

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

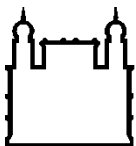
**Estudo do papel do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) na modulação funcional de macrófagos infectados pelo *Mycobacterium leprae*.**

**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

**Aluno:** Leonardo Ribeiro Batista Silva

**Orientador (a):** Prof. Dra Maria Cristina Vidal Pessolani

**RIO DE JANEIRO**  
**março 2014**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

Leonardo Ribeiro Batista Silva

**Estudo do papel do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) na modulação funcional de macrófagos infectados pelo *Mycobacterium leprae*.**

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

**Orientador (a):** Prof. Dra Maria Cristina Vidal Pessolani

**RIO DE JANEIRO**  
**março 2014**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guardar e me guiar no caminho da ciência.

A Dra Maria Cristina Vidal Pessolani, por sempre acreditar no meu trabalho, por toda sua paciência e dedicação. Por me ensinar ciência e que ela deve ser feita com responsabilidade e honestidade. Além disso, Ao longo desses anos me mostrou como trabalhar com responsabilidade, sendo um grande exemplo de profissionalismo a ser seguido;

À Dra Luciana, participou ativamente da realização desse trabalho, sempre me incentivando e contribuindo de maneira ímpar para o seu desenvolvimento;

À Dra Katherine, Dr. Flavio Lara, Dra Márcia, Dra Cristiana, que sempre estiveram dispostos a esclarecer dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso;

Aos meus amigos Julio e Carlos Adriano, que sempre me apoiaram com sua grande apreensão ciência juntos desde a iniciação científica, no mestrado e por fim no doutorado. (Obrigado meus amigos);

A todos meus colegas de laboratório pelo convívio alegre e pelo companheirismo:, André, Débora, Chyntia Carolina, Fabrício, Jéssica, João Pedro, Lívia, Richelle, Roberta, Fernanda, Sabirna, Arthur, Marcos, Karina, Larissa, Paula. (todos fazem parte dessa história);

À todos meus colegas da Hanseníase pelo apoio: Dr. Harrison, Dra. Euzenir Sidra, Thiago, Rafael, Amanda, Luana, Alejandra, Caroline, Carolina, Cynthia, , Lizânia, Valcemir, Solange, Paula, Sr, Sales, Dr. Sergio, , Jô, Danuza, Daniel, Sr. Roberto, Dr. Adalberto;

Ào Dr Milton Moraes pela excelente revisão do meu trabalho;

Aos professores do curso de Pós-Graduação pelas excelentes aulas ministradas e pelo aprendizado;

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e funcionários do departamento de ensino;

Ao Instituto Oswaldo Cruz, CNPq e a Capes pelo financiamento do projeto;

Em especial a minha família que me deu suporte e apoio todos esses anos, me incentivando nos momentos difíceis e acreditando sempre que eu poderia sempre chegar mais longe.

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.C	Antes de Cristo
ATCC	“American type culture collection”
BAAR	bacilo álcool ácido resistente
BB	borderline borderline
BCG	Bacilo Calmete Guérin
BL	boderline lepromatoso
BSA	albumina de soro bovino
BT	borderline tuberculóide
cDNA	ácido desoxirribonucléico
COX	ciclooxigenase
D.O.	densidade ótica
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato (N=A, C, G ou T)
EDTA	ácido etilenodioaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
GAPDH	glicosil 3` fosfato desidrogenase
HEPES	N-2-Hidroxietyl piperazina-N`-2-ácido etanosulfônico
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína ligante a IGF
IGF-IR	receptor de IGF-I
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
KDa	KiloDalton
LAM	lipoarabinomanana
LL	lepra lepromatosa
LPS	lipopolissacarídeo
MB	multibacilar
MDT	multidrogaterapia
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MOI	multiplicidade de infecção
MS	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MTT	sal Metiltetrazóico
NO	óxido nítrico
°C	graus Celsius

OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	paucibacilar
PBS	tampão salina fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PGL-I	glicolípídeo fenólico I
PI 3-K	fosfatidilinositol 3 quinase
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
q.s.p	quantidade suficiente para
RNAM	ácido ribonucleico mensageiro
RNI	reativos intermediários de nitrogênio
RR	reação reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SOCS	supressora de sinalização de citocinas
TBS	tampão tris-salina com tween
TEMED	N,N,N',N'-tetra metil etileno diamina
TLR	receptores do tipo Toll
TNF	fator de necrose tumoral
Tris	trishidroximetil aminometano
V	Volts
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitaciona

## RESUMO

Fagócitos mononucleares são as células-alvo para micobactérias patogênicas que geralmente requerem um ambiente intracelular adequado para sua sobrevivência e replicação. *Mycobacterium leprae*, o agente etiológico da Hanseníase, é capaz de subverter mecanismos microbicidas de macrófagos e sobreviver e replicar no interior dessas células. Contudo o mecanismo molecular envolvido na modulação da célula hospedeira, não é totalmente compreendido. O presente estudo mostrou o potencial papel exercido pelo IGF-I na patogênese causada pelo *M. leprae*. Foi demonstrado que o *M. leprae* induz a expressão do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I), em macrófagos RAW 264.7. Curiosamente, apenas quando as células foram tratadas com anticorpo neutralizante para o receptor do tipo I de IGF-I (IGF-1R) o *M. leprae* foi capaz de regular positivamente a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos RAW 264.7 ou ativar o promotor de iNOS em células transfectadas com a construção contendo gene repórter da luciferase sob o controle do promotor de iNOS. O bloqueio da sinalização de IGF-I reduziu a viabilidade intracelular do *M. leprae* determinada por qPCR. As células RAW 264.7 pré-tratadas com IGF-I apresentaram uma redução significativa da atividade do promotor iNOS em resposta ao *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium smegmatis* e conseqüentemente um aumento na viabilidade intracelular monitorada através de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (CFU). Outro fato é que IGF-I foi capaz de atenuar a ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  medida através da expressão de iNOS e da quantificação da fosforilação de Ativador de transcrição e de transdução de sinal (pSTAT1). Além disso, o IGF-I foi capaz de induzir aumento de PGE<sub>2</sub> em macrófagos, um eicosanoide previamente implicado na persistência micobacteriana no hospedeiro. Finalmente, a análise imuno-histoquímica de lesões cutâneas de pacientes lepromatosos (LL) revelou uma expressão abundante de IGF-I por macrófagos espumosos altamente infectados. Além disso, uma alta expressão da proteína Supressora de sinalização de

citocinas 3 (SOCS3) e diminuição a ativação STAT1 foi observada em lesões LL, em comparação com lesões tuberculóide BT. Esses resultados sugerem que o IGF-I pode contribuir para a persistência micobacteriana no hospedeiro, modulando negativamente s mecanismos microbicidas do hospedeiro durante a infecção.



## ABSTRACT

Mononuclear phagocytes are targeted cells for pathogenic mycobacteria that generally require a favorable intracellular environment in which they survive and replicate. *Mycobacterium leprae*, the etiologic agent of leprosy, is able to subvert macrophage microbicidal mechanisms and survive and replicate within these cells. However, the molecular mechanism involved in pathogen driven host cell modulation is not fully understood. The present study investigated the potential role of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in *M. leprae* pathogenesis. We showed that *M. leprae* induces IGF-I expression in RAW 264.7 macrophages in a dose-dependent manner. Notably, only when cells were treated with a neutralizing antibody to IGF type 1 receptor (IGF-1R), *M. leprae* infection was able to upregulate inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW cells or to activate the iNOS promoter in cells transfected with the iNOS-luciferase reporter construct. The blockage of IGF-I signaling also decreased the intracellular *M. leprae* viability as measured by qPCR. Moreover, RAW cells pre-treated with IGF-I showed a significant reduction in iNOS promoter activity in response to *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis* with subsequent increase in bacterial intracellular survival as assessed by colony-forming unit counts (CFU). Of note, IGF-I was able to attenuate interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) activating effects on macrophages as assessed by iNOS expression and quantification of phosphorylated Signal Transducers and Activators of Transcription 1 (p-STAT1). Additionally, IGF-I was able to induce PGE<sub>2</sub> secretion in murine macrophages, an eicosanoid previously implicated in mycobacterial persistence in the host. Finally, immunohistochemical analysis of skin lesions of lepromatous leprosy (LL) patients revealed an abundant expression of IGF-I by highly infected foamy macrophages. Moreover, LL lesions revealed higher expression of Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3), as well as decreased levels of p-STAT1 when compared to borderline tuberculoid (BT) lesions. Altogether, our data suggest that IGF-I produced by macrophages in response to *M. leprae* infection constitutes a critical regulator in subverting the immune response in leprosy.

## Sumário

AGRADECIMENTOS .....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1- INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A Hanseníase .....	1
1.1.2. Breve histórico.....	1
1.1.3. Epidemiologia.....	2
1.1.4. Formas clínicas .....	5
1.1.5. O <i>Mycobacterium leprae</i> .....	7
1.2. Fagócitos mononucleares e resposta imune inata.....	13
1.3. Fenótipo de ativação de macrófagos (M1 e M2).....	14
1.4. A via de sinalização de Interferons.....	17
1.5. Interação do <i>M. leprae</i> com o Macrófago .....	21
1.6. O fator de Crescimento semelhante à Insulina I (IGF-I) .....	25
1.6.1. IGFs - Sinalização intracelular .....	28
1.6.2. IGFs - Efeitos metabólicos e interação com o sistema imune .....	30
1.6.3. Papel do IGF-1 na interação patógeno-hospedeiro.....	32
2. OBJETIVOS .....	33
2.1. Objetivo Geral .....	33
2.2. Objetivos específicos.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.1. Desenho experimental .....	35
3.2. Micobactérias.....	36
3.2.1. <i>Mycobacterium leprae</i> .....	36
3.2.2. Obtenção de <i>Mycobacterium smegmatis</i> e <i>Mycobacterium bovis</i> BCG.....	37
3.3. Cultura de células .....	37
3.3.1. Cultivo de macrófagos murinos.....	37
3.3.2. Amostras clínicas e pacientes .....	38
3.4. Análise Imunohistoquímica.....	39
3.5. Purificação de ácidos nucleicos .....	39
3.5.1. Isolamento de RNA total .....	39
3.6. Tratamento com DNase .....	40
3.7. Síntese de cDNA .....	41

3.8. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (qPCR).....	41
3.9. qPCR para determinação da viabilidade do <i>M. leprae</i> . .....	42
3.10. Análise dos dados de qPCR.....	43
3.11. Ensaio de gene repórter .....	44
3.12. Obtenção de lisado total de Macrófagos.....	45
3.13. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) .....	46
3.14. Análise da expressão de proteínas por “Western blot” .....	46
3.15. Dosagem de Nitrito.....	47
3.16. Dosagem de IGF-I .....	48
3.17. Dosagem de PGE <sub>2</sub> .....	48
3.18. Análise gráfica e estatística .....	49
4. Resultados.....	54
4.1. A infecção <i>in vitro</i> pelo <i>M. leprae</i> regula positivamente a expressão de IGF-I em macrófagos RAW 264.7 de forma dose dependente. ....	54
4.3. IGF-I inibe o aumento da atividade do promotor de iNOS induzida por <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. smegmatis</i> em macrófago murino. ....	56
4.4. O IGF-I favorece a sobrevivência intracelular de <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. smegmatis</i> em macrófagos.....	59
4.5. O <i>M. leprae</i> estimula a produção de NO em macrófagos com bloqueio na sinalização de IGF-I. ....	61
4.6. O <i>M. leprae</i> aumenta a atividade do promotor de iNOS na presença de bloqueador da sinalização de IGF-I.....	64
4.7. O bloqueio da sinalização de IGF-I diminui a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> em macrófagos.....	66
4.8. IGF-I inibe a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7 .....	68
4.9. IGF-I inibe a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7. ....	70
4.10. IGF-I inibe o aumento da atividade transcricional do promotor de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7.....	72
4.11. Macrófagos infectados com <i>M. leprae</i> se mostram refratários à indução da atividade do promotor de iNOS por IFN- $\gamma$ .....	74
4.12. O bloqueio da sinalização de IGF-I restaura parcialmente a capacidade do IFN- $\gamma$ em aumentar a atividade do promotor de iNOS em macrófagos murinos tratados com <i>M. leprae</i> . ....	76
4.13. IGF-I inibe a fosforilação de STAT1 induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos. ....	78
4.14. <i>M. leprae</i> aumenta a expressão de SOCS3 em macrófagos RAW 264.7.....	80

4.15. IGF-I regula positivamente a expressão de enzimas envolvidas na produção de prostaglandina E <sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7. ....	82
4.16. Macrófagos presentes na lesão de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa (LL) expressam IGF-I .....	84
4.17. Os níveis de SOCS3 se encontram aumentados, e da forma fosforilada de STAT1 diminuídos em lesão de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa. ....	88
5.1 Discussão .....	900
6. Conclusões.....	1044
7. Bibliografia.....	1066

## Sumário Figuras

Figura 1. Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012. ....	3
Figura 2. Número de casos de hanseníase detectados no Brasil, Índia e Indonésia durante de 2004 a 2011.. ....	4
Figura 3. Gráfico mostrando o espectro de formas clínicas na hanseníase segundo classificação de Ridley e Jopling, 1966.....	6
Figura 4. Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i> . ....	10
Figura 5. Modelo esquemático dos fenótipos de ativação macrófagica. ....	16
Figura 6. Modelo esquemático da via de sinalização de IFN- $\gamma$ . I.....	18
Figura 7. Modelo esquemático mostrando a regulação negativa de SOCS na sinalização de citocinas.....	20
Figura 8. Modelo esquemático do Sistema IGF. ....	27
Figura 9. Modelo esquemático das vias de sinalização de IGF-I. ....	29
Figura 10. Esquema mostrando o desenho experimental utilizado .....	35
Figura 11. Desenho esquemático da região promotora de iNOS presente nos plasmídeos..	45
Figura 12. Avaliação da secreção de IGF-I por macrófagos RAW 264.7 estimulados com micobactérias. ....	55
Figura 13. Avaliação da atividade do promotor do gene iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com micobactérias após pré-tratamento para IGF-I. ....	58
Figura 14. Avaliação da viabilidade intracelular do <i>M. smegmatis</i> e do <i>M. bovis</i> BCG em macrófagos RAW 264.7 tratados com IGF-I. ....	60
Figura 15. Avaliação da atividade do promotor iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados <i>M. leprae</i> . ....	62
Figura 16. Avaliação da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com <i>M. leprae</i> e tratados com anticorpo neutralizante para IGF-I.....	63
Figura 17. Avaliação da atividade do promotor de iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com <i>M. leprae</i> após bloqueio da sinalização de IGF-I.....	65
Figura 18. Análise da viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> em macrófagos RAW 264.7 com bloqueio da sinalização de IGF-I.....	67
Figura 19. Avaliação do efeito do IGF-I na produção de NO induzido por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7. ....	69
Figura 20. Avaliação do efeito do IGF-I sobre a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7. ....	71
Figura 21. Avaliação efeito do IGF-I sobre a atividade do promotor de iNOS em macrófagos RAW 264.7 tratados com IFN- $\gamma$ . ....	73
Figura 22. Avaliação da expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7 tratados ou não com <i>M. leprae</i> . ....	75
Figura 23. Avaliação do efeito do bloqueio da sinalização de IGF-I sobre a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7 tratados com <i>M. leprae</i> .....	
Figura 24. Análise do efeito do IGF-I sobre a fosforilação/ativação de STAT1 induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7.....	79

Figura 25. Análise da indução da expressão de SOCS3 por <i>M. leprae</i> em macrófagos RAW 264.7 .	81
Figura 26. Análise do efeito de IGF-I sobre a expressão de enzimas envolvidas na síntese de PGE <sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7.	83
Figura 27. Análise comparativa da expressão de IGF-I em lesão de pele de pacientes lepromatosos e tuberculoíde.	85
Figura 28. Imunorreatividade para IGF-1 e CD68 em secções histológicas adjacentes de pele de pacientes LL (A,B) e BT (C,D).	87
Figura 29. Análise da expressão de SOCS3 e da ativação de STAT1 em biópsia de pele de pacientes BT e LL.	89
Figura 30. Modelo representando o possível papel do IGF-I em macrófagos infectados com <i>M. leprae</i> .	103

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1. A Hanseníase

A hanseníase é uma doença crônica curável causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular que infecta células de Schwann nos nervos e macrófagos na pele (Kaplan e Cohn, 1986). A doença é negligenciada e está associada a baixos índices de desenvolvimento humano. A Hanseníase constitui a principal causa de neuropatia periférica infecciosa, desencadeando uma degeneração, muitas vezes irreversível dos nervos periféricos (Jopling, 1966). O preciso mecanismo de transmissão não é conhecido, mas trabalhos recentes apontam que se dê através das vias respiratórias (Silva *et al*, 2013).

### 1.1.2. Breve histórico

As primeiras evidências históricas sobre a hanseníase são provenientes de textos antigos que remetem que a doença já existia no sul da Ásia e no Egito a cerca de 600 anos a.C. Confirmando o que foi descrito em textos históricos, esqueletos humanos datados desse mesmo período foram descobertos preservando os danos característicos da doença (Trautman, 1984 e Robbins *et al.*, 2009). Entretanto, acredita-se que a hanseníase tenha se originado na Índia e que foi introduzida na Europa pelos soldados gregos que retornaram da campanha Indiana de Alexandre, o Grande. A partir da Grécia a doença se disseminou pela bacia do mediterrâneo, com os romanos levando-a até a Europa ocidental. Já a partir da Índia, sugere-se que a hanseníase tenha se espalhado da China ao Japão até as ilhas do pacífico. Contudo no continente africano há evidências da presença da doença antes do período pré-colonial na África subsaariana. Estudos de genômica comparativa a partir de diferentes cepas de *M. leprae* sugerem que se originou no leste ou oriente africano, e se dispersou através das sucessivas

migrações humanas. No período das grandes colonizações, a hanseníase chegou finalmente ao ocidente africano e as Américas sendo introduzida pelos europeus (Monot *et al.*, 2009. e Verena *et al.*, 2013)

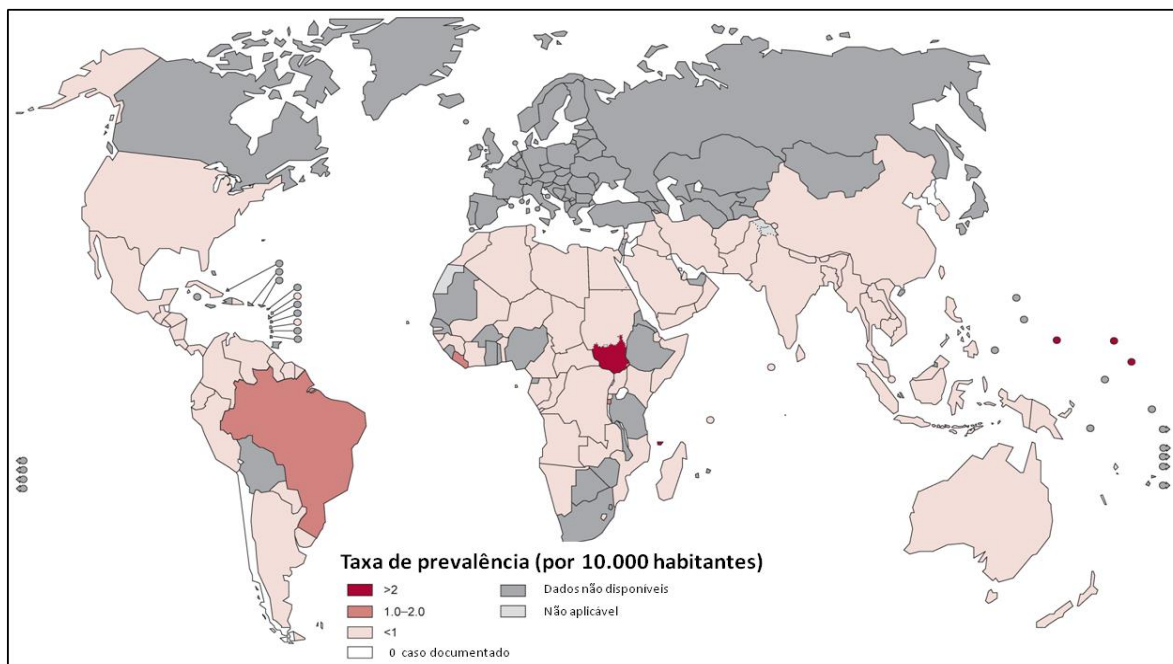
Em 1873, O *Mycobacterium leprae* foi finalmente identificado pelo médico norueguês Gerhard H. Armauer Hansen como o agente etiológico da hanseníase, sendo a primeira bactéria associada à uma doença em humanos (Irgens, 2002). No Brasil, em 1976, a terminologia Lepra foi substituída por Hanseníase, em homenagem a Gerhard Hansen, numa tentativa de amenizar o forte estigma social remetido por esta palavra. Em 1995, com a lei federal 1.010/95, foi proibida a utilização do termo lepra.

### 1.1.3. Epidemiologia

Com o sucesso oriundo da implementação da multidrogaterapia (MDT) adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1982, houve uma diminuição significativa da prevalência global da hanseníase com a cura de mais de 9 milhões de pacientes, cerca de 85% do total. Em alguns países, como Brasil, onde a hanseníase tem alta prevalência a taxa de detecção anual da doença encontra-se estável. Entretanto, há uma diminuição do número total de casos da doença devido a implementação da MDT. De acordo com relatórios oficiais recebidos de 105 países, a prevalência global de hanseníase registrada no final do primeiro trimestre de 2012 foi de 189.018 casos, enquanto o número de casos novos detectados durante 2012 foi de 232.857 (excluindo o pequeno número de casos em Europa) (OMS, 2012). A maioria dos países que anteriormente possuíam alta endêmicidade tem conseguido controlar a doença a nível nacional e estão intensificando os seus esforços a nível regional. Em 2007, a República Democrática do Congo e Moçambique atingiram eliminação em nível nacional, e juntou-se a esse grupo Timor-Leste no final de 2010. No entanto, bolsões regionais de alta endemicidade ainda permanecem em Angola, Brasil, República Centro Africana, Índia, Madagascar, Nepal e Tanzânia e em países anteriormente

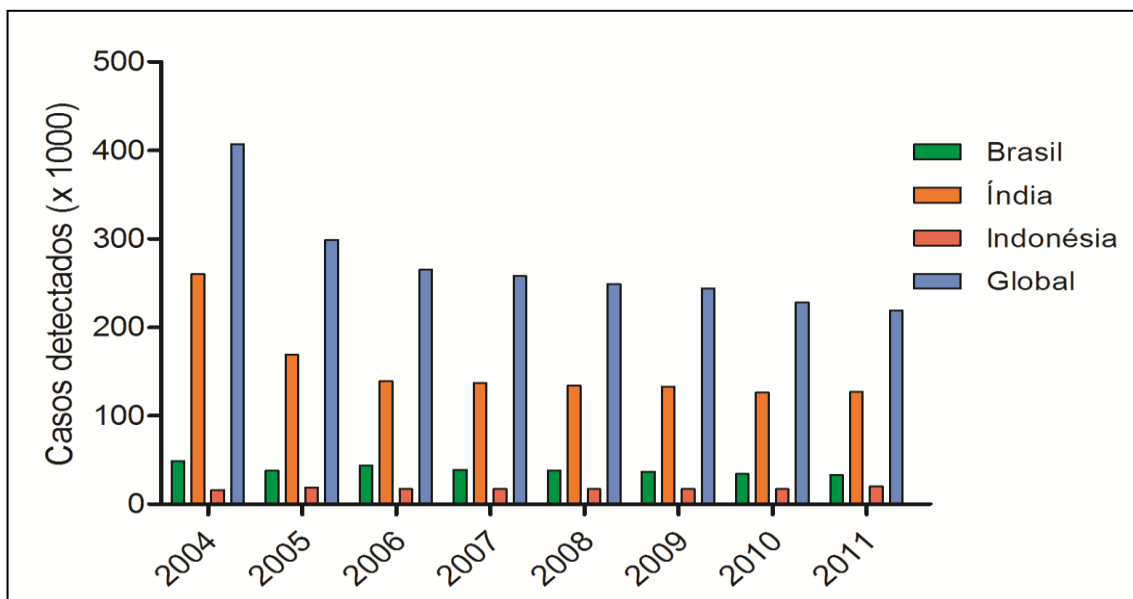


altamente endêmicos, como a República Democrática do Congo e Moçambique (OMS, 2012).



**Figura 1. Taxas de prevalência mundial da hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2012.** As taxas de prevalência correspondem a cada 10.000 habitantes. Em destaque Brasil na América do Sul e Sudão na África (Adaptado de OMS 2013)

A alta endemicidade da hanseníase está correlacionada com os baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico. Em 2011, 83% dos novos casos detectados foram concentrados por três países: Índia (58%), Brasil (16%) e Indonésia (9%). A Indonésia, após um período de estabilização do índice de novos casos, apresentou um aumento deste índice em 2011. Já tanto Índia como o Brasil vêm apresentando um declínio sutil no número de casos a partir de 2006. (OMS, 2012) (Figura 2).



**Figura 2.** Número de casos de hanseníase detectados no Brasil, Índia e Indonésia durante de 2004 a 2011. Adaptado de OMS, 2012.

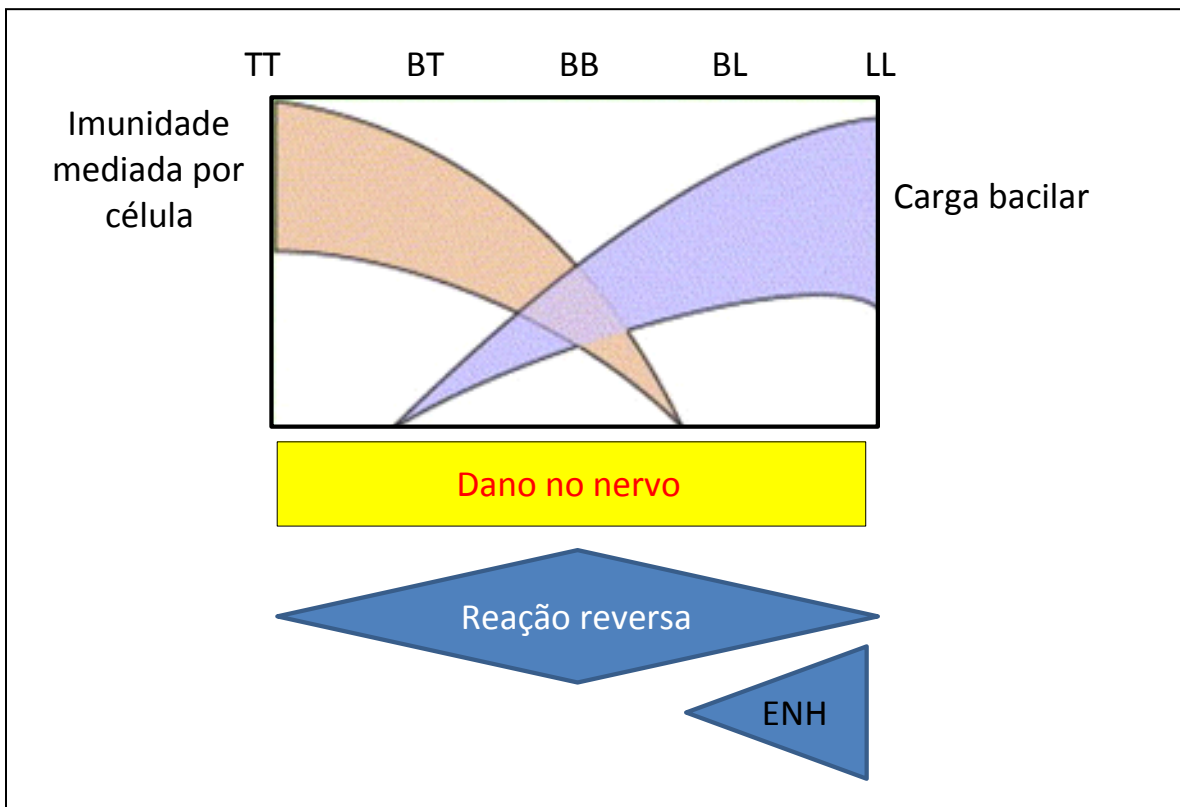
Assim como ocorre em todo o mundo, as taxas de incidência e prevalência da hanseníase no Brasil também estão relacionadas com nível de desenvolvimento social de cada região. Em 2011, a região Nordeste apresentou 41% dos novos casos no Brasil, seguida das regiões Norte com 20,2%, Centro-oeste com 16,9%, Sudeste com 17,7%, e Sul com 4%. Ainda em 2011, o Brasil apresentou um coeficiente de prevalência de 15,4 casos para cada 100.000 habitantes e detectou 33.955 casos novos de hanseníase, correspondendo a um coeficiente de detecção geral de 17,6 para cada 100.000 habitantes. Há um contínuo decréscimo no coeficiente de detecção da hanseníase, mesmo com a crescente expansão do número de unidades de saúde com pacientes em tratamento. Ainda em 2011, foram registrados 2.420 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos e um coeficiente de detecção desse grupo etário de 5,2 por 100.000 habitantes, em decorrência de circuitos ativos de transmissão localizados nas áreas mais endêmicas. A manifestação da doença nessa faixa

etária indica alta endemicidade, sendo a redução de casos em menores de 15 anos é uma das prioridades da secretaria de vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde. (portal do Ministério da Saúde, [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/indi\\_epidemiologicos\\_operacionais\\_hans\\_br2000\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/indi_epidemiologicos_operacionais_hans_br2000_2011.pdf), 2012).

#### 1.1.4. Formas clínicas

O preciso mecanismo de transmissão do *M. leprae* não é conhecido, mas acredita-se que seja através das vias respiratórias, embora também haja a possibilidade de infecção via lesões de pele. O diagnóstico da hanseníase é clínico, baseando-se no aparecimento de manchas avermelhadas ou regiões hipopigmentadas na pele com alterações de sensibilidade, apoiado por exames laboratoriais como a observação de bacilos em esfregaço (baciloscopia) e análise histopatológica das lesões cutâneas. O tratamento quimioterápico baseia-se na administração de um conjunto de três drogas, clofazimina, dapsona e rifampicina, para multibacilares (MB) de 12 a 24 meses. A combinação de dapsona e rifampicina para pacientes paucibacilares (PB) por um período de 6 meses é utilizado. (Britton e Lockwood, 2004). A hanseníase se manifesta segundo um espectro de formas clínicas, determinado essencialmente pela magnitude da resposta imune celular desenvolvida por cada indivíduo em resposta à infecção (Figura 3). A classificação atualmente adotada das formas clínicas da hanseníase é baseada na principalmente na combinação de critérios bacteriológicos e clínicos, mas também são levados em consideração aspectos imunológicos e histopatológicos. Segundo esses critérios a doença compreende as seguintes formas: tuberculóide tuberculóide (TT), “borderline”- tuberculóide (BT), “borderline”-“borderline” (BB), “borderline – lepromatoso (BL), lepromatoso – lepromatoso (LL) e indeterminado (I) (Ridley e Jopling, 1966). Os pacientes com a forma TT desenvolvem uma forte imunidade mediada por células, restringindo a multiplicação do bacilo e sua disseminação pelo organismo. Em conseqüência, estes pacientes apresentam geralmente uma única lesão cutânea e o exame

histopatológico destas lesões revela a presença de um granuloma bem desenvolvido, com raros bacilos. No extremo oposto do espectro encontram-se os pacientes com a forma LL. Estes desenvolvem baixa resposta imune celular contra o *M. leprae* e em consequência apresentam uma infecção disseminada com numerosas lesões. As biópsias destes pacientes revelam abundância de macrófagos com aspecto espumoso na derme, contendo um grande número de bacilos. figura 3 (revisto por Coura, 2005)



**Figura 3. Gráfico mostrando o espectro de formas clínicas na hanseníase segundo classificação de Ridley e Jopling, 1966.** TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais, denominados RR (reação reversa) e ENH (eritema nodoso hansênico), os quais acometem principalmente indivíduos das formas clínicas indicadas para cada tipo de episódio reacional(adaptado de ridley e Jopling, 1966).

Os indivíduos com hanseníase são classificados, operacionalmente, para fins de tratamento com a multidrogaterapia (MDT) em Paucibacilares (PB) ou Multibacilares (MB). Esta classificação, desenvolvida pelo programa de tratamento

da hanseníase da OMS, baseia-se no número de lesões apresentadas pelo doente: até cinco lesões os pacientes são tidos como PB e, se existirem mais de cinco lesões, o paciente é considerado como MB. As formas TT, BT e I são chamadas de PB e as formas LL, BL e BB são chamadas MB. Havendo a disponibilidade do exame baciloscópico, ele também pode ser levado em conta e, neste caso, a baciloscopia positiva indica pacientes com a forma MB da hanseníase, independentemente do número de lesões observadas.

Os quadros reacionais são classificados com reação do tipo I ou reação reversa (RR) e reação do tipo II, cuja característica principal é o eridema nodoso hansênico (ENH) (Ridley, 1969). A resposta inflamatória aguda, observada nos estados reacionais, geralmente contribui para o aparecimento de deformidades e incapacidades físicas, aumentando o risco de dano neural e agravamento do quadro clínico dos pacientes. A reação do tipo I é comum em pacientes com as formas borderline da hanseníase (Lienhard *et al.* 1994). A RR se caracteriza pela inflamação aguda das lesões de pele pré-existentes, tornando-as eridematosas e edematosas. A reação do tipo II é mais comum em pacientes com a forma multibacilar da doença (MB), geralmente na forma lepromatosa (Pocaterra *et al.*, 2006). Nesse caso são consideradas três variações clínicas: Eridema nodoso hansênico, eridema polimórfico e fenômeno de Lúcio (revisto por Cuevas *et al.*, 2007). Os episódios reacionais constituem uma das prioridades no tratamento de pacientes a fim de evitar o aparecimento de incapacidades e deformidades (revisto por Guerra *et al.*, 2004). O ENH é forma mais comum de reação do tipo II e se caracteriza por uma grande alteração imunológica proveniente da grande quantidade de antígenos liberados pelo bacilo após sua morte devido ao tratamento PQT.

#### 1.1.5. O *Mycobacterium leprae*

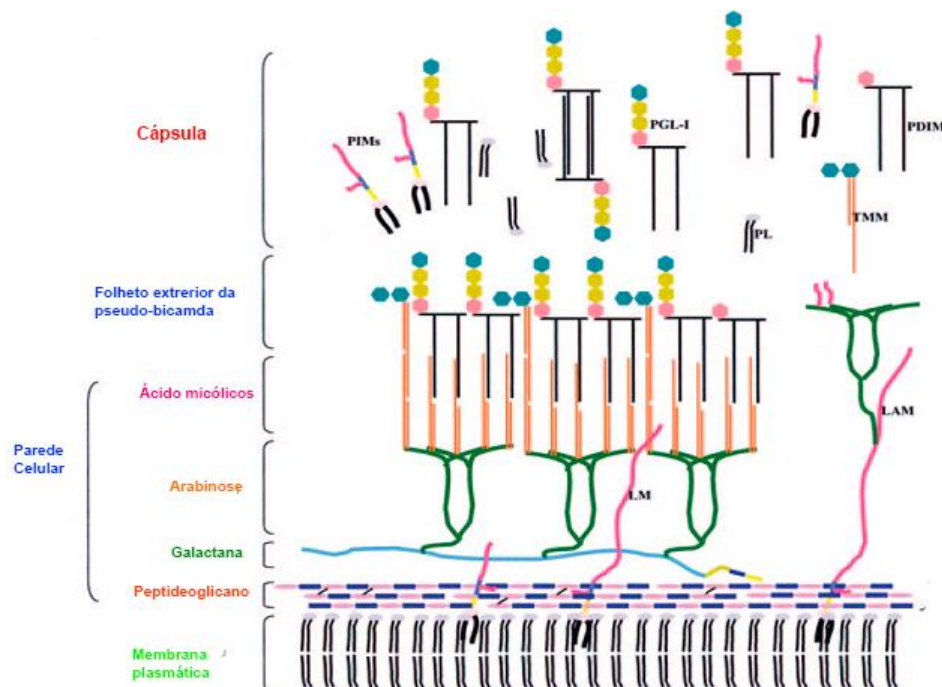
O *Mycobacterium leprae* pertence ao gênero *Mycobacterium*, o qual compreende uma vasta gama de organismos, incluindo agentes patogênicos

oportunistas e espécies saprófitas que são encontradas na natureza. Uma das principais descrições de divisão das micobactérias está relacionada com a taxa de crescimento e a pigmentação. Com base nesses critérios, o gênero *Mycobacterium* foi dividido em 4 grupos: O grupo I consiste nos fotocromogênicos de crescimento lento, o grupo II os escotocromogênicos de crescimento lento, grupo III não-cromogênicos de crescimento lento e o grupo IV os de crescimento rápido (Wayne, 1986 e Kim, 1999). As infecções humanas são causadas principalmente por micobactérias de crescimento lento que precisam em torno de 7 dias para formar colônias em meios sólidos visíveis. Em particular, o *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, e estima-se que tenha um tempo de geração de 12 a 14 dias (Scollard, 2006).

Em termos morfológicos e estruturais, a principal característica do gênero *Mycobacterium* é a presença de um envoltório celular extremamente rico em lipídeos complexos e distintos daqueles observados em outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A grande quantidade de lipídeos presentes na parede celular das micobactérias e a maneira como seus diferentes componentes estão organizados as tornam álcool-ácido resistentes e também contribuem para a formação de uma barreira com baixa permeabilidade e conseqüentemente grande resistência a agentes terapêuticos normalmente eficazes contra outras bactérias. Os lipídeos mais característicos do seu envelope celular são ácidos graxos ramificados com 60-90 átomos de carbono denominados de ácidos micólicos, figura 4 (Brennan e Nikaido, 1995).

Assim como em outras bactérias, o envoltório celular micobacteriano é constituído de dois compartimentos distintos: a membrana plasmática, que se encontra em contato com o citoplasma da célula, e a camada mais externa, constituída pela parede celular propriamente dita. A membrana plasmática é muito semelhante à membrana das demais bactérias, sendo formada por uma clássica bicamada fosfolípídica com proteínas intercaladas. O folheto externo da membrana é, contudo, rico em fosfatidilinositol manosídios (PIMS), lipoarabinomanana (LAM) e lipomanana (LM). O esqueleto da parede celular propriamente dita, como mostra a figura 4, é formado por um complexo

supramolecular resultante da ligação covalente de 3 macromoléculas: o peptidoglicano, um polissacarídeo ramificado (arabinogalactana) e os ácidos micólicos. O peptidoglicano, também conhecido como mureína, constitui a camada mais interna da parede e se encontra assim justaposto ao folheto externo da membrana plasmática, e tem estrutura semelhante àquela encontrada em outras bactérias e está covalentemente ligado à arabinogalactana completando o esqueleto da parede celular, os ácidos micólicos se encontram ligados covalentemente às unidades terminais de arabinose destas cadeias. Acima deste complexo supramolecular, estão presentes moléculas frouxamente ligadas constituindo a camada mais superficial da parede, que podem ser lipídeos, glicolipídeos, polissacarídeos ou proteínas; sendo essa estrutura variável entre as espécies (revisto por Scollard *et al*, 2006).



**Figura 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 componente como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). Ácidos micólicos estão ligados nas porções terminais de arabinose. Na porção mais externa do envelope celular é encontrado: monocolato trealose (TMM), glicolípido fenólico 1 (PGL-I), monossídeos fosfatidilinositol (PIMs), dimicocerosato fitoceroil (PDIM) e fosfolípidos (PL). Adaptado de Vissa e Brennan, 2001.



O glicolípido fenólico I (PGL-I) é um dos componentes mais abundantes da superfície do *M. leprae*, e representa cerca de 2% do seu peso seco (Hunter and Brennan, 1980). O PGL-I apresenta um trissacarídeo distinto [3,6-di-O-Me-glucosopiranosil (1→4) 2,3-di-O-Me-ramnosopiranosil (1→2) 3-O-Me-ramnopiranosil (1→fenol)], que o faz um marcador exclusivo do *M. leprae* (Hunter *et al.*, 1982). Por ser exclusivo do *M. leprae*, a sorologia baseada na detecção de anticorpos contra PGL-I passou a ser vista como um parâmetro potencialmente aplicável no diagnóstico da doença (Young *et al.*, 1989). Estes anticorpos, que são predominantemente da classe IgM, aumentam nas formas multibacilares (MB) do espectro da hanseníase, com alta titulação em pacientes com hanseníase lepromatosa.

Com a implementação do projeto de seqüenciamento do genoma humano, genomas de muitos organismos, inclusive bactérias patogênicas ao homem, vem sendo definidos. Dentre estes, o genoma de algumas micobactérias incluindo o de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) e *M. leprae* (Cole *et al.*, 2001) foram concluídos e estão disponíveis em ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)). A observação mais surpreendente sobre o genoma do *M. leprae* foi a verificação de uma perda maciça de genes quando comparado ao genoma do *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001). Apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* contém genes que codificam para proteínas sendo o restante constituído de 1.116 pseudogenes ou genes degenerados (genes que apresentam perda de regiões necessárias à sua transcrição e/ou tradução). A perda da capacidade de crescimento *in vitro* e seu longo tempo de geração talvez reflita a perda na capacidade de regulação das vias metabólicas e nos sistemas transporte do bacilo, reveladas através da análise de seu genoma (Vissa e Brennan, 2001).

Por ser uma micobactéria de crescimento lento e apresentar uma grande quantidade de pseudogenes, o *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro* até os dias de hoje, o que torna um desafio o estudo de sua patogenia e de sua biologia. Contudo, é possível manter o bacilo em culturas axênicas, mantendo seu estado metabólico estável por algumas semanas (Truman e Krahenbuhl, 2001). É provável que o processo de evolução reductiva observado tenha tornado o *M.*

*leprae* extremamente dependente de um nicho de replicação especializado encontrado no interior das células de Schwann e dos fagócitos mononucleares em humanos fato que também deve estar associado a impossibilidade de cultivo in vitro. Ainda a restrição de modelos experimentais para propagação do *M. leprae* é também notável e incluem o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) e camundongos Balb/C ou ainda os atímicos (nude). Os camundongos atímicos são extremamente susceptíveis à infecção, porém os bacilos só sobrevivem por alguns meses após a inoculação da bactéria. Um total de  $2 \times 10^4$  bacilos inoculados no coxim plantar desses camundongos, num período de aproximadamente 6 meses permite a obtenção de 0,5 a  $1 \times 10^{10}$  bacilos que podem ser prontamente utilizados vivos ou letalmente irradiados (Truman e Krahenbuhl, 2001 e Lahiri *et al.*, 2005). Outro modelo animal utilizado para o cultivo de *M. leprae* é o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*). Kirchheimer e Storrs (1971) documentaram a ocorrência de tatus naturalmente infectados. Em tatu o crescimento ocorre de forma disseminada, por um período de 18 a 24 meses. Além do comprometimento de pele, medula óssea, linfonodos e pulmões, o fígado e o baço do tatu são os órgãos mais afetados (Kirchheimer e Storrs, 1971).

## 1.2. Fagócitos mononucleares e resposta imune inata

A capacidade de sobrevivência dos metazoários está relacionada a um desenvolvimento evolutivo que direcionaram a uma resposta contra microorganismos invasores que conseguem ultrapassar as barreiras superficiais do organismo. Esta habilidade constitui a imunidade, que rapidamente e eficientemente defende o hospedeiro de patógenos invasores através de mecanismos que também são capazes de selecionar o que é benéfico ou não a si próprio (Nussbaum *et al*, 2012). A nível celular, esses microorganismos podem ser reconhecidos por macrófagos, células que expressam um amplo espectro de receptores na superfície celular que medeiam o reconhecimento, fagocitose e subsequente destruição de microorganismos invasores. Essas células são também capazes de secretar um conjunto de moléculas que servem para regular a atividade de outras células que se encontram em sua vizinhança. Nesse contexto, os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) tem um papel essencial constituindo um elo entre o reconhecimento de moléculas e subsequente sinalização celular a sensibilização inicial em resposta ao reconhecimento de diferentes classes de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Medzhitov, 2007).

Os macrófagos podem ser ativados por uma variedade de estímulos e podem assumir diferentes aspectos morfológicos e fenotípicos e, dependendo da localização específica em que são encontrados, recebem nomes especiais como células Kupffer no fígado, microglia no sistema nervoso central, osteoclastos no tecido ósseo, macrófagos alveolares nos pulmões, etc.

As células efectoras  $T_H1$  em resposta a um determinado antígeno recrutam os monócitos do sangue para os tecidos. Essa interação resulta na ativação e conversão de monócitos para macrófagos, os quais possuem a capacidade de eliminar microorganismos invasores. E, resposta a apresentação de antígenos as células T efectoras do tipo  $T_H1$  quando estimuladas secretam diversas citocinas, em especial  $IFN-\gamma$ , levando ao aumento na expressão de CD40 em macrófagos. Em resposta a sinalização via receptor CD40 e produção de  $IFN-\gamma$  há um aumento

significativo da produção de várias proteínas responsáveis por funções especializadas, principalmente na destruição de microorganismos patogênicos por esses macrófagos ativados. A sinalização via receptor CD40 ativa o fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) e proteína de ativação 1 (AP-1). O IFN- $\gamma$  ativa os fatores de transcrição STAT1 e fator de resposta a interferon-1 (IRF-1). Como resultado dessa sinalização, os macrófagos ativados podem agora desempenhar sua função efetora (revisto por Abbas *et al*, 2013).

Para que ocorra a fagocitose, há uma participação em conjunto de diversos receptores que reconhecem microorganismos patogênicos. Os PAMPs são reconhecidos pelos PRRs como os receptores do tipo Toll (TLR-Toll like receptors), que desencadeiam uma série de vias de sinalizações envolvidos no reconhecimento e eliminação de patógenos na resposta imune inata. Após a fagocitose ocorre a fusão dos fagossomos com os lisossomos resultando na formação do fagolisossomos, onde é encontrada uma grande diversidade de enzimas hidrolíticas, e se concentram a maior parte dos mecanismos microbicidas responsáveis pela destruição do microorganismo invasor. Os macrófagos ativados possuem a capacidade de converter oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio (ROS) que são agentes altamente reativos e capazes de destruir não só micróbios como outras células.

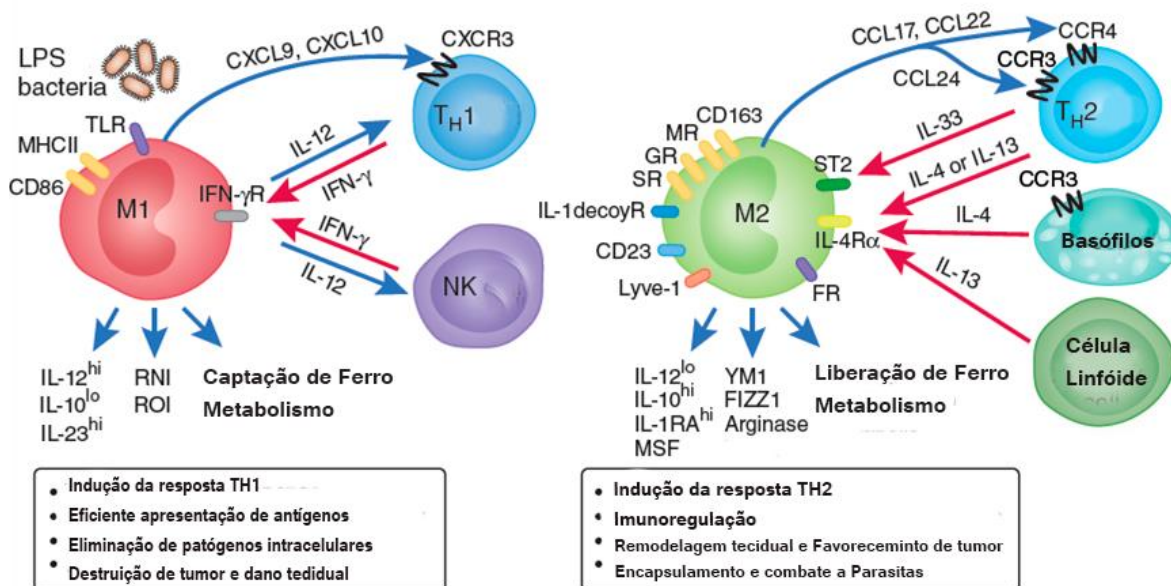
Além de ROS, os macrófagos também produzem intermediários reativos de nitrogênio, principalmente óxido nítrico (NO), pela ação de uma enzima denominada Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). A iNOS é uma enzima citosólica que pode ser induzida em resposta a um produto microbiano reconhecido por TLRs, especialmente em combinação com IFN- $\gamma$ . A produção de NO e outros metabólitos reativos de nitrogênio tem um importante papel na imunidade inata efetora. O NO é altamente reativo e se difunde com muita facilidade, sendo solúvel tanto em lipídeo quanto em água (Davis *et al*, 2007).

### **1.3. Fenótipo de ativação de macrófagos (M1 e M2)**

Os macrófagos tem um papel fundamental na resposta imune inata e adquirida em resposta a patógenos intracelulares e extracelulares. Essas células reconhecem, fagocitam, matam microorganismos e parasitas multicelulares, apresentam antígenos para células T e células B e ainda nos processos de inflamação aguda e inflamação crônica em resposta a infecções. O fenótipo dos macrófagos é heterogêneo, com distintas assinaturas de expressão gênica e função efetora associadas a citocinas de ativação clássica como IFN- $\gamma$  (M1) ou citocinas de ativação alternativa como IL-4/IL-13 (M2).

Os macrófagos ativados alternativamente (M2) compreende um amplo espectro de fenótipos sendo geralmente mais permissivos a replicação de patógenos intracelulares, e estão envolvidos no combate a infecções por parasitas multicelulares, como nematódeos, e no reparo a injúria tecidual como a limpeza de células apoptóticas. Macrófagos M2 são mais fagocíticos e tem aumento na expressão de receptores de superfície celular relacionados com a captação de lipídeos e açúcares como receptores “scavenger” (SRAI e II), receptores de manose (MR - dectina1 e CD206) além de aumento na expressão de arginase 1. Esse fenótipo M2 é induzido por citocinas como IL-4 e IL-13 que induzem a expressão de diversos marcadores característicos que influenciam células vizinhas, como os mediadores anti-inflamatórios IL-10, IL-5, PGE<sub>2</sub> e IGF-I (revisado por Dyken e Locksley, 2013). Já os macrófagos ativados classicamente, também chamados M1, se diferenciam principalmente a partir do estímulo com IFN- $\gamma$  e TNF. O TNF é produzido a partir do reconhecimento pelo macrófago de PAMPs pelos PRRs como os receptores TLRs. O IFN- $\gamma$  é principalmente produzido por linfócitos T e células NK e a ativação clássica mediada pelo IFN- $\gamma$  ocorre a partir de uma exposição exacerbada de componentes microbianos como LPS (Figura 5). Em macrófagos murinos, o fenótipo pode ser identificado através da produção de NO e da expressão de iNOS por essas células. Já em macrófagos humanos, a produção de NO é mais difícil de ser detectada, observando o aumento de outros parâmetros como a expressão de molécula de superfície como MHC II, com o consequente aumento da capacidade de apresentação de antígenos, de CD86, além da produção de moléculas microbicidas como as catelecidinas intermediada

pela via de vitamina D e ainda através do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6 (revisto por Mosser, 2003 e Montoya 2009).



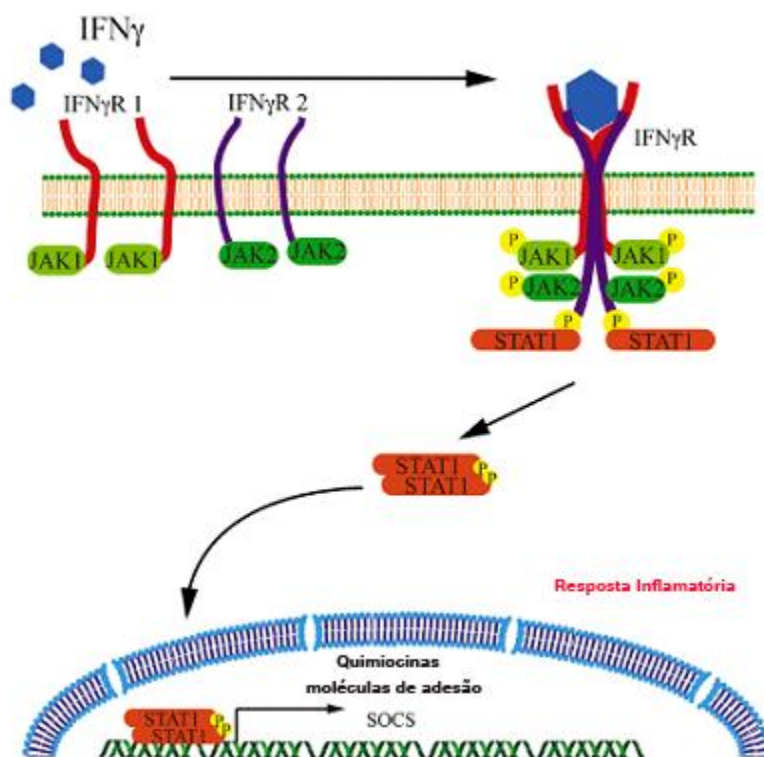
**Figura 5. Modelo esquemático dos fenótipos de ativação macrófagica.** A figura a direita representa a macrófago ativado M1 e as moléculas envolvidas nesse fenótipo. A esquerda representa o macrófago ativado (M2) e as moléculas características desse fenótipo. FR – Receptor de folato, GR – Receptor de galactose, IFN-γR – Receptor de IFN-γ, IL-1decoyR – Receptor decoy de IL1, MHCII – Receptor do complexo de histocompatibilidade II, MR – Receptor de manose, SR – Receptor scavenger, ST2 - Receptor de PGE<sub>2</sub>, ROI – Espécies intermediárias de oxigênio, PTX3 – pentraxina. (Extraído e modificado de Biswas e Mantovani, 2010).

#### 1.4. A via de sinalização de Interferons

Os interferons são citocinas amplamente expressas com potente efeito antiviral e inibidores de crescimento, e são produzidas em resposta a patógenos como vírus, bactérias, parasitas e células tumorais. Os interferons, incluindo o tipo I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$ , IFN- $\tau$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) e tipo III (IFN- $\lambda$ ) ao se ligarem em seus respectivos receptores ativam as proteínas quinases denominadas Janus quinases ativadas (JAKs). As proteínas JAKs encontram-se ancoradas na região citoplasmática do receptor e quando ativadas recrutam e ativam as proteínas Ativadoras de Transcrição e Transdutoras de Sinal, denominadas STATs. Estas proteínas, por sua vez, constituem uma família de 7 proteínas (STAT1-STAT7) que serão ativadas de acordo com estímulo específico. Uma vez ativadas as STATs translocam para o núcleo em forma de homodímeros ou heterodímeros e ativam a transcrição de uma diversidade variada de genes (Schoroder *et al*, 2004).

O IFN- $\gamma$  derivado de células T é vital tanto para resposta imune inata quanto para resposta imune adaptativa, ativando macrófagos, células natural killer, células B, células do músculo liso e células endoteliais vasculares. A via de transdução de sinal iniciada pela ligação do IFN- $\gamma$  ao seu receptor inicia-se com a formação de um complexo tetramérico do receptor que consiste em duas cadeias IFNGR1 e duas cadeias IFNGR2 na superfície celular que leva a ativação intracelular de JAK1 e JAK2, que estão associados com IFNG1 e IFNG2 respectivamente (Pestka, 2007). A JAKs fosforilam resíduos específicos de tirosina na parte citoplasmática do receptor de IFN- $\gamma$  e recrutam STAT1 que se liga ao sítio de ancoramento no receptor via domínio SH<sub>2</sub>. A STAT1 possui um domínio altamente conservado de ligação ao DNA e um conservado domínio SH<sub>2</sub> que interage com motivos fosforilados de tirosina para a ligação entre STAT1 e receptores e para dimerização de STAT1/STAT1 e domínio alfa-hélice que funciona com uma ponte de ligação do DNA ao domínio SH<sub>2</sub>. No caso da fosforilação mediada pelo IFN- $\gamma$ , é originado um homodímero STAT1/STAT1 que transloca para o núcleo onde se liga a sequência de ativação de IFN- $\gamma$

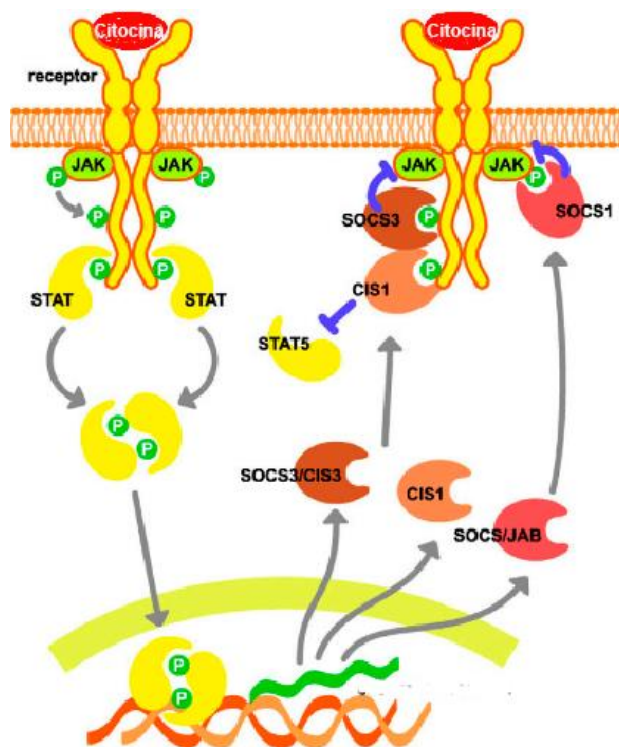
denominada elemento GAS no promotor de genes induzidos por IFN- $\gamma$  levando a expressão de genes inflamatórios, figura 6 (Wesoly *et al*, 2007).



**Figura 6. Modelo esquemático da via de sinalização de IFN- $\gamma$ .** IFN- $\gamma$  medeia a sinalização inflamatória por ativação de JAK/STAT. Após a fosforilação das JAKs, as STATs são recrutadas e fosforiladas pelo receptor. Em seguida forma-se o homodímero STAT1/STAT1 que transloca para o núcleo e induz a transcrição de genes pró-inflamatórios. (Extraído e modificado de Sikorski *et al*, 2011).



As proteínas supressoras de ativação de citocinas (SOCS) constituem uma família com 8 membros (SOCS1-SOCS7 e CIS) e são fundamentais na regulação negativa da sinalização JAK/STAT. Essas proteínas possuem uma importante função tanto na regulação inibitória (“feedback” negativo) como na regulação cruzada frente ao estímulo de citocinas (Figura 7). As SOCS podem inibir a sinalização de citocinas de quatro maneiras: 1) Através do bloqueio do recrutamento de STAT para o receptor de citocina se ligando ao sítio de ligação da própria STAT ao receptor, 2) marcando proteínas para degradação proteossomal via ubiquitinação, 3) ligando-se as JAKs e inibindo sua atividade de quinase ou 4) marcando as próprias JAKs para degradação via proteassoma (revisto por Ohara *et al*, 2013). Estudos comprovaram o efeito regulatório negativo de SOCS3 na função de micróglia, astrócitos e células T CD4 por inibição da ativação de STAT1 e STAT3. SOCS1 inibe a ativação de STAT1 e dos genes regulados pela ativação mediada por IFN- $\gamma$ . (Yoshimura *et al*, 2012). Foi demonstrado que SOCS3 está envolvida na inibição da diferenciação da resposta Th1 e na polarização de macrófagos, facilitando sua mudança para um fenótipo M2 (Holdbrooks *et al*, 2012). SOCS3 inibe a ativação de STAT3 através ligando-se a cadeia gp130 do receptor da IL-6, atenuando assim os efeitos pró-inflamatórios de IL-6. SOCS3 é preferencialmente expressa por células do tipo TH2 e, além disso, SOCS3 é essencial para supressão da sinalização de IL-6 em macrófagos. Outro fato é que SOCS3 também pode se ligar diretamente as JAK1, JAK2 e TYK2, servindo com um inibidor não competitivo de tirosina quinase. (Crocker, *et al*, 2007).



**Figura 7. Modelo esquemático mostrando a regulação negativa de SOCS na sinalização de citocinas.** Mecanismo de supressão de CIS, SOCS1 e SOCS3. Todas as SOCS são induzidas pela estimulação de citocinas. SOCS1 liga-se a JAKs e SOCS3 se liga ao receptor, através do domínio SH2, inibindo a atividade de JAK através de complexos KIR. Esses complexos podem ser ubiquitinados e levados a degradação proteossomal. (Adaptado de Yoshimura *et al*, 2012).

### 1.5. Interação do *M. leprae* com o Macrófago

Nas lesões de pacientes do polo TT é observado um perfil característico de resposta imunológica do tipo Th1, onde se observa uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12 nas lesões. No extremo oposto ao que é observado nas lesões de pacientes do pólo TT, as lesões de pacientes LL se caracterizam por apresentar um predomínio de uma resposta imunológica de perfil de resposta do tipo Th2 e uma alta expressão de citocinas com assinatura anti-inflamatória como IL-4 e IL-10 (Yamamura *et al*, 1991).

Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas presentes na pele e mucosa respiratória, são possivelmente as primeiras células do sistema imune a entrar em contato com o *M. leprae*. Os macrófagos têm um importante papel no sistema imune do hospedeiro contra a infecção causada pelo *M. leprae*, participando no processamento e apresentação de antígenos, secreção de citocinas e na função primária de eliminação do patógeno. Na ausência de uma resposta imune adaptativa eficaz, o bacilo tem a capacidade de se multiplicar dentro dos macrófagos chegando a mais de 100 bacilos por célula (Hagge *et al*, 2004). *In vitro*, o *M. leprae* é capaz de manter um estado metabólico estável por algumas semanas no interior de macrófagos tratados com IL-10 e cultivados a uma temperatura de 33°C (Fukutomi *et al*, 2004).

Durante a resposta imune inata, PAMPs são reconhecidos por PRRs que estão presentes na superfície das células do sistema imune, incluindo nos macrófagos. Os TLRs constituem uma das principais classes de PRRs e são descritos como importantes na ativação e diferenciação de monócitos para macrófagos, promovendo a atividade microbicida dessas células (Krutzik *et al*. 2005). O heterodímero TLR1-TLR2 e o homodímero TLR2 são descritos como os responsáveis pelo reconhecimento de alguns antígenos micobacterianos pelos macrófagos (Kirschning, *et al* 2002). Dados apresentados na literatura demonstram que os TLRs são necessários para uma ótima produção de IL-12 (Brightbill *et al*. 1999), uma citocina proinflamatória responsável pela indução de TNF e por mediar uma resposta imune do tipo T<sub>H</sub>1 (Underhill *et al*, 1999).

Recentemente foi demonstrado que micobacterias induzem expressão de MicroRNA 146a que têm como alvo elementos envolvidos na sinalização dependente de TLR/NF- $\kappa$ B, modulando negativamente a resposta frente a citocinas como TNF, IL1 $\beta$  e IL-6 (Li *et al*, 2013). O TNF é uma importante citocina na ativação celular e na formação do granuloma, mas também por estar implicado na destruição dos tecidos nos estados reacionais da Hanseníase (Sarno *et al*, 1991). O possível envolvimento da classe de receptores citoplasmáticos de PRRs, como os receptores do tipo NOD (NOD-like), no reconhecimento do *M. leprae*, tem sido descrito em estudos de susceptibilidade genética à hanseníase. Esses estudos indicaram que sinalização via NOD está associado a uma baixa indução de NF- $\kappa$ B e de fatores antimicrobianos como na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF, IL-12), agindo sinergicamente com TLRs e favorecendo a infecção pelo *M. leprae*. (revisto por Cardoso *et al*, 2011).

O *M. leprae* é capaz de manter sua viabilidade em macrófagos de camundongo *in vitro*, porém quando esses macrófagos são ativados com IFN- $\gamma$  eles são capazes de inibir o crescimento ou matar o bacilo *in vitro* (Ramasesh *et al*, 1991). Esse dado confirma que macrófagos normais têm a fusão fagolisossômica bloqueada pelo *M. leprae* vivo, porém não acontece o mesmo com o *M. leprae* morto (Sibley *et al*, 1987). Contudo, quando os macrófagos são ativados com IFN- $\gamma$ , a fusão dos fagossomos com os lisossomos secundários é assegurada.

Os principais mecanismos utilizados pelos macrófagos, em modelo de infecção murina, na inibição do crescimento ou eliminação de microorganismos invasores é a geração de reativos intermediários de oxigênio e de reativos intermediários de nitrogênio. Contudo, o *M. leprae* possui efeito antiinflamatório através de uma regulação negativa da ativação de macrófagos e da função de células T (Moura e Mariano, 1996), sendo esse efeito mediado pelos componentes de sua parede celular. Numerosas observações indicam que os lipídeos e glicoconjugados presentes no envoltório micobacteriano participam ativamente da interação do *M. leprae* com as células do hospedeiro. O PGL-I, por exemplo, constitui um importante acceptor do componente C3 do sistema complemento na

superfície da bactéria, sendo um mediador da fagocitose do *M. leprae*, via receptor de complemento (CR1, CR3 e CR4), por fagócitos mononucleares (Schlesinger e Horwitz, 1991; e Schlesinger e Horwitz, 1994). A ligação de C3 ao PGL-I é feita pelo trissacarídeo terminal e ocorre tanto pela via clássica, quanto pela alternativa de ativação do sistema complemento. A utilização destes receptores promove uma entrada segura do *M. leprae* em macrófagos, impedindo a ativação de vias microbicidas. Já outros investigadores atribuem ao PGL-I a capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio e, portanto de proteger o *M. leprae* da atividade antimicrobica gerado por fagócitos ativados (Klebanoff e Neill, 1988). Finalmente a produção de PGL-1 específico de *M. leprae* em BCG transgênico aumenta a capacidade de ativação do complemento C3 promovendo uma maior internalização da bactéria e maior evasão da resposta inflamatória (Tauboret *et al*, 2010).

Dados da literatura indicam que o *M. leprae* possui a capacidade de induzir a produção de fatores antiinflamatórios pelos macrófagos como IL-10, TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, contribuindo para modulação negativa da resposta microbida pela micobactéria (Revisto por Goulart, 2002). Macrófagos isolados de camundongos nude infectados produzem altos níveis de PGE<sub>2</sub> e mostram uma ativação defeituosa quando tratados com IFN- $\gamma$  (Sibley e Khrahenbuhl, 1988). As prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), incluindo PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub>, e TXA<sub>2</sub> são mediadores lipídicos que imediatamente após a síntese são lançados para fora das células, e exercem as suas ações pela ligação a um receptor acoplado a proteína G na superfície das células alvo. Em concentrações fisiológicas as prostaglandinas aumentam a vasodilatação e contribuem para a resolução da inflamação aguda, inibindo NF- $\kappa$ B (Matsuoka e Narumya, 2008). Já a PGE<sub>2</sub> é sintetizada a partir do ácido araquidônico, convertido em araquidonato pela ação da fosfolipase A na membrana plasmática, através de um mecanismo dependente de ciclooxigenase (COX2) (Adams, 1997). A indução de COX 2 é regulada por uma variedade de fatores de crescimento, dentre eles o fator semelhante a insulina I (IGF-I) (Revisto por Tsatsanis, 2006).

Recentemente nosso grupo mostrou que a infecção por *M. leprae* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, sítios de produção de eicosanóides, em macrófagos murinos e humanos (Mattos *et al.*, 2010). Adicionalmente, D'Avila e colaboradores apontaram que corpúsculos lipídicos seriam responsáveis pelo aspecto esponjoso das células infectadas pelo *Mycobacterium bovis* BCG (D'Avila *et al.*, 2006). Além disso, diversos estudos mostraram que o aspecto esponjoso encontrado nas células infectadas por micobactérias são devido, na maior parte, ao acúmulo de lipídeos do próprio hospedeiro, onde a regulação do metabolismo lipídico tem um papel importante na resposta do hospedeiro.. (Cruz *et al.*, 2008; Mattos *et al.*, 2010). Finalmente, a formação de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira, induzida pelo *M. leprae* tem sido associado com a patogênese da hanseníase a uma possível fonte de nutrientes para o patógeno, contribuindo para a persistência da infecção (Mattos *et al.*, 2012).

Teles e colaboradores demonstraram que na hanseníase ocorre uma correlação inversa entre os programas de expressão gênica de IFN- $\beta$  e de IFN- $\gamma$ . Esse trabalho mostrou que tanto o IFN- $\gamma$  assim como os genes antimicrobianos regulados pelo próprio IFN- $\gamma$  foram expressos preferencialmente nas lesões tuberculoides e também mediou atividade antimicrobiana contra o *M. leprae in vitro*. Em contraste, IFN- $\beta$  e os genes regulados por essa citocina, incluindo a interleucina-10 (IL-10), foram induzidos em monócitos por *M. leprae in vitro* e foram preferencialmente expressos nas lesões lepromatosas. A resposta antimicrobiana dependente de vitamina D induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos foi inibida pelo IFN- $\beta$  e pela IL-10, sugerindo que a produção de IFN- $\gamma$  diferencial contribui para a proteção contra o patógeno (Teles *et al.*, 2013). Estudos recentes de expressão gênica global e estudos de associação do tipo caso-controle foram recentemente realizados a fim confirmar a participação de um gene induzido por interferon do tipo I (IFN-I), chamado de OASL, na patogênese da hanseníase (Robottom Ferreira *et al.*, 2011 e Guerreiro *et al.*, 2013). Neste trabalho, a classe de genes induzidos por IFN-I foi identificada como modulada em células de Schwann primárias infectadas por *M. leprae* vivo por microarranjos de DNA. OASL

foi rapidamente induzido em células de Schwann e macrófagos THP1 frente a infecção por *M. leprae*, sugerindo que esse gene seja um sinal precoce da infecção com a micobactéria. Além do mais, *M. leprae* vivo, mas não *M. leprae* morto nem BCG, induziu RNAm do OASL em macrófagos THP1, sugerindo que a ativação da via do IFN-I seja específica de micobactérias patogênicas (Ferreira e Toledo Pinto *et al*, artigo submetido).

Diversos estudos têm sugerido que *M. leprae* cria um nicho favorável a sua sobrevivência dentro das células por ativar um desvio da apoptose tanto em macrófagos (Lahiri *et al*, 2010). Por outro lado, a micobactéria avirulenta, BCG, ativa a apoptose nessas células (Riendeau e Kornfeld, 2003). Montoya e colaboradores foram além ao mostrar que o *M. leprae* é capaz de direcionar a resposta imune inata para ativar um programa fagocítico induzido por IL-10, o que está correlacionado com a resposta imune evidenciada nas lesões do pólo LL. Em contraste, a indução via IL15, IL1 e CYP27B1 leva à resposta antimicrobiana dependente de vitamina D, característica das lesões tuberculóides. A assinatura genética envolvida em resposta ao programa fagocítico mediado por IL-10 *versus* antimicrobiano mediado por IL-15 está diretamente relacionada com as lesões da hanseníase *in vivo* (Montoya *et al*, 2009). Moura e colaboradores demonstraram que um subconjunto predominante de macrófagos em lesões lepromatosas exibe alta expressão de CD163 e IDO, estando isto ligado tanto ao seu aspecto espumoso e a deposição de ferro. Além disso, a *M. leprae* foi capaz de aumentar a expressão de CD163 em monócitos humanos, mostrando que este receptor provável envolvido na captação da micobactéria e na sua sobrevivência (Moura *et al*, 2012).

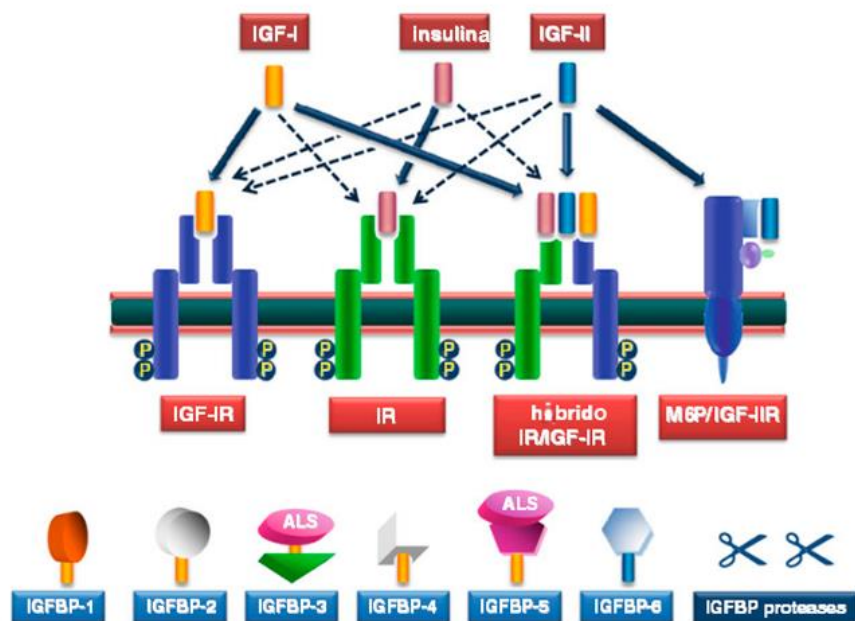
### **1.6. O fator de Crescimento semelhante à Insulina I (IGF-I)**

Dados da literatura mostraram que macrófagos produzem IGF-I em resposta ao estímulo com IL-4, citocina chave na ativação alternativa de macrófago M2. (Wynes *et al*, 2004). Os fatores de crescimento semelhante à insulina IGF-I e IGF-II tem sido descritos como importantes no desenvolvimento fetal e pós natal,

também estimulando o crescimento de órgãos incluindo esqueleto, músculos, cérebro e glândulas mamárias. O IGF-I desempenha um importante papel na proliferação celular e apoptose contribuindo para a homeostase tecidual. O sistema IGF consiste em dois ligantes relacionados à família do peptídeo insulina (IGF-I e IGF-II), insulina, seus respectivos receptores e 6 proteínas ligantes (IGFBPs). O receptor de IGFs do tipo 1 (IGF-1R) tem uma alta afinidade por ambos IGF-I e IGF-II e medeia o efeito de ambos os fatores de crescimento. O IGF-I e o IGF-II são polipeptídeos ubiquitinados que podem agir localmente como fatores autócrinos, parácrinos, ou endócrinos circulantes no plasma, agindo em sítios distantes. O IGF-I predomina na fase adulta, em contraste com o IGF-II que é o principal fator de crescimento fetal. Aproximadamente 80% do IGF-I detectado no plasma é produzido pelos hepatócitos em resposta à ação do hormônio de crescimento (GH) produzido pela hipófise. Os restantes 20% resultam da produção de IGF-I pelos mais diversos tecidos, cuja regulação é complexa e ainda pouco conhecida (revisto por Annunziata, 2010).

As proteínas ligantes de IGFs (IGFBPs 1-6) estão presentes na circulação prolongando a meia vida dos IGFs e modulando sua disponibilidade e atividade. As IGFBPs são bem conservadas entre os mamíferos e a sua afinidade para o IGF-I e IGF-II está na mesma ordem de grandeza da afinidade para o seu receptor. As IGFBPs podem atuar regulando positivamente ou negativamente a ligação dos IGFs aos seus receptores. A competição entre IGFBPs e IGF-IR, em relação aos IGFs disponíveis no microambiente, é um processo dinâmico, uma vez que afinidades de ligação das IGFBPs são freqüentemente alterada por fosforilação, proteólise parcial e adesão à superfície da célula ou na matriz extracelular, figura 8 (Firth *et al*, 2002).





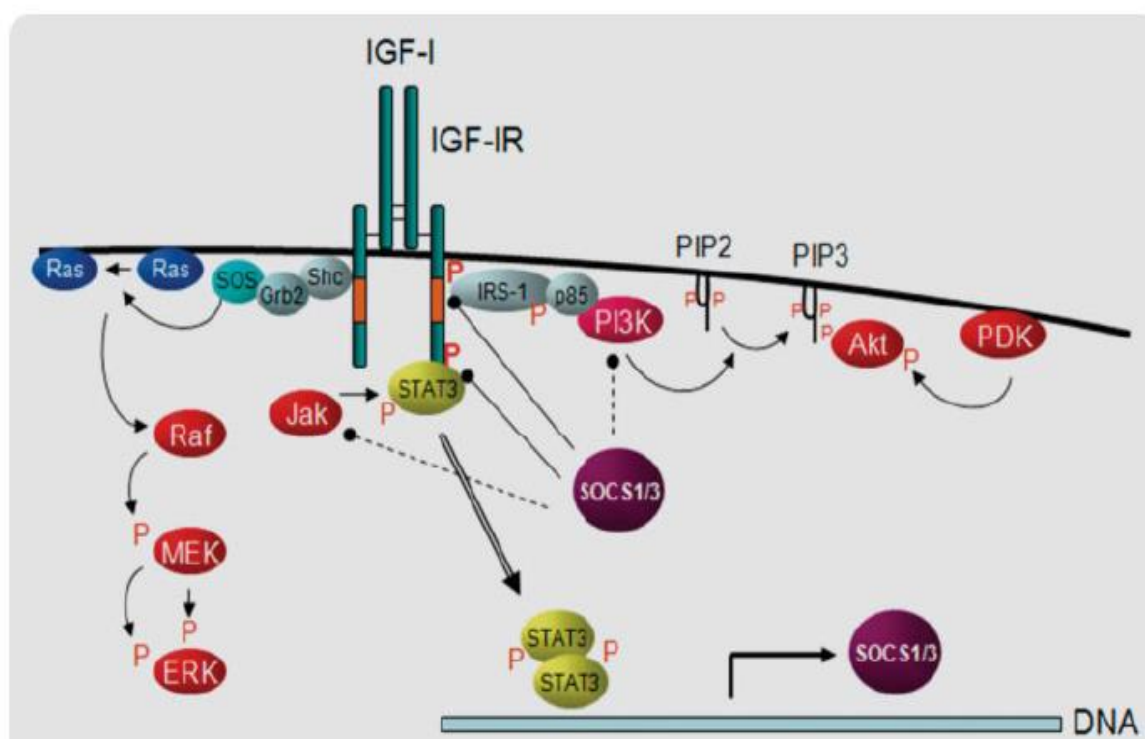
**Figura 8. Modelo esquemático do Sistema IGF.** O sistema IGF compreende seus ligantes (IGF-I, insulina e IGF-II), os seus receptores (receptor de IGF-I, IGF-IR, de receptores de insulina, IR, o IR híbrido / IGF-IR o receptor de manose 6-phosphate/IGF-II, M6P/IGF-IIR), seis proteínas ligantes de IGFs (IGFBPs). (Revisto por *et al*, Annunziata *et al*, 2010).

### 1.6.1. IGFs - Sinalização intracelular

O IGF-1R é expresso na superfície celular na forma de tetrâmero com duas subunidades  $\alpha$  extracelulares e duas subunidades  $\beta$  intracelulares. Ambas subunidades estão ligadas entre si por pontes dissulfeto. O ligante se liga na subunidade  $\alpha$  que é extracelular levando a ativação intrínseca de tirosinas quinases na subunidade transmembrana  $\beta$  e subsequente fosforilação cruzada das subunidades  $\beta$  nos resíduos de tirosina Tyr 1131, 1135 e 1136, levando a uma ativação completa da tirosina quinase. Os resíduos de tirosina fosforilados fora do domínio servem para recrutar outras moléculas sinalizadoras ou sinais inibitórios da via de transdução de sinal via seus domínios SH<sub>2</sub>. (revisto por Himpe e Koojiman, 2009). Essas tirosinas quinases são responsáveis pela fosforilação de diversos substratos intracelulares que desencadeiam uma série de vias de sinalização que regulam a expressão gênica, proliferação, sobrevivência, metabolismo e ciclo celular (revisto por Denley *et al.*, 2005). A ativação do IGF-1R pode desencadear diversas vias de sinalização como: Fosfatidilinositol-3 quinase/Akt (PI-3K/Akt), MAPK (Proteína quinase ativadora de mitógeno) e Janus quinase/Ativador de fator de transcrição e tradução ou JAK/STAT. A principal via que é ativada via receptor IGF-1R, após a fosforilação da tirosina, envolve a ativação de PI3K. Isso leva ao recrutamento da subunidade regulatória de 85 kDa da PI3K, via substrato do receptor de insulina (IRS), ativando PIP3, resultando ativação de Akt (proteína quinase B). Uma segunda via consiste na ativação da quinase regulada extracelular (ERK 1 e 2) que são isoformas da família das proteínas ativadas por mitógeno (MAPK). A terceira já mencionada é a via JAK/STAT, que pode ser ativada por citocinas ou por hormônios através de membros da superfamília de receptores citocina/hematopoiético (Kisseleva *et al.*, 2002). Esses receptores não contem atividade enzimática intrínseca e dependem da transdução de sinal das tirosinas quinases que se ligam no domínio intracelular do receptor, que são as Janus quinases (JAKs). A transfosforilação das JAKs e sua subsequente ativação, leva a fosforilação de resíduos de tirosina nos próprios

receptores que funcionam como sítios de ancoramento para moléculas sinalizadoras que contem o domínio SH2, incluindo as STATs (Figura 8).

Já é descrito que IGF-I induz a expressão de SOCS1 e SOCS3 em células epiteliais murinas via ativação de STAT3 (Ebong *et al*, 2004). Contudo é mais conhecido a estimulação de SOCS mediada por IGF-I via MEK/ERK e PI3K (revisto por Himpe e Koojiman, 2009).



**Figura 9. Modelo esquemático das vias de sinalização de IGF-I.** As duas vias canônicas de sinalização através da via PI3K/Akt e da via ras-raf-MEK-ERK são mostrados em adição à via de sinalização de JAK-STAT. Ações inibitórias são mostradas e os efeitos de moléculas inibidoras postuladas SOCS são indicadas por linhas sólidas ou pontilhada, respectivamente. Abreviaturas: PIP2, fosfatidilinositol-3,4-bifosfato; PIP3, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1, Quinase dependente da fosfoinositideo -1. (Revisto por Himpe e Kooijman *et al*, 2009).

### 1.6.2. IGFs - Efeitos metabólicos e interação com o sistema imune

O IGF-I parece ter um papel importante na homeostasia tecidual, melhor evidenciado durante processos inflamatórios. Contudo, os mecanismos pelos quais atua apenas começam a ser esclarecidos. A inflamação pode induzir um estado catabólico associado com hipercatabolismo, balanço negativo de nitrogênio e caquexia que não pode ser explicada unicamente pela diminuição da ingestão, mas por modificações no sistema neuroendócrino, com a diminuição dos níveis de IGF-I (Douglas e Shaw, 1989). Modelos experimentais da indução de resposta inflamatória por LPS constataram uma inibição da expressão de IGF-I em hepatócitos e células Kupffer e esse efeito parece estar relacionado com o aumento da produção de óxido nítrico e de várias outras citocinas (Priego *et al.*, 2006). Ainda nesse contexto, dados da literatura têm demonstrado que hormônios como IGF-I participam de uma variedade de eventos imunes, atuando na regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  (Connor *et al.*, 2008).

Efeitos benéficos do IGF-I sobre o sistema nervoso central e periférico têm sido demonstrados *in vivo*, particularmente em neuropatias onde a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias é observada (Venters *et al.*, 2000), possibilitando seu emprego clínico em doenças neurodegenerativas (Mynarcik *et al.*, 1999). De fato, relatos da literatura vêm demonstrando efeitos antagônicos entre IGF-I e TNF, citocina implicada no dano ao tecido nervoso observado na hanseníase e outras doenças degenerativas (Wu *et al.*, 1996; Remacle-Bonnet *et al.*, 2000). Também Wang e colaboradores (2003) demonstraram que IGF-I é capaz de reduzir o dano ao nervo induzido por TNF observado em pacientes com demência associada à infecção por HIV. Nestes pacientes, os efeitos neurodegenerativos em consequência da elevada produção de TNF foram correlacionados à redução dos níveis séricos de IGF-I (Laue *et al.*, 1990). Na literatura encontramos alguns trabalhos mostrando o efeito apoptótico do TNF sendo bloqueado por IGF-I (Wu *et al.*, 1996; Remacle-Bonnet *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2003).

Macrófagos residentes possuem a capacidade de liberar fatores de crescimento como o IGF-I promovendo um aumento no crescimento, proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares no sítio da inflamação (Nagaoka *et al*, 1990). O IGF-I derivado de macrófagos tem sido amplamente implicado na patogenia de doenças pulmonares intersticiais como a fibrose pulmonar idiopática, estimulando a proliferação e sobrevivência de fibroblastos e miofibroblastos e promovendo a síntese de matriz de colágeno por essas células. Contudo, pouco é conhecido sobre os mecanismos que regulam a expressão de IGF-I pelos macrófagos (Wynes, 2003).

### 1.6.3. Papel do IGF-1 na interação patógeno-hospedeiro

Há poucos relatos da literatura da participação do IGF-I em doenças infecciosas. Trabalhos recentes indicam que o IGF-I contribui para a infecção de *Leishmania amazonensis*, favorecendo seu crescimento dentro de macrófagos em lesões de leishmaniose cutânea e em ensaios experimentais *in vitro* (Gomes *et al.*, 2000). Esses estudos, demonstraram que o IGF-I favoreceu o crescimento parasita em macrófagos aumentando a expressão e ativação da arginase 1 do próprio parasita, além do seu efeito sobre a arginase de macrófagos. Essa modulação afeta o metabolismo de L-arginina no interior dessas células, afetando também a via de NOS2 (iNOS) diminuindo os níveis de NO após estímulo com IGF-I. Foi demonstrado ainda que IGF-I favorece a infecção por *Leishmania* atuando tanto como um fator de crescimento para o próprio parasita, e modulando a resposta inflamatória local e bloqueando a ativação de macrófagos (Vendrame *et al.*, 2007).

Dados recentes do nosso grupo demonstraram que as células de Schwann, alvos preferenciais da infecção pelo bacilo, aumentam a produção de IGF-I em resposta a infecção pelo *M. leprae*. Esse mecanismo protege essas células da morte por apoptose, o que favorece a manutenção do nicho favorável para sobrevivência e crescimento do bacilo no hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2010). Esta indução representaria uma importante estratégia de sobrevivência e persistência do bacilo no nervo devido às propriedades anti-apoptóticas e anti-inflamatórias deste hormônio no tecido nervoso (Syroid *et al.*, 1999 e revisto por Venters *et al.*, 2000). Contudo, a capacidade de *M. leprae* de induzir IGF-I em macrófagos ainda vem sendo investigada. A nossa hipótese é que o *M. leprae* induz a produção de IGF-I em macrófagos e que o IGF-I regula negativamente o papel efetor dessas células no controle da infecção, o que permitiria a disseminação da infecção e a permanência do *M. leprae* na célula hospedeira.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar o papel do IGF-I na modulação negativa da ativação de macrófagos infectados com *Mycobacterium leprae* na hanseníase.

### 2.2. Objetivos específicos

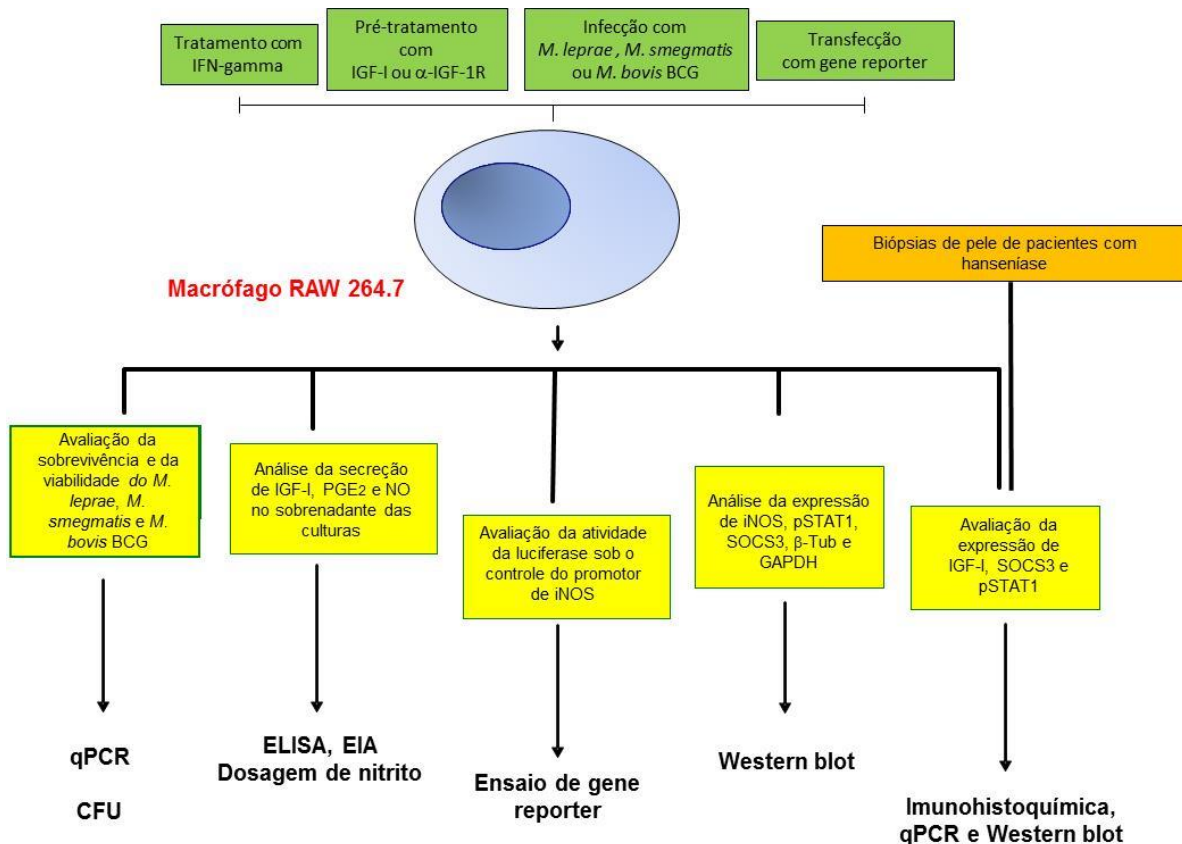
- Analisar comparativamente a capacidade entre *M. leprae* vivo e morto em induzir o aumento na expressão de IGF-I em macrófagos RAW 264.7;
- Avaliar a atividade do promotor de iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com BCG ou *M. smegmatis* na presença e ausência de IGF-I;
- Avaliar o efeito do IGF-I na viabilidade intracelular de BCG ou *M. smegmatis* em macrófagos RAW 264.7;
- Investigar o efeito do bloqueio da sinalização de IGF-I sobre a expressão de iNOS e a produção de NO em macrófagos estimulados com *M. leprae*;
- Avaliar o efeito do IGF-I na viabilidade intracelular do *M. leprae* em macrófagos infectados após bloqueio da via de sinalização de IGF-I;

- Avaliar o a participação do IGF-I na a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$  através da atividade de seu promotor em macrófagos estimulados com *M. leprae* através do bloqueio da via de sinalização de IGF-I;
- Avaliar a expressão das enzimas envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub>, e de PGE<sub>2</sub> em macrófagos estimulados com IGF-I;
- Investigar a expressão de SOCS3 em macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados com *M. leprae* ou IGF-I e o efeito do IGF-I sobre a fosforilação/ativação de STAT1 induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos;
- Comparar o grau de expressão de IGF-I, SOCS3 e a fosforilação/ativação de STAT1 nas lesões de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa (LL) e tuberculóide (BT);



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Desenho experimental



**Figura 10. Representação esquemática do desenho experimental.** Após os diferentes estímulos o sobrenadante das células foi recuperado e NO, IGF-I e PGE<sub>2</sub> secretados foram analisadas por Dosagem NO pelo método de Griess, ELISA e EIA, respectivamente. A viabilidade intracelular micobacteriana foi avaliada por CFU ou qPCR. Os ensaios de gene repórter foi realizado através da atividade da luciferase sob o controle do promotr de iNOS. A análise de expressão de proteínas foi realizada através de Western blot ou Imunohistoquímica.

## 3.2. Micobactérias

### 3.2.1. *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* Thai-53 vivo utilizado nesse estudo, cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), foi proveniente do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*). Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, as patas foram colhidas e enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular (FIOCRUZ, RJ) para purificação. De modo estéril, as patas foram homogeneizadas em meio de cultura RPMI-1640 (LGC biotecnologia, SP). A suspensão de bacilos foi tratada com hidróxido de sódio 0,1 M, posteriormente ressuspensa em meio de cultura RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, SP) suplementado com 50 µg/mL e ampicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e incubadas a 33° C por 3h.

Os bacilos foram quantificados por contagem direta em microscópio óptico conforme descrito por Shepard e McRae (1968). Neste método, retira-se uma pequena alíquota para preparação de esfregaços em lâmina de vidro (Fisherbrand, Pittsburg, PA, EUA) e coloração pelo método de Kynion fazendo diluições de 10 e 100 vezes ou sem diluição do material. Este foi fixado com formol-leite em vapor de formaldeído e calor. Os bacilos foram corados pelo método de Kynion (Shepard e McRae, 1968) utilizando fucsina básica por 5 min e lavados com água corrente. As lâminas foram, então, lavadas com solução álcool-ácida e, em seguida, com água novamente para a retirada de excesso do corante. Finalmente, os esfregaços foram corados com azul de metileno por 3 min e lavados com água. A contagem do número de bacilos foi realizada em microscópio óptico com lente de imersão de 1000X Axiobserver Z1 (Carl Zeiss Inc. Thornwood, NY, EUA). A viabilidade dos bacilos após a purificação foi estimada utilizando o kit Live/Dead (Invitrogen, Rockville, MD, EUA) seguindo protocolo de acordo com as especificações do fabricante. Para os ensaios com *M. leprae* morto, as bactérias foram letalmente irradiadas utilizando fonte (feixe de elétrons) segundo

procedimento padrão utilizado para irradiação de materiais pela empresa especializada (Acelétron, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### 3.2.2. Obtenção de *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium bovis* BCG

O *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 foi doado por Thomas Dick da Universidade de Singapura. O BCG (cepa Pasteur) foi doado pelo pesquisador Franco Menozzi do Instituto Pasteur, Lille, França (linhagem 1173P2 WHO, Estocolmo, Suécia; passagens 3 a 8). Estas micobactérias foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 (Beckton, Dickinson, Sparks, MD, USA) suplementado com 0,05% de Tween 80 e 10 % de ADC (0,2 % de glicose, 0,5 % de albumina de soro bovino [BSA], 0,085 % de cloreto de sódio) sob agitação constante com barras magnéticas em incubadora à 37°C. O cultivo foi interrompido quando a cultura atingiu uma densidade óptica (600nm) igual a 1,0 em um espectrofotômetro (Ultrospec 2000 pro UV/visible (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) correspondente à fase exponencial de crescimento. A concentração de bacilos na suspensão foi determinada através do método de Shepard e McRae (1968) e alíquotas foram, então, congeladas a – 70°C até o seu uso. Ambas micobactérias foram letalmente mortas pelo calor para realização de todos os experimentos, exceto para os ensaios de viabilidade por CFU.

## 3.3. Cultura de células

### 3.3.1. Cultivo de macrófagos murinos

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi obtida através da ATCC (American Tissue Collection) e gentilmente doada pelo Dr. Neil Reiner da University of British Columbia, BC, Canadá. Esta linhagem é estocada em alíquotas no nitrogênio líquido em solução contendo 10% de DMSO (Sigma) e 90% soro fetal bovino (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil). Para o início do cultivo,

as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, ressuspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 comercial (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 nM de HEPES, 100 U/mL de Penicilina, 100 U/mL estreptomicina (Invitrogen), 1 mM Glutamax (LGC Biotecnologia), pH 7.4. As células foram centrifugadas a 500 x g por 10 min para retirada do DMSO e ressuspensas novamente em meio RPMI completo. As células foram mantidas em garrafas de cultura (NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) de 25 cm<sup>2</sup>, à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, a monocamada celular era lavada com PBS (Invitrogen) por duas vezes e as células removidas da garrafa de cultura com o auxílio de um rodinho plástico (“cell scraper” (Corning, Life Science, New York, EUA), em meio RPMI completo. A suspensão celular era contada em câmara de Neubauer e, aproximadamente, 4x10<sup>4</sup>, 8x10<sup>4</sup> e 2x10<sup>5</sup> células eram transferidas para placa de cultura (Corning) de 24, 12 e 6 poços, respectivamente.

### **3.3.2. Amostras clínicas e pacientes**

Um total de 22 pacientes com hanseníase (10 BT e 12 LL, 12 homens e 10 mulheres com idade entre 25-45 anos) classificadas de acordo com a escala de classificação de Ridley e Jopling (Ridley & Jopling, 1966) foram incluídos nesse estudo. Amostras de biópsia de pele foram obtidas antes do início do tratamento e foram usadas para análise por imunohistoquímica e expressão de RNA mensageiro. Bolsas de sangue foram obtidas de doadores sadios pelo serviço de Homoterapia do Hospital Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, RJ, de acordo com as normas estabelecidas na Declaração de Helsinki. A obtenção de todas as amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz projeto nº 504/09 (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) O termo de consentimento foi assinado de cada participante desse estudo.

### 3.4. Análise Imunohistoquímica

Para a detecção por Imunohistoquímica da expressão de IGF - I e CD68 em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase foi realizado protocolo tal como descrito previamente (Mattos *et al*, 2011). Brevemente, os cortes histológicos foram coradas com hematoxilina e eosina (H & E) para estimar a extensão e a composição do infiltrado inflamatório, e a coloração de Wade foi utilizada para avaliar a carga bacilar (Wade, 1962). A imunocoloração foi realizada por incubação com anticorpo policlonal de coelho anti-IGF-I (GroPep, Thebarton Australia) (diluição 1:100) e monoclonal anti-CD68 (DAKO, Glostrup, Denmark) (diluição 1:50) em 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, contendo 1 % de albumina de soro bovino. Os controles negativos foram realizados soro normal de coelho ou isotipo de IgG de camundongo. As incubações foram feitas em secções seriadas sobre as mesmas lâminas de cada amostra, a fim de melhorar os parâmetros de comparação. Após incubação durante a noite a 4°C, em câmara húmida, as secções foram lavadas com TBS/Triton X-100 e incubou-se com anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo conjugados a peroxidase (EnVision + System, DAKO). As lâminas foram coradas com 3,3'- diaminobenzidina (DAB + Líquido cromogénio - DAKO) e, depois da imersão em água destilada, as secções foram contrastadas com hematoxilina de Mayer, seguido de desidratação e finalmente cobertas com meio de montagem permanente (DAKO). As imagens foram obtidas através de um microscópio Nikon Eclipse com software ProPlus imagem (Rockville, MD 20850 USA).

### 3.5. Purificação de ácidos nucléicos

#### 3.5.1. Isolamento de RNA total

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 e macrófagos primários humano derivado de PBMC foram cultivados em placas de 6 poços e após estímulo ou não com *M. leprae*, os sobrenadantes foram coletados e, o RNA total das células foi

extraído com 1 mL do reagente Trizol (Life Technologies, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As biópsias de lesão de pele dos pacientes BT e LL (1/4 de uma biopsia obtida com um *punch* de 6 mm), também foram extraídas em 1 mL com Trizol. Resumidamente, o material foi homogeneizado em vórtex por alguns segundos antes da adição de 200  $\mu$ L de clorofórmio (Merck Whitehouse Station, NJ, U.S.A.). Posteriormente as amostras foram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para um novo tubo e misturada a 500  $\mu$ L de isopropanol (Sigma). Após incubação por no mínimo 24 horas a -70°C, as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C para recuperação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado cuidadosamente com 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 10000 x g por 10min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi removido, o sedimento seco à temperatura ambiente por cerca de 10 min e, então, ressuspenso em água deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC, Life Technologies, EUA).

O RNA total purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EUA) e sua integridade avaliada através de eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,2 % (Life Technologies) em presença de formaldeído. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230}$  apresentaram valores >1,8. O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

### **3.6. Tratamento com DNase**

Com o objetivo de eliminar DNA genômico contaminante, o RNA total purificado (1-2 $\mu$ g) de cada uma das amostras foi tratado com DNase. Para tal, foi utilizado o kit DNA-free™ (Life Technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30  $\mu$ L. Inicialmente, em tubos de 0,6 mL, foi adicionado 3  $\mu$ g de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10X e 1

$\mu\text{L}$  da enzima DNase, seguido por incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Após o período de incubação, foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação enzimática. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 min, agitando os tubos manualmente 2-3 vezes durante esse período para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a  $10000 \times g$  por 2 min, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado.

### **3.7. Síntese de cDNA**

Cada amostra foi dividida em alíquotas de  $5\mu\text{L}$  para realização das reações de síntese de cDNA. O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas de RAW 264.7 mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III<sup>®</sup> (Life technologies, EUA) em uma reação com volume final de  $20 \mu\text{L}$ . Inicialmente, 500 ng de RNA e de Oligo (dT) ou Random Primer (para análise da expressão gênica de micobactérias) foram incubados a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 min para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação foi adicionado o tampão da enzima em concentração de 1X, dNTP 0,125 mM, DTT 10 mM, 40 U de RNase Out<sup>®</sup> e 200 U da enzima Superscript III<sup>®</sup>. Essa mistura foi incubada a  $50^{\circ}\text{C}$  por 1 hora para transcrição, seguida de incubação a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 min para inativação da enzima. Após a incubação as amostras foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.8. Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (qPCR)**

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativo-qPCR) foram realizadas utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems) para IGF-I e 16S ou Sybr Green (Applied Biosystems) para PTGE2 e PTGES2 com os pares de iniciadores específicos para as seqüências codificantes dos genes IGF-I PTGE2, PTGES2 e GADPH de camundongo.

Para análise da expressão gênica de IGF-I, o ensaio foi realizado em placas ópticas de 96 poços onde adicionou-se 12,5 mL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), 1,25 µL dos iniciadores (20x), 2 µL de cDNA e 9,25 µL de água em um volume final de 25 µL por poço. As amostras foram analisadas no programa Prism Sequence Detection System 7000 no termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). As temperaturas usadas foram: desnaturação inicial a 95°C/10 min, 40 ciclos de desnaturação de 95°C/15 seg, anelamento a 60°C /1 min e extensão a 72 °C/1 min, e extensão final a 72°C/2 min.

Para análise da expressão gênica de PTGE2 e PTGES2 foi realizada qPCR utilizando-se o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Para isso, foi realizada uma reação de 20 µL, onde foram adicionados 5 µL de cDNA, 0,25 µM de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystems). As reações foram incubadas no sistema de qPCR StepOne Plus<sup>®</sup> (Applied Biosystems). Condições da reação: 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse e o gene constitutivo GAPDH.

### **3.9. qPCR para determinação da viabilidade do *M. leprae*.**

Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi realizado qPCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S do bacilo, com algumas modificações, como descrito por Martinez *et al.* (2009). A partir das células infectadas com o bacilo viável foi extraído o DNA e o RNA, onde este último foi reversamente transcrito em cDNA com a utilização de Random Primer, conforme descrito anteriormente. Os níveis de RNAr 16S foram normalizados pela detecção de DNA 16S. Os oligonucleotídeos utilizados foram os descritos em Martinez *et al* 2009. Para a extração de DNA total a fase intermediária do Trizol foi armazenada a -20° C e posteriormente utilizada para a extração de DNA total nos experimentos de determinação da viabilidade do *M. leprae* em células RAW infectadas. Em cada



tubo foi adicionado 100  $\mu$ L de tampão TE (5mM Tris; 0,1 mM EDTA) e 150  $\mu$ L de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada no aparelho FastPrep<sup>®</sup> 120 (MP biomedical, EUA) na configuração de velocidade a 6,5 metros por segundo (m/s) por 45 seg. Os tubos foram incubados no gelo por 5 min e centrifugados a 12000 x g por 10 min à temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL contendo 300  $\mu$ L de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e armazenada a -70° C por no mínimo um dia. A fase orgânica resultante foi armazenada a -20° C para posterior extração de proteínas. Após a incubação, foi adicionado 2  $\mu$ L GlycoBlue<sup>®</sup> (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do pellet, e então centrifugados a 12000 x g por 30 min em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70% por centrifugação a 12000 x g por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por 15 min e ressuspensos em 20  $\mu$ L de água de vacina.

As reações de qPCR foram realizadas com 500 ng de DNA e cDNA em volume final de 20  $\mu$ L contendo TaqMan PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 0,1  $\mu$ M da sonda e 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo. 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<sup>®</sup>.

### 3.10. Análise dos dados de qPCR

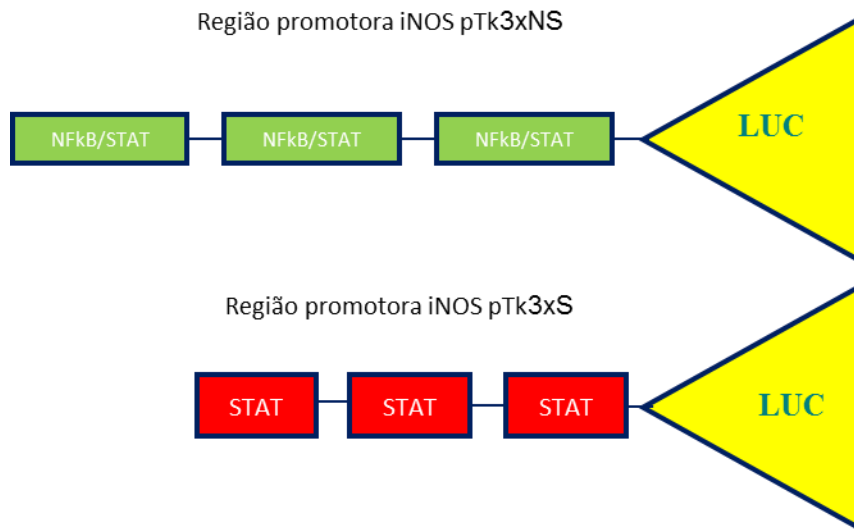
A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta C_T$ ) (Livak e Schmittgen, 2001). Inicialmente foi calculado o  $\Delta C_T$ , subtraindo-se os valores de  $C_T$  (do inglês *threshold cycle*, limiar do ciclo) do gene alvo dos valores de  $C_T$  do gene normalizador (GADPH). Uma vez determinado o  $\Delta C_T$  das amostras, foi escolhido como amostra normalizadora o cDNA referente à condição experimental de células não estimuladas. Para calcular o  $\Delta\Delta C_T$  foi

utilizada a seguinte fórmula: [ $\Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (amostra normalizadora)]. Por fim, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi utilizado também o método descrito acima. Entretanto, para o cálculo do  $\Delta C_T$ , subtraiu-se os valores de  $C_T$  referentes ao cDNA de 16S dos valores de DNA genômico 16S. A condição experimental de células RAW 264.7 infectadas com *M. leprae* sem tratamento foi selecionada como amostra normalizadora. Após se obter o  $\Delta\Delta C_T$ , os valores de expressão relativa de 16S foram obtidos aplicando-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

### 3.11. Ensaio de gene repórter

Para investigar a atividade transcricional do promotor da enzima iNOS, o sistema de gene repórter foi utilizado empregando plasmídeos recombinantes contendo o gene codificante para a luciferase sob controle deste promotor. Macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placa de poliestireno com 24 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço) e transfectadas com  $1 \mu\text{g}$  do plasmídeo pTk3xNS (com 3 elementos responsivos para NF- $\kappa$ B/STAT1 na região promotora) ou com  $1 \mu\text{g}$  do plasmídeo pTk3xS (com 3 elementos responsivos para STAT1 na região promotora) (figura 10), gentilmente cedido pelo Dr. David Geller, utilizando como reagente a Lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Para a normalização do ensaio de luciferase foi usado o plasmídeo pRL-CMV (Promega). Após a transfecção, as células foram tratadas ou não com 50ng/mL de IGF-I recombinante (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA), IFN- $\gamma$  10ng/mL (R & D Systems) ou anti-IGF-1R (R & D Systems  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS, lisadas de acordo com o protocolo fornecido pelo kit Dual Luciferase System (Promega), seguido de análise em TD-20/20 Luminômetro (Turner Designs, Sunnyvale, Ca, USA). A atividade da luciferase foi medida através de Luciferase Assay System (Promega), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Cada transfecção foi realizada em triplicata em 3 experimentos independentes.



**Figura 11.** Desenho esquemático da região promotora de iNOS presente nos plasmídeos pTk3xNS e pTk3xS. Acima é representado em verde as 3 regiões correspondentes ao elemento responsivo para NF-κB/STAT1, abaixo em vermelho a representação das 3 regiões correspondentes ao elemento responsivo para STAT1.

### 3.12. Obtenção de lisado total de Macrófagos

O extrato proteico total foi obtido após lise com tampão RIPA (Current protocols in molecular biology), contendo inibidores de proteases (Mini Complete – Roche) por 15 minutos no gelo. No caso das biópsias de pacientes, as proteínas foram extraídas a partir da fase aquosa resultante da extração de DNA pelo reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Os extratos celulares foram passados em seringa de insulina 1 mL para a quebra do DNA e centrifugados a 14.000 x g por 15 min a 4°C. Em seguida, o material sedimentado foi descartado e as proteínas contidas no sobrenadante foram quantificadas com ácido bicinconínico (kit BCA – Pierce, EUA), utilizando albumina bovina sérica (BSA) como proteína padrão. As amostras foram imediatamente aplicadas em gel de poliacrilamida ou estocadas a - 20°C até o momento de uso.

### **3.13. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)**

Neste procedimento utilizou-se 25 µg de proteínas diluídas em tampão de amostra e fervidas durante 5 minutos foram aplicadas de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada em gel de acrilamida a 8,5% em tampão de corrida Tris 0,25M/Glicina 19,2M contendo 0,1% de SDS, utilizando-se cuba Might Small Transphor (Amersham Biosciences) sob amperagem de 25mA por aproximadamente 2 horas. O padrão de massa molecular (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) utilizado é composto pelas seguintes proteínas: Miosina 212 kDa, Macroglobulina 170 kDa, β- Galactosidade 116 kDa, Transferrina 76 kDa e Ácido Glutâmico Desidrogenase 53 kDa.

### **3.14. Análise da expressão de proteínas por “Western blot”**

As proteínas foram eletroforicamente transferidas sob amperagem de 400 mA por 2 hora a 4°C para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra – GE Healthcare) em tampão de transferência (Tris-Glicina em 10% Metanol) e montado na cuba de transferência. Logo após, a membrana foi corada com solução de amido black (0,1% amido black, 10%metanol, 2% ácido acético) a confirmação da eficiência da transferência e identificação do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi lavada com TBS-0,1%Tween (TBS-T) e bloqueada com solução de TBS-T/3% leite desnatado (Molico) por duas horas. Logo após a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo policlonal anti-iNOS2 (1:200; Santa Cruz, CA, EUA), anticorpo monoclonal anti-β-Tubulina (1:200; Santa Cruz), policlonal anti-SOCS3 (1:200; Santa Cruz), monoclonal anti-GAPDH (1:500; Santa

Cruz) ou anti-STAT1 fosforilada (pSTAT1)(cell signaling) diluídos em TBS-T/5% leite ou BSA. Após esse período a membrana foi lavada duas vezes com TBS-T por 5 minutos e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma) diluídos 1:40.000 e 1:30.000, respectivamente. A membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T e transferida para o cassete de revelação.

Para revelação, o cassete foi levado à câmara escura e adicionado sobre a superfície da membrana 200µl do substrato quimioluminescente ECL-Advance Western blotting Detection kit (GE Healthcare). As membranas foram expostas a um filme fotográfico (Hyperfilm ECL, GE Healthcare), em câmara escura e a revelação foi feita utilizando-se procedimento convencional.

Os gráficos de análise densitométrica apresentados foram realizados utilizando o programa ImageJ. Os resultados foram gerados a partir do cálculo da razão entre valores de densitometria do perfil de bandas da  $\beta$ -tubulina, GAPDH, SOCS3, pSTAT1 e iNOS e, expressos em unidades arbitrárias.

### **3.15. Dosagem de Nitrito**

A produção de óxido nítrico, em sobrenadantes de culturas de macrófagos RAW 264.7 foi determinada pela dosagem de nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ) utilizando o método de Griess (Green *et al.*, 1982). Este método consiste na adição de 100 µL da amostra ou da curva padrão para o desenvolvimento da reação colorimétrica.

Um volume de 100 µL de concentrações conhecidas de nitrito de sódio em concentrações que variam de 5µM a 100µM – para elaboração da curva padrão – ou amostras de sobrenadantes de culturas de macrófagos RAW 264.7 ou macrófagos primários foram adicionados à placas de 96 poços e misturados a 200 µL de reagente de Griess (Sigma) por 15 min, à temperatura ambiente. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro a 570nm e os resultados foram analisados com base na construção de curva padrão.

### 3.16. Dosagem de IGF-I

A quantificação de IGF-I em sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 tratados ou não com as micobactérias por 48 h foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o kit Duo Set IGF-I (R&D Systems), seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, placas de 96 poços pré-recobertas com anticorpo primário anti-IGF-I receberam 50  $\mu$ L de concentrações conhecidas de IGF-I recombinante – (utilizado como proteína padrão para a geração da curva) ou 50  $\mu$ L amostra de sobrenadantes de culturas de células estimuladas conforme descrito acima. A placa permaneceu incubada por 2 h a 4°C, seguida de 4 lavagens com tampão fornecido pelo kit. Logo após, foi adicionado o anticorpo secundário policlonal e realizada incubação de 1 h a 4°C. Os poços foram lavados mais 4 vezes e incubados com substrato por 30 min à temperatura ambiente, protegido da luz. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2N) e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 450 nm. Após a leitura os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão.

### 3.17. Dosagem de PGE<sub>2</sub>

A quantificação de prostaglandina E<sub>2</sub> foi realizada através de ensaio imunoenzimático de competição, seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante do kit (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA).

As placas pré-recobertas com anti-IgG de camundongo produzida em carneiro receberam quantidades definidas de anticorpo monoclonal anti-PGE<sub>2</sub>, da amostra de sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados ou não, e de uma forma de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase. Esta PGE<sub>2</sub> conjugada compete pelos sítios de ligação de PGE<sub>2</sub> nos anticorpos monoclonais com PGE<sub>2</sub> da amostra experimental de forma a estabelecer um equilíbrio de ligações químicas tal que a ligação de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase será menor quanto maior for a concentração de PGE<sub>2</sub> da amostra experimental. A seguir foi

dado ao sistema um reagente que contém substrato para a enzima acetilcolinesterase (acetiltiocolina) que, ao sofrer o processo enzimático pela acetilcolinesterase, gera tiocolina, que por sua vez se conjuga ao ácido 2-nitrobenzóico produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, que tem absorvância ótima a 412 nm.

A análise dos resultados foi feita de forma inversa à intensidade do sinal da absorvância, já que quanto maior a concentração de PGE<sub>2</sub> na amostra, menor será a ligação de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase e, portanto, menor a intensidade de absorvância. Os resultados de absorvância foram convertidos em concentrações de PGE<sub>2</sub> pela comparação dos dados gerados pela curva padrão, construída com concentrações conhecidas de PGE<sub>2</sub>.

### **3.18. Análise gráfica e estatística**

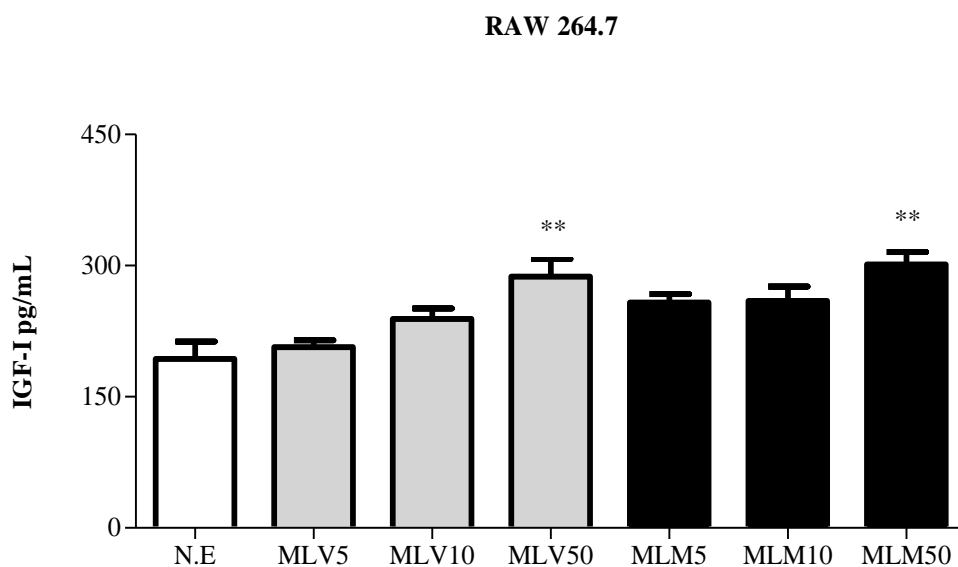
Os resultados foram representados como média  $\pm$ E. P. M. (Erro padrão ou desvio padrão da média) e avaliados estatisticamente pelo teste “t student” para comparação entre duas variáveis. Os valores foram considerados significativos quando o valor de  $p$  foi igual ou inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Para análise estatística dos resultados deste estudo, foi utilizado o programa GraphPad Prism vs 5.0.

## 4. Resultados

### 4.1. A infecção *in vitro* pelo *M. leprae* regula positivamente a expressão de IGF-I em macrófagos RAW 264.7 de forma dose dependente.

Dados anteriores obtidos no mestrado demonstraram a capacidade do *M. leprae* em induzir o aumento da expressão e da secreção de IGF-I em macrófagos RAW 264.7, sempre em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 50:1, (Silva, L.R. et al., 2009). Dando prosseguimento aos estudos de indução de IGF-I pelo *M. leprae*, realizamos ensaios *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7, e infectamos essas células com diferentes MOI com a proposta de comparar a indução da expressão de IGF-I entre o *M. leprae* viável e *M. leprae* morto. Macrófagos RAW foram estimulados com *M. leprae* vivo ou morto em diferentes MOI. Após 48 horas de estímulo, produção de IGF-I pelas células foi determinada. Na figura 12 é possível observar que tanto a bactéria viva como morta induziram um aumento significativo da produção de IGF-I nessas células, contudo somente na MOI de 50.1. Esse aumento foi de aproximadamente 48,7% pela bactéria viva e de 56% pela bactéria morta em relação às células não estimuladas. Não foi observada diferença significativa na indução de IGF-I entre o *M. leprae* vivo e morto nas diferentes doses. Estes dados demonstram que o IGF-I secretado pelos macrófagos frente ao estímulo com *M. leprae* independe da viabilidade do bacilo.



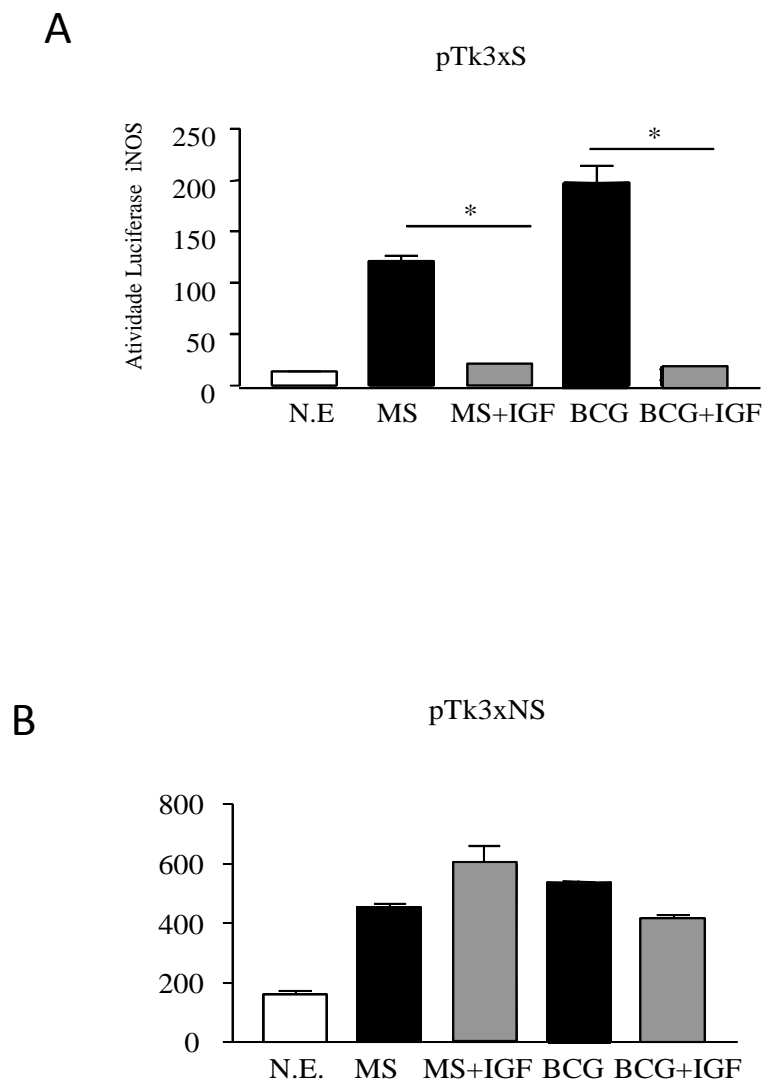


**Figura 12. Avaliação da secreção de IGF-I por macrófagos RAW 264.7 estimulados com micobactérias.** Ensaio mostrando os valores de IGF-I quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA) nos sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 não estimulados (NE), ou incubados por 48 horas com *M. leprae* vivo (MLV) ou, *M. leprae* morto (MLM) em diferentes MOI. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 e 6 experimentos, respectivamente, realizados em duplicata. Análise estatística: ANOVA, \*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.3. IGF-I inibe o aumento da atividade do promotor de iNOS induzida por *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* em macrófago murino.**

Dados da literatura tem evidenciado a participação de IGF-I na modulação negativa da produção de NO em macrófagos murinos infectados com *Leishmania amazonensis* (Vendrame, 2007). Corroborando este dado, nós já havíamos observado um efeito inibitório promovido por esse hormônio na expressão e iNOS e consequente produção de NO induzida por *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG *in vitro* em células RAW 264.7 (Silva, L. R. 2009). Sendo assim, nosso próximo passo foi avaliar a atividade do promotor de *iNOS* em resposta às micobactérias na presença ou ausência de IGF-I exógeno. Para tal, ensaios de gene repórter foram realizados. Na região promotora do gene codificante para a enzima iNOS se encontram sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição. Dados da literatura identificaram a região entre -5kb e -6kb do promotor do gene *iNOS* como importante para o aumento da sua transcrição em humanos, e evidenciaram NF- $\kappa$ B e STAT1 são os principais fatores de transcrição responsáveis por mediar a transcrição desse gene frente ao estímulo por citocinas (Zhong Guo *et al*, 2007). Nessa etapa do trabalho macrófagos RAW 264.7 foram transfectados com dois plasmídeos diferentes, cada um contendo uma região específica do promotor da enzima iNOS, a saber: o plasmídeo pTk3xNS contém três cópias do elementos responsivos para STAT1/NF- $\kappa$ B, e o plasmídeo pTk3xS com três cópias somente do elemento responsivo para STAT1. Todos os resultados foram normalizados usando o plasmídeo pRL-CMV normalizador contendo o gene da Renilla. Após a transfecção com estes plasmídeos as células foram pré-tratadas ou não com IGF-I recombinante e em seguida estimuladas ou não por 24 horas com *M. bovis* BCG ou *M. smegmatis* em um MOI de 50.1.

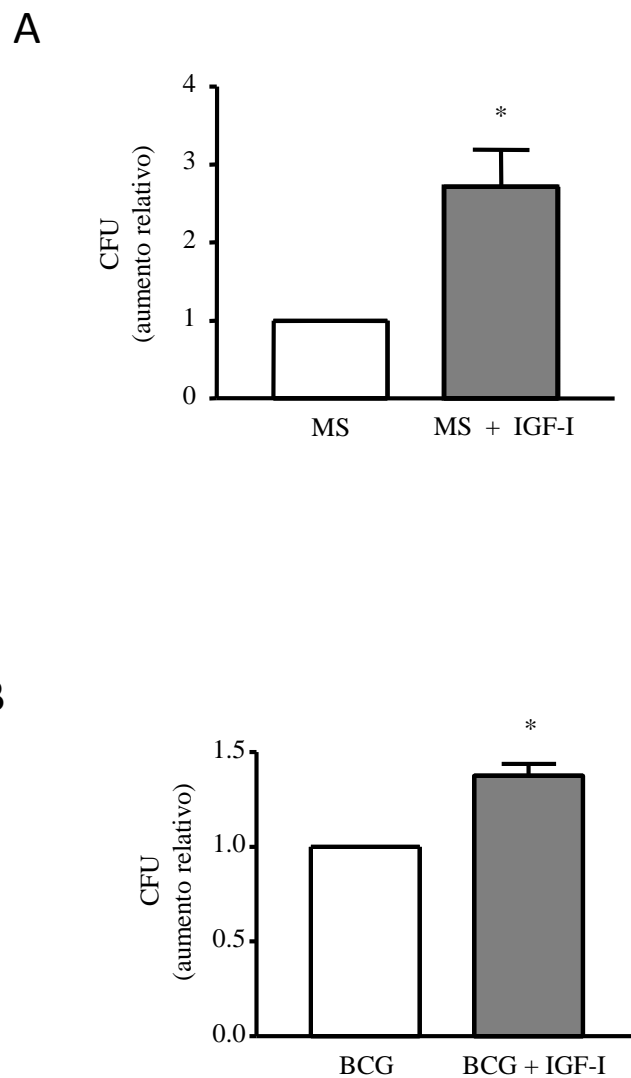
Foi possível observar que o aumento da atividade do promotor de iNOS induzida pelas micobactérias diminuiu drasticamente na presença de IGF-I somente quando o promotor contém unicamente elementos responsivos para STAT1 como mostra a figura 13A. Entretanto, isso só não foi observado no promotor que contém tanto elementos responsivos para NF- $\kappa$ B como STAT1, (figura 13B). Isso indica que o efeito do IGF-I na regulação negativa da expressão de iNOS é dependente da via de STAT1, mas não de NF- $\kappa$ B.



**Figura 13. Avaliação da atividade do promotor do gene *iNOS* em macrófagos RAW 264.7 estimulados com micobactérias após pré-tratamento para IGF-I.** As células foram transfectadas com o plasmídeo pTk3xS (A) ou pTk3xNS (B) contendo o gene da luciferase sob controle do promotor de *iNOS*, não estimuladas (NE), pré-tratadas ou não por 30 minutos com IGF-I recombinante 50ng/mL e estimuladas com *M. smegmatis* ou *M. bovis* BCG (MOI 50:1) por 24 horas. test-t \*  $p < 0,05$ . Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 1 experimento representativo realizado em triplicata de um total de 3 experimentos.

#### **4.4. O IGF-I favorece a sobrevivência intracelular de *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* em macrófagos.**

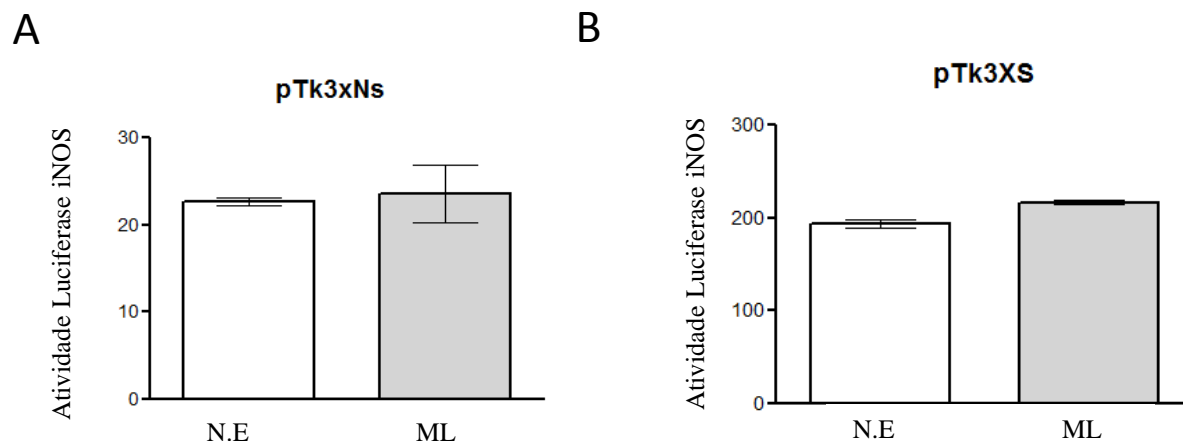
A produção de radicais livres de nitrogênio é fundamental para a eliminação das micobactérias pelos macrófagos. Como nossos resultados indicam que o IGF-I regula negativamente a produção de NO e a expressão de iNOS em nosso modelo de infecção por micobactérias. Nessa etapa do trabalho avaliamos o grau de sobrevivência das micobactérias frente ao tratamento com IGF-I. Para tal, os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados ou não com IGF-I e infectados com *M. bovis* BCG ou *M. smegmatis* ambos em um MOI de 50:1 por 48 horas. Em seguida, os macrófagos foram lisados e as bactérias do meio intracelular foram recuperadas e semeadas em meio específico 7H10. Após seu crescimento, o número de unidades formadoras de colônia (CFU) foi determinado. Nossos resultados mostram que na presença de IGF-I houve um aumento significativo no número de unidades formadoras de colônia indicando um aumento na viabilidade e sobrevivência de ambos *M. smegmatis* (aumento de aproximadamente 2,5 vezes) (Figura 14A) e *M. bovis* BCG (aumento de aproximadamente 0,5 vezes) (Figura 14B) no interior dos macrófagos. Estes dados sugerem que o IGF-I contribui para sobrevivência micobacteriana no interior da célula hospedeira, favorecendo a infecção.



**Figura 14. Avaliação da viabilidade intracelular do *M. smegmatis* e do *M. bovis* BCG em macrófagos RAW 264.7 tratados com IGF-I.** (A) A viabilidade intracelular do *M. smegmatis* (MS) e (B) *M. bovis* BCG (BCG) na presença ou ausência de IGF-I 50ng/mL foi avaliada através de Unidade Formadora de colônia (CFU) após 48 horas. Cada resultado representa a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos independentes realizados em triplicata e a significância estatística foi calculada por teste *t* de Student (\*  $p < 0.05$ ).

#### **4.5. O *M. leprae* estimula a produção de NO em macrófagos com bloqueio na sinalização de IGF-I.**

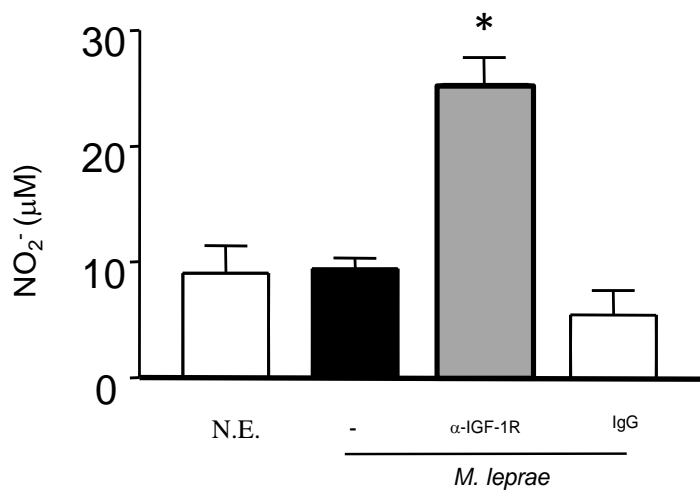
Em estudo anterior observamos a incapacidade do *M. leprae* em induzir a expressão da enzima iNOS em macrófagos RAW 264.7 e consequente produção de NO em macrófagos murinos, ao contrário de outras espécies de micobactérias (Silva, L. R. 2009). Esta característica do *M. leprae* já havia sido previamente relatada por Park *et al*, 1994. Para confirmar os dados obtidos em nosso trabalho anterior, utilizamos como ferramenta ensaios com gene repórter. Após a transfecção com os plasmídeos pTk3xNS e pTk3xS, as células foram estimuladas por 24 horas com *M. leprae* em MOI de 50 bactérias para cada célula na presença ou não de IGF-I recombinante e a atividade da luciferase foi medida utilizando luminômetro. Na figura 15A e 15B observamos que o *M. leprae* não induz o aumento da atividade em ambos os promotores utilizados nesse estudo, corroborando os dados de expressão da enzima iNOS e de secreção de NO previamente obtidos em células RAW 264.7 estimuladas com *M. leprae* (Silva, LR, 2009).



**Figura 15.** *M. leprae* não induz a atividade do promotor iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados *M. leprae*. Para os ensaios com gene repórter os macrófagos foram transfectados com o plasmídeo pTk3xS (A) ou pTk3xNS (B), não estimulados (NE) ou estimulados com *M. leprae* 50.1 por 24 horas. test-t \*  $p < 0,05$ . Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 1 experimento representativo realizado em triplicata em um total de 3 experimentos.

Como o *M. leprae* induz a produção de IGF-I por macrófagos, e este hormônio inibe a expressão da enzima iNOS, postulamos a hipótese de que o IGF-I poderia estar envolvido na não resposta ao *M. leprae* pelo macrófago. Para validar esta hipótese, medimos a produção de NO em resposta ao *M. leprae* (MOI 50:1) na presença de anticorpo neutralizante para o receptor de IGF do tipo 1 ( $\alpha$ -IGF-1R). Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados ou não com  $\alpha$ -IGF-1R, e após 48 horas de incubação o sobrenadante da cultura foi recolhido para dosagem de NO. Na Figura 16 é possível observar o aumento significativo da produção de NO em sobrenadante de macrófagos estimulados com *M. leprae* após tratamento prévio com  $\alpha$ -IGF-1R. Já os macrófagos tratados com IgG controle mostraram níveis de produção de NO semelhantes aos só tratados com *M. leprae*. Estes dados sugerem que a sinalização de IGF-I é importante na modulação negativa da atividade microbicida exercida pelo *M. leprae*.

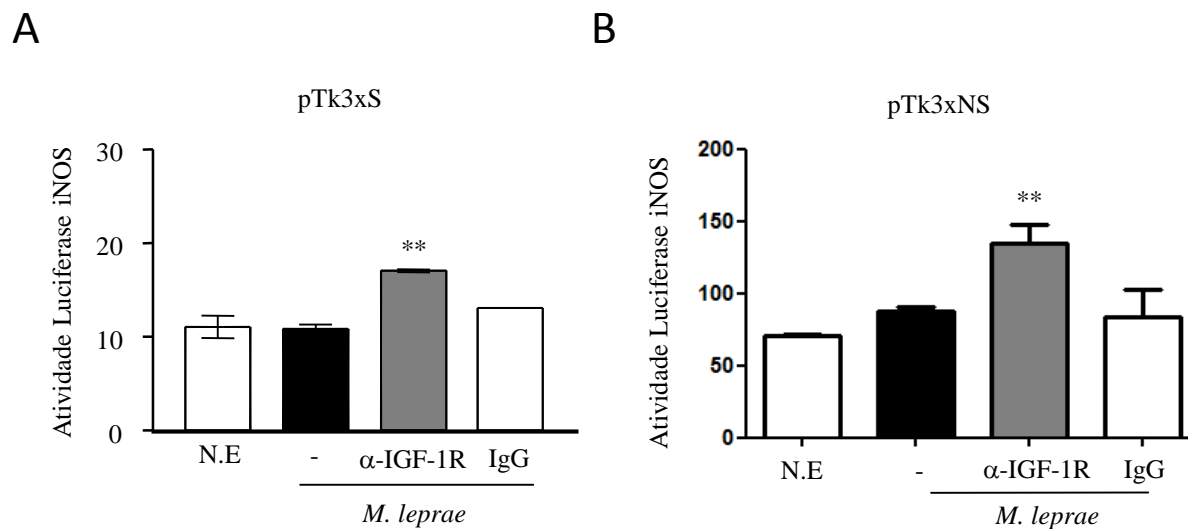




**Figura 16. Avaliação da produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com *M. leprae* e tratados com anticorpo neutralizante para IGF-I.** Ensaio mostrando os valores de NO através de dosagem de nitrito pelo método de Griess nos sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 não estimulados (NE), pré-tratados por 30 minutos com anticorpo neutralizante do receptor de IGF-I ( $\alpha$ -IGF-1R) ou com IgG controle e estimulados ou não com *M. leprae* em um MOI de 50.1 por 48 horas. Test-t \*  $p < 0,05$ . Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 experimentos realizados em triplicata.

#### **4.6. O *M. leprae* aumenta a atividade do promotor de iNOS na presença de bloqueador da sinalização de IGF-I**

Nosso próximo passo foi medir a atividade do promotor de iNOS em resposta ao *M. leprae* quando bloqueamos a sinalização de IGF-I. Para tal, culturas de macrófagos RAW 264.7 foram transfectadas com ambos plasmídeos pTk3xS e pTk3xNS, já descritos anteriormente. Em seguida as células foram pré-tratadas ou não com  $\alpha$ -IGF-1R e estimulados com *M. leprae* (MOI 50:1 por 24 horas. Na Figura 17A e 17B é possível observar que a presença do anticorpo neutralizante para o receptor de IGF-I acarretou um aumento da atividade em ambos os promotores de iNOS frente ao estímulo com *M. leprae*. Os dados de atividade de gene repórter estão de acordo com os resultados de produção de NO frente ao estímulo com *M. leprae* nas células pré-tratadas com  $\alpha$ -IGF-1R mostrados anteriormente. Esses resultados sugerem um papel da via de sinalização de IGF-I na regulação da produção de espécies reativas de nitrogênio (NO) e modulação do mecanismo microbicida do hospedeiro pelo *M. leprae*.

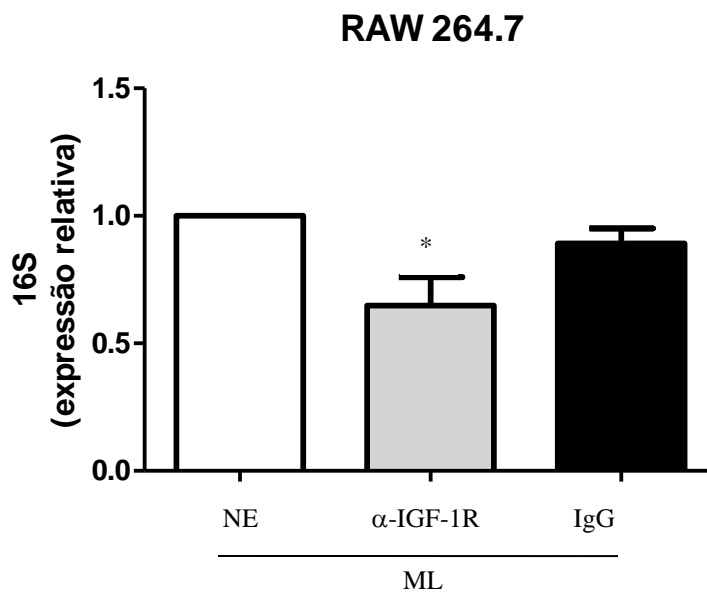


**Figura 17. Avaliação da atividade do promotor de iNOS em macrófagos RAW 264.7 estimulados com *M. leprae* após bloqueio da sinalização de IGF-I.** (A) Para os ensaios com gene repórter os macrófagos foram transfectados com o plasmídeo pTk3xS (A) ou pTk3xNS (B), não estimulados (NE) ou pré-tratadas por 30 minutos com  $\alpha$ -IGF-1R ou IgG controle e estimuladas com *M. leprae* 50:1 por 24 horas. test-t \*\*  $p < 0.001$ . Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 1 experimentos representativo realizado em triplicata em um total de 3 experimentos.

#### **4.7. O bloqueio da sinalização de IGF-I diminui a viabilidade intracelular do *M. leprae* em macrófagos**

O bloqueio da sinalização de IGF-I aumentou de forma significativa a produção de NO e atividade da região promotora de iNOS frente ao estímulo com *M. leprae*. Também já havíamos mostrado que o aumento da disponibilidade do IGF-I para os macrófagos favorece a sobrevivência de outras micobactérias. Agora, buscamos avaliar o grau de sobrevivência do *M. leprae* na ausência da ativação da via sinalização de IGF-I. Uma vez que o bacilo não pode ser cultivado *in vitro*, a estimativa da viabilidade intracelular do *M. leprae* dentro dos macrófagos foi determinada através de qPCR baseado na razão *M. leprae* 16S RNA por *M. leprae* 16S DNA, segundo protocolo estabelecido por Martinez *et al.*, 2009.

Neste ensaio, a cultura de macrófagos foi mantida a 33°C, já que esta é a temperatura ideal de incubação do *M. leprae* viável. Os macrófagos foram então pré-tratados ou não com  $\alpha$ -IGF-1R ou IgG controle, sendo posteriormente infectados com *M. leprae* em uma MOI 50:1 por 48 horas. Após esse período a análise da viabilidade intracelular foi medida através da expressão do gene 16S micobacteriano. Nas células tratadas com  $\alpha$ -IGF-1R ocorreu uma significativa diminuição da viabilidade intracelular do bacilo (aproximadamente 35 %) se comparado com as células não tratadas com  $\alpha$ -IGF-1R ou tratadas com o IgG controle (Figura 18A). Esses dados sugerem que o bloqueio da sinalização de IGF-I favorece a morte do *M. leprae* pelo macrófago.

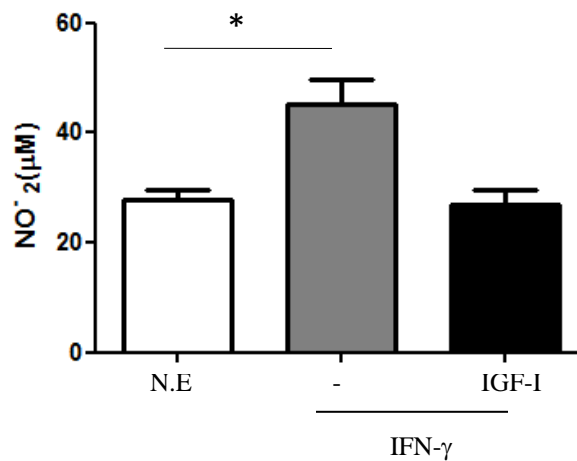


**Figura 18. Análise da viabilidade intracelular do *M. leprae* em macrófagos RAW 264.7 com bloqueio da sinalização de IGF-I.** (A) A viabilidade intracelular do *M. leprae* (ML) após 48 horas foi estimada a partir da razão entre 16S RNA e 16S DNA detectado por qPCR e o percentual de aumento ou diminuição determinado a partir da condição dos macrófagos não tratados (NE) ou pré-tratados com anticorpo neutralizante para o receptor de IGF-I ( $\alpha$ -IGF-1R) ou IgG controle. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos independentes realizados em duplicata e a significância estatística em relação as células não tratadas foi calculada por teste *t* (\*  $p < 0.05$ ).

#### **4.8. IGF-I inibe a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7**

Macrófagos ativados com IFN- $\gamma$  são capazes de promover a maturação do fagossoma. No fagolisossomo, as micobactérias são expostas a efetores microbicidas gerados por macrófagos ativados, como peptídeos anti-microbianos (AMP) e espécies reativas intermediárias de oxigênio e nitrogênio (Ismail N, *et al.* 2002. Gutierrez MG, *et al.* 2004).

Considerando-se que IFN- $\gamma$  desempenha papel central na ativação de mecanismos microbicidas em macrófagos infectados com micobactérias, buscamos investigar se o IGF-I seria também capaz de modular negativamente a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ . Nessa etapa do trabalho células RAW 264.7 foram pré-tratadas com IGF-I e estimuladas ou não com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$  recombinante por 48 horas. Na figura 19 é possível observar que na presença de IGF-I os macrófagos produziram níveis basais de NO em resposta ao estímulo com IFN- $\gamma$  comparado com as células estimuladas com IFN- $\gamma$  e não tratadas com IGF-I. O pré-tratamento com IGF-I bloqueou totalmente a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ . Esses dados indicam que o IGF-I inibe a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$  em macrófago murino.

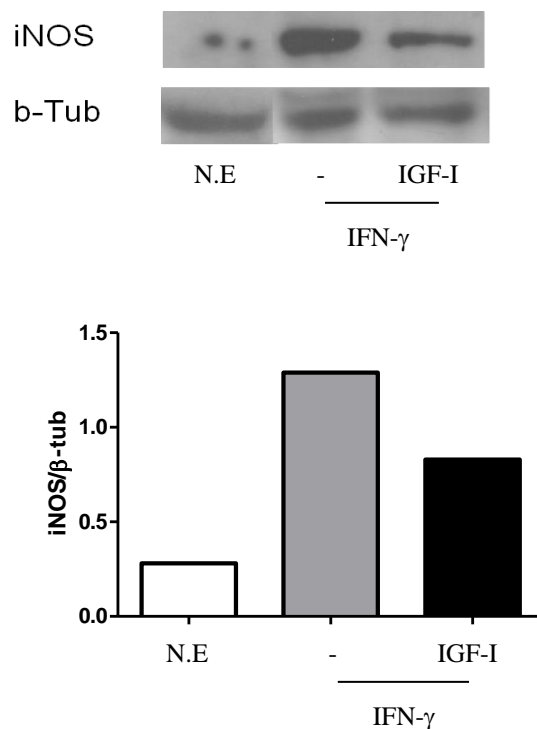


**Figura 19. Avaliação do efeito do IGF-I na produção de NO induzido por IFN- $\gamma$  em macrófagos RAW 264.7.** Quantificação da produção de NO através do método de Griess. Os macrófagos não foram estimulados (NE) ou foram pré-tratados por 30 minutos com IGF-I 50ng/mL e estimulados ou não com IFN- $\gamma$  10ng/mL por 48 horas. Test-t \*  $p < 0,05$ . Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de 5 experimentos realizados em duplicata.

#### **4.9. IGF-I inibe a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7.**

Como o IGF-I mostrou-se capaz de inibir a produção de NO por células RAW 264.7 em resposta a IFN- $\gamma$ , passamos a investigar se ocorre também uma modulação da expressão da enzima iNOS pelo IGF-I. Para tal, os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com IGF-I 50ng/mL e estimuladas ou não com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$ . Após um período de 48 horas de incubação as células foram lisadas e o extrato proteico submetido a técnica de Western blot, utilizando anticorpo anti-iNOS específico. Concordando com os dados anteriores de dosagem de NO, na presença de IGF-I recombinante ocorreu diminuição parcial (aproximadamente 40%) na expressão da enzima iNOS frente ao estímulo com IFN- $\gamma$  quando comparado com as células estimuladas com IFN- $\gamma$  e não tratadas com IGF-I (Figura 20A). A Figura 20B mostra o gráfico de análise densitométrica das bandas, utilizando a  $\beta$ -tubulina como gene normalizador. Esses dados mostram a capacidade do IGF-I de inibir a expressão da enzima iNOS induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos.

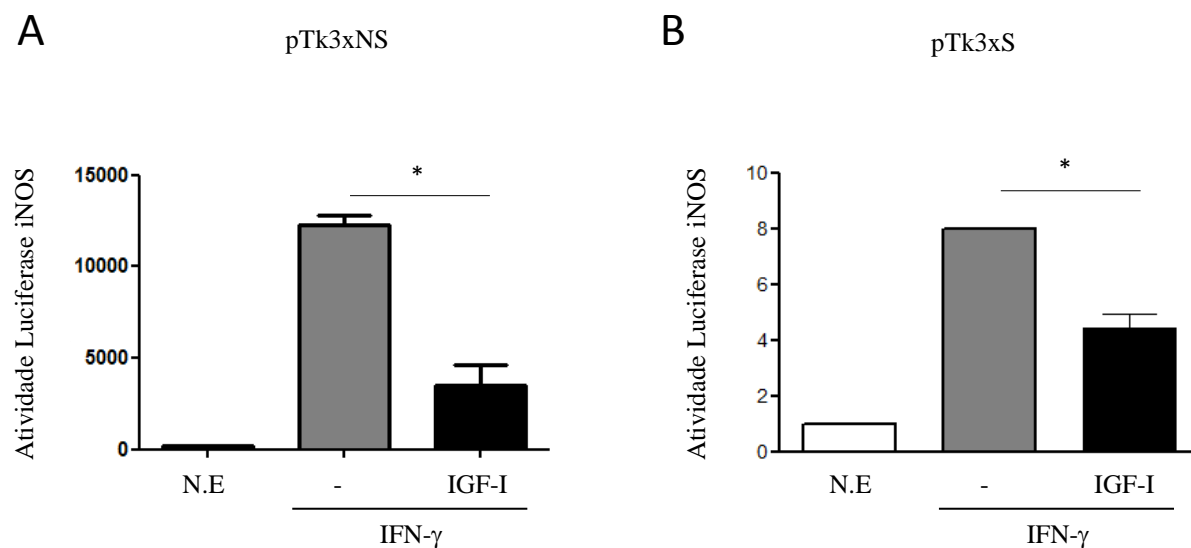




**Figura 20. Avaliação do efeito do IGF-I sobre a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos RAW 264.7.** (A) Ensaio de Western blot mostrando a expressão da enzima iNOS. Os macrófagos foram pré-tratados ou não (NE) por 30 minutos com IGF-I 50ng/mL e estimuladas com IFN- $\gamma$  10ng/mL por 48 horas. (B) Análise densitométrica das bandas mostrando a expressão relativa de iNOS em relação à  $\beta$ -tubulina. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 1 experimento representativo de um total de 3.

#### **4.10. IGF-I inibe o aumento da atividade transcricional do promotor de iNOS induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW 264.7.**

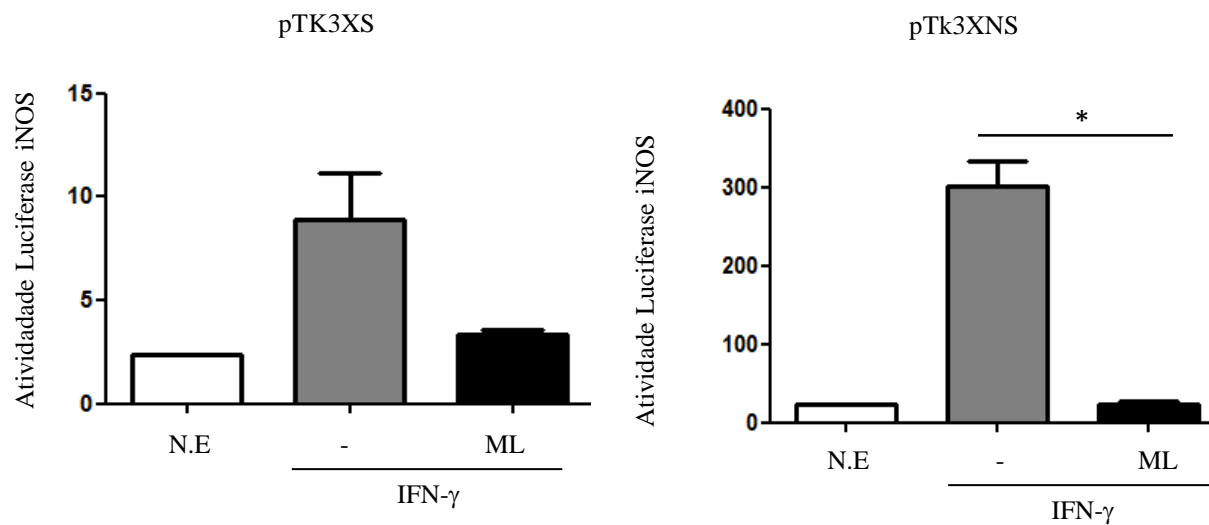
Afim de complementar nosso estudo de interferência do IGF-I na sinalização de IFN- $\gamma$ , investigamos ainda a ativação da região promotora de iNOS, realizamos ensaios de gene repórter utilizando os plasmídeos pTk3xS ou pTk3xNS. Os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados ou não com IGF-I e estimulados ou não com IFN- $\gamma$ . Após um período de 24 horas foi avaliada a atividade dos promotores de iNOS. Concordando com os dados anteriores, na presença de IGF-I recombinante ocorreu a diminuição na atividade do promotor de iNOS frente ao estímulo com IFN- $\gamma$  quando comparado com as células estimuladas com IFN- $\gamma$  e não tratadas com IGF-I (Figura 21A e 21B). Essa diminuição foi observada tanto no promotor que contém somente o elemento responsivo para STAT1, quanto com aquele que possui elementos responsivos para NF- $\kappa$ B e STAT1.



**Figura 21. Avaliação efeito do IGF-I sobre a atividade do promotor de iNOS em macrófagos RAW 264.7 tratados com IFN- $\gamma$ .** (A) Para os ensaios com gene repórter, os macrófagos foram transfectados com o plasmídeo pTk3xS ou pTk3xNS (B), não estimulados (NE) ou pré-tratados por 30 minutos com IGF-I e estimuladas com IFN- $\gamma$  10 ng/mL por 24 horas. test-t \*  $p < 0,05$ . Os dados representam a média  $\pm$  erro do desvio padrão de 1 experimento representativo realizado em triplicata em um total de 3 experimentos.

#### 4.11. Macrófagos infectados com *M. leprae* se mostram refratários à indução da atividade do promotor de iNOS por IFN- $\gamma$

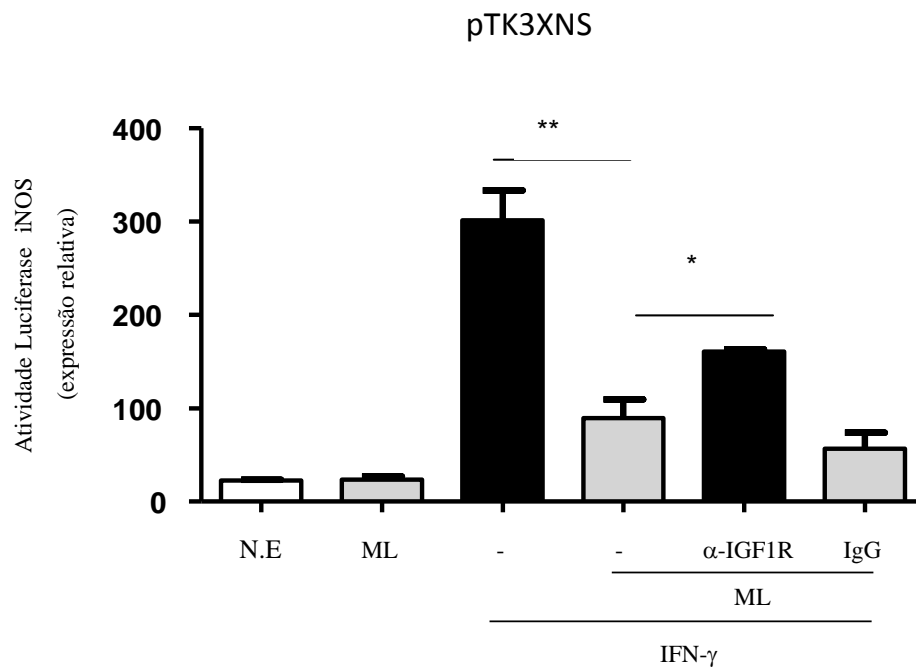
Macrófagos altamente infectados com *M. leprae* isolados de granuloma de camundongos atímicos são incapazes de serem ativados por IFN- $\gamma$  (Sibley e Krahenbuhl, 2009). Esta capacidade do *M. leprae* inibir a sinalização de IFN- $\gamma$  foi investigado em nosso modelo *in vitro*, utilizando ensaios com gene repórter. Para tal, as células foram transfectadas com ambos plásmídeos (pTk3xS ou pTk3xNS), e os macrófagos foram tratados por 6 horas com *M. leprae* (MOI de 50:1). Em seguida efetuamos a estimulação com IFN- $\gamma$  10ng/mL por 24 horas. Nossos resultados mostram que na presença de *M. leprae* os macrófagos responderam bem ao estímulo com IFN- $\gamma$ . Esses macrófagos apresentaram uma ativação do promotor baixa se comparado com os macrófagos não estimulados com *M. leprae* e submetidos ao tratamento com IFN- $\gamma$ . Ambos os plasmídeos forneceram resultados semelhantes (Figura 22A e 22B). Esses dados corroboram com a literatura e demonstram que o papel imunomodulador, exercido pelo *M. leprae* também ocorre em nosso modelo de infecção *in vitro* com os macrófagos RAW 264.7.



**Figura 22. Avaliação da expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos RAW 264.7 tratados ou não com *M. leprae*.** Ensaios com gene repórter onde os macrófagos foram transfectados com o plasmídeo pTk3xS (A) ou pTk3xNS (B) não estimulados (NE) ou tratadas com *M. leprae* (ML) 50:1 por 6 horas e posteriormente estimulados com IFN- $\gamma$  10 ng/mL por 24 horas. Test-t \*  $p < 0,05$ , Os dados representam a média  $\pm$  do desvio padrão de 1 experimento representativo realizado em triplicata em um total de 3 experimentos.

#### **4.12. O bloqueio da sinalização de IGF-I restaura parcialmente a capacidade do IFN- $\gamma$ em aumentar a atividade do promotor de iNOS em macrófagos murinos tratados com *M. leprae*.**

Nossa próxima pergunta foi investigar uma possível participação do IGF-I no efeito imunomodulador exercido pelo *M. leprae* na sinalização do IFN- $\gamma$ . Na tentativa de responder a essa questão, estimulamos os macrófagos por 6 horas com *M. leprae* 50:1. Em seguida pré-tratamos ou não as células com  $\alpha$ -IGF-1R ou anticorpo controle e após 30 minutos submetemos ou não as células ao estímulo com IFN- $\gamma$  por 24 horas. Na presença de *M. leprae* e  $\alpha$ -IGF-1R houve uma recuperação parcial da atividade do promotor frente ao estímulo com IFN- $\gamma$  (aproximadamente 23,7%) em comparação com as células tratadas com IgG controle Figura 23. Esses resultados sugerem a participação do IGF-I na modulação negativa pelo *M. leprae* da resposta efetora de macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ .

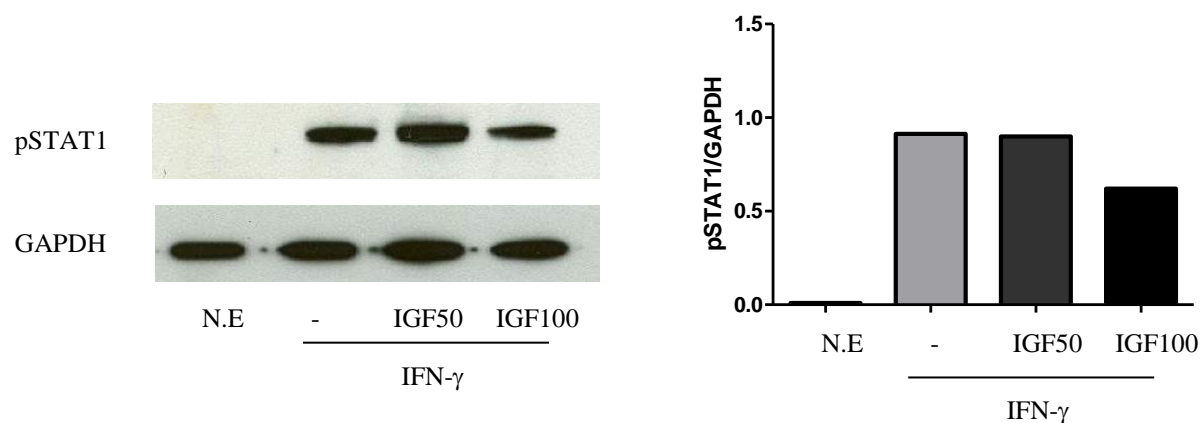


**Figura 23. Avaliação do efeito do bloqueio da sinalização de IGF-I sobre a expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos RAW 264.7 tratados com *M. leprae*.** Ensaio com gene repórter onde os macrófagos foram transfectados somente com o plasmídeo pTk3xNS, não estimulados (NE) ou estimulados com *M. leprae* (ML) 50.1 por 6 horas e posteriormente tratadas com IFN- $\gamma$  10 ng/mL por 24 horas na presença ou ausência de anticorpo neutralizante para o receptor de IGF-I ( $\alpha$ -IGF-1R) e anticorpo IgG controle. test-t \*  $p < 0,05$ . Os dados representam a média  $\pm$  do desvio padrão de 1 experimento representativo realizado em triplicata de um total de 3 experimentos.

#### 4.13. IGF-I inibe a fosforilação de STAT1 induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos.

A via de sinalização de IFN- $\gamma$  é mediada pela ativação de STAT1 que é fosforilada pelas proteínas kinases JAK1 e JAK2. A ativação de STAT1 pelo IFN- $\gamma$  promove sua translocação para o núcleo em sua forma homodimérica. No núcleo o homodímero STAT1/STAT1 se liga ao elemento responsivo GAS iniciando a transcrição de uma série de genes envolvidos na resposta inflamatória (Schoroder *et al*, 2004). Como nas etapas anteriores do nosso trabalho observamos um bloqueio parcial da ação do IFN- $\gamma$  pelo IGF-I, nosso próximo objetivo foi avaliar uma possível interferência desse fator de crescimento na via de sinalização IFN- $\gamma$ /JAK/STAT1. Para tal, os macrófagos RAW 264.7 foram pré-tratados com IGF-I 50ng/mL ou IGF-I 100ng/mL por 30 minutos e finalmente estimulados ou não com IFN- $\gamma$  por 15 minutos. Ao investigarmos o grau de fosforilação/ativação de STAT1 na presença de IGF-I através de Western blot, notamos uma diminuição dos níveis de fosforilação/ativação de STAT1 (figura 24A). Contudo, só foi possível observar essa diminuição quando usamos uma concentração de 100ng/mL de IGF-I. A análise densitométrica da intensidade das bandas através da relação pSTAT1/GAPDH é mostrada na figura 24B. Nossos dados sugerem que a regulação negativa da resposta ao IFN- $\gamma$  exercida pelo IGF-I pode decorrer em parte da interferência sobre fosforilação/ativação de STAT1.

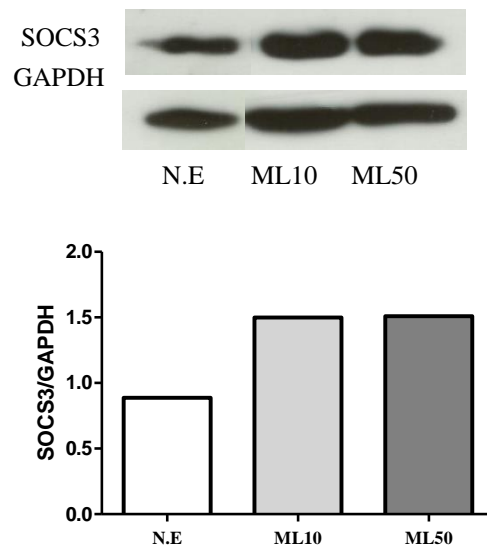




**Figura 24. Análise do efeito do IGF-I sobre a fosforilação/ativação de STAT1 induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos RAW 264.7.** (A). Detecção da fosforilação de STAT1 por Western blot em macrófagos não estimulados (NE) ou pré-tratados com IGF-I (50 ou 100ng/mL) e estimulados com IFN- $\gamma$  10ng/mL por 15 minutos. GAPDH foi utilizado como proteína de expressão constitutiva para o controle de carregamento no gel. (B) Análise densitométrica das bandas mostrando a ativação/fosforilação de STAT1 em relação à GAPDH. Os dados representam 1 experimento representativo de um total de 3 experimentos.

#### 4.14. *M. leprae* aumenta a expressão de SOCS3 em macrófagos RAW 264.7

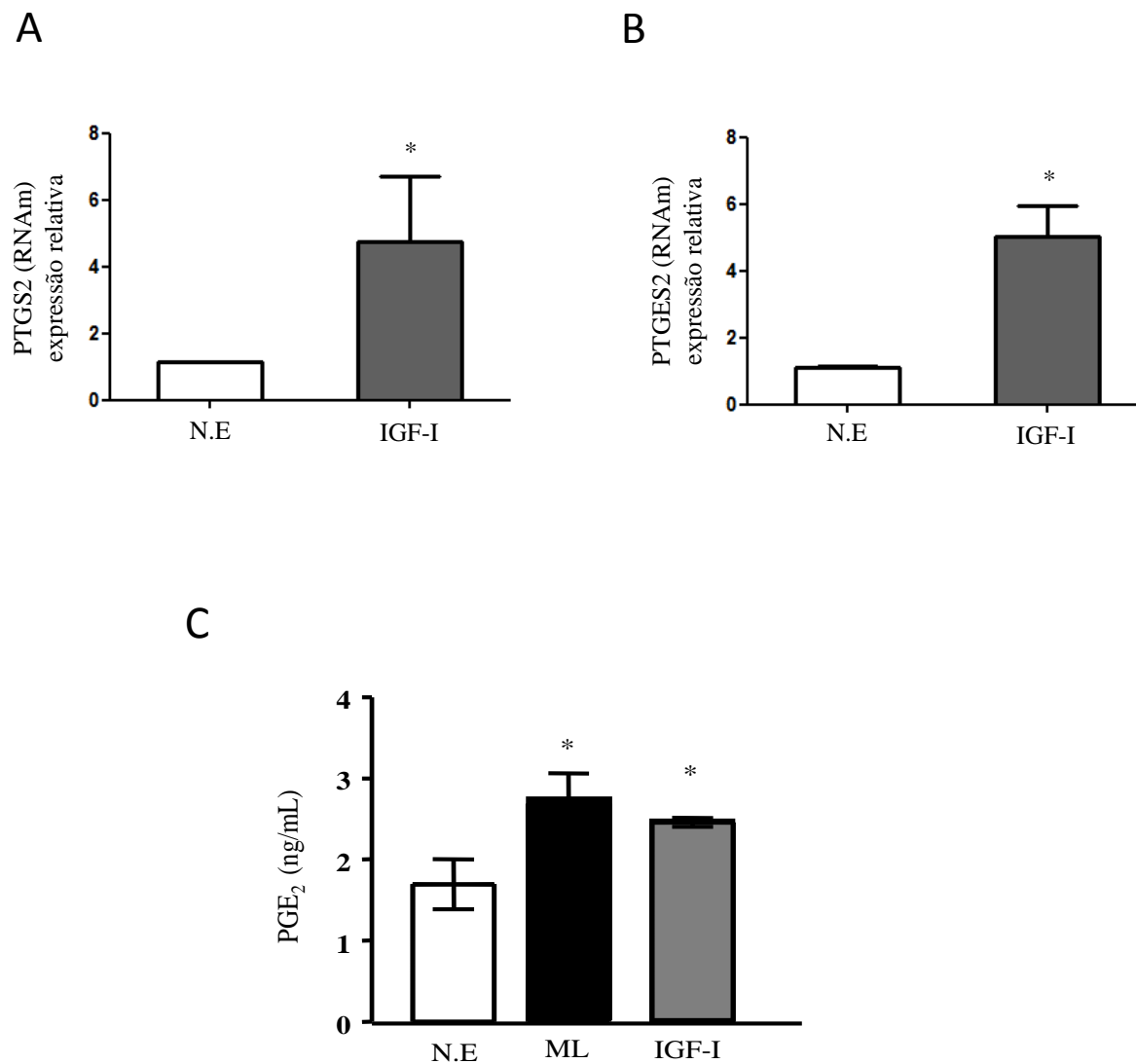
As proteínas SOCS têm sido descritas como importantes reguladores negativos da sinalização de citocinas. As SOCS são potentes inibidores das JAKs, que tornam-se incapazes de ativar as STATs, sendo importantes reguladores na inflamação (revisto por Ohara et. al, 2013). Já é bem descrito que IGF-I induz a expressão de SOCS1 e SOCS3 em células epiteliais murinas. Foi visto que SOCS3, que está envolvida na polarização de macrófagos, facilitando sua mudança para um fenótipo M2, mais permissiva a infecções intracelulares. (Holdbrooks et al, 2012). Nesta última etapa investigamos se o *M. leprae* é capaz de regular a expressão de SOCS3 *in vitro*. Macrófagos RAW 264.7 foram estimulados com *M. leprae* em diferentes MOI por 24 horas e a expressão de SOCS3 foi avaliada por Western blot utilizando anti-SOCS3. Na Figura 25A é possível observar que o *M. leprae* induz de forma dose resposta o aumento da expressão de SOCS3 *in vitro* após 24 horas.



**Figura 25. Análise da indução da expressão de SOCS3 por *M. leprae* em macrófagos RAW 264.7. (A).** Detecção da expressão de SOCS3 por Western blot em macrófagos não estimulados (NE) ou estimulados com *M. leprae* MOI 5:1 (ML5), 10:1 (ML10) e 50:1 (ML50). GAPDH foi utilizado como proteína de expressão constitutiva para o controle de carregamento no gel. Os dados representam um 1 experimento representativo de um total de 3 experimentos.

#### **4.15. IGF-I regula positivamente a expressão de enzimas envolvidas na produção de prostaglandina E<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7.**

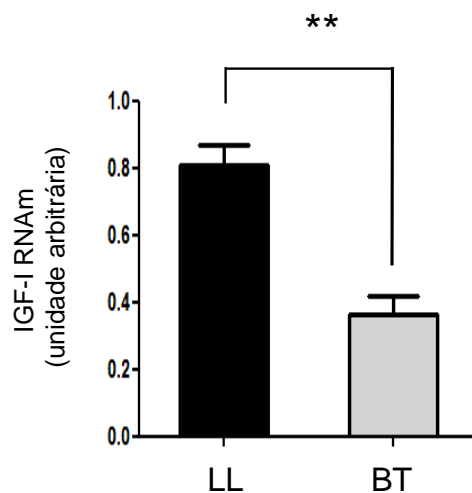
Demonstramos anteriormente que o IGF-I tem um papel imunomodulador frente ao IFN- $\gamma$ . A prostaglandina E<sub>2</sub> é um lipídeo derivado do ácido aracônico, produzido pelas enzimas ciclooxigenases 1 e 2 (COX1 constitutiva e COX2 induzida) e pela prostaglandina sintase E<sub>2</sub>. PGE<sub>2</sub> seletivamente suprime a função efetora de macrófagos e neutrófilos e a imunidade celular mediada por linfócitos TH1, promovendo uma resposta TH2, TH17 e de célula T regulatória (revisto por Pawel Kalinski, 2012). Dados da literatura já descreveram que o PGE<sub>2</sub> tem um importante papel imunomodulador na hanseníase lepromatosa (Misra, N. *et al*, 1995). Nesta etapa do trabalho avaliamos se o IGF-I é capaz de modular a expressão das enzimas envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub>, assim como da própria produção de PGE<sub>2</sub>. Para este propósito, macrófagos RAW 264,7 foram estimuladas por 24 horas com IGF-I, RNA total foi extraído e purificado, e os níveis de RNAm para PTGS2 (COX2) e PTGES2 (PGE sintase 2) quantificada por qPCR. A expressão de PTGS2 (Figura 26A) e PTGSE2 (Figura 26B) foram reguladas positivamente em macrófagos estimulados com IGF-I. Finalmente, medimos também a capacidade de IGF-I, assim como a do próprio *M. leprae*, em induzir a secreção deste prostanóide. Após 48 horas, o sobrenadante da cultura foi recolhido e a análise da produção de PGE<sub>2</sub> foi determinada utilizando ensaio imunoenzimático EIA. A figura 26C mostra que ambos IGF-I e *M. leprae* induzem a produção de PGE<sub>2</sub>, possivelmente contribuindo para a geração de um ambiente mais propício para a sobrevivência da micobactéria,



**Figura 26. Análise do efeito de IGF-I sobre a expressão de enzimas envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7.** qPCR com os valores de expressão gênica (expressão relativa) de PTGS2 (A) e PTGES2 (B) normalizados com GAPDH (deltaCt) em macrófagos RAW 264.7 não estimulados (NE) ou estimulados com IGF-I recombinante 50ng/mL por 24 horas. (C) Gráfico mostrando os níveis de PGE<sub>2</sub> em sobrenadantes de macrófagos tratados com IGF-I ou estimulados com *M. leprae* (ML) (50:1). Test-t \* p< 0,05. Os resultados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 4.16. Macrófagos presentes na lesão de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa (LL) expressam IGF-I

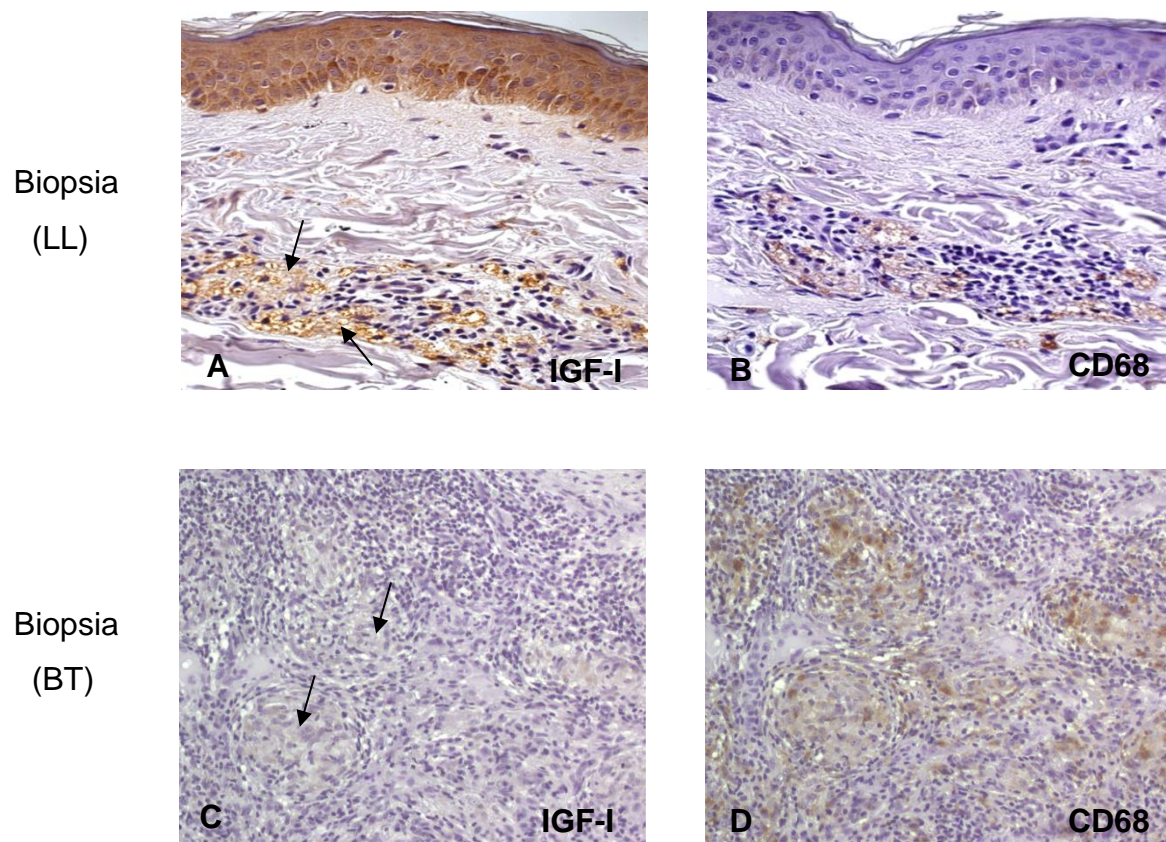
Até agora, nossos ensaios *in vitro* surgiram que o IGF-I modula negativamente os mecanismos de imunidade inata de macrófagos, tornando-os mais permissivos à infecção micobacteriana. Macrófagos com este perfil são característicos de lesões lepromatosas. Nestas lesões o infiltrado inflamatório é de tipo predominantemente histiocitário, com abundância de macrófagos com grande número de bacilos no seu interior. Em contrapartida, lesões do pólo tuberculoide mostram macrófagos diferenciados em células epitelioides, que, reunidas com linfócitos, formam granulomas com maior capacidade de destruir os bacilos (Coura, 2005). Nosso próximo objetivo foi investigar a expressão de IGF-I *in vivo* por macrófagos infectados com *M. leprae*. Primeiramente fizemos um estudo comparativo da expressão de RNAm para IGF-I em lesões de pele de pacientes LL (n=9) e BT (n=7) através de qPCR. A expressão relativa foi calculada, subtraindo-se os valores do gene alvo (IGF-I) dos valores do gene normalizador (GADPH). No resultado obtido em unidades arbitrárias, pode ser verificado um aumento significativo da expressão de IGF-I em biópsia de pele dos pacientes LL (aumento de aproximadamente 2 vezes) em comparação com as biópsias de pele dos pacientes do polo BT (figura 27).



**Figura 27. Análise comparativa da expressão de IGF-I em lesão de pele de pacientes lepromatosos e tuberculoide.** Análise quantitativa da expressão do RNAm de IGF-I através de qPCR nas lesões de pele de pacientes LL (9 indivíduos) e BT (7 indivíduos). Para análise da expressão relativa de IGF-I nas biópsias de pele, inicialmente foi calculado o  $\Delta C_T$ , subtraindo-se os valores de  $C_T$  do gene alvo dos valores de  $C_T$  do gene normalizador (GADPH). test-t \*\*  $p < 0.001$ .

Complementando os dados acima, secções provenientes de lesões de pele em pacientes BT e pacientes LL foram coradas com hematoxilina e eosina e marcadas com anticorpo para CD68, um marcador específico para macrófagos, e com anticorpo anti-IGF-I. É possível observar nas lesões dos pacientes tuberculóides (BT), um infiltrado granulomatoso com células epitelióides circundadas por um halo linfocitário e nas lesões de pacientes do pólo lepromatoso (LL) um infiltrado constituído basicamente por macrófagos altamente vacuolados rodeando os vasos sanguíneos localizados na derme superior. De acordo com os dados mostrados na figura 27, nas lesões de pele dos pacientes LL foi observada uma maior positividade para IGF-I quando comparada as lesões de pele dos pacientes do polo BT. De forma interessante, a positividade para IGF-I nas lesões lepromatosas se sobrepôs à marcação para CD68, evidenciando macrófagos espumosos IGF-1 positivos (figura 28 A,B), sugerindo que o IGF-I está sendo produzido preferencialmente por estas células na lesão. Já na lesão BT, as células epitelióides características desta lesão, expressam CD68 (figura 28D), mas são negativas para IGF-1 (figura 28C). Esses dados sugerem que ocorre uma maior expressão de IGF-I em lesões de pele de pacientes LL comparado com as lesões dos pacientes BT e que os macrófagos são as principais células produtoras deste hormônio na lesão.

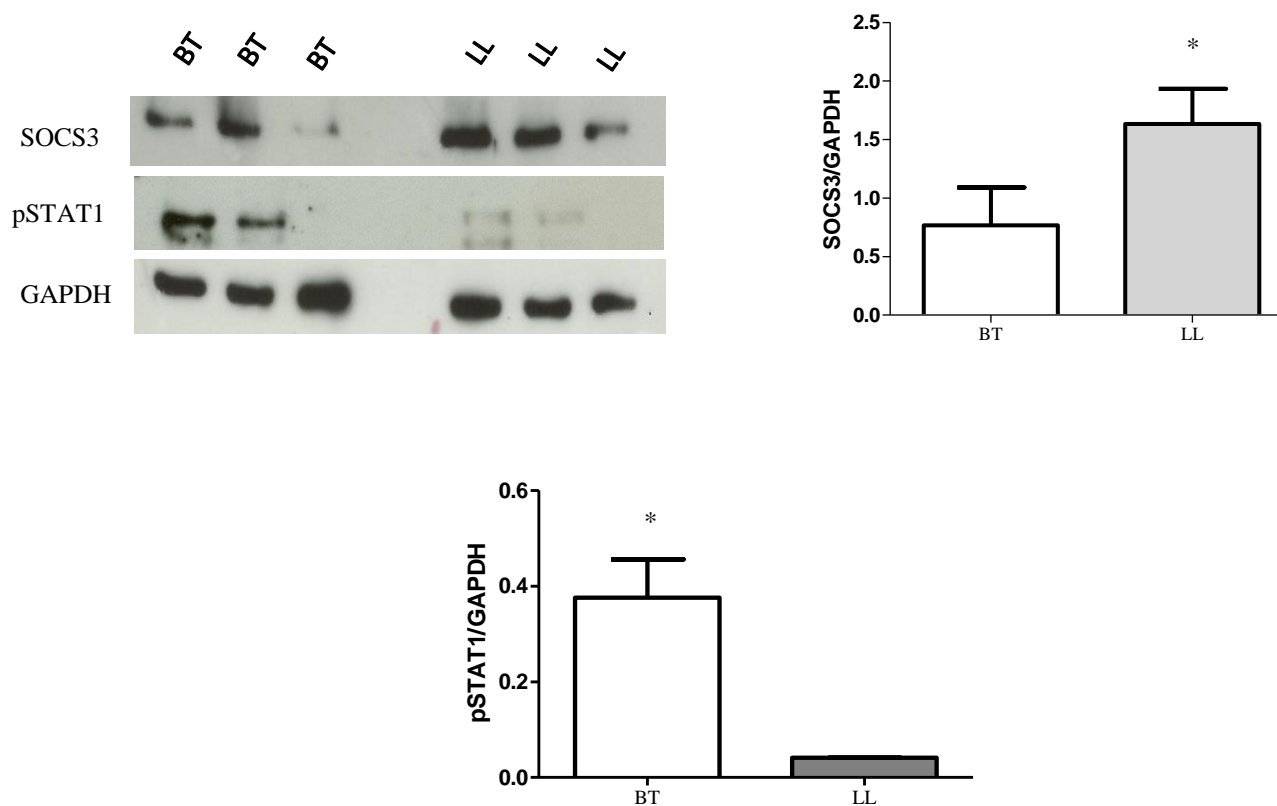




**Figura 28.** Imunorreatividade para IGF-1 e CD68 em secções histológicas adjacentes de pele de pacientes LL (A,B) e BT (C,D). Macrófagos vacuolados IGF-positivos em torno de vasos na derme superior (setas em A). A secção adjacente (B) mostra que as células IGF-positivas são CD68-positivas. Na lesão BT, as células epitelióides características da lesão, expressam CD68 (D), mas são negativas para IGF-1 (setas em C). (aumento 40x).

#### **4.17. Os níveis de SOCS3 se encontram aumentados, e da forma fosforilada de STAT1 diminuídos em lesão de pele de pacientes com hanseníase lepromatosa.**

Visto que o *M. leprae* foi capaz de induzir o aumento da expressão de SOCS3 em macrófagos em nosso modelo *in vitro*, buscamos avaliar o perfil de expressão de SOCS3 em lesões de pele de pacientes do polo BT e LL. Para responder essa pergunta, realizamos a extração das proteínas totais presentes em lesões de pele de 3 pacientes BT e 3 pacientes LL e avaliamos os níveis de expressão de SOCS3 por Western blot. Curiosamente, observamos uma alta expressão de SOCS3 nas lesões de pele de pacientes LL quando comparada com as lesões de pacientes BT, (figura 29A). Como SOCS3 também está relacionada com a inibição de STAT1, verificamos ainda o nível de fosforilação/ativação de STAT1 nas lesões de pele desses pacientes. Nossos dados indicam uma menor fosforilação/ativação de STAT1 nas lesões LL, comparado com as lesões BT (figura 28A). Nas figuras 29B e 29C é possível observar com clareza essa diferença através da análise densitométrica da média de intensidade das bandas. Esses dados sugerem que o aumento de SOCS3 leva a uma regulação negativa da ativação de STAT1 em lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa.



**Figura 29. Análise da expressão de SOCS3 e da ativação de STAT1 em biópsia de pele de pacientes BT e LL.** (A) Detecção da expressão de SOCS3 e da ativação de STAT1 por Western blot em biópsia de pele de pacientes do polo tuberculósido (BT), e pacientes do polo lepromatoso (LL). GAPDH foi utilizado como proteína de expressão constitutiva para o controle de carregamento no gel (B). Análise densitométrica das bandas mostrando a expressão relativa de SOCS3 (B) e STAT1 fosforilado (C) em relação à GAPDH. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de 3 pacientes LL e 3 pacientes BT. test-t (não-pareado) \*  $p < 0,05$ .

## 5. Discussão

A hanseníase e a tuberculose são doenças causadas pelo *M. leprae* e *M. tuberculosis* respectivamente, constituindo ainda um grave problema de saúde pública mundial. As micobactérias estão entre os mais importantes microrganismos patogênicos, e apesar de passados mais de um século do descobrimento de seus agentes etiológicos, estas doenças continuam associadas a altos níveis de morbidade e mortalidade. Micobactérias virulentas, como *M. leprae* e *M. tuberculosis*, são capazes de subverter a função microbicida dos macrófagos, sobreviver e se multiplicar no interior destas células. As micobactérias são, por exemplo, capazes de inibir a fusão do fagossoma ao lisossoma, evitando assim a acidificação da vesícula contendo o patógeno e sua exposição a enzimas hidrolíticas, favorecendo sua sobrevivência e replicação no interior dessas células (revisto por Rodhe *et al.*, 2007; Ehrt e Schnappinger, 2009).

Os macrófagos têm um importante papel no sistema imune do hospedeiro contra a infecção causada pelo *M. leprae*, participando no processamento e apresentação de antígenos, secreção de citocinas e na função primária de eliminação do patógeno. Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas presentes na pele e mucosa respiratória, são possivelmente as primeiras células do sistema imune ao entrar em contato com o *M. leprae*. Também foi descrita a capacidade desta micobactéria em inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo em células de Schwann, alvos preferenciais da infecção pelo bacilo, e em macrófagos RAW 264.7 proporcionando um nicho favorável para sua sobrevivência (Alves *et al.*, 2004). Foi visto ainda que o bacilo é capaz de induzir o aumento da secreção de IGF-I em resposta a infecção pelo *M. leprae* nas células de Schwann. Esse mecanismo protege essas células da morte por apoptose, o que favorece a manutenção do nicho favorável para sobrevivência e crescimento do bacilo no hospedeiro (Rodrigues *et al.*, 2010). Esta indução representaria uma importante estratégia de sobrevivência e persistência do bacilo de Hansen no

nervo devido às propriedades anti-apoptóticas e anti-inflamatórias deste hormônio no tecido nervoso (Syroid *et al*, 1999 e revisado por Venters *et al*, 2000).

Trabalhos realizados na década de 1990 mostraram que macrófagos presentes em sítios inflamatórios constituem fontes importantes de IGF-I (Rom, *et al*, 1988, Rom e Paakko, 1991). O IGF-I produzido pelos macrófagos teria importante papel no reparo tecidual em situações fisiológicas, assim como na fibrose observada em processos patológicos através do aumento da proliferação de fibroblastos e produção excessiva de colágeno (Nagaoka, 1990; Wynes *et al*, 2003). Esse fator de crescimento, também produzido por macrófagos, tem sido, implicado na patogenia de doenças pulmonares intersticiais como a fibrose pulmonar idiopática (Homa *et al*, 1995).

Há poucos relatos da literatura da participação do IGF-I em doenças infecciosas. Gomes e colaboradores descreveram que o IGF-I contribui para a infecção de *Leishmania amazonensis*, favorecendo seu crescimento dentro de macrófagos em lesões de leishmaniose cutânea e em ensaios experimentais *in vitro* (Gomes *et al.*, 2000). Neste estudo o IGF-I favoreceu o crescimento do parasita em macrófagos aumentando a expressão e ativação da Arginase1 do próprio parasita, além do seu efeito sobre a arginase na célula hospedeira. Essa modulação afeta o metabolismo de L-arginina que é o substrato compartilhado entre Arginase1 e NOS2 (iNOS), o que foi demonstrado pelos baixos níveis de NO após estímulo com IGF-I. Foi demonstrado ainda que IGF-I favorece a infecção por *Leishmania* atuando tanto como um fator de crescimento para o próprio parasita, como modulando a resposta inflamatória local e bloqueando a ativação de macrófagos (Vendrame *et al.*, 2007).

Compreender o papel do IGF-I na interação *M. leprae*-macrófago, incluindo a possível participação de mediadores inflamatórios, é uma questão relevante, a qual resolvemos explorar em nosso trabalho. Primeiramente avaliamos a capacidade do *M. leprae* de induzir a produção de IGF-I em macrófagos murinos da linhagem Raw264.7. Durante a dissertação de mestrado havíamos verificado que no modelo de estudo proposto, o *M. leprae* foi capaz de induzir um significativo aumento da expressão e secreção de IGF-I *in vitro* no MOI de 50.1, o

que foi reafirmado no presente trabalho (figura 12A). Essa indução independe da viabilidade do bacilo (figura 12A). Em trabalho anterior havíamos observado que o BCG também era capaz de induzir a secreção de IGF-I por macrófagos. Já *M. smegmatis*, espécie avirulenta, foi incapaz de induzir a secreção de IGF-I (Silva, L. R. 2009). É importante mencionar que aumento da ativação da via de sinalização de IGF-I independe do aumento da secreção desse fator de crescimento pela célula, podendo ser medida de forma indireta pela avaliação da expressão de IGFBP5 (Tang, *et al*, 2011). Os mecanismos que regulam a expressão de IGF-I pelos macrófagos ainda são pouco conhecidos (Wynes, 2003). Dentre os fatores que estimulam a produção de IGF-I por macrófagos estão o TNF, IL-1 $\beta$  e PGE-2 (Noble *et al*, 1993; Furnier *et al*, 1995). Curiosamente, todos estes mediadores são produzidos pelos macrófagos em resposta ao *M. leprae* (Sibley e Krahenbuhl, 1988; Suzuki *et al*, 1993) e poderiam, assim, estar envolvidos na indução de IGF-I pelo bacilo.

Para estudar a participação do IGF-I sobre a ativação de macrófagos na resposta imune inata frente à infecção micobacteriana, utilizamos como célula hospedeira a linhagem macrófagos murinos RAW 264.7, um modelo celular largamente empregado em ensaios funcionais de função efetora de macrófagos medida principalmente através da produção de NO (Raschke *et al*, 1978).

Nossos dados anteriores atestaram a capacidade do IGF-I em modular negativamente a função dos macrófagos, avaliando o seu efeito na indução da expressão da enzima iNOS e conseqüentemente na produção de NO em resposta à *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG (Silva, L. R. 2009). De modo interessante, nos macrófagos estimulados com BCG e *M. smegmatis* foi possível observar que o NO induzido por essas micobacterias foi reduzido praticamente ao nível basal nas células pré-tratadas com IGF-I, indicando que o esse fator de crescimento é capaz de interferir/bloquear a geração de NO em resposta a estas micobactérias. A redução na produção de NO teve uma correlação direta com a expressão da enzima iNOS que também mostrou-se reduzida frente ao pré-tratamento das células com IGF-I (Silva, L.R. 2009).

Para confirmar os dados obtidos anteriormente e entender quais vias de sinalização envolvidas nessa modulação da atividade microbicida, inicialmente passamos a investigar o efeito da adição exógena de IGF-I sobre a atividade da região promotora da enzima iNOS frente ao estímulo com *M. smegmatis* ou *M. bovis* BCG em macrófagos RAW 264.7. Dados da literatura evidenciaram que NF- $\kappa$ B e STAT1 são os principais fatores de transcrição responsáveis por mediar a transcrição do gene *iNOS* em humanos frente ao estímulo por citocinas (Zhong Guo *et al*, 2007). Assim, utilizamos um sistema de gene repórter utilizando dois promotores, o primeiro contendo 3 elementos responsivos para STAT1 e o segundo contendo 3 elementos responsivos para NF- $\kappa$ B/STAT1. De forma interessante, a expressão de atividade do promotor induzida por *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG diminuiu drasticamente após adição de IGF-I, exógeno, entretanto isso só foi observado no promotor que contém elemento responsivo para o fator de transcrição STAT1 (Figura 13A). Curiosamente o mesmo não ocorreu no promotor que contém elementos responsivos para STAT1/NF- $\kappa$ B (Figura 13B). Nossa hipótese é que efeito do IGF-I na regulação negativa da expressão de iNOS induzida por *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG seja dependente da modulação da ativação de STAT1. Possivelmente, no promotor STAT1/NF- $\kappa$ B, somente o NF- $\kappa$ B seja suficiente para manter a atividade da luciferase, mesmo na ausência ou na diminuição da ativação de STAT1, uma vez que ambas micobacterias ativam este fator transcricional em macrófagos (Mendes *et al*, 2009)

Embora nosso conhecimento sobre a regulação recíproca entre a produção de NO e IGF-I em macrófagos ainda esteja incipiente, estudos recentes na lesão hepática durante o quadro de sepse indicam uma inibição recíproca e direta entre ambos. Na sepse provocada por bactérias Gram negativas, LPS é responsável pelas principais alterações fisiológicas observadas, dentre estas, um aumento nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e um concomitante decréscimo de IGF-I circulante, este último essencialmente produzido pelos hepatócitos. Um estudo recente mostrou que a inibição da expressão de IGF-I por hepatócitos induzida por LPS é mediada principalmente pelo NO produzido em consequência da indução de iNOS pelo LPS (Priego *et al*, 2004; Priego *et al*, 2006). Por outro

lado, estudos *in vivo* mostram que a administração de IGF-I em ratos desafiados com LPS e D-galactosamina inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, assim como a expressão de iNOS no fígado, reduzindo a injúria tecidual (Hijikawa *et al*, 2008). Finalmente, podemos constatar também que em macrófagos RAW 264.7, tanto LPS quanto IFN- $\gamma$  inibem a produção basal de IGF-I (dados não mostrados).

Já é bem descrito na literatura que o NO tem um papel importante na eliminação de micobactérias por macrófagos ativos (Jordão *et al*, 2008). Tendo em vista a capacidade do IGF-I de inibir a produção deste mediador, avaliamos sua contribuição para persistência e sobrevivência das micobactérias no interior de macrófagos. Notadamente, a adição de IGF-I exógeno aumentou significativamente a viabilidade e a sobrevivência intracelular de ambos *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG em macrófagos RAW 264.7 (Figura 14A e 14B). A diminuição de NO, um dos principais indicadores de atividade microbicida em macrófagos murinos, seguida do aumento da persistência micobacteriana no interior da célula hospedeira promovida pelo tratamento com IGF-I pode contribuir para o persistência/desenvolvimento da infecção. Em macrófagos alveolares humanos a produção de espécies reativas de nitrogênio não é crucial na eliminação de micobactérias virulentas como *M. tuberculosis* (Miller *et al*, 2004). Em nosso trabalho utilizamos a análise da produção de NO como um marcador de ativação clássica e de atividade microbicida de macrófagos. Entretanto, o favorecimento da sobrevivência das micobactérias no interior dos macrófagos em um ambiente com alta disponibilidade de IGF-I, não necessariamente ocorre devido a diminuição da ação efetora de NO.

Park e colaboradores já haviam descrito a incapacidade do *M. leprae* em induzir um aumento significativo na produção de NO, ao contrário de outras espécies de micobactérias (Park *et al*, 1994). Como esperado, o *M. leprae* não induziu *per se* o aumento da atividade da região promotora de iNOS em ambos pTk3xS e pTk3xNS (figura 15A 15B), corroborando com os dados de expressão da enzima iNOS e de secreção de NO previamente obtidos (Silva, L. R. 2009). O fato de macrófagos não produzirem NO ou não induzirem a expressão de iNOS em resposta a infecção pelo *M. leprae* pode evidenciar um efeito inibitório da



função efetora dessas células promovido pelo bacilo. Assim, nos questionamos se o IGF-I induzido pelo *M. leprae* seria suficiente para induzir esse efeito modulador. Nossa próxima estratégia foi bloquear parcialmente a sinalização de IGF-I utilizando anticorpo neutralizante para o receptor de IGF do tipo 1 ( $\alpha$ -IGF-1R). Nossos dados mostraram um importante aumento da produção de NO pelos macrófagos estimulados com *M. leprae* após tratamento prévio com  $\alpha$ -IGF-1R (figura 16), acompanhado do aumento da atividade do promotor de iNOS (Figura 17A e 17B). Isso indica que na ausência da sinalização de IGF-I o *M. leprae* tornou-se capaz de estimular o macrófago que reestabeleceu parcialmente sua capacidade efetora frente ao estímulo bacteriano. Em seguida avaliamos a viabilidade intracelular do bacilo e constatamos que o bloqueio da sinalização de IGF-I veio acompanhado de uma significativa diminuição da viabilidade intracelular do *M. leprae* (figura 18). Esses dados reforçam que a sinalização de IGF-I é importante na modulação negativa da atividade microbicida exercida pelo *M. leprae*. Consequentemente, o aumento da produção de IGF-I induzida na infecção parece ser relevante na geração/manutenção de um fenótipo do macrófago permissivo à sobrevivência e multiplicação micobacteriana.

Considerando-se que IFN- $\gamma$  desempenha papel central na ativação de mecanismos microbicidas, avaliamos também no presente trabalho a capacidade de IGF-I de modular a ativação clássica de macrófagos induzida por IFN- $\gamma$ . O pré-tratamento com IGF-I bloqueou totalmente a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$  (figura 19) seguida de uma inibição parcial da expressão da enzima iNOS induzida por IFN- $\gamma$  (figura 20A e 20B). O total bloqueio da produção de NO pode ser explicado, não só pela diminuição da expressão de iNOS, mas pelo fato de que o IGF-I também é capaz de induzir o aumento da expressão de arginase 1 (Vendrame *et al*, 2007). A arginase 1 compete com a iNOS pelo substrato L-arginina, catabolizando para L-ornitina, que é direcionada ao ciclo da uréia. O IFN- $\gamma$  se liga ao seu receptor e ativa JAK1 e JAK2 que ao serem ativadas recrutam e ativam a STAT1. Avaliamos ainda se esse efeito era dependente exclusivamente da ativação de STAT1. Curiosamente, a diminuição da atividade da luciferase, foi observada tanto no promotor que contém elemento responsivo para STAT1,

quanto a que possui elemento responsivo para NF- $\kappa$ B/STAT1. (Figura 21A e 21B). No estímulo com IFN- $\gamma$  é possível ver que essa modulação negativa está relacionada exclusivamente da ativação de STAT1, já que o NF- $\kappa$ B não faz parte de sua via de sinalização. Macrófagos são ativados geralmente em resposta a citocinas, com destaque especial para IFN- $\gamma$  que desempenha um papel crítico na eliminação de patógenos intracelulares e controle das infecções causadas por micobactérias (revisto por Kaufmann, 2002). É descrito na literatura que IFN- $\gamma$  regula negativamente a expressão de IGF-I em macrófagos murinos agindo na sinalização intracelular dependente de STAT-1 (Arkins *et al*, 1995). A interferência recíproca entre o IGF-I e citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  vem sendo descrita na literatura no contexto de diferentes tecidos incluindo o sistema nervoso central onde a produção de IGF-I está relacionada com a prevenção da injúria tecidual (Connor, *et al*, 2008).

Macrófagos infectados com *M. leprae* isolados a partir de granulomas de camundongos atímicos se apresentam funcionalmente alterados e incapazes de serem ativados por IFN- $\gamma$  (Sibley e Krahenbuhl, 1988). Em acordo com os dados da literatura, na presença de *M. leprae* os macrófagos RAW 264.7 também não responderam ao estímulo com IFN- $\gamma$ , o que foi refletido na diminuição da atividade do promotor com ambos os plasmídeos (Figura 22A e 22B). O mecanismo supressor exercido pelo *M. leprae* frente ao estímulo com IFN- $\gamma$  ainda não é bem compreendido. Seguindo adiante, buscamos investigar se a sinalização do IGF-I está relacionada com esse efeito supressor da micobactéria sobre a via de IFN- $\gamma$ . Ao bloquearmos a sinalização de IGF-I na presença de IFN- $\gamma$ , os macrófagos infectados com *M. leprae* recuperaram parcialmente a capacidade de responder ao estímulo com IFN- $\gamma$ . Isso foi observado através da medida de atividade do promotor de iNOS, dependente de STAT1 ou de STAT1/NF- $\kappa$ B, figura 23. A próxima pergunta foi saber como IGF-I interfere na sinalização de IFN- $\gamma$ . A análise da fosforilação/ativação de STAT1 revelou que o IGF-I reduziu os níveis de fosforilação desse fator de transcrição, contudo foi somente evidenciado utilizando uma alta dose de IGF-I (100ng/mL) (figura 24A). É provável que essa regulação

negativa da resposta ao IFN- $\gamma$  exercida pelo IGF-I seja devido a interferência sobre a ativação de STAT1, contudo não parece ser exclusivamente por esse mecanismo.

Recentemente foi mostrado que no modelo experimental de infecção por *Leshimania major* que o IGF-I foi capaz de inibir a produção de NO em macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$  (Reis *et al*, 2013), entretanto nosso trabalho foi além ao demonstrar a modulação exercida pelo IGF-I também sobre a expressão da enzima iNOS e sobre a região promotora da iNOS.

Candidatos potenciais seriam as proteínas Supressoras de Sinalização de Citocinas (SOCS) que têm sido descritas como importantes reguladores negativos da sinalização de citocinas, principalmente SOCS1 and SOCS3 que são descritas como potentes inibidores da ativação das STATs (revisto por Ohara *et. al*, 2013). Nossos dados mostraram que o *M. leprae* induziu de forma significativa o aumento da expressão de SOCS3 de maneira dose dependente, figura 25B. Dados preliminares (não mostrados) sugerem que IGF-I é capaz de induzir o aumento da expressão de SOCS3 em macrófagos RAW 264.7. O fato de à semelhança do *M. leprae*, o IGF-I ser um bom indutor da expressão de SOCS3 reforça o papel imunoregulador desse fator de crescimento, e sua possível interferência na sinalização de IFN- $\gamma$  na infecção pelo *M. leprae*. Já é bem descrito que *M. tuberculosis* é capaz de induzir a expressão de SOCS1 e SOCS3 em macrófagos (Masood, *et al*, 2013). Também tem sido que IGF-I induz a expressão de SOCS1 e SOCS3 em células epiteliais murinas, e SOCS1 em mioblastos (Ebong *et al*, 2004 e Inaba *et al*, 2005).

O estímulo com *M. leprae* ou IGF-I induziu o aumento da produção de PGE<sub>2</sub> nos macrófagos RAW 264.7 (figura 26C). A capacidade desse fator de crescimento aumentar os níveis de PGE<sub>2</sub> nos levou a investigar a expressão das enzimas envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub>. A expressão de RNAm para PTGS2 (COX2) e PTGES2 (PGE<sub>2</sub> sintase) foi regulada positivamente pelo IGF-I em macrófagos (figuras 26A e B). Isso mostra que esse fator de crescimento contribui para o aumento da produção desse mediador lipídico, favorecendo um microambiente mais propício para a sobrevivência da micobactéria.

PGE<sub>2</sub> é produzido em altos níveis em camundongos atímicos infectados com *M. leprae* (Sibley e Krahenbuhl, 1988). Outro fato é que PGE<sub>2</sub> possui papel imunomodulador inibitório e em altas concentrações tem um significativo efeito imunossupressor, promovendo uma diminuição na proliferação de linfócitos, diminuição da atividade de células “natural killer”, diminuição na expressão de MHC II e desativação de macrófagos (Philips *et al*, 1991; Goto *et al*, 1983; Snyder *et al*, 1982; Edwards *et al*, 1986). PGE<sub>2</sub> é produzida majoritariamente por macrófagos, agindo como um inibidor da atividade citolítica de macrófagos ativado com IFN- $\gamma$  ou LPS (Snyder *et al*, 1982). Dados recentes indicam que o PGE<sub>2</sub> é preferencialmente sintetizado em organelas denominadas de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados com BCG (D’Avila *et al*, revisto por Bozza *et al*, 2009). Sibley e Krahenbuhl, 1988 relataram a participação de PGE<sub>2</sub> como mediador da desativação funcional de macrófagos infectados com *M. leprae*. Além disso, a infecção por *M. leprae* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, sítios de produção de eicosanóides, em macrófagos murinos e humanos (Mattos *et al.*, 2010). BCG e *M. leprae*, mas não *M. smegmatis*, induzem a formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos (D’Avila *et al*, 2006; Mattos *et al.*, 2010). A formação de corpúsculos lipídicos na célula hospedeira, induzida pelo *M. leprae* tem sido associado com a patogênese da hanseníase, contribuindo para a persistência da infecção (Mattos *et al.*, 2012). A capacidade de PGE<sub>2</sub> de induzir a síntese de IGF-I em macrófagos já foi previamente observada (Furnier *et al*, 1995). Por sua vez, a indução de PGE<sub>2</sub> promovida por IGF-I havia sido descrita apenas em células tumorais de ovário (Cao *et al*, 2007).

Até o momento, os ensaios *in vitro* indicam o IGF-I como um potencial imunomodulador da resposta inata em macrófagos, tornando-os mais permissivos a infecção micobacteriana. Numa etapa final do trabalho avaliamos a expressão de IGF-I *in vivo* através da análise de lesões de pele de pacientes com hanseníase. Em lesões de pacientes TT é observado um característico perfil de resposta do tipo Th1, onde se observa uma alta expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12 nas lesões. Em contrapartida ao que é

observado nas lesões de pacientes TT, as lesões de pacientes LL se caracterizam por apresentar um predomínio do perfil de resposta do tipo Th2 e uma alta expressão de citocinas como IL-4 e IL-10. (Yamamura *et al*, 1991). A partir de uma análise comparativa entre lesões de pacientes LL e BT verificamos um aumento considerável da expressão de RNAm para IGF-I em lesões de pele dos pacientes LL em relação as lesões de pele dos pacientes BT (Figura 27). Além disso, as lesões de pele dos pacientes LL apresentaram maior positividade para IGF-I através de análise imunohistoquímica quando comparadas às lesões de pacientes BT. Outro achado importante foi a maior positividade para IGF-I encontrada em células CD68 positivas, sugerindo que o IGF-I está sendo produzido preferencialmente pelos macrófagos presentes nas lesões lepromatosas, (Figura 28). Isso indica que a presença de IGF-I nas lesões de pacientes LL concorda com uma assinatura anti-inflamatória que favorece a persistência, o desenvolvimento e a disseminação do bacilo. Esses dados sugerem que os macrófagos presentes nas lesões lepromatosas estão desativados ou ativados alternativamente, e o aumento da disponibilidade do IGF-I nesse microambiente pode favorecer a ativação para um perfil M2 modulando a resposta imune no sítio da lesão.

Por fim, decidimos investigar a expressão de SOCS3 e a ativação de STAT1 nessas lesões. Tendo em vista a indução da expressão de SOCS3 pelo *M. leprae* em macrófagos RAW 264.7, passamos a investigar a expressão de SOCS3 em lesões de pele pacientes BT *versus* LL. Como já mencionado anteriormente, a proteína SOCS3 está relacionada com a inibição da fosforilação de STAT1 e STAT3. Vimos anteriormente que IGF-I diminuiu a fosforilação de STAT1 em macrófagos *in vitro*, e que houve uma expressão aumentada de IGF-I nas lesões de pacientes LL em comparação com as lesões de pacientes BT. De forma interessante, foi observado uma relação oposta na expressão de SOCS3 *versus* a ativação de STAT1 nas lesões de pacientes LL comparada as lesões de pacientes BT. Nas lesões de pacientes LL houve uma alta expressão de SOCS3 e uma baixa ativação de STAT1 (figura 29A). Já nas lesões de pacientes BT observamos maior ativação de STAT1 e uma baixa expressão de SOCS3 (figura 29A). É provável que a resposta inflamatória característica de um perfil Th1 favoreça uma

maior ativação de STAT1 em pacientes do pólo BT, o que pode ser relacionado a uma menor expressão de SOCS3 nessas lesões demonstradas no presente trabalho. Nas lesões dos pacientes LL, onde a expressão de SOCS3 é elevada, observou-se uma significativa diminuição da ativação de STAT1, estando de acordo com o fenótipo de macrófagos refratários à ativação clássica encontrado nas lesões desses pacientes. Ainda nesse aspecto, o aumento de SOCS3 na lesão LL poderia colaborar para uma regulação negativa da resposta frente a citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-6.

Atualmente pouco se sabe sobre a participação do IGF-I na fisiologia dos macrófagos, principalmente da sua função na resposta inflamatória em processos infecciosos. Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem levantar a hipótese de que nos estágios iniciais da infecção, o IGF-I secretado em resposta ao *M. leprae* poderia favorecer o estabelecimento da infecção. Já a presença de IGF-I nas lesões de pacientes lepromatosos mostra que o IGF-I também pode colaborar para manutenção de um nicho favorável e persistência do patógeno em estágios tardios da infecção. Nessas lesões é marcante a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13. Principalmente a IL-4, mas também a IL-13 são classicamente descritas como mediadoras da ativação alternativa de macrófagos, além de potentes indutores de IGF-I (Wynes *et al.*, 2003). A ativação de macrófagos para um perfil M2 e mediada pelas citocinas IL-4 e IL-13 que igualmente induzem a produção de IGF-I em macrófagos (revisto por Martinez *et al.*, 2009), e está de acordo com o perfil de citocinas Th2 predominante nas lesões lepromatosas (revisto por Sieling e Modlin, 1994). O fenótipo dos macrófagos presentes na lesão lepromatosa aproxima-se, assim, daquele descrito para macrófagos chamados de M2. A via alternativa de ativação se caracteriza pela diminuição das propriedades microbidas dos macrófagos, aumentando a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , o que favorece a endocitose de ligantes manossilados e antagoniza a resposta induzida por LPS e IFN- $\gamma$  (revisto por Martinez *et al.*, 2009). Esta via alternativa de ativação/diferenciação dos macrófagos é favorecida num microambiente onde TNF- $\alpha$  está presente e IFNs estão ausentes, o que

---

acarreta à indução da produção de IGF-I pelo macrófago (revisto por Winston *et al.*, 1999).

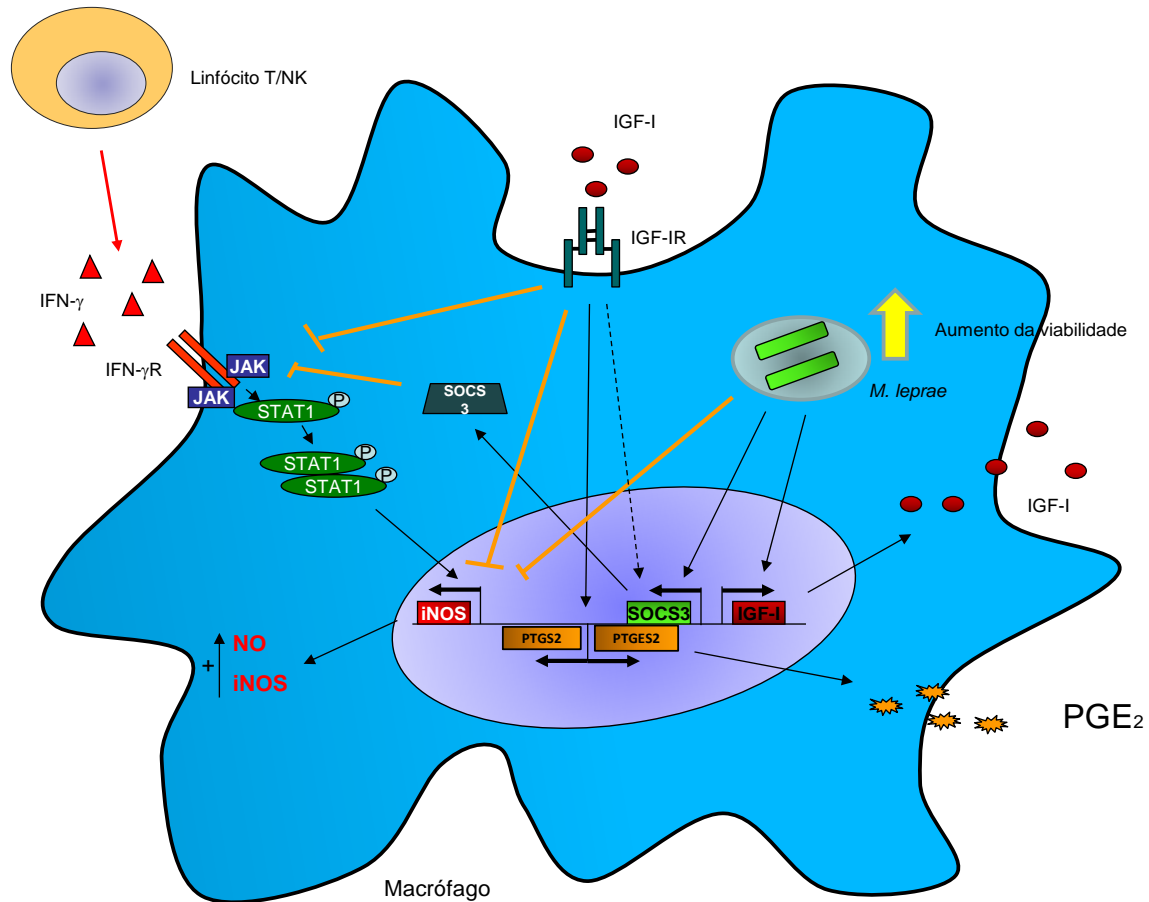
Resumindo, nosso trabalho evidencia que micobactérias não patogênicas estimulam a expressão de iNOS e a produção de NO, favorecendo a eliminação do patógeno pela célula hospedeira. Contudo o *M. leprae* não foi capaz de induzir a produção de NO, o que sugere sua capacidade em inibir a ativação dos mecanismos microbicidas dessas células. O *M. leprae* induz a secreção de IGF-I em macrófagos murinos, podendo esse fator de crescimento agir nessas células de forma parácrina ou autócrina. A adição de IGF-I inibiu a produção de NO e a expressão de iNOS em macrófagos estimulados com *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG. Demonstramos também que ao bloquearmos a sinalização de IGF-I, o macrófago passa a produzir mais NO frente ao estímulo com *M. leprae*. Esse é um forte indicativo que o IGF-I produzido pelo *M. leprae* participa da inibição da expressão iNOS e consequente produção de NO. A regulação negativa de NO pelo IGF-I poderia ocorrer através do aumento da produção de PGE<sub>2</sub>, contudo isso não foi esclarecido. Outra possibilidade é que IGF-I poderia atuar através de SOCS3, induzindo sua expressão como já foi visto em outros tipos celulares, diminuindo, assim, a ativação de STAT1 e consequentemente bloqueando a via de sinalização de IFN- $\gamma$ .

Finalmente foi demonstrado que o *M. leprae* induz a expressão de SOCS3 em macrófagos RAW 264.7, e que a expressão de SOCS3 se encontra aumentada em lesões de pacientes LL em comparação com lesões de pacientes BT. A indução de IGF-I e de SOCS3 pelo *M. leprae* em macrófagos representa um dado inédito que contribui para o melhor entendimento da patogênese da Hanseníase.

---

A figura 29 resume de forma esquemática os mecanismos de participação do IGF-I na interação macrófago-*M. leprae*. Primeiramente o *M. leprae* induz a secreção de IGF-I na célula hospedeira, que atua de forma parácrina ou autócrina inibindo a expressão de iNOS e produção de NO e além de induzir a produção de PGE<sub>2</sub> nessas células. A diminuição da capacidade microbicida do macrófago promove o aumento da permanência e da sobrevivência do bacilo no meio intracelular. Em outro ponto, o IGF-I induzido pelo *M. leprae* torna o macrófago refratário ao estímulo com IFN- $\gamma$ , possivelmente através da indução de SOCS3 que inibe a ativação de STAT1 e conseqüentemente regula negativamente a resposta mediada por IFN- $\gamma$ .





**Figura 30. Modelo representando o possível papel do IGF-I em macrófagos infectados com *M. leprae*.** Efeito anti-microbicida do IGF-I é demonstrado através da inibição da produção de NO e da expressão de iNOS, além da indução da produção de PGE<sub>2</sub>. O *M. leprae* induz o aumento da produção de IGF-I e da expressão de SOCS3. O IGF-I também inibe a ativação de STAT1 e a produção de NO induzida por IFN-γ, possivelmente via indução de SOCS3.

## 6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que:

- 1- *M. leprae* vivo e *M. leprae* morto induzem a produção de IGF-I por macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7;
- 2- *M. leprae* não foi capaz de induzir o aumento da atividade do promotor de iNOS em macrófagos RAW 264.7;
- 3- O IGF-I foi capaz de inibir a atividade do promotor de iNOS em resposta ao estímulo com *M. bovis* BCG e *M. smegmatis*, sendo esta inibição dependente de STAT1;
- 4- O IGF-I favoreceu a sobrevivência intracelular do *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG em macrófagos RAW 264.7;
- 5- O bloqueio da sinalização de IGF-I em macrófagos RAW 264.7 promoveu o aumento da produção de NO e da atividade do promotor de iNOS frente ao estímulo com *M. leprae*;
- 6- O bloqueio da sinalização de IGF-I diminuiu a sobrevivência intracelular do *M. leprae* em macrófagos RAW 264.7;
- 7- IGF-I foi capaz de inibir a expressão de iNOS, a produção de NO, bem como a atividade do promotor de iNOS em macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ ;

- 8- IGF-I induziu a produção de PGE<sub>2</sub> bem como a expressão das enzimas envolvidas na síntese de PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7;
  
- 9- As lesões de pele de pacientes LL apresentaram uma maior positividade para IGF-I quando comparadas às lesões dos pacientes BT, o que foi corroborada com uma maior expressão de RNAm para IGF-I;
  
- 10- A expressão de SOCS3 se encontra aumentada em lesões de pele de pacientes LL quando comparadas às lesões de pacientes BT. Já a ativação de STAT1 apresentou-se diminuída em lesões LL.

Em conjunto, estes resultados sugerem a participação de IGF-I na resposta do hospedeiro ao *M. leprae*, com potencial contribuição para a patogênia deste microorganismo através da inibição de mecanismos microbicidas e do bloqueio da sinalização de IFN- $\gamma$  em macrófagos infectados, com o conseqüente favorecimento de sua sobrevivência e persistência no hospedeiro.

## 7. Bibliografia

Adams, L.B., Gillis, T.P., Hwang, D.H., Krahenbuhl, J.L. (1997). Effects of essential fatty acid deficiency on prostaglandin E2 production and cell-mediated immunity in a mouse model of leprosy. *Infect. Immun.* 65, 1152-1157.

Adams, L.B., Job. C.K., Krahenbuhl, J.L. (2000). Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* in mice. *Infect Immun.* 68(9):5462-5.

Ahmed SF, Farquharson C. The effect of GH and IGF1 on linear growth and skeletal development and their modulation by SOCS proteins. *Journal of Endocrinology.* 14 de julho de 2010;206(3):249–59.

Annunziata, M., Granata, R., Ghigo, E. (2011) The IGF-I system *Acta Diabetol* 48:1–9

Arkins, S., Rebeiz, N., Brunke-Reese, D.L., Biragyn, A., Kelley, K.W. (1995). Interferon- $\gamma$  Inhibits Macrophage Insulin-Like Growth Factor-I Synthesis at the Transcriptional Level *Mol. Endocrinol.* 9, 350–360.

Arnaldez FI, Helman LJ. Targeting the insulin growth factor receptor 1. *Hematol Oncol Clin North Am.* junho de 2012;26(3):527–542, vii–viii.

Ben G. Marshall, Mark A. Chambers, Arun Wangoo, Rory J. Shaw, and Douglas B. Young (1997) production of tumor necrosis Factor and Nitric Oxide by Macrophages Infected with Live and Dead *Mycobacteria* and Their Suppression by an Interleukin-10-Secreting Recombinant infection and immunity, p. 1931–1935

Biswas SK, Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11(10):889–96.

Brennan, P.J., Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.*;64:29-63.

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J., Modlin, R.L., (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 30:732-6.

Britton, W. J., Lockwood, D. O. N., (2004). Leprosy. *Lancet* 363:1209–1219.

Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.*;1791(6):540-51. Epub 2009 Jan 21. Review.

Cao, F., Castrillo, A., Tontonoz, P., Re, F., Byrne, G. I. (2007). Chlamydia pneumoniae-Induced Macrophage Foam Cell Formation is Mediated by Toll-Like Receptor 2. *Infect. Immun.* 75, 753-759.

Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. (2011). Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*;6(5): 533-49.

Chacko, M. S., and Adamo, M. L. (2002). Double-Stranded RNA Decreases IGF-I Gene Expression in a Protein Kinase R-Dependent, but Type I Interferon Independent, Mechanism in C6 Rat Glioma Cells *Endocrinology* 143, 525–534

Cole, S. T., (1998). Comparative mycobacterial genomics. *Curr. Opin. Microbiol.*1:567–571.

Chang Y-P, Chen C-L, Chen S-O, Lin Y-S, Tsai C-C, Huang W-C, *et al.* (2011) Autophagy facilitates an IFN- $\gamma$  response and signal transduction. *Microbes and Infection*.;13(11):888–94.

Cole, S.T., Elglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., McLean, J., Muole, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.–A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R. & Barrell, B.G. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 409, 1007-1011.

Connor, J.C.O. McCusker, R.H. Strle, K. Johnson, R.W. Dantzer, R. Kelley, K.W. (2008). Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: At the interface of immunology and endocrinology. *Cellular Immunology* 252: 1-2.

Cooper, A.M., Adams, L.B., Dalton, D.K., Appelberg, R., Ehlers, S. (2002). IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 10(5):221-6.

Coura, J. R. (2005). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Vol. 2 Guanabara Koogan. Pg 1383-1390.

Croker BA, Krebs DL, Zhang JG *et al.* (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol*;4:540–5

Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, *et al.* Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy *J Clin Invest* 2008;118: 2917-28.

Cuevas J, Rodríguez-Peralto JL, Carrillo R, Contreras F. (2007) Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Semin Cutan Med Surg.* Jun;26(2):126-30.

D'Avila, H., Melo, R.C., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2006). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol.* 176(5):3087-97.

David M. Mosser (2003) The many faces of macrophage activation *Journal of Leukocyte Biology* Volume 73 doi: 10.1189/jlb.0602325

Davis, A.S. Vergne, I. Master, S.S. Kyei, G.B. Chua, J., Deretic, V. (2007). Mechanism of Inducible Nitric Oxide Synthase Exclusion from Mycobacterial Phagosomes. *PLoS Pathog* 3(12): e186. doi:10.1371/journal.ppat.0030186

Ding, A. H., Nathan, C. F. & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immun.*, 141, 2407-2412.

Douglas, R.G., Shaw, J.H.F. (1989). Metabolic response to sepsis and trauma. *British Journal of Surgery* 76 115–122.

Denley, A., Cosgrove, L.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Forbes, B.E. (2005). Molecular Interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(4-5):421-39.

Dyken, S. J. V. and Locksley, R. M., (2013). Interleukin-4- and Interleukin-13 Mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease *Annu. Rev. Immunol.* 2013. 31:317–43

Ebong, S., Yu, C. R., Carper, D. A., Chepelinsky, A. B. Egwuagu, C. E.(2004). Activation of STAT Signaling Pathways and Induction of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Mammalian Lens by Growth Factors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, March 2004, Vol. 45, No. 3

Edwards, C.K., Hedegaard, H.B., Zlotnik, A. Gangadharam P.R., Johnston R.B. Jr, Pabst M.J., (1986). Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon- $\gamma$  *J Immunol*; 136: 1820–7.

Ehrt, S., Schnappinger, D., (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol.*11(8):1170-8.

Eskildsen S, Justesen J, Schierup MH, Hartmann R. (2003). Characterization of the 2-5-oligoadenylate synthetase ubiquitin-like family. *Nucleic acids research*;31(12):3166.

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

Fabrino, L.D., Bleck, C.K.E., Anes, E., Hasilik, A., Melo, R.C.N., Niederweis, M., Griffiths, G., Gutierrez, M.G. (2009). Porins facilitate nitric oxide-mediated killing of mycobacteria. *Microbes and Infection* xx 1-8.

Fernandez J. (1939). Estudio comparativo de la reaccion de Mitsuda con las reacciones tuberculínicas. *Revista Argentina Dermatosifilis*;23:425–53.



Ferreira CDA. Integração de dados de expressão gênica global em tuberculose. Rio de Janeiro. Dissertação [mestrado em Biologia Computacional e Sistemas] - Instituto Oswaldo Cruz; 2011.

Toledo Pinto. (2013). Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase: indução da via de interferon tipo I como potencial mecanismo de sobrevivência do *Mycobacterium leprae* em macrófagos humanos. Dissertação [mestrado em Biologia Celular e Molecular] - Instituto Oswaldo Cruz; 2013.

Firth S. M. Baxter R. C., (2002) Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocrine Reviews* Volume 23 Issue 6

Fournier, T., Riches, D.W., Wiston, B.W., Rose, D.M., Yong, S.K., Noble, P.W., Lake, F.R., Henson, P.M. (1995). Divergence in macrophage insulin-like growth factor-I (IGF-I) synthesis induced by TNF-alpha and prostaglandin E2. *J. Immunology*. 15;155(4):2123-33.

Fukutomi, Y. (2004). Functional changes of macrophages in Hansen's disease. generation. *Infect. Immun*. 51:514–520.

Gomes, C.M., Goto, H., Ribeiro Da Matta, V.L., Laurenti, M.D., Gidlund, M., Corbett, C.E. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*. 81(4):249-55.

Gordon, S. (2007). The Macrophage: Past, present and future. *Eur. J. Immunol*. 37: S9-17.

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 28 de maio de 2010;32(5):593–604.

Goto, T.R., Herberman, R.B., Maluish, A. (1983). Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol*; 130: 1350–5.

Goulart, I.M.B. Penna, G.O., Cunha, G. (2002). Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* vol.35 no.4

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L. Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131-138

Guerreiro LTA, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, *et al.* Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e64748.

Guo Z, Shao L, Du Q, Park KS, Geller DA. Identification of a classic cytokine-induced enhancer upstream in the human iNOS promoter. *FASEB J.* 2 de janeiro de 2007;21(2):535–42.

Hartmann R, Olsen HS, Widder S, Jorgensen R, Justesen J. p59OASL, a 2'–5' oligoadenylate synthetase like protein: a novel human gene related to the 2'–5' oligoadenylate synthetase family. *Nucleic Acids Research* 1998;26(18):4121-7.

Hagge, D.A., Ray, N.A., Krahenbuhl, J.L., Adams, L.B. (2004). An in vitro model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of *Mycobacterium leprae* from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. *J. Immunol.* 172:7771–7779.

Heldwein, K.A., Fenton, M.J. (2002). The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes and Infection*. 4. 937–944

Hijikawa, T., Kaibori, M., Uchida, Y., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Okumura, T. (2008). Insulin-like growth factor 1 prevents liver injury through the inhibition of TNF-alpha and iNOS induction in D-galactosamine and LPS-treated rats. *Shock*. 29(6):740-7.

Himpe E, Kooijman R. Insulin-like growth factor-I receptor signal transduction and the Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT) pathway. *BioFactors*. janeiro de 2009;35(1):76–81.

Homma, S., I. Nagaoka, I., Abe, H., Takahashi, K., Seyama, K., Nukiwa, T., Kira, S. (1995). Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 152:2084.

Hunter, S.W., Fujiwara, T., Brennan, P.J. (1982). Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 257(24):15072-8.

Hwang, S.M., Chen, C.Y., Chen, S.S., Chen, J.C. (2000). Chitinous Materials Inhibit Nitric Oxide Production by Activated RAW 264.7 Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 229–233

Ismail N, Olano JP, Feng HM, Walker DH (2002) Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 207: 111–120. 5. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, et al. (2004)

Irgens LM. The discovery of the leprosy bacillus. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2002;122(7):708–9.

Inaba, M., Saito, H., Fujimoto, M., Sumitani, S., Ohkawara, T., Tanaka, T., Kouhara, H., Kasayama, S., Kawase, I., Kishimoto, T. and Naka, T. (2005). Suppressor of cytokine signaling 1 suppresses muscle differentiation through modulation of IGF-I receptor signal transduction *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 328, Issue 4, Pages 953–961

Jaguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. (2013). Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cellular Immunology*. 281(1):51–61.

Jordão, L., Bleck, C. K. E., Mayorga, L., Griffiths, G., Anes, E. (2008) On the killing of mycobacteria by macrophages *Cellular Microbiology* Volume 10, Issue 2, pages 529–548, February 2008

Kaplan, G., Cohn, Z.A. (1986). Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev.* 57:199-202.

Kaufmann, S.H. (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 61 Suppl 2:ii54-8.

Kim, B. J., Lee, S. H. Lyu, M. Kim, S. J. Bai, G. H. Kim, S. J. Chae, G. T. Kim, E. C. Cha, C. Y. Kook, Y. H. (1999). Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*) *J. of Clinical Microbiology* p. 1714–1720

Kiszewski, A.E.C, Becerril, E., Baquera, J., Ruiz-Maldonado, R., Hernandez Pando, R. (2003). Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br. J. Dermatol.* 148, 795-798.

Kirschning, C.J., Schumann, R.R. (2002). TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol Rev.* 270:121-44.

Kobayashi Y. (2010) The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.*;88(6):1157–62.

Kooijman, R., Coppens, A. (2004). Insulin-like growth factor-I stimulates IL-10 production in human T cells. *J. Of Leucocytes Biology.* 76 10.1189

Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E. (1971). Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 39(3):693-702.

Kisseleva, T., S Bhattacharya, J Braunstein, C.W Schindler (2002) Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene:* Volume 285, Issues 1–2, Pages 1–24

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, *et al.* (2003) Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature medicine*;9(5):525-32.

Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M.T., Liu, P.T., Sharfstein, S.E., Graeber, T.G., Sieling, P.A., Liu, Y.J., Rea, T.H., Bloom, B.R., Modlin, R.L. (2005). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11:653–660.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity *Biochem. Biophys. Res. Commun,* doi:10.1016/ j.bbrc.2009.08.062

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. (2005). Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *Journal of medical microbiology*;54(3)235.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. (2010). Infection of mouse macrophages with viable *Mycobacterium leprae* does not induce apoptosis. *J Infect Dis*;201(11):1736-42.

Laue, L., Pizzo P. A., Butler K., Cutler, G.B. Jr. (1990). Growth and neuroendocrine dysfunction in children with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Pediatr.* Oct;117(4):541-5.

Lee MS, Kim B, Oh GT, Kim YJ. OASL1 inhibits translation of the type I interferon-regulating transcription factor IRF7. *Nat Immunol* 2013;14(4):346-55.

Liongue C, Ward AC. (2013). Evolution of the JAK-STAT pathway. *JAKSTAT* /PMC3670263

Li, S., Yue, Y., Xu, Wei. Xiong, S., (2013) MicroRNA-146a Represses *Mycobacteria*-Induced Inflammatory Response and Facilitates Bacterial Replication via Targeting IRAK-1 and TRAF-6 *Plos one.* vol 8 – Issue 12: e81438

Liu, J., Tran, V., Leung, A.S., Alexander, D.C., Baoli, Z. (2009). BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* 5:2, 70-78;

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

Long, R., Ligth, B., Talbot, J.A. (1999). Mycobacteriocidal Action of Exogenous Nitric Oxide Antimicrobial agents and chemotherapy, 0066-4804/99/04.0010 p. 403–405.

Kyoko Inagaki-Ohara, Taisuke Kondo , Minako Ito, and Akihiko Yoshimura (2013) SOCS, inflammation, and câncer. JAK-STAT 2:3, e24053.

MacMicking, J., Qiao-wen Xie, Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. Annu. Rev. Immunology 15:323–50

Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, *et al.* (2013). The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. Nature.;501(7468):512–6.

Manzanillo PS, Shiloh MU, Portnoy DA, Cox JS. Mycobacterium tuberculosis activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. Cell Host Microbe. 17 de maio de 2012;11(5):469–80.

Martin JL, Baxter RC. Signalling pathways of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF binding protein-3. Growth Factors. dezembro de 2011;29(6):235–44.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO *et al.* (2009). Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR. Journal of clinical microbiology;47(7):2124.

Martinez FO. (2011). Regulators of macrophage activation. European Journal of Immunology.;41(6):1531–4.

Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. and Locati, M., (2008) Macrophage activation and polarization. Front. Biosci.. 13 : 453–461

Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27:451–83

Martino, A., Sacchi, A., Volpe, E., Agrati, C., De Santis, R., Pucillo, L. P., Colizzi, V Vendeti, S., (2005). Non-Pathogenic *Mycobacterium smegmatis* Induces the Differentiation of Human Monocytes Directly into Fully Mature Dendritic Cells *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 25, No. 4 DOI: 10.1007/s10875-005-4188-x

Masood KI, Rottenberg ME, Carow B, Rao N, Ashraf M, Hussain R. (2012). SOCS1. Gene Expression is Increased in Severe Pulmonary Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*;76(4):398–404

Masood KI, Rottenberg ME, Salahuddin N, Irfan M, Rao N, Carow B. Expression of M. tuberculosis-induced suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1, SOCS3, FoxP3 and secretion of IL-6 associates with differing clinical severity of

Matsuoka, T., Narumya, S. (2008). The roles of prostanoids in infection and sickness behaviors. *J. Infec. Chemother.* 14(4):270-8

Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, *et al.* (2010) Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.*;87(3):371–84.

Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, Pessolani, M. C. V. (2011) TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol.*;187(5):2548–58.



Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. (2012) Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* Mem Inst Oswaldo Cruz. Dec;107 Suppl 1:156-66.

Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449:819–26

Melchjorsen J, Kristiansen H, Christiansen R, Rintahaka J, Matikainen S, Paludan, SR *et al.* Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. Journal of interferon & cytokine research 2009;29(4):199-207.

Méndez, P., Samperio Aline Pérez, Laura Rivera (2009) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced activation of PI3K/Akt and NF- $\kappa$ B signaling pathways regulates expression of CXCL10 in epithelial cells Cellular Immunology Volume 256, Issues 1–2, Pages 12–18

Merle CS, Cunha SS, Rodrigues LC. BCG vaccination and leprosy protection: review of current evidence and status of BCG in leprosy control. Expert Rev Vaccines 2010;9(2):209-22.

Miyamoto T. (2013). STATs and macrophage fusion. JAK-STAT. 2013;2(3):e24777.

Miller, B.H., Frati, R. A. Poschet, J. F., Timmins, G. S., Master, S. S., Burgos, M., Marletta, M.A., Deretic, V. (2004). Mycobacteria Inhibit Nitric Oxide Synthase Recruitment to Phagosomes during Macrophage Infection. Infect. Imunity 72(5):2872.DOI 10.128

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, (2005). On the origin of leprosy. Science ;308(5724):1040–2.

Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, (2009). Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*;6(4):343–53.

Mosmann, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 16;65(1-2):55-63.

Motta AC, Pereira KJ, Tarquínio DC, Vieira MB, Miyake K, Foss NT. Leprosy reactions: coinfections as a possible risk factor. *Clinics* 2012;67(10):1145-8.

Moura, A.C. M., Mariano, M. (1996). Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall are endowed with an anti-inflammatory property and inhibit macrophage function in vivo. *Immunology* 1996 89 613-618.

Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, *et al.* CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol* 2012;42(11):2925-36.

Mynarcik, D.C., Frost, R.A., Lang, C.H., DeCristofaro, K., McNurlan, M.A., Garlick, P.J., Steigbigel, R.T., Fuhrer, J., Ahnn, S., Gelato, M.C. (1999). Insulin-like growth factor system in patients with HIV infection: effect of exogenous growth hormone administration. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 22(1):49-55.

Nagaoka, I., Trapnell, B. C., Crystal, R.G. (1990). Regulation of insulin-like growth factor I gene expression in the human macrophage-like cell line U937. *J. of Clinical Invest.* 1990 Feb;85(2):448-55.

Narayana Y, Balaji KN. NOTCH1 up-regulation and signaling involved in Mycobacterium bovis BCG-induced SOCS3 expression in macrophages. J Biol Chem. 2 de maio de 2008;283(18):12501–11.

Neill, M.A., Klebanoff, S.J. (1988). The effect of phenolic glycolipid-1 from Mycobacterium leprae on the antimicrobial activity of human macrophages. J Exp Med.167(1):30-42.

Ng, V., Zanazzi, G., Timpl, R. Talts, J. F., Salzer, J. L., Brennan P. J., Rambukkana, A., (2000). Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. Cell. 103(3):511-24

Noble, W.C. (1993). Gram-negative bacterial skin infections. Semin Dermatol. 12(4):336-41.

Nussbaum JC, Locksley RM. (2012). Infectious (non)tolerance—frustrated commensalism gone awry? Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 4:a007328

Park, S.D., Lee, J.S., Lee, B.S., Jun, C.D., Chung, H.T., Kim, J.G. (1994). Effects of Mycobacterium leprae, M .leprae Phenolic Glycolipid - 1 and Cytokines on the Nitric Oxide Generation of RAW 264.7 Macrophages. Korean J Dermatol. 1994 Apr;32(2):234-244.

Petska, S., (2007) The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn J. Biol. Chem. 282:20047-20051

Phipps, R.P., Stein, S.H., Roper, R.L. (1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol Today 12:349–52.

Pocaterra, L. Jain, S. Reddy, R. Muzaffarullah, S. Torres, O. Suneetha, S. Lockwood D. N., (2006) Clinical course of erythema nodosum leprosum: a 11-years cohort study in Hyderabad, India. Am. J. Tropical Med. Hyg 74: 868-879

Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. New findings in the pathogenesis of leprosy and implications for the management of leprosy. *Curr Opin Infect Dis.* outubro de 2013;26(5):413–9.

Priego, T., Granado, M., Castellero, E., Martín, AI, Villanúa, M.A., López-Calderón, A. (2006). Nitric oxide production by hepatocytes contributes to the inhibitory effect of endotoxin on insulin-like growth factor I gene expression. *J Endocrinol.* 190(3):847-56.

Priego, T., Ibáñez de Cáceres, I., Martín, AI, Villanúa, M.A., López-Calderón, A. (2004). NO plays a role in LPS-induced decreases in circulating IGF-I and IGFBP-3 and their gene expression in the liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(1):E506.

Qin H, Holdbrooks AT, Liu Y, Reynolds SL, Yanagisawa LL, Benveniste EN. (2012) SOCS3 deficiency promotes M1 macrophage polarization and inflammation. *J Immunol.* 1 de outubro de;189(7):3439–48.

Reis L. C., Ramos-Sanches E. M. & Goto, H. (2013) The interactions and essential effects of intrinsic insulin-like growth factor-I on *Leishmania major* growth within macrophages *Parasite Immunology*, 35, 239–244

Ramasesh, N., Adams, L.B., Franzblau, S.G., Krahenbuhl, J.L. (1991). Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 59:2864–2869.

Raschke W.C. 1978 Functional macrophage cell lines transformed by abelson leukemia virus *Cell* Volume 15, Issue 1, Pages 261–267

Remacle-Bonnet, M. M., Garrouste, F. L., Heller, S., Andre, F., Marvaldi, J. L., and Pommier, G. J. (2000). Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor alpha-induced

mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways. *Cancer Res.* 60, 2007–17.

Ridley, D. S. (1974). Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ.* 51, 451-465.

Ridley, D.S., Jopling, W.H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Other Mycobact Dis.*;34(3):255-73.

Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, *et al.* Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 BC). *PloS one* 2009;4(5):e5669.

Robottom Ferreira, AB., (2011). Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica global. Tese de doutorado – Instituto Oswaldo Cruz – Pós Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas.

Rodrigues LS, Hacker MA, Illarramendi X, Pinheiro MFMC, Nery JA da C, Sarno EN, *et al.* Circulating levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) correlate with disease status in leprosy. *BMC Infect Dis.* 2011;11:339

Rodrigues LS, da Silva Maeda E, Moreira MEC, Tempone AJ, Lobato LS, Ribeiro-Resende VT, *et al.* *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell Microbiol.* janeiro de 2010;12(1):42–54.

Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E., Russell, D.G. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol Rev.* 219:37-54.

Rom, W.N., Basset, P., Fells, G.A., Nukiwa, T., Trapnell, B.C., Crystal, R.G. (1988). Alveolar Macrophages Release an Insulin-like Growth Factor I-Type Molecule. *The Journal of Clinical Investigation, Inc.* V. 82, 1685-1693

Rom, W.N., Paakko, P. (1991). Activated alveolar macrophages express the insulin-like growth factor-I receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 4(5):432-9.

Sani M, Houben ENG, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, *et al.* Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog.* março de 2010;6(3):e1000794.

Sarno EN, Grau GE, Vieira M, Nery JA. (1991) Serum levels, of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosyreactional states. *Clin Exp Immunol.* p;84(1):103-8.

Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A. (1991). Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med.* 174(5):1031-8.

Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A. (1994). A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 62(1):280-9.

Schwartz YS, Svistelnik AV. Functional phenotypes of macrophages and the M1-M2 polarization concept. Part I. Proinflammatory phenotype. *Biochemistry Mosc.* março de 2012;77(3):246–60.

Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., Williams, D. L. (2006) The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 338-381.

Shepard CC. 1962, Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *International journal of Leprosy* 1962;30:291.

Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J Bacteriol* 1965;90(5):1271–5.

Shepard CC. Vaccination against human leprosy bacillus infections of mice: protection by BCG given during the incubation period. *J Immunol* 1966;96:279–83.

Shepard, C.C., McRae, D.H. (1968). A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 36(1):78-82.

Schroder, P.J. K., Hertzog, T. Ravasi, D.A. Hume, Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 163 e189.

Sibley, L.D., S. G. Franzblau, S.G., Krahenbuhl, J.L. (1987). Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect. Immun.* 55:680–685.

Sibley, L.D., Krahenbuhl, J.L. (1988). Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 56(8):1912-9.

Sieling, P.A., Modlin, R.L. (1994). Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology.* 191(4-5):378-87. Review.

Sikorski K, Czerwoniec A, Bujnicki JM, Wesoly J, Bluysen HAR. STAT1 as a novel therapeutical target in pro-atherogenic signal integration of IFN $\gamma$ , TLR4 and IL-6 in vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):211–9.

Silva CAM, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, *et al* (2013). Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells:

adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun.*;81(7):2645–59.

Snyder, D.S., Beller, D.I., Unanue, E.R. (1982). Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature*; 299: 163–5.

Sullivan KA, Kim B, Feldman EL. (2008). Insulin-Like Growth Factors in the Peripheral Nervous System. *Endocrinology*;149(12):5963–71.

Suzuki K., Fukutomi, Y., Matsuoka, M., Torii, K., Hayashi, H., Takii, T., Oomoto, Y., Onozaki, K. (1993). Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*

Syroid, D.E., Zorick, T.S., Arbet-Engels, C., Kilpatrick, T.J., Eckhart, W., Lemke, G. (1999). A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival. *J Neurosci.* 19(6):2059-68.

Tabouret Guillaume, Catherine Astarie-Dequeker, Caroline Demangel, Wladimir Malaga, Patricia Constant, Aurélie Ray, Nadine Honoré, Nana Fatimath Bello, Esther Perez, Mamadou Daffé, Christophe Guilhot (2010). *Mycobacterium leprae* Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered *M. bovis*BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes. *Plos pathogens* DOI: 10.1371/journal.ppat.1001159

Tang, S. L., Chen, W. J. Yina, K., G. Zhaoa, Zhong-C., Yun-Cheng Lva, Xin-Ping Ouyanga, Xiao-Hua Yua, Huai-Jun Kuanga,d, Zhi-Sheng Jianga, Yu-Chang Fue, Chao-Ke Tanga, (2012) PAPP-A negatively regulates ABCA1, ABCG1 and SR-B1 expression by inhibiting LXR\_ through the IGF-I-mediated signaling pathway *Atherosclerosis* 222, 344– 354



Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nature medicine* 2006;12(8):961-6.

Teles, R. M. B. Graeber, T. G., Krutzik, S. R., Montoya, D., Schenk, M. Lee, D. J., Komisopoulou, E., Kelly-Scumpia, K., Chun, R., Iyer, S. S., Sarno, E. N., Rea, T. H., Hewison, M., Adams, J. S., Popper, S. J., Relman, D. A., Stenger, S., Blomm, B. R., Cheng, G., Modlin, R. L. (2013). Type I Interferon Suppresses Type II Interferon–Triggered Human Anti-Mycobacterial Responses *Science* 22: Vol. 339 no. 6126 pp. 1448-1453

Trautman JR. A brief history of Hansen's disease. *Bull, NY Acad Med* 1984;60:689-95.

Truman, R.W., Krahenbuhl, J.L. (2001). Viable *Mycobacterium leprae* as a research reagent. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 69:1–12.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, *et al.* Probable zoonotic leprosy in the southern United States, New England. *Journal of Medicine* 2011;364(17):1626-33.

Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A.N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(10):1654-61.

Underhill, D.M., Ozinsku, A., Smith, K.D., Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signals in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14459–14463.

Van der Veen, R.C. (2001). Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol.* 1(8):1491-500.

Vendrame, C.M.V., Carvalho, M. D. T., Rios, F.J.O, Manuli, E.R., Petitto Assis, F., Goto, H. (2007). Effect of Insulin-like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* Promastigote Arginase Activation and Reciprocal Inhibition of NOS2 Pathway in Macrophage in vitro. *Scandinavian Journal of Immunology*. 66, 287–29

Venters, H.D., Dantzer, R., Kelley, K.W. (2000). Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 917:210-20.

Verena J. Schuenemann, Pushpendra Singh, Thomas A. Mendum, Ben Krause-Kyora, Günter Jäger, Kirsten I. Bos, Alexander Herbig, Christos Economou, Andrej Benjak, Philippe Busso, Almut Nebel, Jesper L. Boldsen, Anna Kjellström, Huihai Wu, Graham R. Stewart, G. Michael Taylor, Peter Bauer, Oona Y.-C. Lee, Houdini H.T. Wu, David E. Minnikin, Gurdyal S. Besra, Katie Tucker, Simon Roffey, Samba O. Sow, Stewart T. Cole, Kay Nieselt, Johannes Krause (2013) Genome-Wide Comparison of Medieval and Modern *Mycobacterium leprae* *Science* Vol 341 6142/179-183

Virchow, R. (1863). *Die krankhaften Geschwülste*. August Hirschwald. Berlin, Germany. 208.

Vissa, V. D., and P. J. Brennan. (2001). The genome of *mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol*. 2(8):Reviews.

Vivarini A de C, Pereira R de MS, Teixeira KLD, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, *et al.* (2011) Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *FASEB J.*;25(12):4162–73.

---

Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. (2012). Extracellular M. tuberculosis DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*. 17 de agosto de;150(4):803–15.

Wayne, L. G., and G. P. Kubica. (1986). The mycobacteria, p.1435-1457. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co, Baltimore.

Wesoly, J. Szweykowska-Kulinska Z, Bluysen HA (2007) STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses. *Acta Biochim Pol.*54(1):27-38.

Williams DL, Slayden RA, Amin A, Martinez AN, Pittman TL, Mira A, *et al*. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. *BMC genomics* 2009;10:397.

Winston, B.W., Krein, P.M., Mowat, C., Huang, Y. (1999). Cytokine-induced macrophage differentiation: a tale of 2 genes. *Clin Invest Med.* 22(6):236-55.

World Health Organization WHO Report (2009). *Leprosy Today*. Available from <http://www.who.int/lep/en/>

Wu, Y. Tewari, M. Cui, S. Rubin, R., (1996) Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits tumor necrosis factor-induced cell death *Journal of Cellular Physiology* Volume 168, Issue 3, pages 499–509

Wynes, M.W., Riches, D.W.H. (2003). Induction of Macrophage Insulin-Like Growth Factor-I Expression by the Th2 Cytokines IL-4 and IL-131 *J. Immunol.* 171, 3550–3559

Wynes, M.W., Riches, D.W.H (2005). Transcription of macrophage IGF-I exon 1 is positively regulated by the 5'-untranslated region and negatively regulated by the 5'-flanking region. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288(6):L1089-98.

Yakub I, Lillibridge KM, Moran A, Gonzalez OY, Belmont J, Gibbs RA *et al.* Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L inpatients hospitalized with West Nile virus infection, *The Journal of infectious diseases* 2005;192(10):1741-8.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions, *Science* 1991;254(5029):277.

Yoshimura A, Suzuki M, Sakaguchi R, Hanada T, Yasukawa H. (2012) SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Front Immunol.* PMC3342034

Young, D.B., Mehlert, A. (1989). Serology of mycobacteria: characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. *Rev Infect Dis.* 1989 11 Suppl 2:S431-5.

Yuan Z-Y. (2013) Multiple roles of SOCS proteins: Differential expression of SOCS1 and SOCS3 in atherosclerosis. *International Journal of Molecular Medicine*