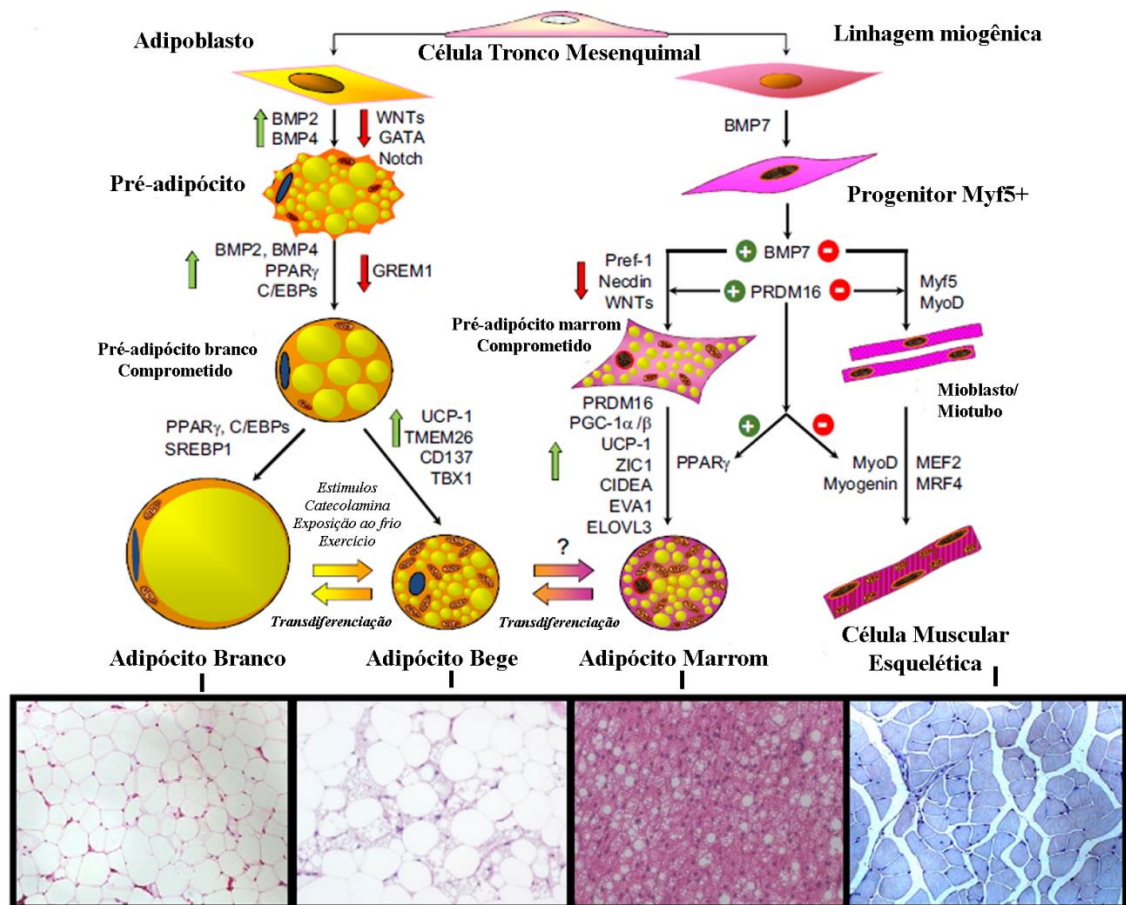


Figura 1.12: Ontogenia de adipócitos branco, marrom, bege e miócitos. A diferenciação de adipócitos é um processo complexo orquestrado por múltiplos fatores. Proteínas BMPs são fundamentais no compromisso de adipócitos branco (BMP2 e BMP4) e marrom (BMP7). Diversos inibidores adipogênicos já foram descritos, incluindo GATA, WNT, Notch, e gremlin-1 (GREM1) para pré-adipócitos brancos, e Pref-1, neccin e Wnt para pré-adipócitos marrons. A diferenciação terminal de adipócitos brancos exige ativação de fatores de transcrição PPAR γ , C/EBP, e SREBP1. Na diferenciação de células progenitoras Myf5+ para adipócitos marrons, PRDM16 é uma molécula chave no desvio entre adipócito-miócito através da ativação da expressão de genes ‘marrom-seletivos’ (PGC-1 α/β , UCP1, ZIC1, e ELOVL3, dentre outros) e repressão de genes miogênicos como Myf5, MYOD, ou miogenina. Recentemente, um terceiro tipo de adipócito foi descrito, chamados de adipócito bege ou ‘brite’ (*brown-in-white*), que são supostamente derivados da transdiferenciação de adipócitos brancos para um fenótipo semelhante ao marrom. Adipócitos bege possuem propriedades termogênicas induzidas pela exposição ao frio, estímulo β -adrenérgico, ou exercícios e mostram uma assinatura genética única (TMEM26, CD137, TBX1). Em seguida, representação histológica de tecido adiposo branco, bege e marrom assim como músculo esquelético (aumento de 100X) obtidos de roedores. Setas verdes indicam modulação positiva, enquanto setas vermelhas indicam modulação negativa dos genes indicados. Adaptado de Fruhbeck et al. (2015)⁽⁵⁰⁾.

1.2.3 Função endócrina do tecido adiposo

Além do seu papel no isolamento e suporte mecânico, o tecido adiposo tradicionalmente é reconhecido como o principal local para armazenamento de energia excedente, com papel crucial na homeostase de ácidos graxos de todo corpo. Em períodos de calorías em abundância, estoca ácidos graxos livres na forma de triglicerídeos através da sua esterificação com glicerol, e os libera de volta para a circulação em momentos de escassez de energia⁽⁷²⁾.

Durante as últimas duas décadas, resultados da ciência básica e estudos clínicos mudaram a visão sobre a patofisiologia dos adipócitos. Desde que a leptina foi descoberta em 1994⁽⁵³⁾, o tecido adiposo branco foi reconhecido como um órgão endócrino e uma fonte importante de substâncias biologicamente ativas com ação local e/ou sistêmica chamadas adipocinas⁽⁷³⁾.

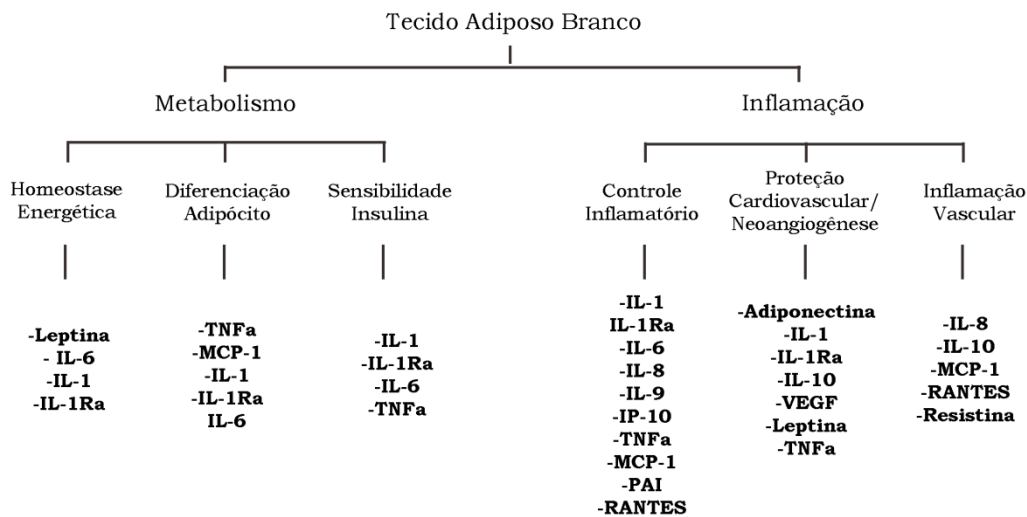


Figura 1.13: Tecido adiposo branco: efeitos sobre o metabolismo e inflamação. O tecido adiposo branco influencia no metabolismo através da homeostase energética, diferenciação de adipócitos, e sensibilidade a insulina, afetando a inflamação através do controle inflamatório, proteção cardiovascular e inflamação vascular, secretando diversos fatores. Adaptado de Juge- Aubry et al. (2005)⁽⁷⁴⁾.

Sendo assim, o tecido adiposo branco, que é o tecido adiposo mais amplo no organismo antes considerado inerte, dedicado principalmente ao armazenamento de energia, está emergindo como um participante ativo na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo imunidade e inflamação⁽⁷⁵⁾.

1.2.4 Adipocinas

O tecido adiposo produz e secreta proteínas bioativas chamadas adipocinas, que não só influenciam na função do adipócito de forma autócrina ou parácrina, mas também afetam diversas vias metabólicas de forma endócrina, através da corrente sanguínea. Dentre estes, uma variedade de fatores próinflamatórios e antiinflamatórios incluindo as adipocinas: leptina, adiponectina, resistina e visfatina, assim como citocinas e quimiocinas como TNF, IL-6, MCP-1 e outros⁽⁷³⁾.

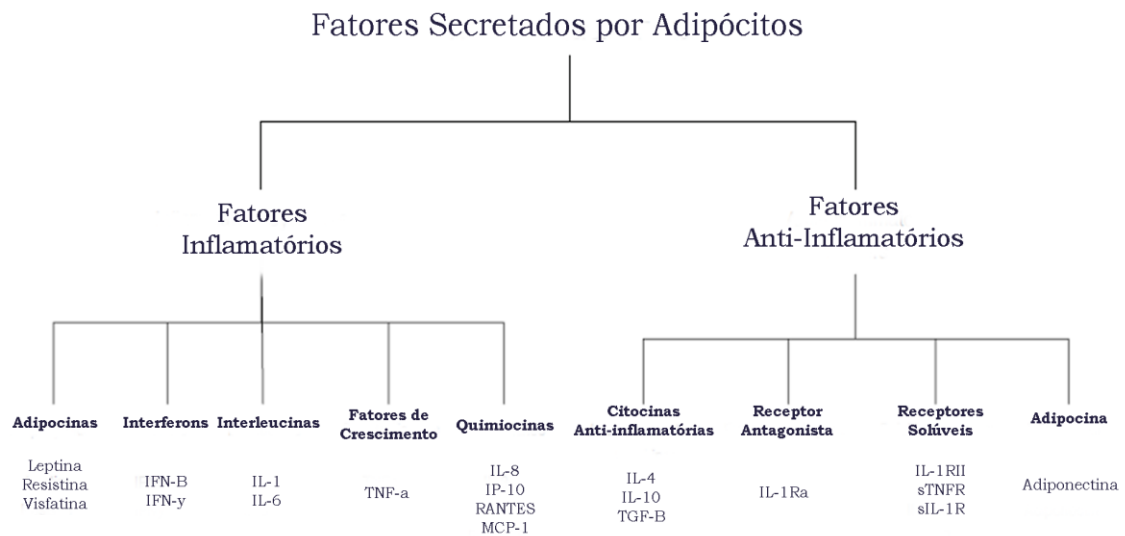


Figura 1.14: Fatores inflamatórios e anti-inflamatórios secretados por adipócitos. Subgrupos de fatores inflamatórios incluem adipocinas, interferons, interleucinas, fatores de crescimento e quimiocinas. Entre os fatores anti-inflamatórios incluem citocinas, receptores antagonistas, receptores solúveis e adipocinas. Muitos fatores recentemente descobertos não foram adicionados na figura devido a falta de pesquisas que os classifiquem como inflamatório ou anti-inflamatório. Adaptado de Juge-Aubry et al. (2005)⁽⁷⁴⁾.

O termo adipocina é usado para descrever certas citocinas que são principalmente produzidas pelos adipócitos, no entanto é importante ressaltar que não são todas exclusivamente derivadas deste órgão. As adipocinas também são produzidas por outras células localizadas no tecido adiposo branco. A síntese de adiponectina e leptina, por exemplo, acontece principalmente nos adipócitos, enquanto outras adipocinas são produzidas principalmente pelas células localizadas na matriz do tecido adiposo. Com composição complexa, o tecido adiposo branco permite integração com múltiplos processos metabólicos⁽⁷²⁾.

A adiponectina e a leptina são as mais abundantes adipocinas produzidas pelos adipócitos. Vários outros produtos do tecido adiposo que estão caracterizados incluem certas citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1; quimiocinas como CCL2 (MCP-1); mediadores do processo de coagulação como PAI-1 e fatores de complemento. Estes produtos tem papel conhecido no sistema imune e, embora alguns deles sejam produzidos pelos adipócitos, não são normalmente considerados adipocinas, no entanto possuem papel importante na interface entre os sistemas imune e metabólico⁽⁷⁶⁾.

Em humanos, as adipocinas funcionam como hormônios, influenciando na homeostase energética e regulando funções neuroendócrinas. Como citocinas, elas afetam funções imunes e processos inflamatórios pelo corpo. Níveis alterados de adipocinas foram observados em uma variedade de condições inflamatórias, porém seu papel patogênico ainda não está claro. Todas se integram em uma rede de comunicações com outros tecidos e órgãos, tais como músculo esquelético, córtex adrenal, cérebro e sistema nervoso simpático e participam na regulação do apetite, equilíbrio energético, imunidade, sensibilidade a insulina, angiogênese, pressão arterial, metabolismo e homeostase lipídica⁽⁷⁷⁾. As adipocinas leptina, adiponectina e resistina, serão caracterizadas a seguir.

1.2.4.1 Leptina

A leptina, do grego *leptos*, que significa magro, é uma proteína de 16kD codificada pelo gene *ob*. A leptina pertence à família de citocinas helicoidais de cadeia longa e tem semelhança estrutural com outras citocinas como IL-6, IL-12, IL-15, hormônio de crescimento, dentre outros (Figura 1.15). É uma proteína produzida pelo tecido adiposo em proporção à massa de gordura corporal, e também é produzida em níveis mais baixos por outros tecidos como estômago, músculo esquelético e placenta⁽⁷⁸⁾. Circula ligada parcialmente a proteínas plasmáticas e entra no sistema nervoso central por difusão. No hipotálamo se liga a receptores que estimulam peptídeos anorexigênicos e inibe peptídeos orexigênicos⁽⁷⁹⁾. O controle do apetite é o seu principal papel, porém também exerce outras funções fisiológicas.

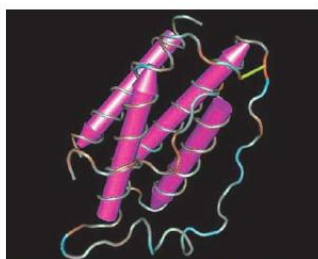


Figura 1.15: Estrutura tridimensional da leptina. Estrutura tridimensional de leptina murina, que contém quatro alfa-hélices que são típicas da estrutura de citocinas como IL-6, IL-12 e IL-15. Fonte: La Cava & Matarese (2004)⁽⁷⁸⁾.

Embora sua importante função seja a regulação do peso corporal através da inibição da ingestão de alimentos e estímulo de gasto de energia pelo aumento da termogênese, evidências recentes indicam a leptina como mais que um “sensor de gordura”^(80,81). Seu papel na regulação da imunidade tem sido estudado desde a sua clonagem em 1994, tendo sido detalhados muitos efeitos sobre a resposta imunológica e inflamatória além de regular funções neuroendócrinas, homeostase energética, hematopoiese e angiogênese. Contudo, o consenso geral é de que a leptina exerce papel pró-inflamatório^(73,76).

1.2.4.2 Adiponectina

A adiponectina, também chamada de Acrp30 ou AdipoQ, é uma proteína hormonal de 30kD com 244 aminoácidos codificada pelo gene *apMI*, com estrutura homóloga similar ao colágeno VIII e X e fator de complemento C1q⁽⁸²⁾. Pertence estruturalmente a família do complemento 1q, e uma vez sintetizada forma trímeros que então se oligomerizam para formar polímeros compostos por 4 a 6 trímeros (Figura 1.16). Ambos trímeros e oligômeros, mas não monômeros, estão presentes na circulação. É uma molécula composta por um domínio globular e um domínio colágeno. Sua função mais conhecida é a regulação da sensibilidade a insulina⁽⁸³⁾.

A adiponectina é a adipocina que circula em mais altos níveis (na faixa de microgramas por mililitros contra nanogramas por mililitros de leptina) no organismo. Na circulação a adiponectina está presente de maneiras variadas: em forma de trímeros (baixo peso molecular), hexâmeros (médio peso molecular) e dodecameros ou 18-meros (alto peso molecular)^(76,84). Embora seja sintetizada quase exclusivamente pelos adipócitos, ela também é expressa em células musculares esqueléticas, miócitos cardíacos e células endoteliais⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾.

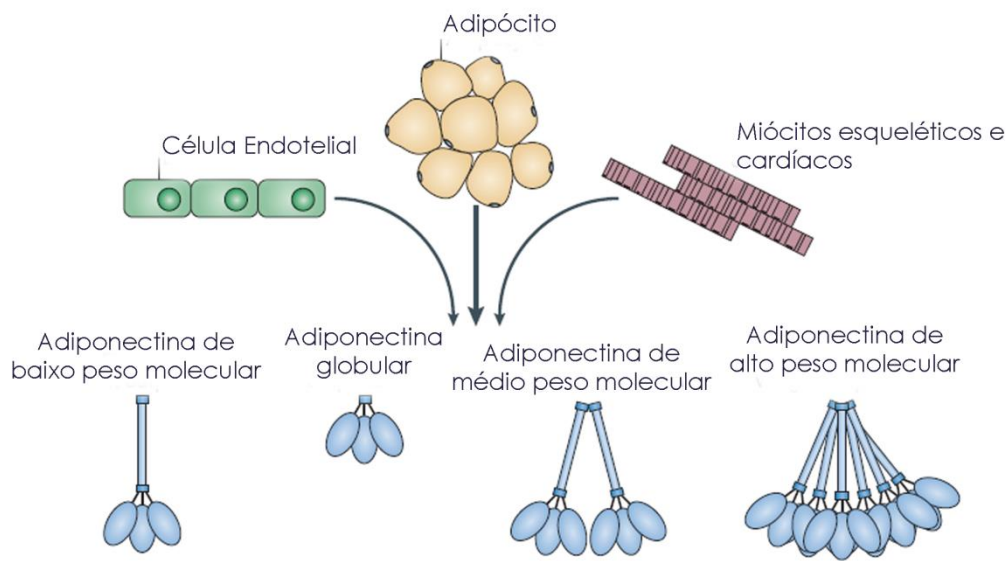


Figura 1.16: Estrutura da adiponectina. A adiponectina existe como um trímero (forma de baixo peso molecular) bem como um fragmento de clivagem proteolítica (globular). Trímeros compridos podem se dimerizar formando um hexâmetro (médio peso molecular) que pode então se oligomerizar, formando um polímero (alto peso molecular). Adaptado de Tilg & Moschen (2006)⁽⁷⁶⁾.

Outras funções envolvidas são mediar propriedades antiaterogênicas, além de regular a sensibilidade a insulina, como descrito em músculo esquelético, fígado e células endoteliais⁽⁸⁸⁾. A adiponectina também induz efeitos na modulação inflamatória, parecendo agir como uma molécula anti-inflamatória⁽⁸⁹⁻⁹¹⁾.

1.2.4.3 Resistina

Resistina, ou ‘resistente a insulina’, foi originalmente descoberta em camundongos em 2001 e nomeada por sua habilidade de resistir (interferir com) à ação da insulina. Também é conhecida como fator adipócito secretado, pertence a família de moléculas semelhantes a resistina (RELM) com padrões de expressão e efeitos biológicos diferentes^(92,93).

São conhecidos diversos tipos celulares que expressam resistina incluindo adipócitos^(94,95), epitélio intestinal, células musculares esqueléticas⁽⁹⁶⁾ e possivelmente, astrócitos⁽⁹⁷⁾.

Há debates sobre o papel funcional da resistina em camundongos e humanos. A principal fonte de resistina em camundongos são os adipócitos. A resistina murina é um polipeptídeo rico em cisteína de 11kD, e seu gene está localizado no cromossoma 8. É sintetizado como um precursor de 114 aminoácidos, com uma sequência sinal de 20

aminoácidos e um segmento maduro com 94 aminoácidos⁽⁹⁸⁾. A resistina por si só pode formar homodímeros ou multímeros de diferentes tamanhos através de ligações dissulfeto ou não-dissulfeto⁽⁹³⁾. No entanto, a formação desses dímeros ou multímeros parece não ser necessária para sua bioatividade⁽⁹⁸⁾.

A resistina humana é um peptídeo rico em cisteína de 12,5kD, com uma sequência madura de 108 aminoácidos. O gene da resistina humana se encontra no cromossoma 19. Enquanto segmentos maduros são 55% idênticos entre murinos e humanos⁽⁹⁴⁾, os genes tem regiões promotoras diferentes, indicando mecanismos de regulação, distribuição de tecidos e funções diversas^(99,100).

A proteína madura tem tendência a formar oligômeros que circulam no soro humano em diversas isoformas de baixo e alto peso molecular⁽¹⁰¹⁾. Em humanos, a resistina é produzida por populações de células além dos adipócitos, que incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), macrófagos e células da medula óssea^(102,103). Podem modular vias moleculares envolvidas no metabolismo, resposta inflamatória e doenças autoimunes, além de seus alvos cardiovasculares. No geral, parece ter papel na modulação de moléculas pró-inflamatórias.

1.3 Células da Linhagem 3T3-L1

As células 3T3-L1 são células de linhagem clonada, estabelecidas como pré-adipócitos por sua capacidade de acumular triglicerídeos e se tornarem adipócitos. Também são especializadas na síntese de colágeno e, antes de sua conversão a adipócito, produzem colágeno como qualquer outra célula de linhagem 3T3, sendo considerada assim 3T3-L1 como uma linhagem de fibroblastos com uma forma adicional de especialização. A conversão de 3T3-L1 de pré-adipócito até adipócito maduro envolve um processo de diferenciação que pode ser estudado sob condições de cultura⁽⁵⁸⁾. O estabelecimento das células de linhagem de fibroblastos murinos 3T3-L1 evoluiu sob definidas condições de cultura⁽¹⁰⁴⁾, de uma linhagem clonada a partir de embrião de camundongo suíço, sendo designada 3T3-M. Em Green & Kehind (1974)⁽⁵⁸⁾ é descrito o isolamento de clones de 3T3-M (3T3-L1 e 3T3-L2), que acumulavam grande quantidade de lipídios quando entravam em seu estado de repouso. Estes lipídios consistiam em triglicerídeos, sugerindo a relação entre células 3T3-L1 e adipócitos.

Com características de tecido adiposo multilocular, essa linhagem de fibroblastos tem capacidade de se diferenciar em adipócitos maduros, com característica distribuição de gotículas lipídicas por todo o citoplasma (Figura 1.17). Essas células são usadas como modelos para vários estudos, principalmente aos envolvendo a produção de mediadores inflamatórios⁽⁵¹⁾.

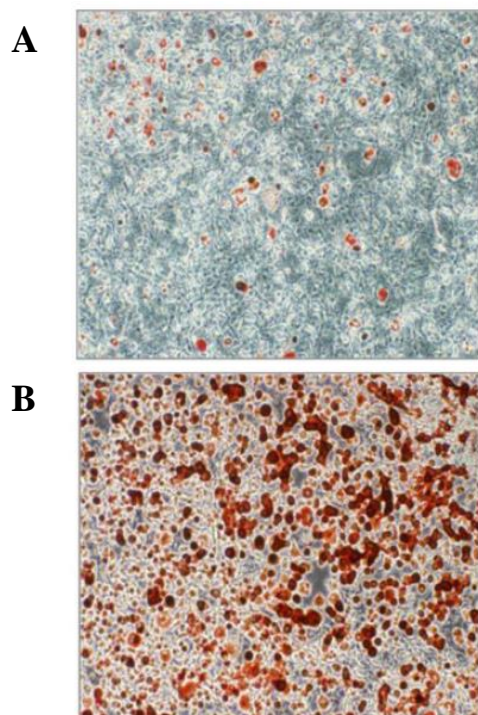


Figura 1.17: Acúmulo de lipídios durante a diferenciação de células de linhagem 3T3-L1. A- Pré-adipócitos; B-Adipócitos maduros. Lipídios marcados em vermelho (Coloração OilRed O). Fonte: KIM et al. (2011)⁽¹⁰⁵⁾.

1.4 Lipólise de Corpúsculos Lipídicos de Adipócitos

O triacilglicerol (TAG) estocado no tecido adiposo é a principal reserva energética em mamíferos. O TAG é sintetizado e estocado em corpúsculo lipídicos citosólicos durante momentos de excesso de alimento, e é mobilizado dos corpúsculos, via lipólise, durante momentos de carência de energia para gerar ácidos graxos (AGs). Enquanto a síntese de TAG é compartilhada por outros órgãos como o fígado, para produção de VLDL, a lipólise para liberação de AGs como fonte de energia é uma função exclusiva do tecido adiposo^(106,107).

Em adipócitos, o TAG é estocado em corpúsculos lipídicos citosólicos. Embora uma vez considerado um local de armazenamento inerte, os corpúsculos lipídicos recentemente se tornaram reconhecidas organelas dinâmicas, de central importância para o metabolismo lipídico e energético. Os corpúsculos lipídicos são compostos de um núcleo com TAG e éster de colesterol, circundados por uma monocamada fosfolipídica revestida de proteínas. Muitas destas proteínas são caracterizadas pela

presença de motivos N-terminal conservados definidos como domínios PAT, nomeadas perilipina, adipofilina (também chamada ADRP, proteína relacionada à diferenciação de adipócitos), e TIP47. No entanto estas proteínas PAT são expressas em diferentes tecidos, sugerindo potenciais funções tecido específicas⁽¹⁰⁸⁾.

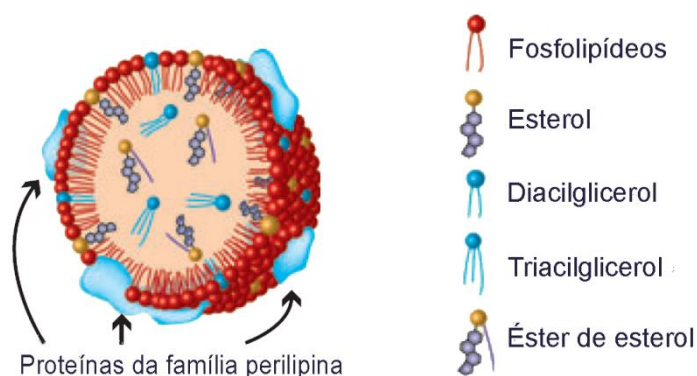


Figura 1.18: Representação esquemática da composição do corpúsculo lipídico. Adaptado de Guo et al. (2009)⁽¹⁰⁹⁾.

A caveolina, uma proteína integral de membrana associada com jangadas lipídicas na superfície celular (cavéolas), foi localizada em corpúsculos lipídicos regulando a lipólise⁽¹¹⁰⁾. A abundância relativa de corpúsculos associados a proteínas, suas modificações pós traducionais e interações com outras proteínas ajudam a regular a atividade lipolítica nos adipócitos.

Apesar dos recentes progressos nos estudos sobre corpúsculos lipídicos, algumas questões permanecem. A primeira é: como as gotículas lipídicas são formadas? Embora existam várias teorias sobre a biogênese de corpúsculos lipídicos, o modelo mais amplamente aceito afirma que lipídios neutros se acumulam na bicamada do retículo endoplasmático e, posteriormente, brotam da camada citosólica da membrana⁽¹⁰⁷⁾. Como TAG é transportado do seu sítio de síntese para o corpúsculo lipídico? Os lipídios devem ser transportados para o corpúsculo possivelmente via transporte vesicular, ou sintetizado localmente, provavelmente por enzimas como as diacilglicerol aciltransferases (DGATs) que já foram demonstradas estarem presentes nos corpúsculos lipídicos. É postulado também que pequenos corpúsculos lipídicos recentemente formados podem se fundir, formando corpúsculos maiores^(107,109). Em adição, para ajudar os adipócitos a lidar com grande quantidade de AGs, é sugerido que a biogênese e o crescimento de corpúsculos lipídicos pode ocorrer na membrana plasmática⁽¹¹¹⁾.

Durante a lipólise, o TAG estocado nos corpúsculos lipídicos é hidrolisado a AGs e glicerol. Os AGs liberados pelo tecido adiposo podem entrar na circulação e serem utilizados por outros órgãos através da β -oxidação e subsequente geração de ATP. Adicionalmente, AGs e glicerol liberados também servem de substrato no fígado, para a cetogênese e gliconeogênese, respectivamente⁽¹¹²⁾.

Anteriormente, a HSL (lipase hormônio sensível) uma proteína citoplasmática de 84kDa, era considerada a enzima limitante na hidrólise de TAG⁽¹¹³⁾. No entanto, estudos com camundongos *knockout* para HSL demonstraram que os mesmos não eram obesos e acumulavam diacilglicerol (DAG) no tecido adiposo ao invés de TAG, indicando que a HSL age primariamente como uma DAG lipase, sugerindo a atividade de novas lipases adicionais nos adipócitos⁽¹¹⁴⁾. Em 2004, três laboratórios independentes identificaram a mesma nova TAG lipase, nomeada desnutrina, ATGL e fosfolipase A2, conduzindo a reavaliação do modelo clássico de lipólise⁽¹¹⁵⁻¹¹⁷⁾. A desnutrina/ATGL é uma proteína de 54kDa, predominantemente expressa em tecido adiposo e exibindo alta especificidade pelo TAG^(115,117). É agora conhecida como a principal TAG lipase no tecido adiposo, hidrolisando TAG em DAG e um AG. DAG é posteriormente hidrolisado pela HSL gerando monoacilglicerol (MAG) e um segundo AG. A MAG lipase, uma proteína de 33kDa, então hidrolisa MAG produzindo glicerol e um terceiro AG.

A lipólise nos adipócitos é altamente regulada por hormônios. No estado de jejum, elevados níveis de glicocorticoides regulam positivamente a transcrição de ATGL⁽¹¹⁵⁾. Além disso, as catecolaminas, através da ligação em receptores β -adrenérgicos acoplados a proteínas $G\alpha$, geram uma cascata de sinalização que aumenta os níveis de AMPc e ativa a PKA. A PKA fosforila a HSL resultando em sua translocação do citosol para o corpúsculo lipídico associado a proteína perilipina permitindo maior acesso de lipases ao corpúsculo⁽¹⁰⁸⁾. Em contraste, durante o estado alimentado a insulina se liga a seu receptor nos adipócitos, iniciando uma sinalização que, via fosforilação e ativação de fosfodiesterase 3B (PDE3B), diminui o AMPc que por fim inibe a lipólise.

Enquanto a regulação endócrina da lipólise por catecolaminase insulina encontra-se bem caracterizada, ainda há muito a ser investigado sobre a regulação local da lipólise em adipócitos por fatores autócrinos e/ou parácrinos. Os adipócitos secretam diversos fatores que podem regular a lipólise localmente, como TNF que estimula a

lipólise e adenosina que inibe a lipólise. As prostaglandinas demonstraram inibição, estímulo, ou nenhum efeito na lipólise dependendo da sua concentração e espécies testadas^(118,119).

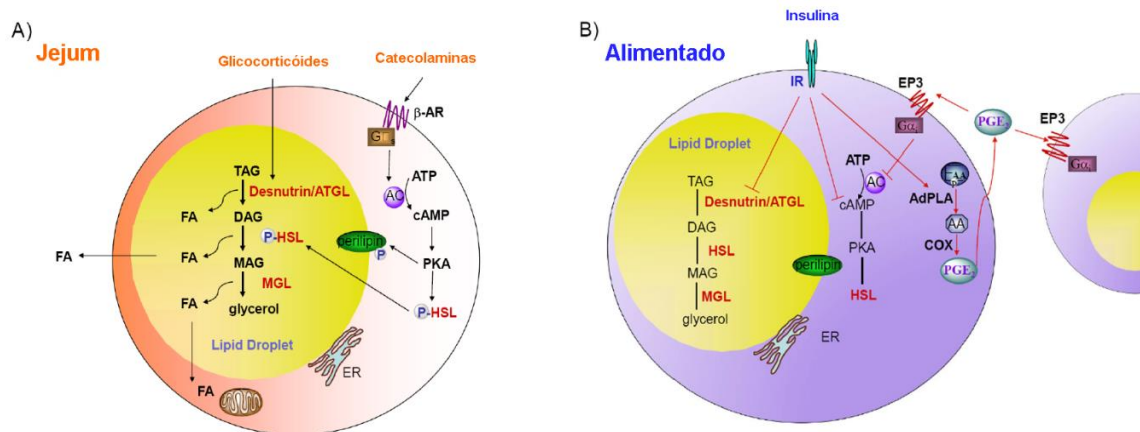


Figura 1.19: Regulação da lipólise em adipócitos. A: Desnutrina/ATGL inicia a lipólise hidrolisando o Triacilglicerol (TAG) a diacilglicerol (DAG). A lipase hormônio-sensível (HSL) hidrolisa DAG a monoacilglicerol (MAG), que é sequencialmente hidrolisado pela MAG lipase gerando glicerol e três ácidos graxos livre (FAs). Os FAs gerados na lipólise podem ser liberados na circulação para serem utilizados por outros órgãos ou oxidados dentro dos adipócitos. Durante o jejum, catecolaminas, através da ligação a receptores B-adrenérgicos acoplados a proteínas $G\alpha$, ativam a adenilato ciclase (AC) aumentando AMPc e ativando a proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila a HSL e a perilipina, resultando na translocaçãoda HSL do citosol para o corpúsculo lipídico assim como sua ativação. Adicionalmente, durante o jejum, glicocorticoides aumentam a expressão de desnutrina/ATGL. **B:** No estado alimentado, a insulina se liga ao seu receptor (IR), resultando na redução dos níveis de AMPc, reduzindo a lipólise. A insulina também suprime a expressão de desnutrina/ATGL. Estudos recentes revelam que a lipólise é predominantemente regulada pela prostaglandina E2 (PGE2) através da fosfolipase A2 específica ao adipócito (AdPLA), que hidrolisa fosfolipídios para formar ácido araquidônico (AA), que via ciclooxigenase (COX) produz PGE2, que age localmente através da ligação a receptores EP3 acoplados a proteínas $G\alpha$ inibitória presente em adipócitos, resultando na inibição de AC e consequentemente reduzindo a lipólise. Fonte: Ahmadian et al. (2007)⁽¹⁰⁶⁾.

1.5 Tecido Adiposo e Doenças Infeciosas

Já é aceito que os adipócitos são células altamente ativas endocrinamente, com papel central na homeostase energética e importantes contribuintes do sistema imunológico. Eles não só influenciam sistemicamente na homeostase lipídica, mas

também na produção de fatores hormonais, citocinas e componentes da matriz extracelular, comumente referidos como adipocinas. Pouca atenção tem sido dada ao papel do tecido adiposo em doenças infecciosas. Contudo, o forte potencial inflamatório do tecido adiposo sugere um importante papel na resposta imune inata sistêmica⁽¹²⁰⁾.

Diversas evidências têm apoiado a interligação entre o tecido adiposo e células imunocompetentes. Esta ligação é ilustrada na obesidade, onde o excesso de tecido adiposo e inflamação tem sido descritos tanto em seres humanos quanto em roedores obesos. Além disso, inúmeros fatores envolvidos na resposta inflamatória são secretados por pré-adipócitos e macrófagos, e há comprovação de que pré-adipócitos desenvolvem atividade fagocítica para microorganismos, tendo sido utilizada a linhagem 3T3-L1 como modelo experimental⁽¹²¹⁾.

Diversos estudos demonstram que os adipócitos servem adequadamente como alvos dos parasitas intracelulares *Trypanosoma cruzi*^(122,123), *Trypanosoma brucei*⁽¹²⁴⁾, *Rickettsia prowazekii*⁽¹²⁵⁾ e *M. tuberculosis*⁽¹²⁶⁾, dentre outros, porém há poucos estudos sobre a resposta imune de adipócitos a infecções de patógenos intracelulares.

Em Combs et al. (2005)⁽¹²²⁾ é demonstrado que adipócitos 3T3-L1 são eficientemente infectados por *T. cruzi* onde as células infectadas apresentam grande número de parasitas intracelulares que se agrupam em torno dos corpúsculos lipídicos. Além disso, os adipócitos infectados exibiram mudanças nos níveis de expressão das adipocinas adiponectina, leptina e resistina. Em outro trabalho utilizando *T. cruzi*⁽¹²³⁾, foram feitos ensaios utilizando camundongos como modelo de infecção, que apresentaram alta carga parasitária no tecido adiposo, com aumento significativo de macrófagos e redução no acúmulo de lipídios, tamanho dos adipócitos e massa de gordura corporal, além do aumento da expressão de enzimas lipolíticas. Em conjunto, estes trabalhos sugerem que o tecido adiposo seja um alvo importante na infecção aguda da doença de Chagas, podendo ser um importante reservatório dos parasitas durante a doença crônica.

O tecido adiposo também foi descoberto como importante nicho de infecção para *T. brucei*, descrito por Trindade et al.(2016), após se acumularem no tecido, os parasitos apresentaram extensiva remodelação da expressão de genes, regulando positivamente genes de enzimas da β -oxidação de ácidos graxos, formando moléculas intermediárias da via, sugerindo que se utilizam dos ácidos graxos como fonte

nutricional. Simultaneamente, se replicaram e foram capazes de infectar camundongos saudáveis⁽¹²⁴⁾.

Em outro estudo utilizando como modelo infecção intranasal de *M. tuberculosis* em camundongos⁽¹²⁷⁾, foi demonstrado o acesso da micobactéria a diferentes depósitos adiposos. Além disso, Neyrolles et al. (2006)⁽¹²⁶⁾ comprovaram que o *M. tuberculosis* pode persistir em estágio não replicativo em adipócitos *in vitro* e em tecido adiposo humano, onde resiste a antibióticos e ao sistema imune do hospedeiro, sugerindo que o tecido constitui um importante reservatório de micobactérias, potencialmente associado a persistência das mesmas.

1.6 Modulação do Metabolismo Lipídico na Infecção por *Mycobacterium leprae*

É conhecido que patógenos requerem lipídios da célula hospedeira para sua colonização e progressão da infecção, incluindo as micobactérias⁽¹²⁸⁾. Um exame detalhado de macrófagos infectados feito por Chatterjee et al. (1959)⁽¹²⁹⁾, revelou que o *M. leprae* reside e se multiplica amplamente dentro de fagossomos lipídicos, sugerindo uma importante alteração do metabolismo lipídico durante a infecção, mas o mecanismo dessa homeostase lipídica permaneceu obscuro. Inicialmente se pensava que os lipídios eram derivados da micobactéria⁽¹³⁰⁾, no entanto estudos independentes comprovam que os lipídios acumulados no interior dos macrófagos espumosos são na verdade derivados do próprio hospedeiro⁽¹³¹⁾.

Há evidências da regulação do metabolismo lipídico e acúmulo em corpúsculos lipídicos durante a resposta do hospedeiro à patógenos intracelulares. Ocorre aumento na formação de corpúsculos lipídicos induzidos por patógenos em infecções virais, fúngicas, bacterianas e parasitárias, sugerindo a importância dessa organela para a sobrevivência e replicação intracelular de diferentes patógenos. Também há descrição de desregulação do metabolismo lipídico em infecções por micobactérias. Evidências sugerem que a patogênese das infecções micobacterianas estão diretamente relacionadas ao metabolismo lipídico do hospedeiro⁽¹³²⁾. Durante o processo infeccioso, corpúsculos lipídicos são acionados por micobactérias patogênicas incluindo *M. bovis*⁽¹³³⁾, *M. tuberculosis*⁽¹³⁴⁾ e *M. leprae*⁽¹³¹⁾, reforçando a ideia de que o acúmulo de lipídios está intimamente relacionado com a sobrevivência e persistência dos microorganismos na célula hospedeira. Além disso, estudos metabólicos e proteômicos indicam que a β -

oxidação de ácidos graxos é uma via ativa no crescimento *in vivo* do *M. leprae*, tendo os lipídios como substrato dominante de mobilização de carbono na infecção⁽²⁾.

Também há investigações sobre o papel de corpúsculos na regulação de citocinas em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. Estudos mostram que as células infectadas secretam níveis aumentados de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e níveis reduzidos de IL-12 e de óxido nítrico, em contraste direto às demais condições e infecções que induzem a formação de corpúsculos lipídicos, onde ocorre diminuição na produção de IL-10 e aumento na de IL-12, além da detecção de nitrito nos sobrenadantes de culturas, o que sugere que o *M. leprae* adaptou-se para subverter a resposta imune, modulando-a negativamente⁽¹³²⁾.

Justificativa

2. JUSTIFICATIVA

A Hanseníase, mesmo sendo uma das doenças mais antigas da humanidade, ainda apresenta alta prevalência no Brasil, sendo um problema de saúde pública nas Américas, África e Sul da Ásia. A importância da homeostase lipídica em macrófagos e células de Schwann para a sobrevivência intracelular do *M. leprae* já foi demonstrada. Sabe-se que a infecção por micobactérias patogênicas aumentam a produção de corpúsculos lipídicos por parte da célula hospedeira, e que a inibição desse processo apresenta forte impacto sobre a viabilidade e manutenção da infecção, reforçando a hipótese de que o acúmulo de lipídios está intimamente relacionado com a sobrevivência e persistência desses microrganismos na célula hospedeira.

A escolha dos adipócitos como modelo experimental se dá pela inédita investigação desse potencial sítio de infecção da micobactéria, representando células que tem como principal função servir como depósito de triglicerídeos e colesterol, sugerindo um ambiente propício para estabilização do bacilo. Também tem se tornado mais evidente a contribuição dessas células na função endócrina do tecido adiposo, com participação na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo imunidade e inflamação. São também reconhecidas células alvo de infecções de patógenos como *T. cruzi* e *M. tuberculosis*, permitindo a utilização dos ácidos graxos dos adipócitos como fonte de energia, assim como o escape da resposta imune do hospedeiro e da ação de drogas.

O presente estudo justifica-se pela necessidade de avaliar a interação entre adipócitos e *M. leprae*, contribuindo para a investigação do papel do tecido adiposo na infecção *in vivo*, revelando o envolvimento deste tecido na patogênese como um possível novo sítio de infecção, reservatório do patógeno e modulação da resposta imune na Hanseníase.

Objetivos

3. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do tecido adiposo nos mecanismos de patogenia na hanseníase.

3.1 Objetivos Específicos:

- Investigar se adipócitos oferecem um sítio de infecção e persistência para o *M. leprae*, mensurando sua viabilidade ao longo do tempo em culturas de adipócitos da linhagem 3T3-L1.
- Analisar a modulação lipídica dos adipócitos infectados;
- Demonstrar a presença do *M. leprae* em tecido adiposo de pacientes do polo multibacilar da Hanseníase;
- Mensurar a expressão e liberação de adipocinas produzidas pelos adipócitos infectados *in vitro* e em soro de pacientes;

Materiais e Métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Grupo de Estudo

Para compor o grupo de análise do estudo, foi utilizado soro de pacientes de diversas formas clínicas de hanseníase, atendidos e diagnosticados pelo Ambulatório Souza-Araújo/FIOCRUZ, disponibilizados no banco de amostras do Laboratório de Hanseníase – IOC/FIOCRUZ, RJ para utilização em projetos de pesquisa, sob aprovação do comitê de ética em pesquisa número: 34239814.7.0000.5248. Foram analisados 12 soros controles de indivíduos saudáveis, 15 soros de pacientes LL, 15 soros de pacientes BT, 9 de pacientes em reação do tipo 2 (ENL), antes e 7 dias após o início do tratamento com talidomida.

Também foram utilizados fragmentos de tecido subcutâneo de pacientes diagnosticados como multibacilares, disponibilizadas a partir da coleta de rotina para exame baciloscópico dos pacientes no Ambulatório Souza-Araújo/FIOCRUZ, cedidas pelo Laboratório de Hanseníase – IOC/FIOCRUZ, RJ, sob aprovação do comitê de ética em pesquisa número: 205.047.

4.2 Obtenção do *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* vivo utilizado nesse estudo, cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), consiste na cepa Thai-53 cultivada no modelo de infecção de coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*). Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, o coxim plantar dos camundongos foram colhidas e enviadas ao Laboratório de Microbiologia Celular – IOC/FIOCRUZ, RJ para purificação. De modo estéril, as patas foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI-1640 (LGC biotecnologia). A suspensão de bacilos foi tratada com hidróxido de sódio 0.1M, posteriormente ressuspensa em meio de cultura suplementado com 50 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich) e incubadas a 33° C por 3h. Os bacilos foram quantificados por contagem direta como descrito por Shepard & McRae (1968)⁽¹³⁵⁾ e a viabilidade medida pelo método *Live/Dead BacLight*, como recomendado pelo fabricante. A marcação do *M. leprae* para ensaios de imunofluorescência foi realizada através do kit PKH2 *Green Fluorescent Cell Linker* (Sigma-Aldrich). Para isso, aproximadamente 10⁷ bacilos foram centrifugados a 10 000xg por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensa em 1 mL do diluente A. Posteriormente, foi adicionado 1 mL do corante PKH2 diluído no

diluyente A e homogeneizado. A mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Em seguida, foi adicionado igual volume de soro fetal bovino (SFB, Cripion Biotecnologia LTDA.) e incubado por 1 minuto. A suspensão de bacilos foi então diluída em igual volume de meio de cultura com antibiótico e centrifugada por 10 minutos a 10 000xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as bactérias foram lavadas por três vezes com meio de cultura para a retirada do excesso de fluorocromo. Ao final, as bactérias foram ressuspensas no volume inicial do meio RPMI-1640.

4.3 Cultura de Células de Linhagem 3T3-L1

Fibroblastos murinos da linhagem 3T3-L1 foram inicialmente cultivados em meio DMEM high glucose (Sigma-Aldrich), contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, suplementado com 10% de soro bovino (SB, Gibco) a 37°C em 5.0% de CO₂ e mantidos em garrafas de culturas através de repiques semanais. A partir do plaqueamento, o SB utilizado foi substituído pelo soro fetal bovino (SFB, Cripion). Ao atingir a confluência (48 horas após plaqueamento), as células foram diferenciadas adicionando meio de indução de diferenciação contendo 0.5mM de 3-isobutilmetilxantina (IBMX, Sigma-Aldrich), 1µM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 2µM de rosiglitazona (Sigma-Aldrich) e 0.3UI/mL de insulina (Humulin). Após 72 horas, o meio de diferenciação foi retirado e as culturas foram mantidas com meio de maturação contendo somente 2µM de rosiglitazona e 0.3UI/mL de insulina, com troca a cada 48 horas durante 10 dias, quando se tornam adipócitos maduros, com visível presença de diversos e grandes corpúsculos lipídicos. Para os ensaios de infecção, o *M. leprae* vivo ou *M. smegmatis* na multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 foram adicionados a cultura de adipócitos com meio DMEM high glucose com SFB, sem antibiótico, e as mesmas mantidas a 33°C em 5.0% de CO₂.

4.4 Purificação de Ácidos Nucleicos

4.4.1 Extração e purificação de RNA e DNA

Os ácidos nucleicos totais das culturas de 3T3-L1 foram extraídos utilizando o reagente Trizol (Life technologies) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após os períodos de infecção, o sobrenadante das culturas foi coletado, e então adicionado 500uL de Trizol em cada poço para lise das células aderentes. O conteúdo lisado transferidos para tubos RNase Free foi submetido as etapas de extração. Foi

adicionado 100µL da solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) (Merck) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão e então centrifugados a 12 000xg a 4° C por 15 min. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos RNase Free e adicionados 250µL de isopropanol (Sigma-Aldrich), misturado por inversão para precipitação do RNA, e então utilizados para a etapa de purificação. As fases intermediária e orgânica foram posteriormente submetidas a extração de DNA. Foram adicionados 50µL de solução 10 mM de Tris-EDTA (5mM Tris; 0.1 mM EDTA, pH 8.0) e 75µL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após a centrifugação de 12 000xg por 10 minutos a temperatura ambiente, o líquido sobrenadante foi transferido para tubos RNase Free, e adicionados de 150µL de isopropanol.

A segunda etapa realizada, para purificação do RNA e DNA, consistiu em realizar sucessivas centrifugações após a adição de etanol 70%. Após a última centrifugação, o pellet foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em água de ampola (pura), e as amostras de DNA armazenadas a -20°C e as de RNA em freezer -70° até sua utilização para as etapas seguintes.

As etapas posteriores à extração e purificação de RNA consistiram no tratamento e transcrição reversa do RNA para cDNA conforme instruções do fabricante. A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific).

4.4.2 Tratamento do RNA com DNase

Após a quantificação e confirmada a integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit TURBO DNA-*free* (Life technologies) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30 µL por amostra. Inicialmente, em tubos RNase *Free*, foi adicionado 1000ng de RNA ao kit seguido por incubação a 37° C durante 30 min. Após o período de incubação, foi adicionado 1 µL do reagente de inativação enzimática e os tubos incubados à temperatura ambiente durante 5 min, para ação do reagente de inativação. Após, os tubos foram centrifugados a 12 000xg por 1 min. e os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e novamente quantificado.

4.4.3 Síntese de cDNA – RT-PCR

O cDNA foi obtido a partir do RNA das culturas de 3T3-L1 mediante o uso do kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermofisher) em uma reação com volume final de 20 μ L. Inicialmente, 1000 ng de RNA e *Random Primer* foram incubados a 65° C por 5 min para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação foi utilizado o kit contendo os reagentes necessários para funcionamento da enzima transcriptase reversa conforme descrito pelo fabricante. Essa mistura foi incubada a 25° C por 5 min e seguido por 1 hora a 45° C para transcrição, e depois incubação a 70° C por 5 min para inativação da enzima. Após o término da reação, as amostras de cDNA foram armazenadas a -20° C.

4.4.4 PCR em tempo real para determinação da viabilidade micobacteriana

Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi utilizado o sistema de PCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S do bacilo como descrito por Martinez et al. (2009)⁽¹³⁶⁾, com algumas modificações. A partir das células infectadas com o bacilo viável, foi extraído o DNA e o RNA, onde este último foi reversamente transcrito em cDNA, conforme descrito anteriormente. Os níveis de RNAr 16S foram normalizados pelos seus níveis de DNA. Utilizando o sistema de reação *TaqMan*, com o kit *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Thermofisher) seguindo as instruções do fabricante, as reações de PCR em tempo real foram realizadas com 10ng de cDNA e DNA em volume final de 10 μ L. As reações foram incubadas a 50° C por 2 min, 95° C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 min no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus (Thermofisher).

4.4.5 Análise dos dados obtidos a partir do PCR em tempo real

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ CT)⁽¹³⁷⁾. Inicialmente foi calculado o Δ CT, subtraindo-se os valores de Ct (limiar do ciclo) do alvo dos valores de CT do normalizador. Para se calcular o $\Delta\Delta$ CT foi utilizada a fórmula: [Δ CT (amostra) - Δ CT (amostra normalizadora)]. Por fim, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT}.

4.5 Microscopia de Fluorescência

A caracterização das culturas de adipócitos maduros infectados com *M. leprae* foi realizada por microscopia de fluorescência convencional e investigações *in vivo* por microscopia de fluorescência confocal.

No experimento *in vitro*, foram utilizadas 5×10^4 células por poço, em placas de 24 poços (Corning), onde as células foram diferenciadas sobre lamínulas de vidro e os adipócitos infectados com *M. leprae* marcados anteriormente com o fluoróforo PKH2 (Sigma-Aldrich). Ao final dos ensaios de infecção, o meio de cultura foi coletado, as células lavadas duas vezes com PBS 1X (LGC biotecnologia) e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min à temperatura ambiente e então as culturas marcadas com Oil Red O (Sigma-Aldrich), para detecção dos corpúsculos lipídicos. Para este, foram adicionados 200µL de solução de Propileno Glicol a 100% por 5 min a temperatura ambiente, e descartado. Em seguida, adicionado 200µL da solução de OilRed O por 7 min e removido. Na última etapa, foi feita adição de 200µL da solução de Propileno Glicol 85% durante 3min e descartado. Posteriormente, foi feita marcação dos núcleos com 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI - Sigma-Aldrich) por 5 minutos e posterior lavagem com PBS para retirada do excesso dos corantes.

Após todo procedimento de marcação, as culturas em lamínulas foram montadas em lâminas de vidro contendo 3µL de solução *ProLong Gold Antifade* (Life Technologies) e seladas com Entellan (Merck) para visualização no microscópio.

As imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axio Observer com sistema de iluminação Colibri (Zeiss). O sinal verde do *M. leprae* marcado foi fotografado utilizando-se o led 488nm / filtro Zeiss 60, o sinal vermelho do OilRed O capturado através da combinação do led 530nm e o filtro Zeiss 50 e o sinal azul do DAPI pelo led 365nm/filtro Zeiss 61. As imagens foram registradas em câmera monocromática HMR (Zeiss). A intensidade de fluorescência dos corpúsculos lipídicos foi mensurada utilizando o software ImageJ.

Para o método por microscopia confocal, fragmentos de tecido subcutâneo de pacientes com Hanseníase multibacilar foram coletados e cedidos pelo Ambulatório Souza-Araújo (FIOCRUZ), foram fixados com paraformaldeído 4% e processados seguindo como descrito em Martinez-Sabadinez et al. (2014)⁽¹³⁸⁾ com algumas modificações. Após fixação, o tecido foi cortado em pedaços pequenos, com aproximadamente 0.5cm e feita a primeira etapa com bloqueio de 30 min em solução tampão de marcação intracelular contendo 5% de albumina de soro bovino (BSA)

diluída em PBS pH 7,4 e 0,1% de Saponina, a temperatura ambiente. Após esta etapa, foi adicionado o anticorpo primário contra a micobactéria Anti-*M. leprae* lipoarabinomanana (LAM) CS-35, gentilmente cedido pelo Repositório de Recursos em Pesquisa de Biodefesa e Infecções Emergentes (<http://www.beiresources.org>), e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Foram realizadas então três lavagens por 10 minutos, com a solução tampão. Para incubação dos anticorpos secundários, foi utilizado o anticorpo secundário conjugado Alexa Fluor 633 IgG *anti-mouse* (Life Technologies), o marcador de corpúsculos lipídicos Bodipy (Life Technologies) e DAPI por 1 hora a temperatura ambiente, seguida de lavagem como descrito. Após processamento das amostras, fatias ópticas foram capturadas em microscópio confocal Olympus FV1000 (Olympus) em aumento de 60x. As imagens foram processadas e editadas utilizando o Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems).

4.6 Detecção Histopatológica de *M. leprae* em Fragmentos de Tecido Adiposo de Lesão de Pacientes Lepromatosos

Fragmentos de tecido subcutâneo obtidos por fragmentos de pacientes multibacilares oriundas do Ambulatório Souza Araújo (Fiocruz), processados e congelados, foram corados pelo método Wade (1928)⁽¹³⁹⁾, para detecção de bacilos álcool-ácido resistentes corados com fucsina, no tecido adiposo. Foram capturadas imagens utilizando o microscópio óptico com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 100x.

4.7 Extração de Lipídios e Cromatografia de Camada Delgada de Alta Performance(HPTLC)

Para a extração de lipídios, culturas de células 3T3-L1 infectadas ou não por *M. leprae* foram extraídas em tampão RIPA e tratadas com metanol e clorofórmio seguindo metodologia descrita por Bligh & Dyer (1959)⁽¹⁴⁰⁾. O extrato celular foi ressuspensão em metanol e clorofórmio (1:1 v/v) em tubos de vidro e em seguida misturados e centrifugados sequencialmente para coleta da fase inorgânica.

Para identificação dos componentes lipídicos, o extrato lipídico foi eluído em uma solução de metano e clorofórmio (1:1 v/v) e aplicadas em placas de HPTLC (SilicaGel, 60-Merck). Para as HPTLCs de lipídios neutros foram usados os solventes Hexano:Éter:Ácido Acético (15:10:0,25 v/v/v) e Hexano:Clorofórmio:Ácido Acético (20:5:0,25 v/v/v) e os padrões: monoglicerídeo, diglicerídeo, triglicerídeo, éster de

colesterol, colesterol e ácidos graxos (Sigma Aldrich). A revelação foi feita com Iodo e após digitalização da placa, a mesma foi exposta a Reagente de *Sharring* (10% ácido fosfórico, 8% sulfato de cobre), e aquecida a 200°C por 10 minutos.

4.8 Ensaio de Lipólise

A taxa de lipólise foi avaliada pela detecção de glicerol livre, utilizando o kit *Adipocytes Lipolysis Assay for 3T3-L1 cells: Glycerol Detection* (ZenBio). Sobrenadantes de adipócitos 3T3-L1 infectados por *M. leprae*, *M. smegmatis* e expostas a lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) por 24 horas foram coletados e utilizados no ensaio. Em placas de 96 poços foram adicionados 25µL de sobrenadantes e adicionado o mesmo volume de Reagente A de detecção de Glicerol e incubados a 25°C por 15 min, com posterior leitura de densidade optica a 540nm utilizando leitor espectrofotômetro (BioTek).

4.9 Análise da Produção de Adipocinas

Níveis de adipocinas no meio condicionado de células 3T3-L1 infectadas e não infectadas e em soro de pacientes com Hanseníase das diversas formas clínicas foram avaliados por método de multiplex com o kit Milliplex MAP (Merck Millipore), utilizando a plataforma Luminex.

Para detecção das adipocinas adiponectina, IL-6, leptina, MCP-1, resistina e TNF em sobrenadantes de cultura foi utilizado o kit *MILLIPLEX MAP Mouse Adipocyte Magnetic Bead Panel*, e para detecção das adipocinas adiponectina, IL-6, leptina, MCP-1, resistina, TNF e IL-1β em soros de pacientes foi utilizado o kit *MILLIPLEX MAP Mouse Adipocyte Magnetic Bead Panel*, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

4.10 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software), aplicando-se o teste *one way* ANOVA, não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de pós teste de Dunn e teste Mann-Whitney (*two tailed*).

Resultados e Discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Modelo *in vitro* de Infecção do *M. leprae* em Adipócitos

As primeiras investigações neste estudo foram conduzidas para se analisar a viabilidade de infecção da micobactéria no modelo experimental proposto com células de linhagem 3T3-L1. Nossa abordagem baseou-se na utilização deste modelo celular, que já foi utilizado para estudos de infecção e persistência de patógenos intracelulares como *M. tuberculosis*⁽¹²⁶⁾, *T. cruzi*⁽¹²²⁾, e *S. aureus*⁽¹⁴¹⁾. Para isto, as culturas de células 3T3-L1 diferenciadas à adipócitos foram inoculadas com *M. leprae* e mantidas por 1 dia ou 15 dias. Após este tempo, as culturas foram lisadas e extraído os ácidos nucleicos para posterior detecção do RNAr 16S da micobactéria, sabidamente lábil após a sua morte, através da técnica de PCR em tempo real. A expressão relativa dos níveis de DNA e RNA da micobactéria, que se refere à sua viabilidade, entre as diferentes culturas é demonstrada na Figura 5.1, onde podemos observar que o bacilo teve sua viabilidade mantida após 15 dias nas culturas de adipócitos.

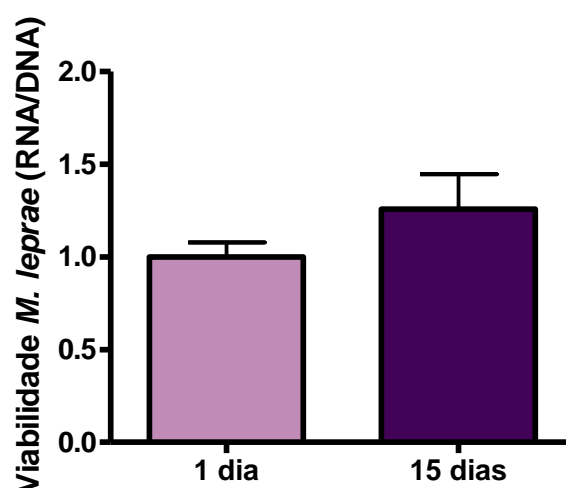


Figura 5.1: Viabilidade do *Mycobacterium leprae* em culturas de adipócitos 3T3-L1. Um dia ou 15 dias após a infecção com o bacilo em adipócitos maduros, as células foram lisadas e os níveis de RNA foram determinados e normalizados pelos níveis de DNA do *M. leprae*. Definimos como 1 os níveis detectados no tempo de 1 dia, nosso controle de viabilidade no início do experimento de 15 dias. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado representativo de dois experimentos feitos em triplicata.

É bem conhecido que o *M. leprae* é capaz de infectar macrófagos e células de Schwann *in vivo*⁽⁶⁾, porém não há estudos *in vitro* em que a micobactéria tenha se mantido viável nestes mesmos tipos celulares por um período tão longo, somente sendo

possível seu cultivo no modelo *in vivo* descrito por Sheppard (1960)⁽¹⁸⁾. No nosso trabalho utilizando células de linhagem 3T3-L1 diferenciadas a adipócitos, os resultados mostram que a infecção é possível e que a micobactéria se mantém viável após 15 dias de infecção, sugerindo um ambiente propício para persistência do bacilo, sendo a primeira evidência de viabilidade do *M. leprae* por um longo tempo *in vitro*. Mais ensaios serão necessários para a confirmação de uma possível multiplicação do bacilo nestas células, fato que abriria oportunidades de cultivo e transformação desta bactéria até o momento incultivável *in vitro*.

Estudos descrevem a mobilização e acúmulo de corpúsculos lipídicos pelo *M. leprae* em células de Schwann e macrófagos⁽¹³²⁾, sendo o colesterol identificado como uma molécula importante para a sobrevivência da micobactéria⁽¹⁴²⁾. É descrito que as células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* demonstram efeitos na homeostase lipídica, com regulação do tráfico e biogênese de corpúsculos lipídicos que favorecem a sobrevivência intracelular do patógeno⁽¹³¹⁾. Criou-se uma hipótese de trabalho onde a manutenção da viabilidade do bacilo no interior das células adiposas estaria relacionada à sua abundante reserva lipídica, facilitando assim a relação patógeno-hospedeiro e a infecção.

Para se analisar os corpúsculos lipídicos dos adipócitos, as culturas foram inoculadas por 24 horas com *M. leprae* ou *M. smegmatis*, marcado com PKH2 (verde) e posteriormente submetidas a marcação por OilRed O para evidenciar as gotículas lipídicas em vermelho, e DAPI para marcação nuclear.

Nas imagens obtidas por microscopia de fluorescência é possível confirmar a associação do *M. leprae* aos adipócitos, porém aparentemente não está modulando o acúmulo de corpúsculos lipídicos como esperado (Figura 5.2B). Paradoxalmente, observamos uma redução na quantidade de corpúsculos lipídicos em culturas infectadas pelo bacilo, diferente do que é descrito na literatura para outros tipos celulares como macrófagos e células de Schwann. Para confirmar a redução no número de corpúsculos lipídicos após a infecção, foram utilizados diversos campos para quantificação da intensidade de fluorescência do sinal dos corpúsculos lipídicos entre as culturas controle e inoculadas com as micobactérias, feita pelo software ImageJ, ilustrado na Figura 5.2D.

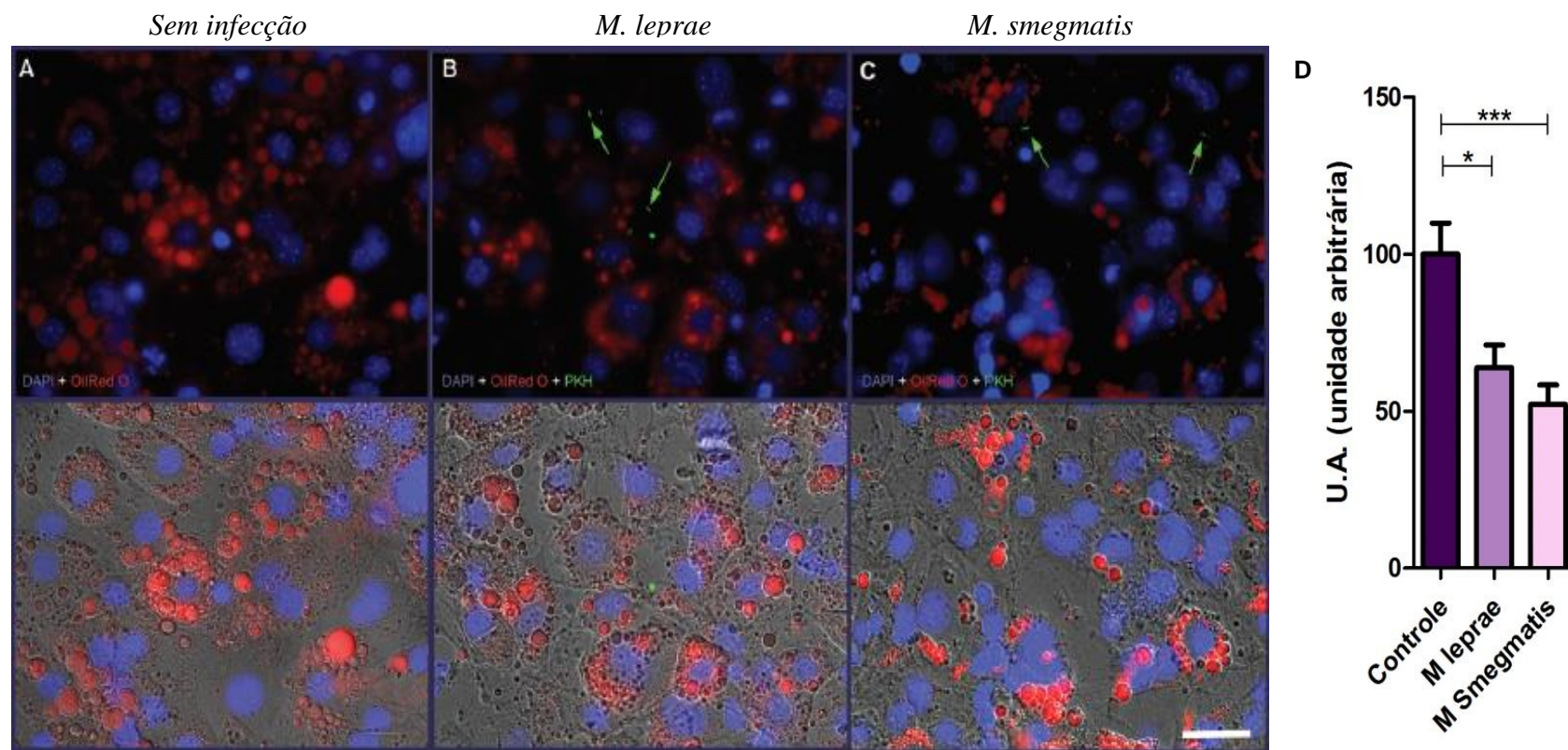


Figura 5.2: Avaliação da modulação lipídica durante a infecção de adipócitos 3T3-L1 por *M. leprae*. A: Culturas de células 3T3-L1 mostrando gotículas lipídicas abundantes marcadas de vermelho por OilRed O. Os núcleos foram contrastados por DAPI (azul); B: cultura após 24 horas de infecção por *M. leprae* PKH28 (verde) (MOI 5:1); C: cultura após 24 horas de infecção por *M. smegmatis* PKH2 (verde) (MOI 5:1) D: Quantificação da intensidade de fluorescência de corpúsculos lipídicos (canal vermelho) em culturas não infectadas (controle), inoculadas com *M. leprae* ou *M. smegmatis*, com o uso do software ImageJ. Imagens da parte inferior apresentam contraste interferencial de campo (DIC). Barra de escala representa 20µm. Os valores representam a média ± desvio padrão. Resultado representativo de diversas imagens analisadas de três experimentos feitos em triplicata. *p<0.05; ***p<0.001 (One way ANOVA, teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

Houve redução lipídica também nas culturas expostas ao *M. smegmatis*, uma micobactéria não patogênica utilizada como controle nos experimentos. Estudos adicionais deverão ser feitos a fim de se descrever o que ocasionou esta significativa redução mensurada neste modelo experimental.

Visto isto, para confirmar a mobilização lipídica que aparentemente ocorreu nas culturas infectadas, o próximo passo foi avaliar o processo da quebra de triglicerídeos, a lipólise, nas culturas expostas às micobactérias.

5.2 Análise de Modulação Lipídica em Culturas Infectadas por *M. leprae*

Para observação do perfil de abundância na composição lipídica das culturas, foi feita extração dos lipídios das culturas controle e infectadas pelo *M. leprae*. Os extratos lipídicos foram submetidos à separação utilizando-se uma placa de cromatografia de alta performance em camada fina (HPTLC). O perfil de separação cromatográfico (Figura 5.3A) das amostras oriundas de culturas controles e infectadas pelo *M. leprae* (colunas C e D respectivamente) foram comparadas com os padrões de separação de mono, di e triglicerídeos (coluna A) e colesterol (coluna B). Foi feita então a quantificação dos triglicerídeos entre as duas condições de culturas, apresentadas na Figura 5.3B.

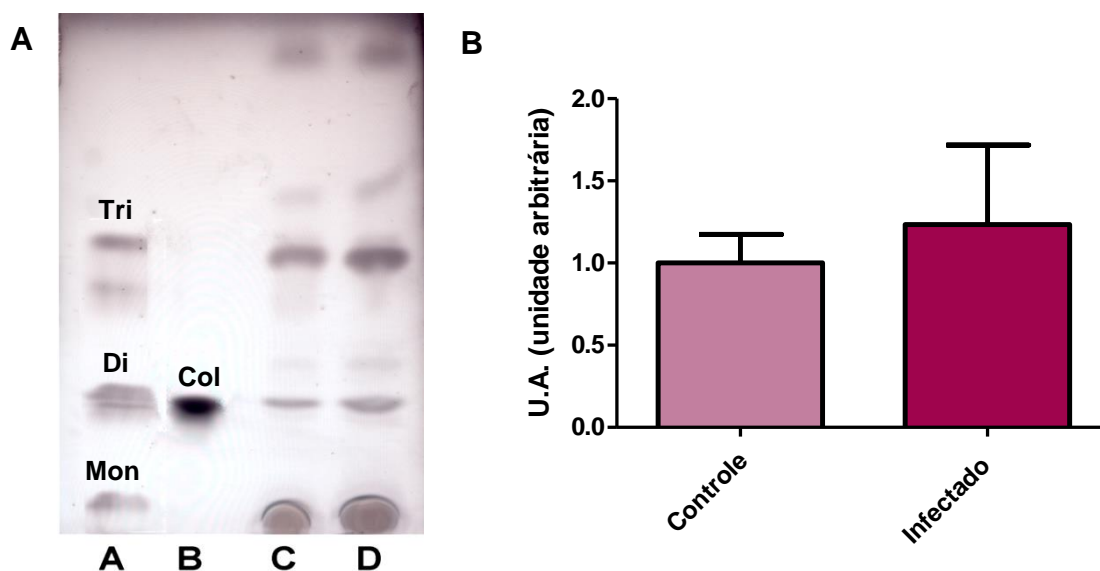


Figura 5.3: Extração lipídica de cultura de adipócitos 3T3-L1. A: Comparação cromatográfica do conteúdo lipídico entre culturas controle ou infectadas pelo *M. leprae*, onde A= 50 µg de Padrão de Mono, Di e Triglicerídeo; B= 20 µg de Padrão de Colesterol; C= 250 µg de amostra de lipídio total de culturas controle; D=250 µg de amostra de culturas infectadas. B: Gráfico de quantificação de triglicerídeos entre

as cultura controle e infectada. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado representativo de um experimento.

Apesar das diferenças de quantidade de corpúsculos lipídicos observadas na quantificação da fluorescência, através da quantificação dos triglicerídeos na Figura 5.3 é possível observar que não há diferenças significativas no conteúdo lipídico entre a cultura controle e a infectada pelo *M. leprae*.

Para se avaliar o processo de lipólise desencadeado pelas células infectadas, os sobrenadantes das culturas foram analisados para detecção de glicerol, produto da mobilização de triglicerídeos, e confirmação da atividade lipolítica nos adipócitos infectados comparados com culturas controle, expostas ao *M. leprae* ou *M. smegmatis* (Figura 5.4).

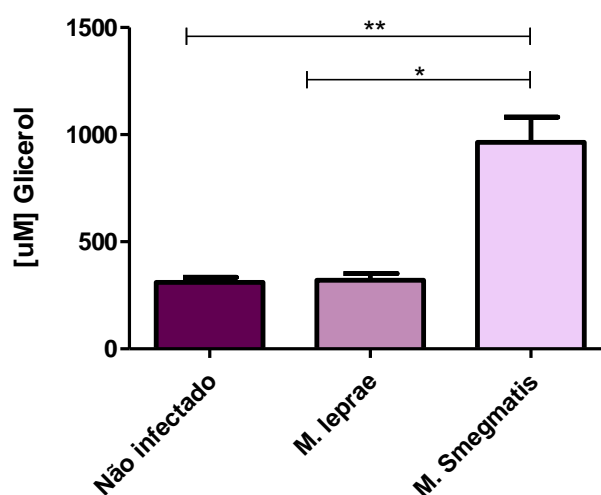


Figura 5.4: Análise de lipólise. Quantificação da concentração de glicerol livre em sobrenadantes de culturas de 3T3-L1 controle, infectadas por *M. leprae* (5:1) ou *M. smegmatis* (5:1). Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado representativo de cinco experimentos. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (One way ANOVA, teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

Em um trabalho utilizando adipócitos 3T3-L1 como modelo de infecção para *S. aureus* é descrita a sobrevivência bacteriana por 5 dias, com aumento na secreção de MCP-1, visfatina e IL-6 e redução das adipocinas resistina e adiponectina. Adicionalmente, os adipócitos infectados apresentaram mais altas concentrações de triacilglicerol intracelular e grandes corpúsculos lipídicos comparados às culturas não infectadas(141). No entanto, com os resultados deste ensaio, sugere-se que mesmo após observarmos uma redução no número de corpúsculos lipídicos durante a infecção, não observamos diferenças na composição lipídica geral das gotículas entre as diferentes

culturas, assim como na liberação de glicerol para o meio extracelular. Concluímos que nas cultura infectadas por *M. leprae* há mobilização lipídica, mas os mesmos parecem não estar sendo liberados para o meio extracelular. A partir desses dados podemos propor que os lipídios das células infectadas são mobilizados dos corpúsculos lipídicos para o citosol das mesmas, sem sofrer lipólise ou β -oxidação, de modo a reduzir sua detecção nos corpúsculos sem a redução dos seus níveis totais ou liberação de glicerol no meio. Esse fenômeno observado em adipócitos difere enormemente do que é descrito na literatura para os modelos de infecção *in vitro* em macrófagos e células de Schwann, onde ocorre acúmulo de corpúsculos lipídicos durante a infecção pelo *M. leprae*.

5.3 Confirmação de Acesso da Micobactéria ao Tecido Adiposo *in vivo*

No trabalho de Neyrolles et al. (2006)⁽¹²⁶⁾ é demonstrada a presença de *M. tuberculosis* em cultura de adipócitos e em autópsias de indivíduos com tuberculose, além de ser descrita a capacidade da micobactéria acumular lipídios e sobreviver em estágio não replicativo, garantindo a proteção contra ação de drogas quando internalizados nos adipócitos. Além disso, já foi comprovado o acesso do *M. tuberculosis* em diversos depósitos adiposos em modelos de infecção murino *in vivo*⁽¹²⁷⁾. No trabalho de Combs et al. (2005)⁽¹²²⁾, o adipócito também é descrito como importante alvo de infecção e reservatório de *T. cruzi* com evidência em tecido adiposo *in vivo*.

Para investigar a presença da micobactéria em tecido adiposo de pacientes com Hanseníase, foram realizadas diferentes técnicas na busca do melhor método. A primeira análise foi feita através de exame histopatológico de cortes parafinizados de lesão de pele de pacientes com hanseníase multibacilar, utilizado em exames de diagnóstico e determinação de baciloscopia da lesão cutânea de pacientes. Após desparafinização, os tecidos foram submetidas ao método de coloração Wade⁽¹³⁹⁾, revelando a presença de inúmeros bacilos no parênquima do tecido adiposo (figura 5.5).

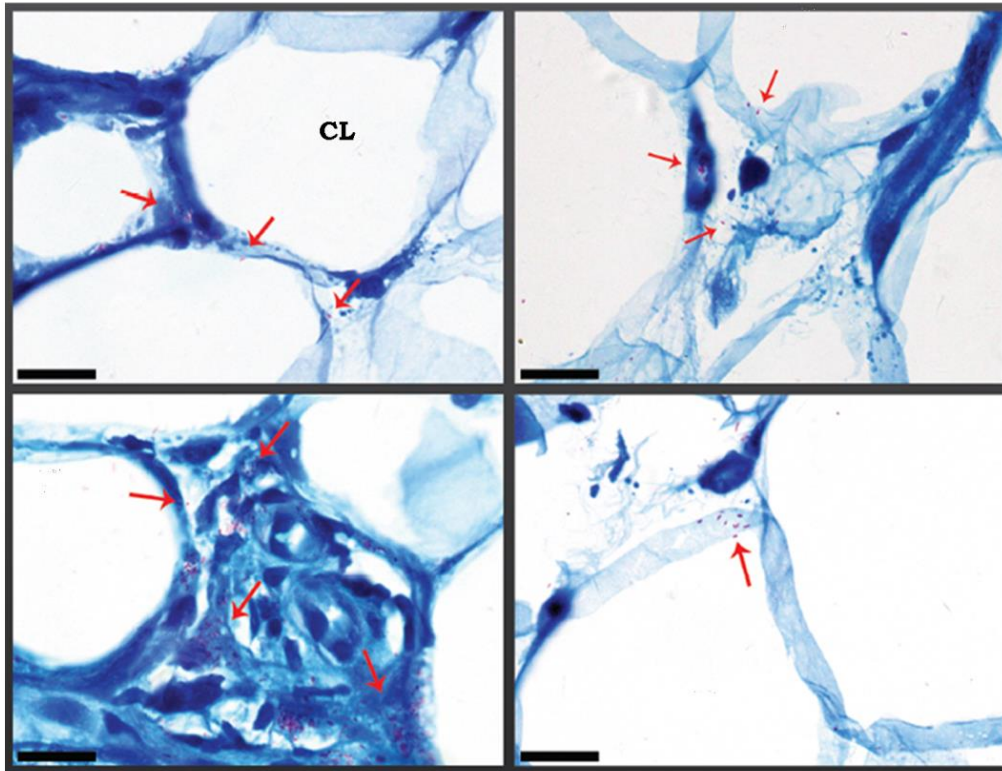


Figura 5.5: Exame histopatológico de fragmentos de tecido subcutâneo de paciente com hanseníase multibacilar. Fotomicrografia de fragmento de lesão de pele de paciente do polo multibacilar da hanseníase, corado por Wade, revela a presença de numerosos bacilos associados ao tecido adiposo. Setas = *M. leprae*; CL = corpúsculos lipídicos; Aumento de 100x. Barra de escala representa 20µm.

Após este método, percebemos que esta metodologia padrão de detecção de micobactérias em pacientes com hanseníase não é a ideal para investigação da internalização destas ao tecido adiposo, pois há perda de todo conteúdo lipídico no processamento destes fragmentos para análise. Tal fato pode explicar porque nunca antes havia sido descrita a presença de *M. leprae* em tecido adiposo de pacientes acometidos pela hanseníase.

Apesar das imagens nos confirmar o acesso do *M. leprae* ao tecido adiposo subcutâneo, por este método não é possível afirmar a localização intracelular da micobactéria no tecido, não sendo possível comprovar que o *M. leprae* está associado diretamente aos adipócitos, nem em seu interior, por conta da perda do conteúdo lipídico destas células nas imagens analisadas.

Buscando aprimorar a técnica para identificação do *M. leprae* em adipócitos de pacientes do Mal de Hansen, preservando as gotículas lipídicas destas células, fragmentos de tecido subcutâneo de pacientes multibacilares foram fixadas e

processadas para análise por microscopia de fluorescência, utilizando microscópio confocal para investigação e registro em diferentes fatias ópticas do tecido adiposo. Nas imagens, é possível observar a presença de antígenos da micobactéria, marcados pelo anticorpo Anti-LAM em vermelho no tecido, confirmando mais uma vez o acesso da micobactéria no tecido adiposo (Figura 5.6). No entanto, ainda não é possível excluir sua presença no interior das gotículas lipídicas. Além disso necessita-se de marcações adicionais para afirmarmos com toda a clareza que tratam-se de adipócitos infectados, já que não há um marcador específico para as células adiposas, excluindo-se assim a possibilidade de tratar-se de outros tipos celulares presentes no tecido adiposo, como por exemplo os macrófagos residentes, que também podem ser alvos de infecção da micobactéria.

Nestas imagens podemos observar também o perfil de mobilização de gotículas lipídicas visto nas culturas *in vitro*, com visível localização de antígenos de *M. leprae* em áreas onde há gotículas lipídica sem visível mobilização (setas), como foi demonstrado no modelo de infecção em células 3T3-L1.

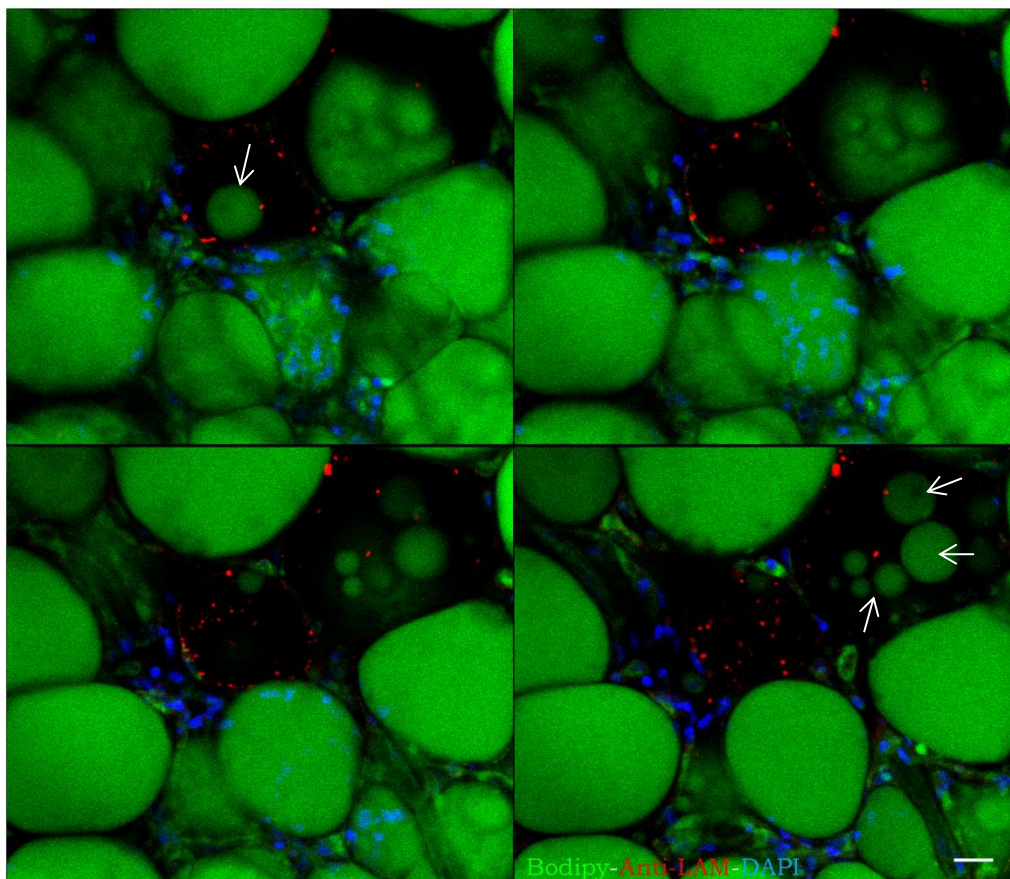


Figura 5.6: Presença de antígenos de *M. leprae* em fragmentos de tecido subcutâneo de paciente com hanseníase multibacilar. Fragmentos de tecido adiposo subcutâneo fixada em paraformaldeído 4%, gotículas lipídicas evidenciadas com BODIPY (verde), núcleos das células com DAPI (azul) e antígenos de *M. leprae* evidenciados através do uso de anticorpo anti-LAM (vermelho). Nestas imagens de microscopia confocal é possível confirmar a presença da micobactéria no tecido adiposo de pacientes, correlacionado sua presença com a mobilização de gotículas lipídicas (setas). Aumento de 60x. Barra de escala representa 10 μ m.

5.4 Contribuição Endócrina do Tecido Adiposo durante a Infecção por *M. leprae*

Até recentemente, o tecido adiposo foi considerado como sendo um simples compartimento de armazenamento de triglicerídeos. No entanto, os adipócitos são células endócrinas ativas que desempenham um papel central na homeostase global de energia e sistema imune, influenciando na homeostase lipídica sistêmica e na produção e liberação de uma série de mediadores inflamatórios específicos, como citocinas, quimiocinas e componentes da matriz extracelular, classificados como adipocinas. Tem sido dada pouca atenção ao papel de tecido adiposo em doença infecciosa⁽¹²⁰⁾, mas o

forte potencial pró-inflamatório do tecido adiposo sugere que ele pode ter um papel importante na resposta imune inata sistêmica.

Sabendo que os adipócitos contribuem na função endócrina, secretando diversos fatores envolvidos na resposta imune celular, adicionado ao fato de a Hanseníase ser uma doença com diversos espectros clínicos e diferentes perfis de resposta imunológica, nos atentou a investigação do perfil de adipocinas produzidas pelos adipócitos frente à infecção por *M. leprae*, que podem estar envolvidas na imunomodulação da doença. Para isto, foi feita análise em soro de pacientes de diversas formas clínicas de hanseníase por ensaio multiplex para a detecção das adipocinas leptina, adiponectina, resistina, MCP-1, TNF, IL-6 e IL-1 β .

Leptina:

Além do envolvimento nas funções fisiológicas, a leptina é reconhecida como uma citocina de cadeia longa helicoidal, caracterizada por um conjunto de quatro α -hélices com semelhança estrutural a IL-6 e com múltiplas ações⁽⁷⁸⁾. No contexto da resposta imune, a leptina pode ser induzida por mediadores inflamatórios como TNF e IL-1 e atuar como uma proteína de fase aguda inicial, sendo produzida em níveis elevados durante a sepse⁽¹⁴³⁾. Sua função imunológica tem sido demonstrada em camundongos deficientes de leptina (*ob/ob*) e deficientes de receptores de leptina (*db/db*), bem como em seres humanos geneticamente deficientes desta adipocina, que desenvolvem obesidade profunda e uma série de anormalidades nos sistemas endócrino e imunológico⁽¹⁴⁴⁾. Além disso, a diminuição da concentração de leptina parece ser responsável por reduzir a atividade dos linfócitos T durante o jejum⁽¹⁴⁵⁾ enquanto que nos processos inflamatórios e infecciosos os níveis séricos de leptina encontram-se aumentados⁽¹⁴⁴⁾.

Visto o envolvimento desta adipocina em processos imunológicos, neste trabalho avaliamos então os níveis de leptina em soro de indivíduos de diferentes formas clínicas da hanseníase. Pacientes do polo lepromatoso apresentaram mediana semelhante aos dos indivíduos controles, enquanto que os do polo tuberculoide apresentaram níveis mais altos de leptina sérica detectada, no entanto, os resultados não foram significativos em relação ao grupo controle. Pacientes em reação do tipo 2 (ENL) tratados ou não, apresentaram níveis quase indetectáveis da proteína (Figura 5.7), com mediana abaixo do grupo controle.

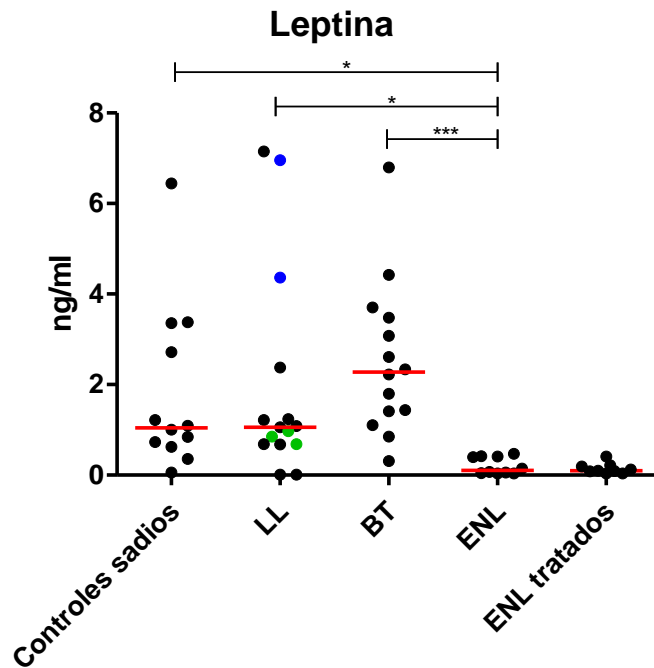


Figura 5.7: Níveis séricos de leptina em pacientes com hanseníase e controles saudios. Os traços em vermelho representam a mediana e cada círculos representa um indivíduo. Círculos verdes representantam pacientes que desenvolveram reação reversa; Em azul, os que desenvolveram eritema nodoso leproso. LL – Lepromatoso- Lepromatoso, BT – *Borderline*-Tuberculoide, ENL – Eritema Nodoso Leproso recém diagnosticados, ENL tratados – Os mesmos pacientes ENL após 7 dias de tratamento com talidomida. *p <0.05; ***p<0.001(One way ANOVA, teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

A leptina parece ser um importante mediador inflamatório em doenças infecciosas. A fim de descrever o papel da leptina na proteção contra agentes infecciosos Nagajyothi et al. (2010)⁽¹⁴⁶⁾ demonstraram uma elevada mortalidade nos camundongos *db/db* infectados pelo *T. cruzi*. Além disso, estes animais deficientes em leptina também apresentam maior susceptibilidade a infecções sistêmicas por *Listeria monocytogenes*⁽¹⁴⁷⁾ e *M. tuberculosis*, uma vez que a leptina contribui para uma resposta imune protetora contra patógenos intracelulares⁽¹⁴⁸⁾. Na tuberculose, a produção de leptina está suprimida, como observamos nos indivíduos acometidos pelo ENL, e a baixa concentração desta proteína contribui para o aumento da susceptibilidade à infecção pelo *M. tuberculosis*⁽¹⁴⁹⁾. Prabha et al. (2005)⁽¹⁴⁵⁾ observaram que os níveis séricos de leptina também são significativamente reduzidos nos indivíduos acometidos pela tuberculose na AIDS.

Em um estudo da análise de leptina em pacientes com hanseníase⁽¹⁵⁰⁾, os indivíduos com formas multibacilares, os quais apresentam reduzida resposta imune celular com predomínio de citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, demonstraram níveis reduzidos

de leptina. Por outro lado, no polo tuberculoide, de maior resposta imune celular à infecção pelo *M. leprae*, foi observado um discreto aumento nos níveis de leptina em comparação com o observado nos contatos, o que poderia corroborar nossos dados. No entanto as diferenças encontradas não foram estatisticamente significantes, assim, os dados obtidos nesse estudo embora sugiram uma diminuição da leptina nas formas multibacilares não permitem nenhuma associação conclusiva entre a forma clínica da hanseníase e os níveis séricos desta adipocina. Ainda no trabalho de De Macedo et al. (2013), os autores analisaram a produção de leptina na reação do tipo 1 (RR), que apresentou um discreto aumento em relação aos contatos intradomiciliares, mas não em relação aos controles. Na reação tipo 2 (ENL) caracterizada por intensa resposta inflamatória aos antígenos do *M. leprae*, não foi verificado nenhum indício de elevação nos níveis séricos de leptina, sugerindo que esta não tem papel neste fenômeno.

Nossos dados apontam para uma drástica redução nos níveis da adipocina durante o quadro de ENL, situação não revertida após 7 dias de tratamento com talidomida. Pacientes LL que desenvolveram reação (círculos verdes e azuis) não apresentaram o mesmo perfil de níveis da adipocina, sugerindo que seus níveis reduzidos não são indicadores de desenvolvimento de reação nos indivíduos.

Propomos estudos futuros considerando o estado nutricional do indivíduo com base no índice de massa corporal (IMC), de modo a propiciarem um melhor entendimento da participação desta molécula na doença. Santucci et al. (2011)⁽¹⁵¹⁾ estudaram a relação entre o metabolismo e os sistemas imune e endócrino em pacientes com tuberculose e correlacionaram positivamente o IMC e os níveis de leptina, sendo estes últimos diminuídos nas formas graves da doença. Keicho et al. (2012)⁽¹⁵²⁾ abordando o evento inflamatório e o metabolismo, mostraram níveis de leptina significativamente mais baixos em pacientes com tuberculose ativa e justificaram tal fato pelo estado de desnutrição da população estudada corroborando com a susceptibilidade do paciente frente à infecção em decorrência da deficiente imunidade mediada por células.

Adiponectina

A adiponectina é uma proteína específica de adipócitos que possui propriedades anti-inflamatórias, bem como efeito lipolítico, sendo um redutor da obesidade⁽¹⁵³⁾. Em indivíduos obesos, o nível de adiponectina é diminuído e inversamente correlacionada com o peso e massa de gordura corporal. A hipoadiponectinemia (baixas concentrações

de adiponectina sérica) é correlacionada com a resistência à insulina e aterosclerose, resultando em doença cardiovascular. Um estudo indicou que a adiponectina tem propriedades anti-inflamatórias, através da indução do mediador anti-inflamatório IL-10 em monócitos humanos primários, macrófagos e células dendríticas⁽¹⁵⁴⁾.

Adicionalmente, a adiponectina prejudica significativamente a produção de IFN- γ , que tem efeito pró-inflamatório em macrófagos humanos⁽⁹¹⁾. Vários estudos têm relatado que a forma fisiologicamente relevante, de alto peso molecular da adiponectina, tem efeitos anti-inflamatórios em endotélio e macrófagos. Além de suas várias propriedades anti-inflamatórias, já é bem descrita a modulação desta adipocina por outras citocinas envolvidas em um estado de inflamação sistêmica. Por exemplo, a produção de adiponectina por adipócitos em cultura é inibida por citocinas inflamatórias, tais como TNF^(120,155).

Não há investigações a respeito dos níveis de adiponectina na infecção por *M. leprae*. Nossos resultados demonstram uma variabilidade muito grande nos níveis séricos de adiponectina entre indivíduos da mesma forma clínica da doença, no entanto, apesar de não haver diferença estatística entre a maior parte dos grupos analisados e os controles, pacientes BT apresentaram altos níveis da proteína em relação aos pacientes LL. Considerando os pacientes ENL, estes apresentaram a mediana mais alta dos níveis de adiponectina, que foi reduzida após uma semana de tratamento com talidomida (Figura 5.8).

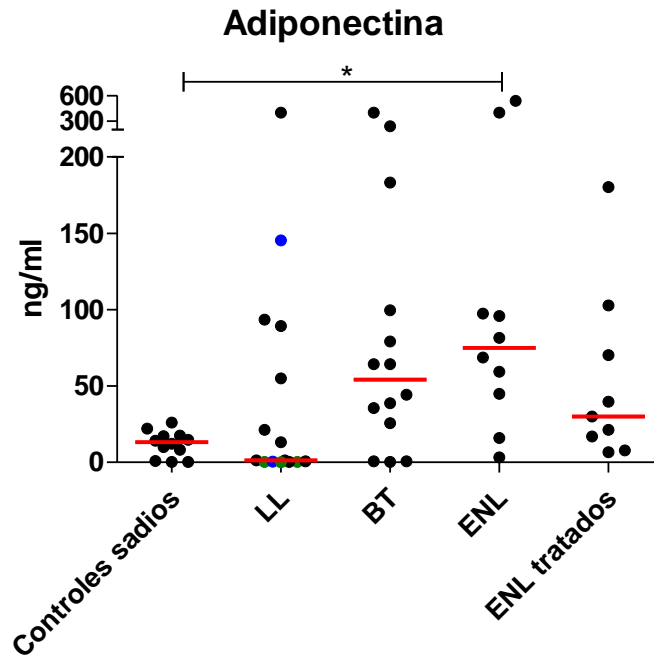


Figura 5.8: Níveis séricos de adiponectina em pacientes com hanseníase e controles saudáveis. Os traços em vermelho representam a mediana e cada círculo representa um indivíduo. Círculos verdes representam pacientes que desenvolveram reação reversa; Em azul, os que desenvolveram eritema nodoso leproso. LL – Lepromatoso- Lepromatoso, BT – Borderline-Tuberculoide, ENL – Eritema Nodoso Leproso recém diagnosticados, ENL tratados – Os mesmos pacientes ENL após 7 dias de tratamento com talidomida. * $p < 0.1$ (One way ANOVA, teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

Postula-se que a adiponectina possui atividades moduladoras de inflamação e estudos clínicos têm demonstrado associações inversas entre os níveis de adiponectina e marcadores séricos de inflamação^(156,157). No trabalho de Combs e colaboradores (2005)⁽¹²²⁾ foi feita a detecção de adiponectina frente à infecção por *T. cruzi*, apresentando significativa redução dos níveis de adiponectina durante a infecção aguda, sugerindo que componentes pró-inflamatórios da infecção podem estar modulando a redução da adipocina.

No entanto, em outro trabalho, Elmargoushy e colaboradores (2014)⁽¹⁵⁸⁾ determinaram os níveis de adiponectina em soro de pacientes com TB pulmonar ativa, TB pulmonar tardia e controles saudáveis, demonstrando que pacientes com TB pulmonar ativa apresentaram níveis mais altos que os controles saudáveis e que indivíduos com TB pulmonar tardia, porém, comparado a este último, com menor significância estatística.

Foi também demonstrado em pacientes acometidos por infecção pulmonar por *M. avium* que os níveis de adiponectina sérica encontram-se significativamente maiores do que em indivíduos saudáveis⁽¹⁵⁹⁾.

Esses dados parecem apontar que a resposta inflamatória é resultante da infecção por micobactérias. Outro trabalho mostrou resultados semelhantes após analisar os níveis circulantes de adiponectina em pacientes com TB pulmonar ativa, foi demonstrado que pacientes com a forma mais severa da doença, apresentando extensas lesões pulmonares, apresentaram níveis mais altos da proteína, com subsequente redução durante o tratamento, concluindo que o aumento dos níveis de adiponectina pode ser um marcador promissor de severidade em TB⁽¹⁵²⁾.

Aparentemente as infecções por micobactérias apresentam um perfil diferenciado na modulação da adiponectina, com o seu aumento concomitante à inflamação, ao contrário do observado durante a infecção por outros patógenos. Na nossa coorte de pacientes observamos efeito compatível com essa conclusão. Pacientes em reação tipo 2, que são caracterizados por altos níveis de TNF circulantes, apresentaram os mais altos níveis de adiponectina, que foram reduzidos após uma semana de administração de talidomida, um inibidor da via de sinalização desta citocina (ENL tratados). No entanto não é possível afirmar que um perfil aumentado dos níveis de adiponectina seja um marcador para desencadeamento da reação, pois indivíduos da forma lepromatosa da doença analisados em nosso teste que desenvolveram reação ao longo do tratamento (círculos verdes e azuis) apresentaram em sua maioria níveis bastante reduzidos da adipocina.

Resistina

As investigações relatadas até agora na literatura têm se centrado no papel da resistina como um indutor de resistência à insulina. No entanto, o fato da resistina ser expressa abundantemente em células da medula óssea e, em particular, nos leucócitos e macrófagos, corroborado com o fato que moléculas da família RELM, a qual faz parte a resistina, são encontradas em tecidos inflamados, sugere-se que a resistina pode desempenhar um papel importante no processo inflamatório. Porém, há poucas informações disponíveis atualmente sobre este assunto. Vários estudos demonstraram seu papel em doenças inflamatórias crônicas, como aterosclerose, endotoxemia, asma e artrite por exemplo⁽¹⁶⁰⁻¹⁶³⁾. No entanto, a capacidade da resistina em induzir uma resposta pró-inflamatória⁽¹⁶⁴⁾ também explica o seu papel em doenças infecciosas por

meio de mecanismos imune inatos. Além disso a detecção de altos níveis de resistina no sangue em sepse severa ou choque séptico também sugere um papel importante de resistina em doenças infecciosas⁽¹⁶⁵⁾.

Estudos demonstram que citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, e TNF) aumentam a expressão de resistina em PBMC humano⁽¹⁶⁶⁾, ao passo que TNF é um regulador negativo de expressão de resistina em células adiposas murinas⁽¹⁶⁷⁾. Estudos que examinam a expressão da resistina como parte da resposta a endotoxina têm demonstrado que a expressão de RNAm de resistina é detectável na fase inicial⁽¹⁶⁸⁾, mas não detectável após 24 horas de exposição⁽⁹⁵⁾.

Além disso, a resistina se apresenta em altos níveis em pacientes apresentando infecção pulmonar ativa por *M. tuberculosis*, demonstrando a redução destes níveis ao longo do tratamento⁽¹⁶⁹⁾. Ehtesham e colaboradores (2011)⁽¹⁷⁰⁾ exploraram a utilidade da resistina como um biomarcador de severidade de infecção em tuberculose e eficácia de tratamento. Foi feita a análise do soro de pacientes com TB pulmonar ativa, contatos e controles sadios, onde a resistina se apresentou em mais altos níveis em pacientes em comparação aos controles sadios. Seus níveis em contatos também se apresentaram altos em relação aos controles. Quando tratados, estes pacientes apresentaram aumento de massa corporal correlacionada com a redução dos níveis de resistina, sugerindo que o efeito observado pode não estar relacionado diretamente à resposta inflamatória, e sim ao aumento do IMC do paciente. Mesmo assim os autores propõem que a molécula pode ser um marcador no tratamento da tuberculose, servindo como um biomarcador de prognóstico para adoecimento.

Em nossa coorte de pacientes os níveis de resistina sérica não apresentaram diferenças significantes entre as diferentes formas clínicas da hanseníase e dos pacientes analisados (Figura 5.9), porém esta análise pode se alterar após a correção destes dados pelos IMCs dos pacientes incluídos neste estudo, análise a ser realizada em futuro próximo.

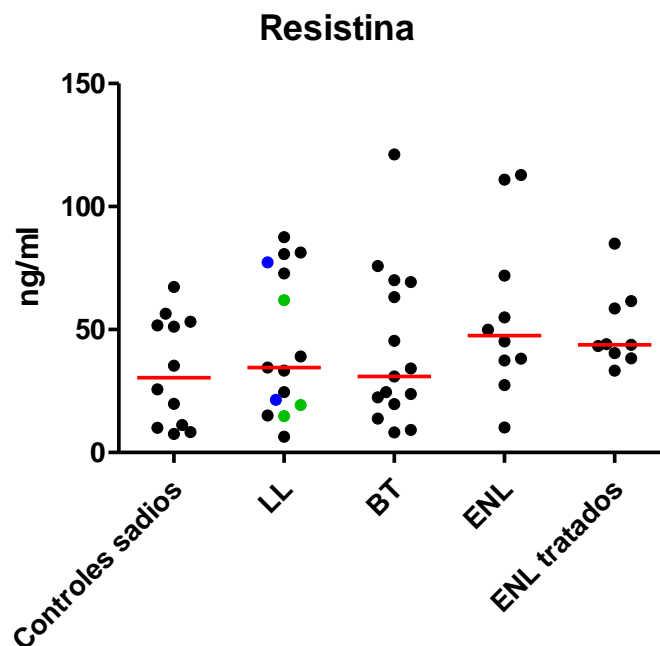


Figura 5.9: Níveis séricos de resistina em pacientes com hanseníase e controles sadios. Os traços em vermelho representam a mediana e cada círculo representa um indivíduo. Círculos verdes representam pacientes que desenvolveram reação reversa; Em azul, os que desenvolveram eritema nodoso leproso. LL – Lepromatoso- Lepromatoso, BT – Borderline-Tuberculose, ENL – Eritema Nodoso Leproso recém diagnosticados, ENL tratados – Os mesmos pacientes ENL após 7 dias de tratamento com talidomida.

MCP-1

Além das adipocinas apresentadas, foram analisados os níveis séricos da proteína quimioatrativa de monócitos-1 nestes indivíduos. O MCP-1 (ou CCL2) é um membro da família de quimiocinas C-C, produzida por uma variedade de tipos celulares, porém predominantemente pelos macrófagos e células endoteliais, quer constitutivamente ou após a indução pelo estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. As quimiocinas são secretadas em resposta a sinais, tais como citocinas pro-inflamatórias, e desempenham um papel importante no recrutamento de monócitos, neutrófilos e linfócitos. Uma vez induzida, a migração dirigida de células que expressam os receptores de quimiocinas adequados ocorre ao longo de um gradiente de ligante químico conhecido como o gradiente de quimiocina. Isto permite que as células se movam para locais de altas concentrações de quimiocinas⁽¹⁷¹⁾.

Lew e colaboradores (2002)⁽¹⁷²⁾ analisaram os níveis de MCP-1 em soro de pacientes da forma LL da hanseníase, detectando níveis mais altos desta quimiocina

neste grupo de pacientes, e este se correlaciona com o IB dos pacientes, indicando que os níveis mais altos da quimiocina estão de acordo com a severidade da doença.

Nos nosso trabalho analisamos os níveis séricos do MCP-1, e semelhante ao trabalho descrito, os níveis da quimiocina estão mais altos no grupo de pacientes LL e ENL em relação ao controle, antes ou após o tratamento com talidomida (Figura 5.10).

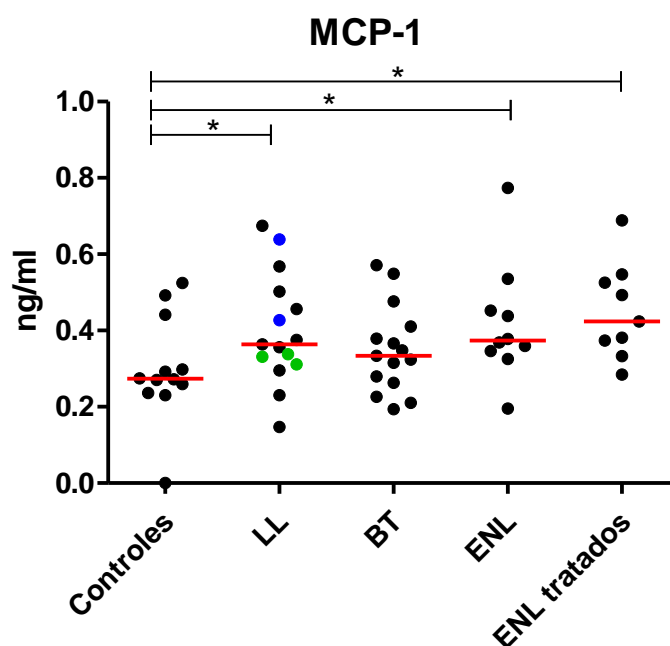


Figura 5.10: Níveis séricos de MCP-1 em pacientes com hanseníase e controles sadios. Os traços em vermelho representam a mediana e cada círculo representa um indivíduo. Círculos verdes representam pacientes que desenvolveram reação reversa; Em azul, os que desenvolveram eritema nodoso leproso. LL – Lepromatoso- Lepromatoso, BT – *Borderline*-Tuberculoide, ENL – Eritema Nodoso Leproso recém diagnosticados, ENL tratados – Os mesmos pacientes ENL após 7 dias de tratamento com talidomida. * $p < 0.05$ (Teste Mann-Whitney - *two-tailed*).

Aa citocinas TNF, IL-6 e IL-1 β obtiveram níveis de detecção abaixo dos limites mínimos de detecção do kit utilizado, por isso não foram apresentadas.

Para observarmos a contribuição direta dos adipócitos na produção das adipocinas observadas, sobrenadantes de culturas de adipócitos da linhagem 3T3-L1 infectadas com *M. leprae* foram analisados por ensaio multiplex. Analisamos a produção de diferentes adipocinas inicialmente em uma curva temporal de infecção com a micobactéria, para identificar qual tempo de infecção seria ideal para análise do maior número possível de adipocinas a partir de um mesmo sobrenadante (Figura 5.11). Foram analisados os tempos de 4, 6 e 24 horas de infecção com *M leprae* em

comparação com o controle de culturas não infectadas para detecção de adiponectina, IL-6, MCP-1, resistina, leptina e TNF.

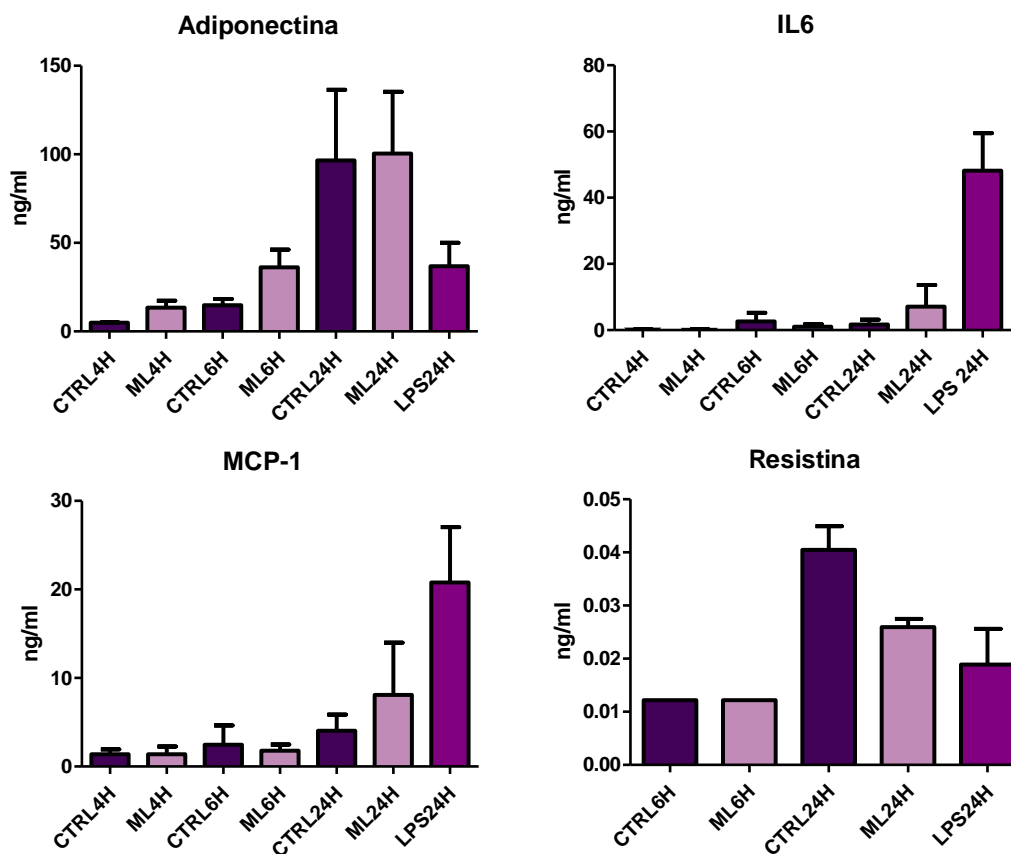


Figura 5.11: Ensaio de curva temporal da produção de adipocinas em sobrenadantes de adipócitos da linhagem 3T3 infectados *in vitro*. CTRL= controle não infectado; ML= adipócitos infectado por *M. leprae* utilizando-se uma MOI de 5:1 após os diferentes tempos de infecção indicados; LPS = sobrenadantes de adipócitos expostos a LPS 10ng/mL nos diferentes tempos indicados.

Neste ensaio concluímos que o tempo de 24 horas de infecção seria o mais adequado para análise de todas as adipocinas, visto que foi o tempo em que há consideráveis concentrações das moléculas no sobrenadante para serem detectadas. As citocinas leptina e TNF não foram apresentadas pois não obtiveram níveis de detecção acima dos valores mínimos de detecção do kit em nenhuma das amostras analisadas.

Foi repetido então o ensaio multiplex com um número maior de sobrenadantes de culturas de adipócitos murinos, no tempo de 24 horas de infecção (Figura 5.12). No entanto, neste ensaio não houve diferença significativa na produção das diferentes adipocinas entre as condições controle e infectadas por *M. leprae*. Neste momento, esta etapa do estudo encontra-se inconclusiva. Não podemos ainda concluir que o *M. leprae*

não é capaz de modular estas adipocinas no modelo de adipócitos murinos oriundos de 3T3-L1. Concluímos apenas que o bacilo não é capaz de modulá-las no intervalo de tempo testado. Um maior esforço se faz necessário, utilizando-se de ferramentas moleculares como PCR em tempo real, no sentido de avaliar tempos mais longos como uma semana de infecção por exemplo, antes de descartarmos essa ferramenta de estudo.

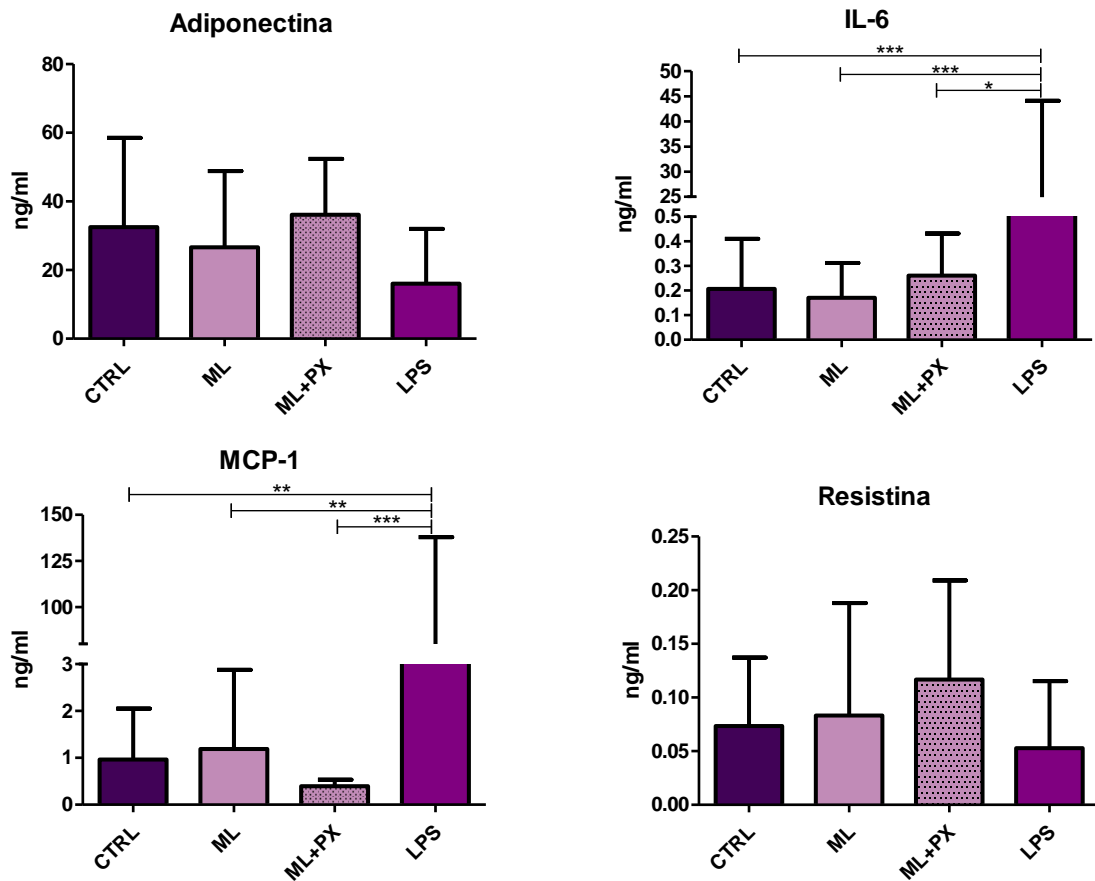


Figura 5.12: Análise da produção de adipocinas por adipócitos in vitro em resposta a infecção por *M. leprae*. CTRL= controle não infectado; ML= infectado por *M. leprae*; ML+PX = infectado por *M. leprae* com adição de polimixina (neutralizante de LPS); LPS = lipopolissacarídeo. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 (One way ANOVA, teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn).

Perspectivas e Conclusões

6. PERSPECTIVAS

Nossos dados sugerem que o tecido adiposo pode funcionar como um novo nicho de infecção e possível persistência do *M. leprae*, abrindo novas perspectivas para a descrição dos efeitos imunopatológicos, cronicidade e tratamento da doença.

Para se obter respostas mais concretas, serão necessárias mais estudos sobre as interações entre adipócitos e o *M. leprae*, como descrever o ambiente intracelular de infecção do *M. leprae* no tecido adiposo, quais as vias de sinalização envolvidas na redução drástica no número de corpúsculos lipídicos observada, o destino desses lipídios que ao que tudo indica não estão sendo endereçados à β -oxidação. Na busca de respostas sobre a viabilidade da micobactéria em adipócitos, ensaios utilizando as drogas utilizadas na poliquimioterapia descreverão se há redução do efeito micobactericida dessas drogas no interior das células adiposas.

Como o tecido adiposo consiste não só de adipócitos, mas também de macrófagos, a interação entre as duas células perante a infecção por *M. leprae* deverá ser analisada. Para descrever melhor o modelo de infecção, será necessário descrever o *crosstalk* entre adipócitos e macrófagos, que podem estar envolvidos na relação de persistência ou imunomodulação do patógeno no tecido. Para descrever melhor o envolvimento de adipocinas na imunomodulação da doença, será feita sua detecção no tecido adiposo subcutâneo de pacientes multibacilares, assim como sua correlação com a presença do patógeno.

Além disso, será feita a caracterização por espectrometria de massas do perfil lipídico de adipócitos infectados *in vitro* por *M. leprae*, de modo a detectarmos alterações, mesmo que tênues, no metabolismo lipídico durante a evolução da infecção.

7. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi estudado um novo modelo experimental de infecção pelo bacilo *M. leprae*, identificando os adipócitos como um novo e potencial sítio de infecção da micobactéria até então desconhecido.
- No presente projeto observamos que o *M. leprae* infecta e se mantém viável por até 15 dias em cultura de adipócitos de linhagem 3T3-L1.
- Foi observada redução do número de gotículas lipídicas em adipócitos após a infecção, através de mecanismos ainda desconhecidos.
- Foi avaliada a modulação das adipocinas nos diferentes polos da doença compatível com o observado em outras infecções micobacterianas.
- Foram analisados fragmentos de tecido subcutâneo de pacientes multibacilares, onde não só foi confirmada a presença do bacilo, revelando assim o acesso do *M. leprae* ao tecido adiposo subcutâneo humano, como também a confirmação do resultado descrito *in vitro* envolvendo a mobilização das gotículas lipídicas durante a infecção.

8. REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy today. WHO. World Health Organization; Acesso em Maio de 2016. Disponível em: <http://www.who.int/lep/en/>
2. COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILL J, JAMES KD, THOMSON NR, WHEELER PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007–11.
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2009. 819 p.
4. LARA FA, MATTOS KA DE, RODRIGUES LS, MARQUES MA DE M, PESSOLANI MCV. Hanseníase lições e desafios. *Rev Ciência Hoje*. 2012;50:43–5.
5. QUEIROZ M, PUNTEL M. Um pouco de história da hanseníase. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 1997. 120 p.
6. SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):338–81.
7. EIDT LM. 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 Soc*. 2004;13(2):76–88.
8. SOUZA ARAÚJO HC. História da lepra no Brasil, períodos colonial e monárquico (1500-1889). 1º ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional; 1946. 487 p.
9. INSTITUTE OF MATERIA MEDICA - HANOI - WHO/WPRO. Medicinal plants in Viet Nam. 1990. Acesso em Junho de 2016. Disponível em: <http://www.nzdl.org/>
10. BROWNE S, HOGERZEIL L. “B663” in the treatment of leprosy: preliminary report of a pilot trial. *Lepr Rev*. 1962;33:6–10.
11. OPROMOLLA DVA. As reações adversas à rifampicina com especial referência à insuficiência renal aguda. *Hansenol Int*. 1992;17(17):1–4.
12. REES RJW. The microbiology of leprosy. In: *Leprosy*. Churchill Livingstone, Edinburgh; 1985. p. 31–52.
13. GALLO ME., SAMPAIO E, NERY JA., MORAES M., ANTUNES SL., PESSOLANI MC., et al. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. 1º ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 1383–94.
14. NG V, ZANAZZI G, TIMPL R, TALTS JF, SALZER JL, BRENNAN PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103:511–24.

15. VISSA VD, BRENNAN PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001;2(8):REVIEWS1023.
16. EAPEN BR. *Mycobacterium leprae* genome revisited using the latest bioinformatics tools. *Gulf J Dermatology Venereol.* 2012;9(1):25–7.
17. SINGH P, COLE ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Futur Microbiol.* 2011;6(1):57–71.
18. SHEPARD CC. the Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli Into Foot-Pads of Mice. *J Exp Med.* 1960;112(3):445–54.
19. AZOUAOU N, GELBER RH, ABEL K, SASAKI DT, MURRAY LP, LOCKSLEY RM, et al. Reconstitution of *Mycobacterium leprae* immunity in severe combined immunodeficient mice using a T-cell line . *IntJLeprOther MycobactDis* . 1993;61(0148–916X):398–405.
20. BALAMAYOORAN G, PENA M, SHARMA R, TRUMAN RW. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. *Clin Dermatol.* Elsevier B.V.; 2015;33(1):108–15.
21. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy - Forty-fourth World Health Assembly. In: Eleventh plenary meeting. 1991.
22. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. Vol. 44, Boletim epidemiológico. 2013. 1-12 p.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy: weekly epidemiological record, Setembro 2016. *World Heal Organ Wkly Epidemiol Rec.* 2016;91(35):405–20.
24. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hanseníase. In: Guia de vigilância epidemiológica. 2005. p. 364–94.
25. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores da hanseníase no Brasil: o que avançamos e o que ainda podemos avançar? [Internet]. 2015. Acesso em Junho de 2016. Disponível em: <http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=0t6aEqf8J3I%253D>
26. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões, Brasil, 2014. 2015;
27. WALKER SL, LOCKWOOD DNJ. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull.* 2006;77–78(1):103–21.
28. PINHEIRO R, SALLES J, SARNO E, SAMPAIO E. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genet. *Futur Microbiol.* 2011;6(2):217–30.
29. RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255–73.

30. BASOMBRIO, B, COCHRANE, RG, PRIETO, JG, KHANOLKAR, VR, KITAMURA, K, LATAPI, F, RABELLO, FEA, VEGAS, M, WADE, HW, ARNOLD H. Comision of classification - Draft Report of Classification Committee. In: Memoria de VI Congreso Internacional de Leprologia. Madrid; 1953. p. 75–86.
31. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Tech Rep Ser. Geneva; 1982;(675):36.
32. VANVOORHIS W, KAPLAN G, SARNO E, HORWITZ M, STEINMAN R, LEVIS W, et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N Engl J Med.* 1982;(307):1593–1597.
33. MODLIN RL, HOFMAN FM, TAYLOR CR, REA TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol.* fevereiro de 1983;8(2):182–9.
34. MISCH EA, BERRINGTON WR, VARY JR. JC, HAWN TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(4):589–620.
35. SOUZA CS. Hanseníase: Formas Clínicas e Diagnóstico Diferencial. Simpósio Hanseníase. Ribeirão Preto: Medicina; 1997;30:325–34.
36. NERY JA DA C, BERNARDES FILHO F, QUINTANILHA J, MACHADO AM, OLIVEIRA S DE SC, SALES AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol. Sociedade Brasileira de Dermatologia;* 2013;88(5):787–92.
37. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Hanseníase. In: Guia de vigilância em saúde. 2014. p. 344–68.
38. BARNETSON RS, BJUNE G, PEARSON JM, KRONVALL G. Cell mediated and humoral immunity in “reversal reactions”. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 44(1–2):267–74.
39. MODLIN RL, GEBHARD JF, TAYLOR CR, REA TH. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. *Clin Exp Immunol. Wiley-Blackwell;* julho de 1983;53(1):17–24.
40. MODLIN RL, MELANCON-KAPLAN J, YOUNG SM, PIRMEZ C, KINO H, CONVIT J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences;* fevereiro de 1988;85(4):1213–7.
41. TUNG KS, UMLAND E, MATZNER P, NELSON K, SCHAUF V, RUBIN L, et al. Soluble serum interleukin 2 receptor levels in leprosy patients. *Clin Exp Immunol.* julho de 1987;69(1):10–5.
42. YAMAMURA M, WANG XH, OHMEN JD, UYEMURA K, REA TH, BLOOM BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol.* 15 de agosto de 1992;149(4):1470–5.
43. DUNCAN ME, PEARSON JM, RIDLEY DS, MELSOM R, BJUNE G. Pregnancy and leprosy: the consequences of alterations of cell-mediated and

- humoral immunity during pregnancy and lactation. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* dezembro de 1982;50(4):425–35.
44. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância em saúde. Guia de vigilância em saúde. 2014. 1-812 p.
 45. ASSOCIAÇÃO ALEMÃ DE ASSISTÊNCIA AOS HANSÊNICOS E TUBERCULOSOS. Galeria de imagens. Acesso em dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.dahwmt.org.br>
 46. URA S. Tratamento E Controle Das reações hansênicas. *Hansen Int.* 2007;32(1):67–9.
 47. SARNO EN, SANTOS AR, JARDIM MR, SUFFYS PN, ALMEIDA AS, NERY JA, et al. Pathogenesis of nerve damage in leprosy: genetic polymorphism regulates the production of TNF alpha. *Lepr Rev.* dezembro de 2000;71 Suppl:S154-8-60.
 48. SAMPAIO EP, HERNANDEZ MO, CARVALHO DS, SARNO EN. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit *M. leprae*-induced TNF alpha production in vitro. *Biomédecine & pharmacothérapie.* 2002;56(1):13–9.
 49. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Tecido Adiposo. In: *Histologia Básica.* 10^o ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 125–9.
 50. RODRÍGUEZ A, EZQUERRO S, MÉNDEZ-GIMÉNEZ L, BECERRIL S FG. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;309(8):E691-714.
 51. KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–2556237.
 52. GALIC S, OAKHILL JS, STEINBERG GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;316:129–39.
 53. ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Vol. 372, *Nature.* 1994. p. 425–32.
 54. FARMER SR. Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev.* 2008;22(10):1269–75.
 55. KHANDEKAR M, NUUTILA P, SCHAART G, HUANG K, TU H, VAN WD. Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell.* 2012;150(2):366–76.
 56. GIORDANO A, SMORLESI A, FRONTINI A, BARBATELLI G, CINT S. White, brown and pink adipocytes: The extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(5).
 57. NEDERGAARD J, CANNON B. How brown is brown fat? It depends where you look. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2013;19(5):540–1.

58. GREEN H, KEHINDE O. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell*. 1974;1(3):113–6.
59. ROSEN ED, MACDOUGALD O a. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(12):885–96.
60. Alarcón C, Zaromytidou Ai, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, et al. Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways. *Cell*. 2009;139(4):757–69.
61. HUANG H, SONG T-J, LI X, HU L, HE Q, LIU M, et al. BMP signaling pathway is required for commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(31):12670–5.
62. ROSEN ED, WALKEY CJ, PUIGSERVER P, SPIEGELMAN BM. Transcriptional regulation of adipogenesis Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:1293–307.
63. GUO L, LI X, TANG QQ. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: A central role for CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP) β . *J Biol Chem*. 2015;290(2):755–61.
64. KIM JB, WRIGHT HM, WRIGHT M, SPIEGELMAN BM. ADD1/SREBP1 activates PPAR γ through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4333–7.
65. KIM JB, SPIEGELMAN BM. ADD 1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*. 1996;10:1096–107.
66. TSENG Y, KOKKOTOU E, SCHULZ T, HUANG T, WINNAY J, TANIGUCHI C, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. 2008;454(7207):1000–4.
67. BECERRIL S, GÓMEZ-AMBROSI J, MARTÍN M, MONCADA R, SESMA P, BURRELL MA, et al. Role of PRDM16 in the activation of brown fat programming. Relevance to the development of obesity. *Histol Histopathol*. noviembre de 2013;28(11):1411–25.
68. SEALE P, BJORK B, YANG W, KAJIMURA S, CHIN S, KUANG S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008;454(7207):961–7.
69. OHNO H, SHINODA K, OHYAMA K, SHARP LZ, KAJIMURA S. EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature*. Nature Publishing Group; 2013;504(7478):163–7.
70. HARMS MJ, ISHIBASHI J, WANG W, LIM HW, GOYAMA S, SATO T, et al. Prdm16 is required for the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab*. Elsevier Inc.; 2014;19(4):593–604.
71. FINCK BN, KELLY DP. PGC-1 coactivators: Inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):615–22.

72. ADAMCZAK M, WIECEK A. The Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *Semin Nephrol*. Elsevier Inc.; 2013;33(1):2–13.
73. WOZNIAK SE, GEE LL, WACHTEL MS, FREZZA EE. Adipose tissue: The new endocrine organ? a review article. Vol. 54, *Digestive Diseases and Sciences*. 2009. p. 1847–56.
74. JUGE-AUBRY CE, HENRICHOT E, MEIER CA. Adipose tissue: A regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005;19(4):547–66.
75. FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):911–20.
76. TILG H, MOSCHEN AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):772–83.
77. RONTI T, LUPATTELLI G, MANNARINO E. The endocrine function of adipose tissue: An update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(4):355–65.
78. LA CAVA A, MATARESE G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(5):371–9.
79. AHIMA RS, SAPER CB, FLIER JS, ELMQUIST JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 2000;21(3):263–307.
80. ELMQUIST JK. Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*. dezembro de 2001;25 Suppl 5:S78-82.
81. FRIEDMAN JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev*. 2002;60(10):S1–14.
82. WONG GW, WANG J, HUG C, TSAO T-S, LODISH HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(28):10302–7.
83. PAJVANI UB, DU X, COMBS TP, BERG AH, RAJALA MW, SCHULTHESS T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin: Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9073–85.
84. WAKI H, YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, UCHIDA S, KITA S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*. 2003;278(41):40352–63.
85. DELAIGLE AM, JONAS J-C, BAUCHE IB, CORNU O, BRICHARD SM. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology*. dezembro de 2004;145(12):5589–97.
86. PIÑEIRO R, IGLESIAS MJ, GALLEGO R, RAGHAY K, EIRAS S, RUBIO J, et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 26 de setembro de 2005;579(23):5163–9.

87. WOLF AM, WOLF D, AVILA MA, MOSCHEN AR, BERASAIN C, ENRICH B, et al. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol.* março de 2006;44(3):537–43.
88. KADOWAKI T, YAMAUCHI T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* maio de 2005;26(3):439–51.
89. KUMADA M, KIHARA S, OUCHI N, KOBAYASHI H, OKAMOTO Y, OHASHI K, et al. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation.* 4 de maio de 2004;109(17):2046–9.
90. MASAKI T, CHIBA S, TATSUKAWA H, YASUDA T, NOGUCHI H, SEIKE M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* julho de 2004;40(1):177–84.
91. WOLF AM, WOLF D, RUMPOLD H, ENRICH B, TILG H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;323(2):630–5.
92. STEPPAN CM, BROWN EJ, WRIGHT CM, BHAT S, BANERJEE RR, DAI CY, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 de janeiro de 2001;98(2):502–6.
93. BANERJEE RR, LAZAR MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J Biol Chem.* 13 de julho de 2001;276(28):25970–3.
94. STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 18 de janeiro de 2001;409(6818):307–12.
95. RAJALA MW, LIN Y, RANALLETTA M, YANG XM, QIAN H, GINGERICH R, et al. Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue. *Mol Endocrinol.* agosto de 2002;16(8):1920–30.
96. NOGUEIRAS R, GALLEGO R, GUALILLO O, CAMINOS JE, GARCÍA-CABALLERO T, CASANUEVA FF, et al. Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett.* 31 de julho de 2003;548(1–3):21–7.
97. MORASH BA, WILLKINSON D, UR E, WILKINSON M. Resistin expression and regulation in mouse pituitary. *FEBS Lett.* 28 de agosto de 2002;526(1–3):26–30.
98. JUAN C-C, KAN L-S, HUANG C-C, CHEN S-S, HO L-T, AU L-C. Production and characterization of bioactive recombinant resistin in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 26 de junho de 2003;103(2):113–7.
99. GHOSH S, SINGH AK, ARUNA B, MUKHOPADHYAY S, EHTESHAM NZ. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. *Gene.* 13 de fevereiro de 2003;305(1):27–34.

100. YANG R-Z, HUANG Q, XU A, MCLENITHAN JC, EISEN JA, SHULDINER AR, et al. Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 de outubro de 2003;310(3):927–35.
101. GERBER M, BOETTNER A, SEIDEL B, LAMMERT A, BÄR J, SCHUSTER E, et al. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *J Clin Endocrinol Metab.* agosto de 2005;90(8):4503–9.
102. PATEL L, BUCKELS AC, KINGHORN IJ, MURDOCK PR, HOLBROOK JD, PLUMPTON C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun.* 10 de janeiro de 2003;300(2):472–6.
103. FAIN JN, CHEEMA PS, BAHOUTH SW, LLOYD HILER M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 17 de janeiro de 2003;300(3):674–8.
104. TODARO GJ, GREEN H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* 1963;17(6):299–313.
105. KIM JS, RYU MJ, BYUN EH, KIM WS, WHANG J, MIN KN, et al. Differential immune response of adipocytes to virulent and attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect. Elsevier Masson SAS;* 2011;13(14–15):1242–51.
106. AHMADIAN M, DUNCAN RE, JAWORSKI K, SARKADI-NAGY E, SUL HS. Triacylglycerol metabolism in adipose tissue. *Future Lipidol.* abril de 2007;2(2):229–37.
107. WALTHER TC, FARESE R V. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta.* junho de 2009;1791(6):459–66.
108. BRASAEMLE DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2547–59.
109. GUO Y, CORDES KR, FARESE R V, WALTHER TC. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 6):749–52.
110. COHEN AW, RAZANI B, SCHUBERT W, WILLIAMS TM, WANG XB, IYENGAR P, et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes.* maio de 2004;53(5):1261–70.
111. OST A, ORTEGREN U, GUSTAVSSON J, NYSTROM FH, STRÅLFORS P. Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J Biol Chem.* 7 de janeiro de 2005;280(1):5–8.
112. STIPANUK MH. *Biochemical, Physiological, Molecular Aspects of Human Nutrition.* 2^o ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2006. 1232 p.
113. DUNCAN RE, AHMADIAN M, JAWORSKI K, SARKADI-NAGY E, SUL HS.

- Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:79–101.
114. HAEMMERLE G, ZIMMERMANN R, HAYN M, THEUSSL C, WAEG G, WAGNER E, et al. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem.* 15 de fevereiro de 2002;277(7):4806–15.
 115. VILLENA JA, ROY S, SARKADI-NAGY E, KIM K-H, SUL HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 5 de novembro de 2004;279(45):47066–75.
 116. JENKINS CM, MANCUSO DJ, YAN W, SIMS HF, GIBSON B, GROSS RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem.* 19 de novembro de 2004;279(47):48968–75.
 117. ZIMMERMANN R, STRAUSS JG, HAEMMERLE G, SCHOISWOHL G, BIRNER-GRUENBERGER R, RIEDERER M, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 19 de novembro de 2004;306(5700):1383–6.
 118. JAWORSKI K, SARKADI-NAGY E, DUNCAN RE, AHMADIAN M, SUL HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* julho de 2007;293(1):G1-4.
 119. DHALLA AK, CHISHOLM JW, REAVEN GM, BELARDINELLI L. A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(193):271–95.
 120. DESRUISSEAU MS, NAGAJYOTHI, TRUJILLO ME, TANOWITZ HB, SCHERER PE. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun.* 2007;75(3):1066–78.
 121. COUSIN B, MUNOZ O, ANDRE M, FONTANILLES A M, DANI C, COUSIN JL, et al. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J.* 1999;13(2):305–12.
 122. COMBS TP, NAGAJYOTHI, MUKHERJEE S, DE ALMEIDA CJG, JELICKS LA, SCHUBERT W, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* 2005;280(25):24085–94.
 123. NAGAJYOTHI F, DESRUISSEAU MS, MACHADO FS, UPADHYA R, ZHAO D, SCHWARTZ GJ, et al. Response of adipose tissue to early infection with *trypanosoma cruzi* (Brazil Strain). *J Infect Dis.* 2012;205(5):830–40.
 124. TRINDADE S, RIJO-FERREIRA F, CARVALHO T, PINTO-NEVES D, GUEGAN F, ARESTA-BRANCO F, et al. *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe.* 2016;1–12.
 125. BECHAH Y, PADDOCK CD, CAPO C, MEGE J-L, RAOULT D. Adipose

- tissue serves as a reservoir for recrudescence *Rickettsia prowazekii* infection in a mouse model. *PLoS One*. 2010;5(1):e8547.
126. NEYROLLES O, HERNÁNDEZ-PANDO R, PIETRI-ROUXEL F, FORNÈS P, TAILLEUX L, PAYÁN JAB, et al. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS One*. 2006;1(1).
 127. AGARWAL P, PANDEY P, SARKAR J, KRISHNAN MY. *Mycobacterium tuberculosis* can gain access to adipose depots of mice infected via the intra-nasal route and to lungs of mice with an infected subcutaneous fat implant. *Microb Pathog*. Elsevier Ltd; 2016;93:32–7.
 128. WENK MR. Lipidomics of host-pathogen interactions. *FEBS Lett*. 9 de outubro de 2006;580(23):5541–51.
 129. CHATTERJEE K., DAS GUPTA N., DE ML. Electron Microscopic observations on the morphology of *Mycobacterium leprae*. *Exp Cell Res*. 1959;18:521–7.
 130. SAKURAI I, SKINSNES OK. Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 38(4):389–403.
 131. MATTOS KA, LARA FA, OLIVEIRA VGC, RODRIGUES LS, D’AVILA H, MELO RCN, et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol*. 2011;13(2):259–73.
 132. MATTOS KA, SARNO EN, PESSOLANI MCV, BOZZA PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(SUPPL.1):156–66.
 133. ALMEIDA PE, SILVA AR, MAYA-MONTEIRO CM, TÖRÖCSIK D, D’AVILA H, DEZSÖ B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol*. 15 de julho de 2009;183(2):1337–45.
 134. PEYRON P, VAUBOURGEIX J, POQUET Y, LEVILLAIN F, BOTANCH C, BARDOU F, et al. Foamy macrophages from tuberculous patients’ granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog*. novembro de 2008;4(11):e1000204.
 135. SHEPARD CC, MCRAE DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1968;36(1):78–82.
 136. MARTINEZ AN, LAHIRI R, PITTMAN TL, SCOLLARD D, TRUMAN R, MORAES MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2124–30.
 137. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. Academic Press; dezembro de 2001;25(4):402–8.

138. MARTINEZ-SANTIBAÑEZ G, CHO KW, LUMENG CN. Imaging White Adipose Tissue With Confocal Microscopy. In: *Methods in Enzymology*. 1^o ed Elsevier Inc.; 2014. p. 17–30.
139. WADE HW, HISS PH, ZINSSER H, HISS PH, ZINSSER H, HISS PH, et al. The variable partial solubility of basic fuchsin in alcohol. *J Lab Clin Med*. Elsevier; 1928;13(11):1052–6.
140. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. agosto de 1959;37(8):911–7.
141. HANSES F, KOPP A, BALA M, BUECHLER C, FALK W, SALZBERGER B, et al. Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* in adipocyte-like differentiated 3T3-L1 cells is glucose dependent and alters cytokine, chemokine, and adipokine secretion. *Endocrinology*. 2011;152(11):4148–57.
142. MATTOS KA, OLIVEIRA VCG, BERREDO-PINHO M, AMARAL JJ, ANTUNES LCM, MELO RCN, et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol*. 2014;16(6):797–815.
143. LAM QLK, LU L, LAI Q, LAM K, LU L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*. 2007;4(1):1–13.
144. HSU A, ARONOFF DM, PHIPPS J, GOEL D, MANCUSO P. Leptin improves pulmonary bacterial clearance and survival in ob/ob mice during pneumococcal pneumonia. *Clin Exp Immunol*. novembro de 2007;150(2):332–9.
145. PRABHA C, KARTHIC S, DAS SD, SWAMINATHAN S, SUBRAMANIAM S, SUKUMAR B. Impact of tuberculosis on serum leptin levels in patients with HIV infection. *Horm Res*. 2005;63(5):228–33.
146. NAGAJYOTHI F, ZHAO D, MACHADO FS, WEISS LM, SCHWARTZ GJ, DESRUISSEAU MS, et al. Crucial role of the central leptin receptor in murine *Trypanosoma cruzi* (Brazil strain) infection. *J Infect Dis*. 1 de outubro de 2010;202(7):1104–13.
147. IKEJIMA S, SASAKI S, SASHINAMI H, MORI F, OGAWA Y, NAKAMURA T, et al. Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice. *Diabetes*. janeiro de 2005;54(1):182–9.
148. WIELAND CW, FLORQUIN S, CHAN ED, LEEMANS JC, WEIJER S, VERBON A, et al. Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection in leptin-deficient ob/ob mice. *Int Immunol*. novembro de 2005;17(11):1399–408.
149. BUYUKOGLAN H, GULMEZ I, KELESTIMUR F, KART L, OYMAK FS, DEMIR R, et al. Leptin levels in various manifestations of pulmonary tuberculosis. *Mediators Inflamm*. Hindawi Publishing Corporation; 2007;2007:64859.
150. DE MACEDO A, GIGLIOTTI P, GAMEIRO J, DE SOUZA V. Quantificação dos níveis séricos de leptina na hanseníase. *Hansenol Int*. 2013;37(2):40–6.
151. SANTUCCI N, D'ATTILIO L, KOVALEVSKI L, BOZZA V, BESEDOVSKY

- H, DEL REY A, et al. A Multifaceted Analysis of Immune-Endocrine-Metabolic Alterations in Patients with Pulmonary Tuberculosis. Giambartolomei GH, organizador. PLoS One. Public Library of Science; 13 de outubro de 2011;6(10):e26363.
152. KEICHO N, MATSUSHITA I, TANAKA T, SHIMBO T, HANG NT LE, SAKURADA S, et al. Circulating Levels of Adiponectin, Leptin, Fetuin-A and Retinol-Binding Protein in Patients with Tuberculosis: Markers of Metabolism and Inflammation. Cardona P-J, organizador. PLoS One. Public Library of Science; 7 de junho de 2012;7(6):e38703.
 153. NISHIDA M, FUNAHASHI T, SHIMOMURA I. Pathophysiological significance of adiponectin. *Med Mol Morphol.* junho de 2007;40(2):55–67.
 154. MATSUZAWA Y, FUNAHASHI T, KIHARA S, SHIMOMURA I. Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* janeiro de 2004;24(1):29–33.
 155. RUAN H, LODISH HF, OLEFSKY JM, CIARALDI TP, KOLTERMAN OG, OLEFSKY JM, et al. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev.* Elsevier; outubro de 2003;14(5):447–55.
 156. OUCHI N, KIHARA S, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, WALSH K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol.* dezembro de 2003;14(6):561–6.
 157. GOLDSTEIN BJ, SCALIA R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab.* junho de 2004;89(6):2563–8.
 158. ELMARGOUSHY NM, ELNASHAR NA, MOHAMMAD SM, ELNASHAR MA, MOHAMMAD HA. Assessment of Adiponectin as a Marker for Severity of Pulmonary Tuberculosis. *Egypt J Hosp Med.* 2014;57(October):418–21.
 159. TASAKA S, HASEGAWA N, NISHIMURA T, YAMASAWA W, KAMATA H, SHINODA H, et al. Elevated serum adiponectin level in patients with mycobacterium avium-intracellulare complex pulmonary disease. *Respiration.* 2010;79(5):383–7.
 160. LEHRKE M, REILLY MP, MILLINGTON SC, IQBAL N, RADER DJ, LAZAR MA. An Inflammatory Cascade Leading to Hyperresistinemia in Humans. Scherer P, organizador. PLoS Med. Public Library of Science; 30 de novembro de 2004;1(2):e45.
 161. REILLY MP, LEHRKE M, WOLFE ML, ROHATGI A, LAZAR MA, RADER DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation.* 22 de fevereiro de 2005;111(7):932–9.
 162. PANG SS, LE YY. Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases. *Cell Mol Immunol.* fevereiro de 2006;3(1):29–34.
 163. SENOLT L, HOUSA D, VERNEROVÁ Z, JIRÁSEK T, SVOBODOVÁ R, VEIGL D, et al. Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid

- and serum. *Ann Rheum Dis*. BMJ Group; abril de 2007;66(4):458–63.
164. FILKOVÁ M, HALUZÍK M, GAY S, ŠENOLT L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immunol*. 2009;133(2):157–70.
 165. JOHANSSON L, LINNÉR A, SUNDÉN-CULLBERG J, TREUTIGER C-J, NORRBY-TEGLUND A. Resistin in severe bacterial infections. *Crit Care*. BioMed Central; 2007;11(Suppl 4):P10.
 166. KASER S, KASER A, SANDHOFER A, EBENBICHLER C., TILG H, PATSCH J. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;309(2):286–90.
 167. FASSHAUER M, KLEIN J, NEUMANN S, ESZLINGER M, PASCHKE R. Tumor Necrosis Factor α Is a Negative Regulator of Resistin Gene Expression and Secretion in 3T3-L1 Adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. Academic Press; novembro de 2001;288(4):1027–31.
 168. LU S-C, SHIEH W-Y, CHEN C-Y, HSU S-C, CHEN H-L. Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Lett*. 23 de outubro de 2002;530(1–3):158–62.
 169. ALVI A, FATIMA N, JERAH AA, RIZWAN M, HOBANI YH, SUNOSI R AL, et al. Correlation between Resistin, Tuberculosis and Khat Addiction: A Study from South Western Province of Saudi Arabia. Hasnain SE, organizador. *PLoS One*. Public Library of Science; 8 de outubro de 2015;10(10):e0140245.
 170. EHTESHAM NZ, NASIRUDDIN M, ALVI A, KUMAR BK, AHMED N, PERI S, et al. Treatment end point determinants for pulmonary tuberculosis: Human resistin as a surrogate biomarker. *Tuberculosis*. Elsevier Ltd; 2011;91(4):293–9.
 171. YADAV A, SAINI V, ARORA S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clin Chim Acta*. Elsevier B.V.; 2010;411(21–22):1570–9.
 172. LEW W, CHANG SK, KWAHEK H, TADA Y, NAKAMURA K, TAMAKI K. Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 is Elevated in Lepromatous Leprosy Patients with High Bacterial Indices. *Int J Lepr*. 2002;70(L1):129–31.