



**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Doutorado em Biologia Parasitária**

**Interação de *Mycobacterium leprae* com células epiteliais  
humanas das vias aéreas: aderência, entrada,  
sobrevivência e identificação das potenciais adesinas  
através da análise do proteoma de superfície**

**Carlos Adriano de Matos e Silva**

**Rio de Janeiro**

**2013**

## Ficha catalográfica

de Matos e Silva, Carlos Adriano

Interação de *Mycobacterium leprae* com células epiteliais humanas das vias aéreas: aderência, entrada, sobrevivência e identificação das potenciais adesinas através da análise do proteoma de superfície. / Carlos Adriano de Matos e Silva. – Rio de Janeiro: 2013.

191 f.; il.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Parasitária, 2013.

1. *M. leprae*; 2. Células epiteliais humanas das vias aéreas; 3. Aderência e entrada; 4. Proteoma de superfície. I. Interação de *Mycobacterium leprae* com células epiteliais humanas das vias aéreas: aderência, entrada, sobrevivência e identificação das potenciais adesinas através da análise de proteoma de superfície.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-graduação em Biologia Parasitária**

**Autor: Carlos Adriano de Matos e Silva**

**Interação de *Mycobacterium leprae* com células epiteliais humanas das vias aéreas: aderência, invasão, sobrevivência e identificação das potenciais adesinas através da análise do proteoma de superfície**

**Orientador: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani**

**Aprovada em: 07/03/2013**

**Banca Examinadora:**

**Dr. Luis Caetano Antunes – Escola Nacional de Saude Pública- FIOCRUZ-  
Revisor/Suplente**

**Dra. Euzenir Nunes Sarno – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ- Presidente/  
Titular**

**Dr. João Ramos da Costa Andrade- Universidade do Estado do Rio de Janeiro-  
Titular**

**Dr. Marcio Lourenço Rodrigues - Centro de Desenvolvimento Tecnológico em  
Saúde – FIOCRUZ - Titular**

**Dr. Rafael Silva Duarte - Laboratório de Micobactérias, Dept. Microbiologia  
Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ - Suplente**

**Rio de Janeiro, 11 de Junho de 2013**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que serão mencionados abaixo, pois com certeza jamais teria conseguido alcançar essa nova vitória se não fossem por vocês, visto que as vitórias não são individuais, mas sim coletivas.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais Eunice Lourenço e Carlos Roberto, pelo grande amor que recebo de vocês. Grande parte de meu mérito é também de vocês. Além disso, também gostaria de agradecer às minhas irmãs Bianca e Danielle pelo amor e grande carinho. Ao meu sobrinho Phelipe (famoso Ph) pela amizade e raro relacionamento que possuímos entre tio e sobrinho. À minha avó Floripes, por existir. Finalmente, gostaria de dedicar essa tese também à minha companheira Viviane Bastos pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo.

À minha eterna professora Dra. Cristina Pessolani, por sempre me ensinar com enorme carinho e dedicação, além de sempre ter acreditado em meu trabalho.

Ao Dr. Luiz Bermudez, por ter me recebido em seu laboratório e ter contribuído de forma significativa na concepção dos experimentos. Agradeço também pelos ensinamentos.

Às Dras Márcia Berredo e Luciana Rodrigues, pela ajuda na etapa final da tese, em especial na concepção do artigo.

Ao Dr. Caetano Antunes pela cuidadosa revisão realizada.

Ao Dr. Ulisses Lopes pela contribuição com alguns experimentos.

Aos amigos do Laboratório de Hanseníase: Leonardo, Júlio, André, Marjorie, Viviane, Lívia, Fernanda, Flávio, Harrison, Fabrício, Paula, Camila, Rafael, Sidra, Harrison, Chyntia, Rosana, Cristiana, Roberta; pela grande amizade que possuo com cada um de vocês.

Finalmente, agradeço aos fundos de amparo à pesquisa: CNPq, CAPES E Fulbright, pelo financiamento do projeto.

# ÍNDICE

Índice das tabelas.....	VIII
Índice das Figuras.....	IX
Lista de siglas e abreviaturas.....	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XIV
Introdução.....	01
1.    Aspectos gerais da hanseníase.....	01
2.    A biologia do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	07
3.    Mecanismos de aderência e invasão bacteriana.....	13
4.    O epitélio respiratório como principal porta de entrada de microrganismos patogênicos.....	19
5.    O envolvimento do epitélio respiratório no curso natural da infecção pelo <i>M. leprae</i> .....	25
6.    O papel das proteínas micobacterianas HBHA e Hlp na interação com as células hospedeiras.....	27
7.    O papel das células epiteliais na resposta imune contra as micobactérias.....	31
Objetivos.....	34
Materiais e métodos.....	36
1.    Reagentes utilizados.....	36
2.    Células epiteliais utilizadas.....	36
3.    Cultivo das linhagens celulares.....	37
4.    Gel de colágeno para os cultivos de células epiteliais nasais primárias humanas.....	37
5.    Obtenção e cultivo de células epiteliais nasais primárias humanas.....	38
6.    Avaliação da pureza do cultivo das células epiteliais primárias.....	38
7.    Proteínas recombinantes utilizadas.....	39
8.    Micobactérias utilizadas.....	39

9.	Cultivo de <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	40
10.	Determinação da viabilidade do <i>M. leprae</i> .....	40
11.	Ensaio de interação <i>in vitro</i> .....	40
12.	Ensaio de invasão na presença dos inibidores de tubulina e actina.....	41
13.	Aquisição de imagens no microscópio confocal.....	41
14.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	42
15.	Comparando a capacidade fagocítica da célula epitelial alveolar (A549) e célula epitelial nasal (RPMI 2650).....	43
16.	Ensaio <i>in vitro</i> com as proteínas recombinantes de <i>M. leprae</i> .....	44
17.	Confirmando a ligação das proteínas recombinantes de <i>M. leprae</i> na superfície de <i>M. smegmatis</i> .....	45
18.	Análise da sobrevivência do <i>M. leprae</i> dentro das células epiteliais por ensaio <i>live/dead</i> .....	46
19.	Estudo das quimiocinas secretadas pelas células epiteliais.....	46
20.	Estudo da translocação do NF- $\kappa$ B.....	46
21.	Infecção de camundongos.....	47
22.	Biotinilação das proteínas de superfície de <i>M. leprae</i> .....	48
23.	Preparação das amostras para espectrometria de massa.....	49
24.	Espectrometria de Massa.....	50
25.	Análise dos dados obtidos na espectrometria de massa.....	50
26.	Análise estatística.....	51

<b>Resultados.....</b>	<b>52</b>
1. <i>Mycobacterium leprae</i> adere e invade às células epiteliais nasais e alveolares.....	52
2. Microscopia eletrônica das células epiteliais infectadas com <i>M. leprae</i> .....	61
3. A invasão do <i>M. leprae</i> nas células epiteliais independe da viabilidade bacteriana.....	64
4. O efeito de inibidores do citoesqueleto na invasão em células epiteliais por <i>M. leprae</i> .....	66
5. O <i>M. leprae</i> é capaz de sobreviver nas células epiteliais.....	68
6. Infecção intranasal de camundongos.....	71
7. Proteoma da superfície de <i>M. leprae</i> .....	73
8. O papel das proteínas HBHA e Hlp na interação entre o <i>M. leprae</i> e as células epiteliais nasais e alveolares.....	81
9. As células epiteliais nasais primárias e alveolares respondem ativamente após infecção por <i>M. leprae</i> .....	88
<b>Discussão.....</b>	<b>94</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>104</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>106</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>132</b>
<b>Artigo submetido.....</b>	<b>159</b>

## Índice das tabelas

Tabela 1. Comparando os genomas de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> .....	11
Tabela 2. Relação dos anticorpos utilizados no ensaio imunoenzimático (ELISA).....	45
Tabela 3. Análise da presença de <i>M. leprae</i> no trato respiratório de camundongos C57BL/6 infectados pela via intranasal.....	71
Tabela 4. Novas proteínas identificadas no presente estudo.....	78
Tabela 5. Proteínas identificadas na superfície do <i>M. leprae</i> envolvidas provavelmente em adesão e/ou invasão.....	79
Tabela 6. Listagem de proteínas falso-positivas.....	132
Tabela 7. Proteínas totais identificadas da superfície do <i>M. leprae</i> .....	134



## Índice das Figuras

Figura 1. Prevalência global da hanseníase.....	2
Figura 2. Classificação de Ridley-Jopling.....	4
Figura 3. Representação esquemática da parede celular micobacteriana.....	9
Figura 4. Mecanismos de aderência bacteriana.....	14
Figura 5. Etapas no processo de infecção e disseminação bacteriana no hospedeiro.....	15
Figura 6. Esquema representando os epitélios alveolar e nasal.....	24
Figura 7. Regiões da proteína Hlp e a HBHA de <i>M. leprae</i> envolvidas na ligação à heparina e heparan sulfato. ....	30
Figura 8. Interação do <i>M. leprae</i> com as células epiteliais nasais e alveolares em 24 horas de infecção.....	55
Figura 9. Cinética de interação do <i>M. leprae</i> com células epiteliais nasais .....	56
Figura 10 Cinética de interação do <i>M. leprae</i> com células epiteliais alveolares.....	57
Figura 11. Comparando a atividade fagocítica das células RPMI2650 e A549.....	58
Figura 12. Isolamento de células epiteliais nasais primárias humanas (CENPH).....	59
Figura 13. <i>M. leprae</i> interage com células epiteliais nasais primárias humanas (CENPH).....	60
Figura 14. <i>M. leprae</i> reside dentro de vacúolos nas células epiteliais.....	63
Figura 15. <i>M. leprae</i> vivo e morto possuem a mesma capacidade de aderir e entrar em células epiteliais.....	65
Figura 16. Efeito de inibidores do citoesqueleto na internalização de <i>M. leprae</i> .....	67
Figura 17. O <i>M. leprae</i> sobrevive no ambiente intracelular de células epiteliais.....	69
Figura 18. Sobrevivência do <i>M. leprae</i> intracelular na célula A549 na temperatura de 37°C.....	70
Figura 19. Coloração álcool-ácido para detecção de <i>M. leprae</i> no epitélio alveolar.....	72
Figura 20. Controle de biotilação das proteínas de <i>M. leprae</i> .....	76

<b>Figura 21. Classificação funcional do proteoma de superfície de <i>M. leprae</i>.....</b>	<b>77</b>
<b>Figura 22. Efeito das proteínas HBHA e Hlp recombinantes de <i>M. leprae</i> na interação de microesferas (<i>beads</i>) com as células epiteliais A549 e RPMI2650.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 23. Quantificando a interação de microesferas (<i>beads</i>) pré-tratadas com Hlp ou HBHA com as células epiteliais.....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 24. A proteína Hlp interage mais com a célula A549 do que a HBHA.....</b>	<b>85</b>
<b>Figura 25. A proteína HBHA e Hlp se ligam à superfície de <i>M. smegmatis</i>.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 26. Efeito da proteína Hlp sobre a interação do <i>M. smegmatis</i> com as células epiteliais alveolares e nasais.....</b>	<b>87</b>
<b>Figura 27. <i>M. leprae</i> induz a expressão de IL-8 nas células epiteliais nasais primárias e alveolares.....</b>	<b>90</b>
<b>Figura 28. <i>M. leprae</i> induz a expressão de MCP-1 mas não de IL-6, RANTES e TNF-<math>\alpha</math> nas células epiteliais alveolares.....</b>	<b>91</b>
<b>Figura 29. <i>M. leprae</i> induz a ativação do dímero p65 para o núcleo em células epiteliais alveolares.....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 30. <i>M. leprae</i> aumenta os níveis de p65 nas células epiteliais alveolares.....</b>	<b>93</b>

## **Lista de siglas e abreviaturas**

<b>A549</b>	Linhagem de pneumócitos do tipo II humanas
<b>ADC</b>	Catalase, albumina bovina e glicose
<b>BB</b>	Borderline-Borderline
<b>BCG</b>	Bacilo Cálmette-Guérin
<b>BL</b>	Borderline-Lepromatosa
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>BT</b>	Borderline-Tuberculóide
<b>CK19</b>	Citoqueratina-19
<b>D.O.</b>	Densidade óptica (absorbância)
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático ligado à enzima
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HBHA</b>	Hemaglutinina ligante de heparina
<b>Hlp</b>	Proteína semelhante à histona
<b>IB</b>	Índice baciloscópico
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-13</b>	Interleucina-13
<b>IL-4</b>	Interleucina-4
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>MIF</b>	Mediana da intensidade de fluorescência
<b>IP</b>	Iodeto de propídeo
<b>LL</b>	Forma polar Virchowiana ou lepromatosa da hanseníase
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática derivada de monócito
<b>MOI</b>	Multiplicidade de infecção

<b>MS</b>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<b>MS+HBHA</b>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> pré-tratado com HBHA
<b>MS+Hlp</b>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> pré-tratado com Hlp
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator de transcrição kappa B
<b>OADC</b>	Ácido oleico, catalase, albumina bovina e glicose
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato
<b>PDIM</b>	Dimicocerosato de phthiocerol
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PGL-1</b>	Glicolípido fenólico-1
<b>Rantes</b>	Regulação da expressão e secreção sob a ativação de células T normais
<b>RPMI 2650</b>	Células epiteliais de septo nasal humano
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral - $\alpha$
<b>TT</b>	Forma polar Tuberculóide da hanseníase
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia

## RESUMO

As vias aéreas são consideradas a principal porta de entrada para *Mycobacterium leprae*, o agente etiológico da hanseníase. Portanto, estudos sobre a interação do *M. leprae* com as células epiteliais são de grande relevância para a compreensão dos eventos iniciais que ocorrem durante a interação de *M. leprae* com o ser humano. Nesse contexto investigamos a interação *in vitro* de *M. leprae* com as células epiteliais alveolares (linhagem A549) e nasais humanas (linhagem RPMI2650). Nossos resultados mostram que *M. leprae* é capaz de aderir, entrar e também de sobreviver nas células epiteliais nasais e alveolares. Entretanto, *M. leprae* possui uma maior capacidade de aderir e invadir as células A549. Ademais, a habilidade de *M. leprae* de entrar em células epiteliais nasais foi confirmada através do isolamento e infecção de células epiteliais nasais primárias humanas advindas de pacientes com polipose nasal. Também demonstramos que o processo de entrada do bacilo nas células epiteliais é um processo passivo dependente de microfilamentos de actina e também de tubulina. Visto que a adesão é um evento crucial no estabelecimento da infecção, torna-se relevante a identificação de proteínas de superfície expostas em *M. leprae*. Para atingir este objetivo, *M. leprae* isolado do coxim plantar de camundongo nude foi pré-incubado com biotina e em seguida as proteínas biotinizadas foram purificadas com microesferas magnéticas recobertas com estreptavidina e finalmente os peptídeos digeridos foram submetidos a LC/MS-MS. Com esta metodologia, identificamos 279 proteínas na superfície de *M. leprae*. Dentre este conjunto de proteínas, identificamos 12 potenciais adesinas previamente descritas e ainda confirmamos a presença da proteína semelhante à histona (Hlp) e da hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) na superfície de *M. leprae*. Estudos com a Hlp e a HBHA recombinante de *M. leprae* mostraram que ambas proteínas são capazes de interagir com as células epiteliais alveolares. No entanto, apenas a Hlp foi capaz de se ligar às células epiteliais nasais. A inoculação de *M. leprae* no septo nasal de camundongos resultou na infecção de macrófagos e também de células epiteliais pulmonares. Além disso, *M. leprae* induziu a expressão de IL-8 nas células A549 e nas células epiteliais primárias humanas. Ainda, *M. leprae* foi capaz de induzir a produção de MCP-1 nas células A549. A bactéria também foi capaz de aumentar os níveis da subunidade p65 de NF- $\kappa$ B no extrato nuclear das células alveolares. Concluindo, nossos dados reforçam a importância da interação do *M. leprae* com o epitélio respiratório durante eventos iniciais da infecção.

## ABSTRACT

---

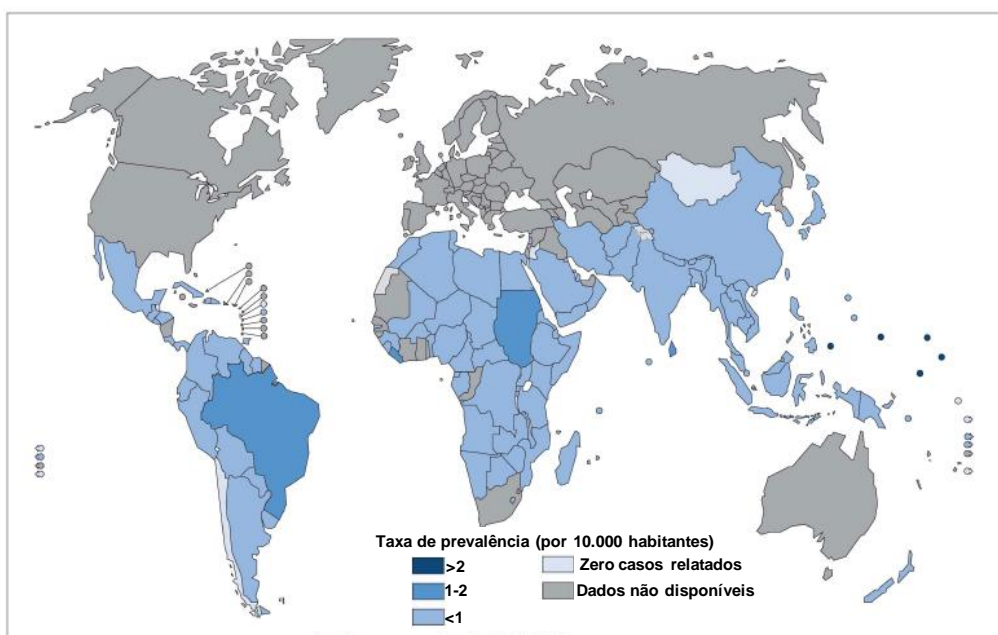
The airways are considered the major port of entry of *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. Therefore, studies on the *M. leprae* interaction with epithelial cells are of great relevance to shed light on earlier events in *M. leprae*-host interaction. We examined the *in vitro* interaction between *M. leprae* and human alveolar and nasal epithelial cells. It was observed that *M. leprae* can enter both cell types and that epithelial cells can sustain bacterial survival. However, *M. leprae* had a higher capacity to bind and invade alveolar epithelial cells. Additionally, bacterial ability to interact with nasal epithelial cells was confirmed through the isolation and infection of nasal primary epithelial cells. Moreover, *M. leprae* entry in epithelial cells is a passive process and actin/tubulin-dependent. Since a critical aspect for understanding the mechanisms of infection is the identification and characterization of the adhesins involved in pathogen-host cell interactions, we studied the surface proteome of nude mouse-derived *M. leprae* to uncover potential adhesin candidates relevant in *M. leprae*-epithelial cell interaction. Two hundred and seventy-nine cell surface-exposed proteins were identified based on selective biotinylation, streptavidin-affinity purification and shotgun mass spectrometry. Among these proteins, the histone-like protein (Hlp) and hemagglutinin binding heparin (HBHA), two major mycobacterial adhesins, were shown to be exposed on the *M. leprae* surface and to mediate bacterial attachment to epithelial cells. Delivery of *M. leprae* to the nasal septum of mice resulted in infection of macrophages and also epithelial cells in the lung tissue. Additionally, *M. leprae* induces IL-8 in A549 cells but not in RPMI cells. However, human primary nasal epithelial cells secrete IL-8 during *M. leprae* infection. Also, alveolar epithelial cells produce monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) during *M. leprae* infection. Moreover, p65 NF- $\kappa$ B subunit levels in A549 nuclear extracts increase in response to *M. leprae*. Altogether, our data point to the potential of the epithelial airway mucosa as a primary site of *M. leprae* infection in humans.

## 1. Aspectos gerais da hanseníase

A hanseníase é uma das doenças mais antigas que acomete o homem. As referências mais remotas datam de 600 a.C. e procedem da Ásia, que, juntamente com a África, são consideradas como o possível berço da doença ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1466](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1466)). A doença esteve presente em todos os continentes, deixando uma terrível imagem na memória da humanidade. O agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, foi a primeira bactéria a ser identificada como causadora de uma doença humana. A sua descoberta se deu em 1873 pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen (Eidt, 2004). Nas Américas, a hanseníase veio através dos colonizadores, entre os séculos XVI e XVII, pois não havia indícios da doença entre os nativos (Opromolla, 1981 e 2000), sendo que os primeiros casos de indivíduos infectados com *M. leprae* foi no ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (Brasil, 1989).

Atualmente, todos os países sul-americanos possuem indivíduos com hanseníase, sendo o Brasil o país de mais alta incidência ([www.who.int/leprosy](http://www.who.int/leprosy), ver Figura 1). No Brasil, as regiões mais afetadas são as regiões norte, centro-oeste e nordeste, enquanto que a região sul é a que possui os menores índices de detecção. Portanto os fatores sociais e históricos podem em parte explicar o maior número de pessoas infectadas em certas regiões do Brasil ([http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_novembro.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf)).

Em 2011, houve um total de 30.298 novos casos detectados, resultando em um coeficiente de casos novos de 15,88 por 100 mil habitantes. Ainda no Brasil, a hanseníase apresenta tendência de estabilização dos coeficientes de detecção, porém em patamares muito altos, justificando o esforço pela redução da doença. Após mais de duas décadas de implantação da poliquimioterapia, assim como a ampliação dos serviços de saúde do Sistema Único de Saúde (SUS), ocorreu uma desaceleração na ocorrência de novos casos. Entretanto, os níveis médios de detecção permanecem elevados, justificando assim novas estratégias, tanto sociais quanto científicas, no combate à hanseníase.



**Figura 1. Prevalência global da hanseníase.** Mapa representativo da distribuição mundial da hanseníase no início de 2011 ([http://www.who.int/lep/situation/Leprosy\\_PR\\_2010.pdf](http://www.who.int/lep/situation/Leprosy_PR_2010.pdf)).

A hanseníase possui uma grande diversidade de manifestações clínicas e histopatológicas, resultando essa diversidade da capacidade do hospedeiro de gerar uma resposta imune celular contra o *M. leprae* (Scollard *et al.*, 2006) (Figura 2). Em 1966, foi criado um esquema de classificação levando em conta critérios imunológicos e histológicos (Ridley e Jopling, 1966) (Figura 2).

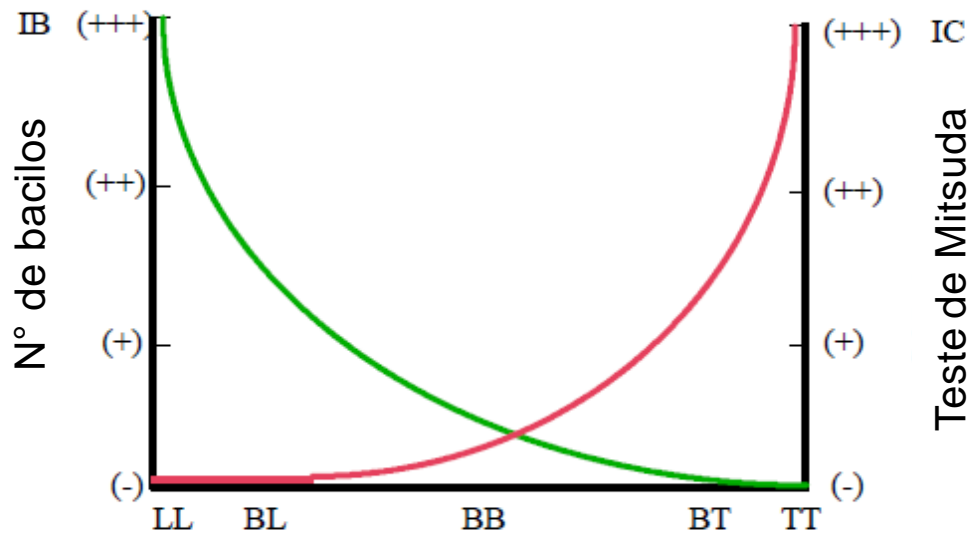
As formas clínicas formam um espectro, no qual os extremos são constituídos pelas formas polares tuberculóide e lepromatosa (também chamada virchoviana), que constituem padrões evidentemente opostos da doença. Além disso, para incluir os casos que estariam perto do extremo tuberculóide ou lepromatoso, mas que no entanto pelos aspectos histológicos e imunológicos não se enquadram em nenhum dos extremos, foi criado o termo dimorfo ou borderline que correspondem às formas intermediárias da doença. É importante ressaltar que a hanseníase dimorfa pode evoluir para a hanseníase da forma lepromatosa ou para a tuberculóide.

Ridley e Jopling ainda levaram em consideração outros elementos para a classificação dos casos: teste cutâneo de Mitsuda, estabilidade imunológica, ocorrência



de eritema nodoso hansênico, presença de bacilos na mucosa nasal, quantidade de bacilos no granuloma, presença de células epitelióides, células gigantes tipo Langhans, células gigantes de Touton, globias, células espumosas, linfócitos, e destruição de nervos. Este esquema de classificação também está correlacionado com o número de bacilos álcool-ácido resistentes presentes na derme – geralmente expresso em escala logarítmica pelo índice bacteriológico (IB), com uma pontuação que varia de 0 a  $\geq 6$  (Figura 2). Ainda neste método de classificação, um valor de IB maior ou igual a 2 em qualquer local da pele é considerado como multibacilar, ou seja, um paciente com alto número de bacilos. Por outro lado, um indivíduo com IB abaixo de 2 é classificado como paciente paucibacilar, isto é indivíduo com baixa carga bacilar.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) também classifica pacientes em pauci ou multibacilares com base na contagem de lesões da pele (paucibacilar,  $\leq 5$  lesões; multibacilar,  $>5$  lesões) (WHO,1995). A classificação do paciente em pauci ou multibacilar é importante pois irá determinar o tipo de tratamento poliquimioterápico que o mesmo irá receber. A OMS preconiza o uso de dois diferentes regimes de terapia multidrogas. Atualmente, pacientes paucibacilares são tratados por 6 meses com uma dose diária de 100 mg de dapsona e uma dose mensal de 600 mg de rifampicina, sob administração supervisionada, enquanto que os pacientes multibacilares recebem, além da dapsona e rifampicina, 300 mg de clofazimina a cada mês sob supervisão médica (WHO, 1998).



**Figura 2. Classificação de Ridley-Jopling.** As formas clínicas da hanseníase dependem do tipo de resposta imune do hospedeiro ao *M. leprae*. O índice baciloscópico (IB) é inversamente proporcional à imunidade celular (IC). A imunidade celular do paciente é investigada pelo Teste de Mitsuda. TT - forma polar Tuberculoíde (estável); LL – forma polar Virchowiana ou Lepromatosa (estável); BT, BB e BL – Grupo Borderline (instável) (Figura extraída de Goulart *et al.*, 2002). A linha verde representa o índice baciloscópico e a linha rosa a imunidade celular (determinada pelo Teste de Mitsuda).

A hanseníase da forma tuberculoíde apresenta uma vigorosa resposta imune celular, poucos bacilos e lesões limitadas. Ainda, esta forma clínica possui granulomas constituídos de agregados de células fagocitárias mononucleares com diferenciação epitelióide bem evidente e participação de células gigantes multinucleadas tipo Langhans no centro da lesão com a presença de linfócitos que conferem um halo denso contornando este granuloma (Fleury, 1989).

Pacientes que apresentam esta forma clínica são positivos no Teste de Mitsuda. Para melhor compreensão, o teste de Mitsuda consiste na injeção intradérmica de lepromina, uma suspensão de tecidos ricos em *Mycobacterium leprae*, oriundos de pacientes lepromatosos, triturados em uma solução isotônica de cloreto de sódio, e esterilizada pelo calor, capaz de provocar uma reação de hipersensibilidade tardia. Esta reação, que é lida após 28 dias de aplicação, mede a capacidade de um indivíduo de gerar uma resposta imune celular contra o *M. leprae* em caso de uma eventual infecção.

Caso o resultado do exame for positivo significa que o indivíduo possui uma menor chance de evoluir para a forma lepromatosa da hanseníase. No entanto, se o resultado do exame for negativo as chances do paciente evoluir para o quadro lepromatoso são maiores. No polo oposto, a forma lepromatosa, os indivíduos possuem uma enorme susceptibilidade ao *M. leprae*, resultando em uma proliferação disseminada do bacilo. Esta forma clínica apresenta lesões de pele difusamente distribuídas, além de possuir uma forte resposta humoral (Figura 02). A lesão histopatológica do paciente lepromatoso mostra um extenso infiltrado composto de histiócitos-macrófagos com citoplasma carregado de bacilos e lipídeos, conferindo o aspecto de células espumosas (células de Virchow) e às vezes multivacuoladas.

O grupo de formas borderline é altamente complexo e instável, sendo sua classificação baseada no aumento do número de bacilos em granulomas e também em ramos nervosos além de diminuição do número de linfócitos e um aumento de macrófagos indiferenciados (Fleury, 1989).

A forma borderline tuberculóide (BT) é a forma borderline na qual o indivíduo apresenta uma maior resistência contra a doença, tendo raros bacilos e o granuloma formado por células epitelióides focalizadas por zona periférica de linfócitos com presença de células gigantes tipo Langhans. Os casos borderline-borderline (BB) são pouco frequentes e tendem a evoluir para um dos pólos. O número de bacilos é maior, com células epitelióides difusamente espalhadas por todo o granuloma e não focalizadas por zonas de linfócitos. Células gigantes e linfócitos em geral são escassos e difusos. Há presença de edema intra e intercelular o qual é um aspecto comum do BB. Por fim, a forma borderline-lepromatosa apresenta um granuloma contendo macrófagos indiferenciados com um grande número de bacilos (Ridley & Jopling, 1966).

É importante ressaltar que todas as formas clínicas apresentam danos neurais ocasionados pela interação do *M. leprae* com as células de Schwann do sistema nervoso periférico. Estas células são responsáveis por produzir um envoltório constituído de camadas de membrana que envolvem o axônio, acarretando em seu isolamento elétrico. Esta camada de membrana especializada é chamada de bainha de mielina, responsável pela condução saltatória dos estímulos nervosos propagados pelo axônio. O sistema nervoso periférico consiste de nervos mielinizados e não mielinizados, envolvidos por uma lâmina basal (Webster et al., 1973; Bunge and Bunge, 1996). Estudos mostram que

a interação entre o *M. leprae* e as células de Schwann é devido às interações que ocorrem entre moléculas de superfície do *M. leprae* e as moléculas que compõem a lâmina basal (Rambukkana *et al.*, 1997; Rambukkana *et al.*, 1998).

A transmissão da hanseníase ocorre por contato pessoa-pessoa, sendo que todas as formas clínicas possuem papel na transmissão da doença. Entretanto, a forma lepromatosa desempenha um papel mais importante na transmissão. A principal de via de infecção ainda é incerta, entretanto, acredita-se que o *M. leprae* se dissemina através da inalação de aerossóis ou pelo contato cutâneo com secreções respiratórias ou exsudatos de feridas. Encontra-se uma grande quantidade de *M. leprae* nas secreções nasais de pacientes com lepra lepromatosa, levando a crer que estes pacientes possuam um papel essencial na dispersão do bacilo.

Estudos histopatológicos da mucosa nasal de pacientes que apresentam a doença em estágio avançado mostram que a principal fonte de dispersão do bacilo é a mucosa nasal e não a pele (McDougall *et al.*, 1975), indicando que a liberação do *M. leprae* pela mucosa nasal é a principal forma de transmissão da doença. Além disso, a mucosa nasal aparenta ser a principal porta de entrada para o patógeno, assim como ocorre na tuberculose. Entretanto, existem poucos estudos *in vitro* sobre a interação entre o *M. leprae* e o epitélio nasal, sendo portanto um vasto campo que necessita ser explorado.

## 2. A biologia do *M. leprae*

O *M. leprae* pertence ao filo *Actinobacteria*, e ao gênero *Mycobacterium*, possuindo em seu genoma um alto conteúdo de nucleotídeos de citosina e guanina (conteúdo G+C). Estes microrganismos ocorrem como bastonetes retos ou ligeiramente curvados, embora também possam aparecer em forma de hifa que se fragmentam em elementos cocóides ou em bastões (Tortora *et al.*, 2005).

*M. leprae* possui preferência pelas áreas periféricas do corpo, explicando, em parte, o motivo pelo qual a hanseníase afeta a pele, a mucosa nasal e os nervos periféricos. Este microrganismo tem preferência pelas células de Schwann do sistema nervoso periférico. Ainda, estudos prévios indicam que o *M. leprae* tem preferência por células de Schwann não mielinizadas (Rambukkana *et al.*, 2002), sendo que em estágios avançados da doença as células mielinizadas também se encontram infectadas.

*M. leprae*, assim como os demais microrganismos que compõem o gênero *Mycobacterium*, possui como característica uma incomum parede celular composta de ácidos micólicos, que formam uma camada cérea, impermeável à água, fazendo assim com que estas bactérias sejam resistentes ao ressecamento. Além disso, os ácidos micólicos são responsáveis por uma importante característica das micobactérias: a álcool-ácido resistência. Esta característica se deve ao fato de que quando as micobactérias são coradas com fucsina, um corante básico, e em seguida submetidas a descoloração com uma solução contendo etanol e ácido clorídrico, a fucsina permanece presa à parede da micobactéria.

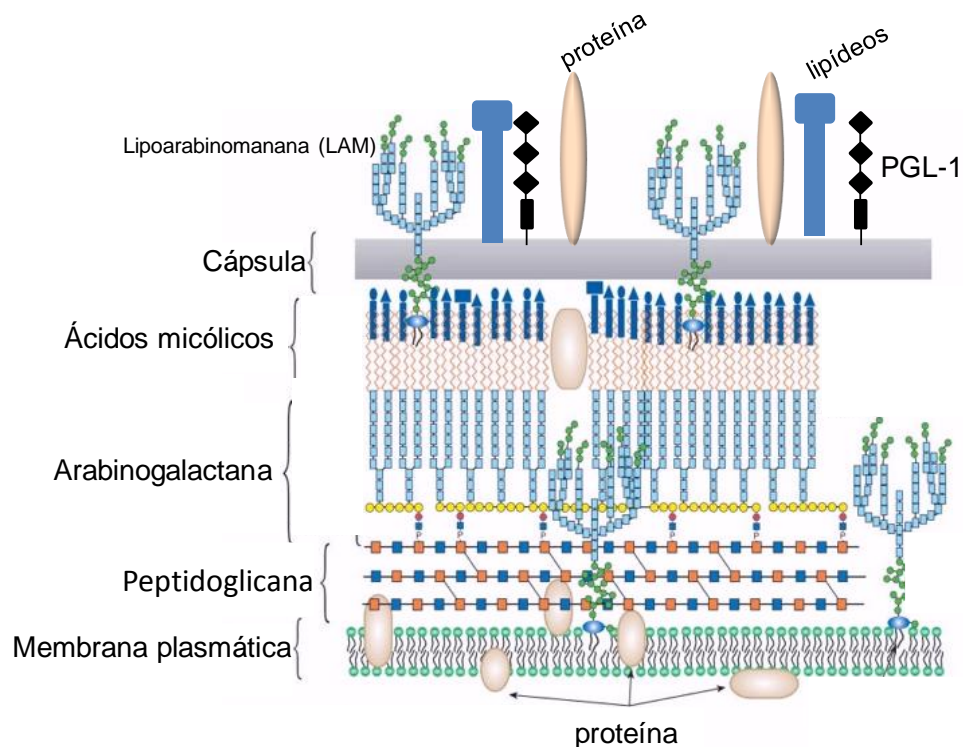
Outros gêneros de bactérias são fracamente ácido-resistentes, como por exemplo, a *Nocardia* e também o *Rhodococcus*. Os ácidos micólicos são ácidos graxos longos e ramificados ligados por ligação éster à arabinogalactana. A cadeia principal possui de 70 a 90 carbonos, enquanto que as ramificações (cadeia alfa) possuem de 20 a 25 carbonos, fazendo com que estas cadeias sejam as maiores quando comparadas aos outros gêneros do filo *Actinobacteria* (tais como *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*), permitindo assim a distinção entre as micobactérias e os demais gêneros da ordem *Actinomycetales* (Brennan & Nikaido, 1995).

A estrutura básica do envelope celular das micobactérias é típica de bactérias gram-positivas, constituída por uma espessa camada de peptidoglicana. No entanto,

diferentemente da maior parte das bactérias gram-positivas, as micobactérias possuem em sua parede celular uma camada assimétrica de ácidos micólicos além de um arranjo diversificado de lipídeos livres, formando uma membrana externa (Brennan, 2003; Daffe & Draper, 1998).

As cadeias dos ácidos micólicos constituem a porção mais interna dessa membrana, enquanto que, os lipídeos livres fazem parte da porção mais externa, assim como proteínas, polissacarídeos e glicolipídeos. Estes lipídeos livres estão intercalados com os ácidos micólicos e são específicos para cada micobactéria. Os ácidos micólicos estão covalentemente ligados ao polissacarídeo arabinogalactana, o qual, por sua vez, está ligado à camada de peptidoglicana também de forma covalente (Crick *et al.*, 2001). Portanto, o envoltório celular das micobactérias, de uma forma geral, é composto de três componentes principais: a camada de peptidoglicana, as cadeias de ácidos micólicos e um material capsular composto basicamente de polissacarídeos tais como a glicana e a arabinomanana (Figura 3). Curiosamente, a parede celular do *M. leprae* contém uma extensa zona externa eletrotransparente de natureza lipídica que contém uma grande abundância de dimicocerosato de phthiocerol (PDIM) e também de glicolipídeo fenólico (PGL-1) (Brennan, 1984; Rastogi *et al.*, 1986).

O PGL-1 é específico para *M. leprae*, enquanto PDIM também está presente em *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose, e está relacionado à patogênese dessa micobactéria (Cox *et al.*, 1999). O PGL-1 também está envolvido na resistência aos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Neill e Klebanoff, 1988), além de atividades imunomodulatórias (Mehra *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1989) e fixação do complemento (Schlesinger & Horwitz, 1991). Além disso, o PGL-1 atua no processo de invasão do *M. leprae* em células de Schwann através da interação com laminina-2 (Ng *et al.*, 2000).



**Figura 3. Representação esquemática da parede celular micobacteriana.** Os ácidos micólicos estão ligados às moléculas de arabinogalactana (arabinana + galactana) os quais formam ligações com a espessa camada de peptidoglicanas (barras cinza). Moléculas de glicolipídeos, assim como lipídeos, estão expostas na superfície através de sua interação com os ácidos micólicos, formando assim o material capsular (Draper, 1982).

Além da presença de PGL-1 em sua parede, o *M. leprae* se diferencia de muitas micobactérias pelo fato de ainda não poder ser cultivado *in vitro*. Atualmente, o seu cultivo é possível em dois modelos animais: o tatu da espécie *Dasypus novemcinctus*, comumente chamado de tatu de nove bandas, e o camundongo nude. Essa espécie de tatu é excepcionalmente suscetível ao *M. leprae*, devido em parte, ao fato desse animal apresentar uma temperatura corporal em torno de 30°C a 35°C, faixa de temperatura que propicia a longevidade do bacilo (Kirchheimer e Storrs, 1971; Kirchheimer *et al.*, 1972).

O tatu de nove bandas é o único modelo animal imunologicamente competente que desenvolve infecção disseminada após inoculação experimental de *M. leprae*. A inoculação intravenosa de  $10^8$  a  $10^9$  bactérias resulta no aumento de 10.000 vezes no

número de bacilos após 18 meses de infecção, podendo render até quantidades em gramas de *M. leprae*, o que fez com que este animal fosse utilizado por mais de 30 anos para cultivo *in vivo* de *M. leprae* (Job *et al.*, 1985).

Exames histopatológicos de tatus infectados revelam infiltrados inflamatórios no fígado, baço, linfonodos, além de lábios, língua, nariz, mucosa nasal, pele, medula óssea, olhos, pulmões e sistema nervoso periférico. Assim como nos humanos, os tatus podem modular positiva ou negativamente sua resposta ao *M. leprae* durante o curso da infecção. Ainda, apenas 10% dos animais infectados, assim como ocorre nos humanos, irão desenvolver a doença. Entretanto, diferentemente do que ocorre na infecção humana, 90% dos animais adoentados irão sucumbir à doença (Job *et al.*, 1992). Estudos com animais que vivem em ambiente selvagem, especificamente no centro-sul dos Estados Unidos, mostraram que esses tatus atuam como hospedeiros naturais do *M. leprae* (Truman, 2005). Entretanto, poucos relatos na América Central e também na América do Sul são conhecidos, e é difícil estabelecer uma relação entre a aquisição da doença com a exposição ao tatu infectado.

Com relação ao camundongo nude, a primeira vez em que foi mostrado que o *M. leprae* é capaz de crescer neste modelo animal foi em 1976, quando Colston e Hilson inocularam *M. leprae* na pata de camundongos normais e também em camundongos imunocomprometidos por timectomia e irradiação (Colston & Hilson, 1976). Neste trabalho, a inoculação da bactéria na pata de camundongos resultou em uma infecção localizada e auto-limitante, exibindo uma carga bacilar máxima de  $10^6$  microrganismos por pata. Entretanto, nos camundongos timectomizados e irradiados observou-se um aumento da carga bacilar e também a disseminação do bacilo, mostrando dessa forma a importância da resposta das células T na defesa contra o *M. leprae*. Além disso, a multiplicação do *M. leprae* se mostrou desimpedida, pois as patas de camundongo nude apresentaram em torno de  $10^{10}$  bacilos por pata.

Esses modelos animais forneceram uma série de recursos básicos para estudos metabólicos, genéticos e antigênicos do bacilo. Além disso, o crescimento do *M. leprae* em camundongos nude também foi uma ferramenta valiosa para estudos de avaliação da viabilidade do bacilo (Lahiri<sup>a</sup> *et al.*, 2005; Lahiri<sup>b</sup> *et al.*, 2005). Nestes trabalhos, os autores mostraram que a bactéria apresenta uma alta queda em sua atividade metabólica



a 37°C. Por outro lado, a atividade metabólica da bactéria permanece inalterada a 33°C, confirmando, portanto, a preferência do patógeno por temperaturas mais baixas.

Além dos estudos de viabilidade bacteriana, esses animais permitiram o cultivo de *M. leprae* para estudos de genômica e também de proteoma do bacilo, permitindo assim um melhor entendimento sobre a sua biologia (Cole *et al.*, 2001; Marques *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2008). Para a investigação do genoma bacteriano, *M. leprae* purificado de lesões de peles de um paciente multibacilar (cepa Thai 53) e posteriormente expandido e purificado do fígado de tatu foi utilizado (Cole *et al.*, 2001). O genoma do *M. leprae* contém cerca de 3.268.203 pares de base (pb) e possui uma média de conteúdo de citosina e guanina (G+C) de 57,8%. Tais valores são muito menores do que os relatados para o genoma do *M. tuberculosis*, que possui em torno de 4000 genes, 4.411.532 pb e 65,5% de G+C (Cole *et al.*, 1998). Apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* possui genes que codificam proteínas, enquanto que 27% são de pseudogenes e o restante 23,5% não parecem codificar nenhuma proteína, podendo corresponder a sequências regulatórias ou mesmo remanescente de genes mutados. Portanto, como mostrado nos dados da Tabela 1, o *M. leprae* sofreu evolução reductiva, acarretando em uma perda massiva de genes, explicando parcialmente o motivo pelo qual o *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório.

**Tabela 1: Comparação dos genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001)**

<b>Características de cada genoma</b>	<b><i>Mycobacterium leprae</i></b>	<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>
Tamanho do genoma (pb)	3.268.203	4.411.532
Conteúdo G+C (%)	57,7%	65,61%
Genes que codificam proteínas (%)	49,5%	90,8%
Genes que codificam proteínas (n°)	1.604	3.959
Pseudogenes (n°)	1.116	6

Os dados do genoma de *M. leprae* ainda mostram que o metabolismo lipídico nesta bactéria é preponderante. Entretanto, a quantidade de genes envolvidos com o metabolismo lipídico ainda é menor do que em *M. tuberculosis*, no qual o envelope celular possui uma maior diversidade de lipídeos, glicolipídeos e carboidratos. Além disso, as deleções eliminaram vários genes envolvidos com importantes atividades metabólicas, incluindo a produção de sideróforos e também das cadeias oxidativas e anaeróbicas, assim como sistemas catabólicos e seus circuitos de regulação. Um estudo do nosso grupo utilizando uma metodologia de proteômica mostrou que o *M. leprae* manteve, durante sua história evolutiva, uma alta porcentagem de enzimas responsáveis pela biossíntese e degradação de lipídeos (Marques *et al.*, 2008), confirmando os dados obtidos no estudo do genoma (Cole *et al.*, 2001). Também foi observado que os mecanismos anabólicos estão ativos na bactéria purificada de tatu. Nesse trabalho, foi sugerido que a parede celular é um compartimento altamente ativo, estando envolvido em processos metabólicos e celulares, tais como a oxidação do colesterol, visto que a enzima ChoD foi encontrada na fração de parede. Ainda com relação ao proteoma, foi visto que as enzimas para a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos também foram mantidas e estão associadas com a fração de membrana, sugerindo que os ácidos graxos, mais do que os carboidratos, são a fonte de carbono dominante utilizada pelo *M. leprae* durante a infecção (Marques *et al.*, 2004).

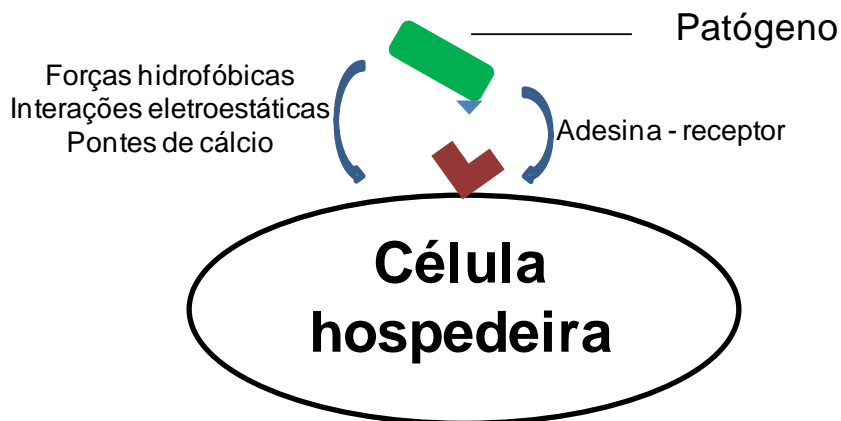
### 3. Mecanismos de aderência e invasão bacteriana.

Para obter sucesso na colonização, patógenos microbianos necessitam aderir às superfícies do hospedeiro, uma etapa crítica no estabelecimento da infecção. Inicialmente, a interação de um microrganismo com as células hospedeiras ocorre via processos não específicos, tais como interações hidrofóbicas entre moléculas da bactéria, como, por exemplo, os ácidos micólicos, com os ácidos graxos de membrana do hospedeiro. Além disso, interações eletrostáticas também auxiliam nesse processo. Muitas proteínas de superfície bacteriana, e também do hospedeiro, são eletricamente carregadas, podendo favorecer a atração da bactéria pela célula hospedeira.

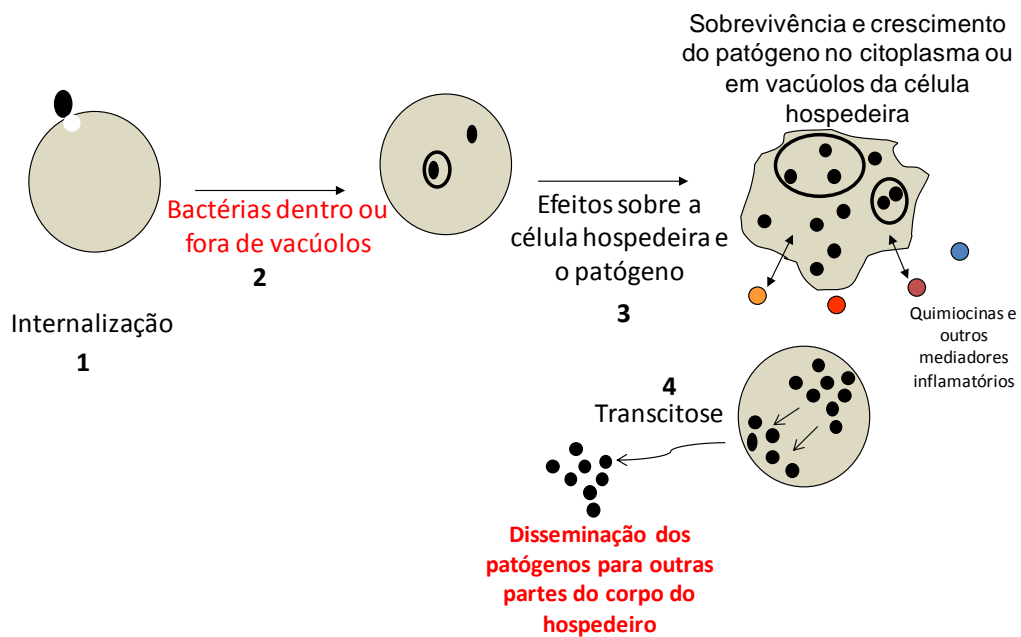
Outras forças, como van der Waals e pontes de cálcio, também fazem parte desta interação inicial (revisado por Wilson, 2002) (Figura 4). Dentre essas forças, porém, as interações hidrofóbicas são as mais importantes por serem as mais estáveis. Após esta primeira fase de interação inespecífica, as interações receptor-ligante irão desempenhar um papel crucial. Dentro deste contexto, as adesinas, moléculas presentes na superfície dos patógenos, são responsáveis por reconhecer de forma específica moléculas de superfície do hospedeiro que irão atuar como receptores. Apesar da importância destas moléculas para o sucesso do parasita, nem todas as adesinas são consideradas fatores de virulência essenciais, tendo em vista que uma única bactéria é capaz de expressar vários fatores de adesão (revisado por Krogfelt, 1991; Uliczka *et al.*, 2011).

Posteriormente, os patógenos são também capazes de invadir as células do hospedeiro e em seguida se multiplicar, interferindo com os mecanismos de defesa do hospedeiro e podendo causar danos teciduais (Figura 5). Um amplo arranjo de adesinas bacterianas tem sido identificado ao longo do tempo, sendo que alguns patógenos parecem possuir não menos do que uma dúzia de diferentes adesinas expressas de uma só vez e também em diferentes linhagens da mesma espécie. Além disso, as adesinas podem estar ou não associadas a estruturas microbianas denominadas fímbrias (adesinas fimbriais ou afimbriais, respectivamente). As fímbrias são apêndices filamentosos de superfície que variam em diâmetro e também em tamanho, sendo que não aparentam estar associadas à motilidade. Vários estudos demonstraram a presença dessas estruturas em inúmeras bactérias gram-negativas, tais como *Pseudomonas* (Fuerst & Hayward, 1969), *Vibrio* (Tweedy *et al.*, 1968) e *Herellea* (Swanson & Goldschneider, 1969),

assim como em bactérias gram-positivas, como no grupo A dos estreptococos (Swanson & McCarty, 1969) e em numerosas linhagens de *Corynebacterium renale* (Yanagawa & Otsuki, 1970). A bactéria *Bordetella pertussis*, por exemplo, possui vários fatores de aderência fimbriais e não fimbriais, mostrando desta forma a complexidade da aderência bacteriana às células do hospedeiro (Seros & Tuomanen, 1993; Conover *et al.*, 2010).



**Figura 4. Mecanismos de aderência bacteriana.** O esquema acima mostra os tipos de interações moleculares específicas (adesina-receptor) e inespecíficas (forças hidrofóbicas, pontes de cálcio) que ocorrem durante a adesão de uma bactéria na superfície celular do hospedeiro (adaptado de Wilson, 2002).



**Figura 5. Etapas no processo de infecção e disseminação bacteriana no hospedeiro.** Após a adesão, a bactéria pode posteriormente invadir, residir e se multiplicar dentro ou não de vacúolos da célula hospedeira, o que irá acarretar na secreção de inúmeros fatores inflamatórios que podem resultar no controle ou mesmo na disseminação do microrganismo no hospedeiro (adaptado de Wilson, 2002).

A bactéria, além de aderir diretamente nas células do hospedeiro, também pode interagir com a matriz extracelular. Quando o tecido sofre algum tipo de injúria (possivelmente devido à inflamação ou intoxicação), a matriz extracelular fica exposta, possibilitando a aderência do microrganismo. Existem vários exemplos de patógenos que utilizam os componentes de matriz extracelular para se ligar no hospedeiro (Westerlund, & Korhonen, 1993). As proteínas de matriz, tais como a fibronectina, a vitronectina, o fibrinogênio, colágeno, osteopontina e também a laminina, possuem sequências tripeptídicas de arginina, glicina e ácido aspártico (também chamadas de sequências RGD) como sítios de reconhecimento (Ruoslahti & Pierschbacher, 1987). As sequências RGD dessas proteínas são reconhecidas por integrinas, uma grande família de proteínas de ligação transmembrana que são homólogas. Desta forma, algumas bactérias se ligam, por exemplo, à fibrinogênio plasmático para poderem aderir às integrinas da célula hospedeira (Rao *et al.*, 1993). Alternativamente, muitas adesinas possuem sequências RGD permitindo aderência direta a integrinas da célula hospedeira (Leininger *et al.*, 1992).

Um exemplo interessante é o da *Neisseria meningitidis*, que desenvolveu um conjunto diverso de estruturas de superfície capazes de interagir com as células hospedeiras (Vries *et al.*, 1998). Neste contexto as proteínas de membrana externa das famílias Opa e Opc desempenham importante papel. Opc e Opa são proteínas que possuem peso molecular entre 24 e 35 kDa e que existem como múltímeros, sendo responsáveis por conferir coloração opaca às colônias além de facilitar a aderência e invasão dos meningococos em várias células hospedeiras (Achtman *et al.*, 1988; Virji *et al.*, 1992).

As proteínas Opa são capazes de se ligar aos receptores CD66 via domínio N-terminal desses receptores (Virji *et al.*, 1996). Através dessa interação, a *N. meningitidis* pode aderir em células epiteliais alveolares da linhagem A549. Com relação às proteínas Opc, foi mostrado que estas se ligam às proteoglicanas contendo heparan sulfato (Vries *et al.*, 1998). Ademais, o tratamento da bactéria com heparina diminui a aderência às células epiteliais, além de inibir a invasão. Além disso, foi mostrado nesse trabalho que o efeito da heparina sobre a adesão é dose-dependente. Portanto, a *N. meningitidis* explora as proteoglicanas da superfície celular para poder invadir as células epiteliais, com o auxílio da interação proteoglicanas-proteína Opc. Outro interessante trabalho mostrou que a proteína Opc de *N. meningitidis* é capaz de interagir com uma proteína do citoesqueleto chamada  $\alpha$ -actinina (Cunha *et al.*, 2009). Esta interação ocorre apenas após a invasão bacteriana e parece estar envolvida em eventos intracelulares que possam levar ao aumento da sobrevivência bacteriana além de uma intensa manipulação do citoesqueleto para ultrapassar barreiras celulares. Outro exemplo interessante são bactérias do gênero *Yersinia*, que aderem na superfície apical das células M através da ligação ao subgrupo de  $\beta$ -1 integrina (Schulte *et al.*, 2000). Posteriormente a *Yersinia* irá se translocar rapidamente do lúmen intestinal para os linfonodos. Estas bactérias também interagem indiretamente com as  $\beta$ -1 integrinas através da ligação às proteínas de matriz, como fibronectina e colágeno.

A relação do patógeno com as células hospedeiras frequentemente causa ativação dos mecanismos de sinalização do hospedeiro, tanto pela ação direta de fatores microbianos quanto pela indução da produção de fatores derivados do hospedeiro. A indução desses fatores altera a superfície do hospedeiro, fornecendo receptores alternativos para a interação com o patógeno. Um interessante exemplo é o de *M. tuberculosis* que é capaz de induzir a expressão de dectina-1, receptor de

reconhecimento de padrões capaz de se ligar a  $\beta$ -glicanas (Lee *et al.*, 2009). A indução desse receptor ocorre através do reconhecimento de *M. tuberculosis* pelo receptor semelhante a Toll-2 (TLR-2) em células epiteliais alveolares A549. Este estudo ainda mostrou que a TLR-2 induz a fosforilação da proteína cinase Src o que irá resultar na expressão de dectina-1. A expressão deste receptor é responsável pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-8, aumento da atividade microbicida através do aumento da geração de espécies reativas de oxigênio e também está relacionado com o processo de internalização do bacilo.

Outro exemplo é o da bactéria *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) que é uma das principais causas de diarreia infantil persistente especialmente em países em desenvolvimento (Kaper *et al.*, 2004). A principal característica da patogênese de EPEC é a lesão A/E (*Attaching / Effacing*), que é a perda de microvilos na mucosa intestinal levando à formação de um pedestal. Acredita-se que esta lesão é causada devido a uma proteína secretada pela EPEC chamada TIR (Receptor intimina translocada). A proteína TIR é introduzida para dentro da célula hospedeira através do sistema de secreção tipo III. Após atingir o citosol da célula hospedeira a proteína é fosforilada pelas quinases do enterócito sendo assim capaz de se inserir na membrana da célula, localizando-se externamente à membrana (Michgehl *et al.*, 2006). A partir desse momento a proteína está pronta para exercer uma de suas funções que é a de receptor da proteína intimina localizada na membrana externa da EPEC. Após a inserção na membrana os domínios citosólicos amino e carboxi terminal recrutam componentes do citoesqueleto exatamente onde as bactérias aderem disparando uma cascata de sinalização no hospedeiro levando à formação do pedestal (Deibel *et al.*, 1998; Devinney *et al.*, 2001).

Importante ressaltar que a adesão e a internalização são processos claramente distintos. Por exemplo, quando os ensaios de interação com *Trypanosoma cruzi* e macrófagos são realizados a 4°C, apenas a adesão irá ocorrer (De Meirelles *et al.*, 1982). Além disso, tratamento com inibidores da polimerização de actina tais como as citocalasinas mostram uma imagem clara da etapa de aderência. Portanto, a aderência de um parasita às células hospedeiras não significa necessariamente que a etapa de invasão irá ocorrer. Geralmente, organismos invasores utilizam uma classe de adesina, as chamadas invasinas, que induzem o engolfamento das bactérias pelas células hospedeiras. Esses mecanismos de aderência geralmente ativam sinais na célula hospedeira que diretamente ou indiretamente medeiam ou facilitam a entrada bacteriana

(Bliska *et al.*,1993; Rosenshine & Finlay,1993). Assim, a invasão bacteriana é um evento que depende de funções normais das células. Os componentes do hospedeiro fornecem a maquinaria necessária para a captura bacteriana.

No caso de *Yersinia pseudotuberculosis*, uma invasina se liga firmemente à família das integrinas  $\beta$ -1 mediando mecanismo semelhante à *zipper*, no qual a membrana vai envolvendo aos poucos a bactéria (Isberg & Leong, 1990). O mesmo ocorre com o *Mycobacterium avium*, no qual foi mostrada a formação de dobras na membrana das células epiteliais Hep-2, além de um processo conhecido como *ruffling* de membrana (Reddy & Kumar, 2000). No caso do *Trypanosoma cruzi*, um dos mecanismos de entrada é a macropinocitose, no qual as células emitem pseudópodos com a participação dos filamentos de actina (Schenkman *et al.*,1992). Em outro mecanismo conhecido como endocitose mediada por receptor, a emissão de pseudópodos não acontece, mas a participação dos filamentos de actina ainda é crucial. Os parasitas podem, ainda, induzir a invaginação da membrana sem a participação dos filamentos de actina, sendo esse um mecanismo ativo com gasto de energia (Schenkman *et al.*,1992).

Nos eventos que ocasionam a invasão, dois componentes do hospedeiro participam do processo: os filamentos de actina e os microtúbulos. Estudos com *Salmonella* mostraram que a prevenção da polimerização da actina inibe a internalização bacteriana, enquanto que a rede de microtúbulos não parece desempenhar um papel importante. Outros patógenos, tais como EPEC, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *N. gonorrhoeae*, *Citrobacter freundii*, *Campylobacter jejuni* e *Klebsiella pneumoniae*, requerem microtúbulos, uma rede formada por tubulina, para invadir as células (Finlay & Falkow, 1988). Além disso, a proteína EspG de EPEC pode formar complexos estáveis com tubulina *in vitro* (Hardwidge *et al.*,2005).

Trabalhos com *M. tuberculosis* demonstram que essa bactéria invade as células A549 via filamentos de actina e tubulina (Bermudez & Goodman, 1996). Com relação ao *M. leprae* foi visto que a fagocitose por células de Schwann é fortemente inibida pelo tratamento com citocalasina D (Mattos *et al.*, 2011). O mesmo ocorre na interação entre o *M. avium* e as células epiteliais intestinais, com a consequente formação de fagossomo (Bermudez & Sangari, 2001).



#### **4. O epitélio respiratório como principal porta de entrada de microrganismos patogênicos**

A via aérea é definida anatomicamente como o trato respiratório superior e o trato respiratório inferior. O trato respiratório superior compreende as fossas nasais e a nasofaringe, enquanto o trato inferior se inicia na laringe continuando até a traquéia e posteriormente se ramificando até chegar aos alvéolos pulmonares paredes de epitélio muito delgados constituindo o local onde ocorrem as trocas gasosas.

Os alvéolos são constituídos por três tipos celulares principais: células endoteliais dos capilares, pneumócitos do tipo I e pneumócitos do tipo II. As células endoteliais são as mais numerosas, possuindo um núcleo mais alongado que o dos pneumócitos. O pneumócito do tipo I, chamado também de célula alveolar pavimentosa, forma uma camada contínua e têm o núcleo achatado. Por outro lado, os pneumócitos do tipo II são células arredondadas que se localizam entre os pneumócitos do tipo I, com os quais formam desmossomos e junções unitivas (Figura 6A). Essas células são responsáveis por secretar um complexo lipoprotéico sintetizado no retículo endoplasmático rugoso e também no complexo de golgi, chamado surfactante pulmonar. A camada surfactante cobre a superfície dos alvéolos e exerce diversas funções importantes, sendo a mais evidente a redução da tensão superficial dos alvéolos, o que reduz a força necessária para a inspiração (Breeze & Wheeldon, 1977; Diamond *et al.*, 2000).

É comum ainda distinguir no aparelho respiratório uma porção condutora que compreende as fossas nasais, nasofaringe, laringe, traquéia, brônquios e bronquíolos e uma porção respiratória, constituída pelos bronquíolos respiratórios, dutos alveolares, e alvéolos (Breeze & Wheeldon, 1977; Harkema *et al.*, 2006). Além de possibilitar a entrada e a saída de ar, a porção condutora limpa, umedece e aquece o ar inspirado, protegendo o delicado revestimento dos alvéolos pulmonares. Dividida por duas passagens pelo septo nasal, a via aérea nasal se estende das narinas até a nasofaringe. A nasofaringe é a porção posterior das vias aéreas, separada de forma incompleta da orofaringe pelo palato mole. O vestíbulo é a porção mais anterior e dilatada das fossas nasais. Sua mucosa é a continuação da pele do nariz, porém o epitélio estratificado pavimentoso da pele logo perde sua camada de queratina e o tecido conjuntivo da derme dá origem à lâmina própria da mucosa (revisto por Harkema *et al.*, 2006). O vestíbulo

nasal possui uma grande variedade de pêlos perto das narinas, constituindo em uma barreira contra a penetração de partículas nas vias aéreas. Cada passagem nasal é definida por uma parede lateral, uma parede de septo, um teto e um piso. Estas passagens são bem vascularizadas e inervadas, sendo cobertas por uma contínua camada de muco, que se move de forma distal, através dos cílios, até atingir o esôfago.

A membrana mucosa, ou mucosa, que reveste as vias respiratórias, consiste de duas camadas: a superfície luminal do epitélio e o tecido conjuntivo ou lâmina própria (Figura 6B). A lâmina própria possui uma grande diversidade, dependendo da localização intranasal, de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, glândulas e células mesenquimais (tais como fibroblastos, linfócitos e mastócitos), os quais estão imersos no tecido conjuntivo propriamente dito. A maior parte da superfície luminal da mucosa nasal está recoberto por um material viscoso chamado muco. O muco tem como principal função a defesa do epitélio respiratório, filtrando o ar inalado através da captura de partículas além de certos gases ou vapores. O muco é produzido por células caliciformes na superfície do epitélio e nas glândulas subepiteliais da lâmina própria. A batida sincronizada dos cílios impulsiona o muco a diferentes velocidades, dependendo também da localização intranasal (Harkema *et al.*, 2006).

O epitélio das vias aéreas representa o sítio primário para a introdução e deposição de microrganismos potencialmente patogênicos no corpo, principalmente os patógenos de transmissão aérea (Diamond *et al.*, 2000). As fossas nasais são um dos locais que mais entra em contato com microrganismos patogênicos. O *Staphylococcus aureus*, por exemplo, ocorre regularmente nas fossas nasais de pacientes hospitalizados, trazendo sérias consequências (Kluytmans *et al.*, 1995). Pacientes colonizados são uma fonte predominante de *S. aureus* em hospitais. Além disso, uma proporção substancial de pacientes hospitalizados desenvolvem severas infecções de *S. aureus* advindo de seus próprios reservatórios nasais endógenos (Kluytmans *et al.*, 1997; Wertheim *et al.*, 2004). Ainda, a quantidade de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos vêm aumentando, tornando as terapias problemáticas (Shittu *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2006). Portanto, o transporte de *S. aureus* na mucosa nasal possui um papel importante na epidemiologia e patogênese das infecções provocadas por *S. aureus* (Kluytmans *et al.*, 1997). Apesar de não se saber ao certo como ocorre a aderência dessa bactéria no epitélio nasal, sabe-se que a aderência é um evento crucial no transporte dessa bactéria na mucosa nasal.

Glicoproteínas e proteoglicanas presentes no muco do epitélio nasal contribuem para a adesão de *S. aureus*. Linhagens deficientes em proteínas ligantes de fibronectina apresentam uma queda na interação com células epiteliais nasais primárias humanas, sugerindo que essas proteínas estariam envolvidas no processo de colonização do epitélio nasal (Mongodin *et al.*, 2002). Um estudo prévio utilizando epitélio primário advindo de pacientes com polipose nasal mostrou que a bactéria é capaz de aderir principalmente nas células não diferenciadas, mas exibe também uma baixa aderência nas células diferenciadas (Mongodin *et al.*, 2002). Outro trabalho mostrou evidências de que o *S. aureus* é capaz de interagir com a mucina nasal humana, podendo essa ser uma etapa crítica na colonização nasal (Shuter *et al.*, 1996). Além disso, *S. aureus* possui um grande potencial de invasão de células epiteliais, endoteliais, osteoblastos e também fibroblastos, explicando, em parte, a persistência desse microrganismo por longos períodos na mucosa nasal (Clement *et al.*, 2005).

A bactéria *Bordetella pertussis*, agente etiológico da coqueluche, tem a cavidade nasofaríngea como um importante reservatório. Vários estudos relatam que *B. pertussis* pode ser isolada da nasofaringe de crianças e adultos (Strebel *et al.*, 2001). Ainda, indivíduos que abrigam *B. pertussis* na nasofaringe são responsáveis pela transmissão da bactéria (Raymond *et al.*, 2007). Estudo envolvendo o cultivo de tecidos primários advindo de órgãos humanos mostrou que *B. pertussis* é encontrada principalmente em células epiteliais ciliadas das narinas (Soane *et al.*, 2000).

Trabalho recente demonstrou que *B. pertussis* produz um polissacarídeo que é crucial para a colonização do nariz e também da traquéia de camundongos (Conover *et al.*, 2010) Ainda, foi mostrado que este polissacarídeo não participa do processo de colonização dos pulmões. Finalmente, outras bactérias de importância médica também são encontradas na mucosa nasal, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e estreptococcus  $\beta$ -hemolíticos (Glück & Gebbers, 2003). Essas bactérias, assim como o *S. aureus*, são também capazes de causar doenças infecciosas, tais como sinusite, pneumonia e otite. Portanto, a mucosa nasal além de ser uma importante porta de entrada também se caracteriza como uma importante fonte de infecção entre humanos, visto que é um ambiente que tolera a colonização de microrganismos.

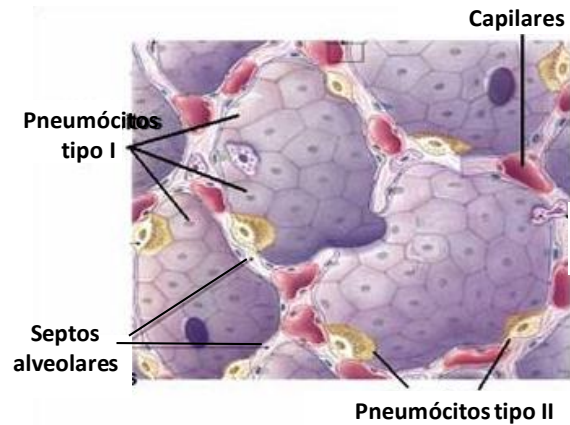
O epitélio alveolar, diferentemente do epitélio nasal, é um ambiente estéril com vários mecanismos do sistema imune inato que funcionam para manter a esterilidade do ambiente (Sethi *et al.*, 2006). Os fumantes, por exemplo, acabam por prejudicar os mecanismos da imunidade inata e, como consequência, alguns patógenos são capazes de persistir nas vias aéreas inferiores. Entre os capazes de colonizar o pulmão estão os Adenovírus, *Chlamydia pneumoniae*, *Pneumocystis jiroveci*, *H. influenzae*, além de outros patógenos bacterianos. *H. influenzae* é uma das bactérias mais frequentemente isoladas no caso de doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (Sethi *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2004).

A fibrose cística, distúrbio disseminado do transporte epitelial que afeta a secreção dos fluidos nas glândulas exócrinas e também no revestimento epitelial dos tratores respiratório, gastrointestinal e reprodutor, é uma doença que também facilita a colonização do pulmão por bactérias patogênicas tais como *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Thomassen *et al.*, 1987). Os pulmões desses pacientes são frequentemente colonizados durante a infância por *S. aureus* e *H. influenzae*, acarretando em danos à superfície do epitélio. Tais danos podem favorecer a adesão de *P. aeruginosa* ao epitélio pulmonar (revisto por Lyczak *et al.*, 2002). Apesar de *S. aureus* e *H. influenzae* serem capazes de causar danos ao epitélio, a infecção crônica por *P. aeruginosa* é a principal causa de queda da função pulmonar e também de mortalidade entre os pacientes com fibrose cística, causando danos à superfície epitelial e obstruindo as vias aéreas. A infecção por essa bactéria é caracterizada por intensa reação inflamatória caracterizada por um grande número de neutrófilos. Os danos também ocorrem devido a liberação por parte dos macrófagos de uma variedade de oxidantes e enzimas.

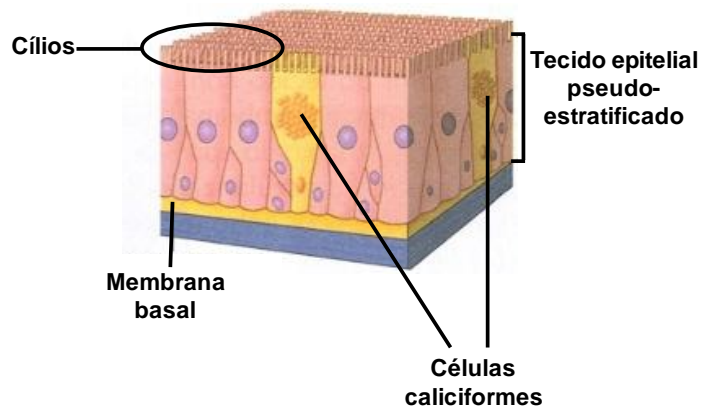
O pulmão de indivíduos sadios também pode ser infectado, originando uma pneumonia. Além disso, infecções micobacterianas tais como a tuberculose também podem atingir o epitélio alveolar. A tuberculose tem como principal característica a formação de um granuloma nos alvéolos pulmonares (Rubin, 2009). Granulomas estão presentes em pessoas com a imunidade intacta, mas ausentes ou fracamente formados em pessoas com a imunidade baixa (revisto por Tortora *et al.*, 2005). Os bacilos da tuberculose que atingem os alvéolos pulmonares são ingeridos por macrófagos, podendo parte dos bacilos serem mortos enquanto que outros permanecem vivos. Os bacilos sobreviventes se multiplicam dentro dos macrófagos, causando uma resposta quimiotática e atraindo outros macrófagos para o sítio da infecção. Em torno de 3

semanas, as células de defesa formam uma camada circundante, denominado tubérculo. No centro deste tubérculo estão os macrófagos, enquanto que na periferia temos linfócitos do tipo Th1 que estimulam os macrófagos a destruírem as micobactérias. Quando a doença é interrompida neste ponto, as lesões lentamente cicatrizam, tornando-se calcificadas. Entretanto se as defesas do corpo falham nesse estágio, o tubérculo se rompe e os bacilos são liberados nas vias aéreas pulmonares e posteriormente para o sistema vascular e linfático, causando a tuberculose miliar.

A



B



**Figura 6. Esquema representando os epitélios alveolar e nasal.** (A) O epitélio alveolar é constituído de dois tipos epiteliais: os pneumócitos do tipo I e os pneumócitos do tipo II, finas camadas de epitélio apoiadas sobre um delicado tecido conjuntivo. Os septos alveolares são formados por essas duas camadas de pneumócitos, sendo irrigado por uma rica rede capilar. (B) O epitélio nasal é formado por células epiteliais pseudo-estratificados, contendo cílios, apoiadas em uma membrana basal. Entre essas células temos as células produtoras de muco chamadas células caliciformes (esquema extraído de <http://www.unifesp.br/dmorfo/histologia/ensino/pulmao/alveolos.htm>).

## **5. O envolvimento do epitélio respiratório no curso natural da infecção pelo *M. leprae***

Estudos prévios mostraram que o *M. leprae* encontra-se presente na cavidade nasal de pacientes lepromatosos, e que essa seria o principal reservatório do bacilo (Davey & Rees, 1974; McDougall *et al.*, 1975). Além disso, outro estudo mostrou a presença de bacilos na mucosa nasal de contatos de pacientes com hanseníase, sugerindo que o transporte de *M. leprae* na mucosa nasal em indivíduos saudáveis pode vir a ser uma forma de dispersão do bacilo (Klatser *et al.*, 1993). Outro trabalho utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) mostrou que 60% dos pacientes multibacilares que não receberam tratamento poliquimioterápico foram positivos para a presença de DNA de *M. leprae* em amostras de *swab* nasal (Job *et al.*, 2008). Ainda nesse trabalho, 4% dos contatos domiciliares tiveram DNA de *M. leprae* detectado na mucosa nasal, reforçando a idéia de que a bactéria seria capaz de colonizar a mucosa nasal para posterior invasão do hospedeiro ou mesmo para a dispersão do bacilo.

Vários outros trabalhos apontam a mucosa nasal como provável sítio de entrada e também de disseminação do bacilo (Pedley, 1973; Britton, 2004). Além disso, estes autores sugerem que a mucosa nasal pode ser a sede inicial das lesões lepróticas. Em pacientes não tratados e tratados, foi comparado o número de bacilos exalados pelo nariz (Green *et al.*, 1983). Em pacientes multibacilares não tratados o número de bacilos exalados é em torno de  $3,8 \times 10^4$ , enquanto que em 1 mês de tratamento a quantidade de bacilos foi de  $2,9 \times 10^4$  e em pacientes com 3 meses de tratamento encontrou-se  $2,8 \times 10^4$  bacilos.

Um detalhado estudo imunohistoquímico em 40 pacientes com hanseníase mostrou um considerável dano na mucosa nasal, assim como na lâmina própria, sendo que durante a inspeção clínica a mucosa nasal aparentava-se normal (Fokkens *et al.*, 1998). O epitélio continha vários buracos, os quais pareciam células caliciformes estendidas. Outra interessante observação foi a ausência de vasoconstrição após a aplicação de cocaína, sendo que os vasos não pareciam estar expressando o fator VIII, sugerindo uma ruptura do endotélio. Ainda nesse trabalho foi visto que ocorre uma redução do número de neurofilamentos nos pacientes hansenianos em comparação com controles saudáveis. Outro estudo mostrou que a mucosa nasal pode ser um dos primeiros locais do corpo a apresentarem lesão primária na hanseníase (Suneetha *et al.*, 1998).

Ainda, o trabalho demonstrou que a mucosa nasal pode estar envolvida precocemente na hanseníase, mesmo antes das lesões se tornarem aparentes na pele ou em outras partes do corpo. Portanto, exames histológicos e clínicos da mucosa nasal podem ser importantes no diagnóstico precoce da hanseníase e em especial em contatos, mas mais estudos serão necessários para determinar sua importância e eficácia (Martins *et al.*, 2010).

Um estudo comparando a incidência de tuberculose e hanseníase aponta para a possibilidade do *M. leprae* ser transmitido da mesma forma que o *M. tuberculosis*, visto que a carga bacilar nos pacientes com lepra lepromatosa e em pacientes com tuberculose são semelhantes quando foram analisados as secreções nasais e o escarro desses pacientes, respectivamente (Rees, 1974). Além disso, o nível de incidência destas duas doenças em contatos domiciliares seria semelhante, sugerindo, portanto, que o *M. leprae* poderia vir a ter a mesma rota e também forma de transmissão do que o *M. tuberculosis*.

Trabalho de Rees e McDougall, em 1977, demonstrou a presença de *M. leprae* nos pulmões de camundongos imediatamente após a exposição do animal a aerossóis contendo bacilos (Rees & McDougall, 1977). No entanto, não foi encontrado bacilo álcool-ácido resistente na mucosa nasal desses camundongos, indicando que o bacilo pode vir a invadir o hospedeiro humano pela via pulmonar. Curiosamente, não existem relatos de pulmões afetados em pacientes com hanseníase. Logo, é provável que a bactéria interaja com os pulmões com a única finalidade de ganhar acesso aos outros tecidos do hospedeiro. Apesar disso, não existem estudos sobre a interação do *M. leprae* com células epiteliais pulmonares. Tais estudos realizados no contexto de outras micobactérias mostraram que esses microrganismos são capazes de interagir com o epitélio pulmonar (Bermudez & Goodman, 1996; Middleton *et al.*, 2002). *M. tuberculosis* é capaz de aderir e invadir pneumócitos do tipo II da linhagem A549 (Bermudez & Goodman, 1996). Além disso, foi observado que uma linhagem virulenta possui uma maior capacidade de invadir as células A549 do que uma linhagem atenuada. *M. tuberculosis* também é capaz de aderir e invadir tecidos brônquicos humanos (Middleton *et al.*, 2002). Desta forma, esses dados indicam a possibilidade do *M. leprae* interagir com o epitélio pulmonar.



Com relação ao epitélio nasal, apesar dos estudos clínicos e histopatológicos, existem poucos estudos com relação à interação do *M. leprae* com a mucosa nasal. Byrd e colaboradores mostraram que o *M. leprae* é capaz de aderir às células epiteliais do septo nasal da linhagem RPMI 2650 através da cadeia  $\beta$ -1 de integrinas (Byrd *et al.*, 1993). Entretanto, este trabalho não investiga se o *M. leprae* é capaz de invadir esta linhagem celular. Logo, novos estudos são necessários para melhor compreender os eventos iniciais na interação entre o *M. leprae* e o ser humano.

## **6. O papel das proteínas micobacterianas HBHA e Hlp na interação com as células hospedeiras**

No contexto de adesinas micobacterianas, duas proteínas têm sido intensamente estudadas: a hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) e a proteína semelhante à histona (Hlp) (Menozzi *et al.*, 1996; Shimoji *et al.*, 1999). A HBHA é uma proteína de 22kDa, e que possui um domínio C-terminal com regiões repetitivas ricas em lisina (Menozzi *et al.*, 1998) (Figura 6). Esta proteína foi primeiramente descrita em *M. bovis*, agente causador da tuberculose bovina, e *M. bovis* BCG, bactéria utilizada como vacina contra a tuberculose (Menozzi *et al.*, 1996). A proteína HBHA possui modificações pós-traducionais nos resíduos de lisina na região C-terminal (Pethe *et al.*, 2002). Essas modificações consistem em um padrão complexo de metilação que protege contra ações proteolíticas. Ainda, a HBHA recombinante produzida em *E. coli* não é imunogênica, sendo que a metilação é indispensável para as propriedades imunológicas dessa proteína (Temmerman *et al.*, 2004).

Foi demonstrado também que essa proteína está presente na parede celular de BCG podendo ser secretada em meios de cultivo (Menozzi *et al.*, 1996). Além disso, foi mostrado que a HBHA é capaz de mediar as interações entre *M. tuberculosis* e as células epiteliais (Pethe *et al.*, 2001). Nesse trabalho, foi visto que a HBHA é capaz de promover a disseminação extrapulmonar do bacilo. Outro estudo mostrou que a HBHA é capaz de induzir a passagem de partículas inertes através de uma barreira de células epiteliais de pneumócitos do tipo II, sem alterar a integridade das junções celulares (Menozzi *et al.*, 2006). Estes resultados vão de encontro com dados que demonstram que o *M. tuberculosis* é capaz de ultrapassar uma bicamada de epitélio-endotélio (Bermudez *et al.*, 2002).

Trabalhos mostraram que a HBHA é capaz de se ligar a heparan sulfato presente em proteoglicanas da matriz extracelular em pneumócitos humanos do tipo II (Menozzi *et al.*, 1998; Pethe *et al.*, 2000). Nesses estudos, foi determinado que o domínio C-terminal é responsável pela interação com heparan sulfato (Figura 7A). Também foi visto que a perda destas repetições enfraquece a ligação da HBHA à heparina (Pethe *et al.*, 2000). Além disso, a HBHA de *M. leprae* apresenta uma identidade de 86% em relação à proteína homóloga de *M. tuberculosis*. A proteína recombinante é igualmente capaz de interagir com heparina e heparan sulfato e além disso, a adição exógena dessa proteína aumenta a interação de *M. leprae* e também de partículas inertes com células epiteliais brônquicas da linhagem 16 HBE (De Lima *et al.*, 2009). Também nesse estudo, foi mostrado a presença de Imunoglobulina G anti-HBHA em soro de indivíduos infectados com *M. leprae*, indicando que a HBHA pode ser reconhecida ao longo do curso da infecção em humanos.

A proteína Hlp foi inicialmente descrita como uma proteína ligante de laminina (LBP) envolvida na interação com as células de Schwann (Shimoji *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2000). Essa proteína também medeia adesão de *M. bovis* BCG às células epiteliais respiratórias através da interação com receptores celulares que contém proteoglicanas, tais como heparan sulfato e ácido hialurônico (Pethe *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2004). A Hlp de micobactérias tem o dobro do tamanho de outras proteínas bacterianas semelhantes à histonas, sendo altamente conservada e compartilhada por todas as espécies de micobactérias. A metade N-terminal da Hlp micobacteriana é capaz de se ligar ao DNA de procariotos e compartilha uma alta identidade com proteínas histonas HU encontradas em *E. coli*.

A porção C-terminal da Hlp, ausente na maior parte das outras bactérias, possui uma combinação incomum de aminoácidos, com alto conteúdo de alanina, lisina e prolina, semelhante à porção C-terminal de histonas da classe H1 de eucariotos (Prabhakar *et al.*, 1998). Estudos prévios mapearam os sítios de ligação da Hlp à heparina (Aoki *et al.*, 2004; Soares de Lima *et al.*, 2005; Portugal *et al.*, 2008). Foi determinado que a região entre os aminoácidos Thr31 e Phe50, localizados na porção N-terminal, é capaz de interagir com a heparina (Aoki *et al.*, 2004). Entretanto, dados do nosso laboratório utilizando as porções N e C-terminal da Hlp indicam que o domínio C-terminal também é responsável pela ligação a heparina (Soares de Lima *et al.*, 2005). Além disso, o mesmo domínio é capaz de se ligar às células de Schwann humanas.

Posteriormente, a interação de Hlp com heparan sulfato foi investigada utilizando-se ressonância magnética nuclear e um painel de peptídeos sintéticos de 30-mer que cobre toda a sequência da proteína (Portugal *et al.*, 2008). Neste trabalho, os aminoácidos identificados como mediadores da interação com heparan sulfato foram arginina, lisina, valina, lisina, fenilalanina e isoleucina. Ainda, duas regiões pertencentes à porção N-terminal foram identificadas como sítio de ligação à heparina, a região entre os resíduos de Gly46 e Ala60 e entre Thr31 e Phe50. Além disso, os resíduos ricos em lisina, localizados na porção C-terminal, foram confirmados como sítios de ligação à heparina (Figura 7 b).

Portanto, podemos concluir que a Hlp e a HBHA são moléculas que participam na interação das micobactérias com as células do hospedeiro. Entretanto, existem poucos estudos sobre o papel da Hlp e a HBHA de *M. leprae* na interação com as células epiteliais do trato respiratório. Logo, a investigação de possíveis proteínas envolvidas na adesão de *M. leprae* às células epiteliais é de crucial importância para o entendimento dessa interação.

A)

HBHA *M. leprae*

MAENPNVDDLRAPLLAALGAADLALTTVNELVGNMRERAETRIDTRSRVEESRARVAKL  
QEVLPEHLSELREKFTADELRKAAEGYLEAATNRYNELVERGEAALERLRSRPVFEDASA  
RAEGYVDQAVELTQEALGTVASQTRAVGGRAAKLVGIELPKKAAAPARKAPAKKAPAKKA  
PAKKVTQK

B)

Hlp *M. leprae*

MNKAELIDVLTQKLGSDRRQATAAVENVVD TIVRAVHKGDSVTITGFGV F EQRRRAARVA

RNPRTGETVKVKPTSVPAFRPGAQFKAVVAGAQRPLEGPAVKRGVATS AAKKAAIKKA P

V KKA LAKKAAT KAPAKKAVKA P AKK ITTAVKVP AKKA TKVVKKV AAKA PVRKATTRAL AK

KA AVKKAPAKK VT AAK RGRK

Aoki et.al., 2004 Portugal et.al., 2008

**Figura 7. Regiões da proteína Hlp e a HBHA de *M. leprae* envolvidas na ligação à heparina e heparan sulfato.** (A) Sequência da proteína HBHA de *M. leprae* com as regiões ricas em alanina e lisina marcadas em vermelho. (B) Esquema representando as regiões da Hlp que medeiam a interação da Hlp com heparina. As regiões marcadas pelos retângulos são as sequências de aminoácidos que foram reconhecidos por se ligarem à heparina de acordo com os estudos de Aoki *et al.*, 2004 e Portugal *et al.*, 2008. Os retângulos de cor vermelha marcam as sequências ricas em alanina (A) e lisina (L) localizadas na porção C-terminal, enquanto que os retângulos verde e azul ressaltam as sequências localizadas na porção N-terminal.

## 7. O papel das células epiteliais na resposta imune contra as micobactérias.

As invasões por microrganismos são inicialmente contidas em todos os vertebrados pelos mecanismos de defesa inata que preexistem nos indivíduos e agem minutos depois da infecção. Somente quando as defesas inatas do hospedeiro são sobrepujadas, evadidas ou dominadas, é necessária uma resposta imune adaptativa ou induzida. Portanto, os agentes infecciosos devem superar as defesas inatas do hospedeiro para estabelecer um foco de infecção. Nesse contexto, as células epiteliais constituem o primeiro desafio que os patógenos necessitam superar. Além de servir como uma barreira mecânica, as células epiteliais são capazes de produzir fatores inflamatórios em resposta à infecção, influenciando desta forma a resposta imune adaptativa (Barnes *et al.*, 1998). Além disso, estudo utilizando cultivo de células epiteliais de vias aéreas e também biópsias brônquicas revelou que várias cascatas inflamatórias são ativadas nas células epiteliais (Polito *et al.*, 1998). Ainda, as células epiteliais do trato respiratório, tais como do epitélio alveolar, da traquéia e também dos brônquios, expressam quimiocinas, que são moléculas capazes de promover a migração de neutrófilos, linfócitos, monócitos e também macrófagos (Meyer-Hoferrt *et al.*, 2003; Stanciu *et al.*, 2006; Heijink *et al.*, 2007).

As células epiteliais também podem secretar citocinas, tais como IL-4 e IL-13, capazes de amplificar respostas do tipo Th2. Essas citocinas também induzem a secreção de várias quimiocinas, tais como RANTES, MCP-1 e eotaxina, resultando no recrutamento de células Th2 (Meyer-Hoferrt *et al.*, 2003; Heijink *et al.*, 2007).

Estudo recente mostrou que as células epiteliais primárias brônquicas são capazes de inibir a replicação do vírus Influenza após o aumento da produção da proteína IFN- $\beta$  (Hsu *et al.*, 2012). Outro trabalho mostrou que camundongos que expressam MyD88 somente nas células epiteliais respiratórias são capazes de controlar a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando, portanto, a importância da resposta imune inata das células epiteliais durante a infecção (Mijares *et al.*, 2011). Além disso, células epiteliais infectadas pelo vírus da Influenza são capazes de expressar e liberar IL-6, RANTES, e IL-8 (Choi e Jacoby, 1992; Matsukura *et al.*, 1996). Sachse e colaboradores demonstraram em epitélio nasal primário que *S. aureus* está associado à rinosinusite crônica e que, quando esta bactéria invade o epitélio nasal,

ocorre a produção de IL-6 e IL-13, favorecendo uma resposta do tipo Th2 (Sachse *et al.*, 2010).

Com relação às micobactérias, um trabalho com as células epiteliais alveolares da linhagem A549 mostrou que o *M. tuberculosis* é capaz de induzir a produção de IL-8 após 24 horas de infecção, sendo essa produção dependente de IL-1 (Wickremasinghe *et al.*, 1999). Além disso, *M. tuberculosis* induz a produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Lee *et al.*, 2009). Também foi visto que as células A549 expressam MCP-1 em resposta a *M. tuberculosis* mas não em resposta a *M. avium* (Lin *et al.*, 1998). Entretanto, *M. tuberculosis* não induz a expressão de RANTES. Nesse estudo foi ainda sugerido que o crescimento da bactéria dentro da célula está relacionado com a expressão de IL-8 e MCP-1.

Células epiteliais intestinais do tipo Hep-2 liberam IL-8 e também RANTES após serem infectadas por *M. avium*. (Sangari *et al.*, 1999). Células epiteliais brônquicas de pacientes com tuberculose produzem IP-10, uma quimiocina capaz de atrair para o sítio da infecção células T ativadas e células NK, indicando que as células epiteliais podem ter um papel importante na defesa contra *M. tuberculosis* (Sauty *et al.*, 1999). Além disso, foi visto nesse trabalho que a expressão de IP-10 em células epiteliais brônquicas e alveolares é induzida pela combinação de IFN- $\gamma$  mais TNF- $\alpha$ , citocinas que são altamente expressas em pacientes com tuberculose ativa. Outro trabalho mostrou que as células epiteliais alveolares A549 produzem IFN- $\gamma$  em resposta à infecção por *M. tuberculosis* (Sharma *et al.*, 2007). Ainda nesse trabalho, foi observado que frações subcelulares de *M. tuberculosis* (citosol, membrana e parede) podem induzir a expressão de IFN- $\gamma$  nas células A549.

A indução da secreção de várias quimiocinas por micobactérias em células epiteliais possivelmente ocorre, pelo menos em parte, através da ativação do fator de transcrição kappa B (NF- $\kappa$ B), responsável por induzir a produção de vários fatores inflamatórios incluindo as quimiocinas (Li *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2003). Esse fator de transcrição na verdade consiste de cinco proteínas: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50; p105), e NF- $\kappa$ B2 (p52; p100) (Nishikori, 2005). Essas proteínas são capazes de interagirem entre si formando homo ou heterodímeros, tais como p65/p50 e p50/p50. Quando a célula não está estimulada, essas proteínas se localizam no citoplasma. Entretanto, quando a célula é ativada o fator de transcrição se desloca para o núcleo para

interagir com regiões específicas do DNA responsáveis pela ativação ou não dos genes-alvo. A presença de NF- $\kappa$ B no citoplasma é mantida pelas proteínas I $\kappa$ B, chamadas também de proteínas inibidoras de NF- $\kappa$ B. Essas proteínas se ligam aos dímeros de NF- $\kappa$ B, retendo-os no citoplasma através do mascaramento das sequências de localização nuclear. Quando a célula é ativada, a proteína I $\kappa$ B é degradada e a região de localização nuclear é exposta, sendo o NF- $\kappa$ B translocado para o núcleo (Li *et al.*, 2002; Schmitz *et al.*, 2003). Um estudo com *M. leprae* mostrou que essa bactéria é capaz de induzir a translocação nuclear do dímero p65/p50 e p50/p50 em células de Schwann (Pereira *et al.*, 2005). Ainda, foi visto que a translocação do dímero p50/p50 está relacionada à repressão da expressão de TNF- $\alpha$  nessas células. Outro trabalho mostrou que *M. bovis* BCG induz a produção de  $\beta$ -defensina-2 em células A549, sendo essa indução mediada por NF- $\kappa$ B (Mendez Samperio *et al.*, 2006). *M. bovis* BCG também induz a expressão de IP-10 nas células A549 via NF- $\kappa$ B (Mendez Samperio *et al.*, 2009). Logo, o epitélio do trato respiratório desempenha um papel ativo na resposta inflamatória contra as micobactérias, atuando como uma importante fonte de quimiocinas, sendo que o NF- $\kappa$ B parece também exercer um papel importante. Entretanto não existem trabalhos mostrando a capacidade das células epiteliais de responder ao *M. leprae*.

## OBJETIVOS

As vias áreas, incluindo a mucosa nasal e o epitélio pulmonar, são consideradas a principal porta de entrada de *Mycobacterium leprae* e, apesar de existir um intenso debate a respeito, estudos da interação de *M. leprae* com as células epiteliais ainda são escassos. Ainda nesse contexto, pouco se sabe sobre as moléculas de superfície que participam da interação *M. leprae*-células epiteliais. Além disso, as células epiteliais contribuem de forma relevante na resposta imune inata através da secreção de diversos fatores inflamatórios (Meyer-Hoferrt *et al.*,2003). Portanto, o presente trabalho tem como objetivos:

### 2.1. Objetivo geral

- Estudar os mecanismos de interação do *M. leprae* com células epiteliais do trato respiratório.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar se o *M. leprae* é capaz de aderir e infectar as linhagens celulares humanas de epitélio nasal RPMI e alveolar A549;
- Investigar se o *M. leprae* é capaz de aderir e de ser internalizado por células epiteliais nasais primárias humanas;
- Investigar se o *M. leprae* é capaz de infectar as células do trato respiratório de camundongo C57BL/6 após infecção intranasal;
- Determinar se a viabilidade bacteriana e os inibidores de componentes do citoesqueleto afetam o processo de entrada do *M. leprae* nas células epiteliais;
- Avaliar a capacidade de sobrevivência do *M. leprae* nas linhagens de células epiteliais alveolar e nasal;
- Identificar potenciais adesinas do *M. leprae* envolvidas na interação com células do epitélio respiratório através da definição de seu proteoma de superfície;



- Investigar se a proteína semelhante à histona (Hlp) e a hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) podem contribuir na interação do *M. leprae* com as linhagens de células epiteliais nasal RPMI e alveolar A549;
- Avaliar se as células epiteliais secretam quimiocinas em resposta ao *M. leprae*;
- Verificar se o *M. leprae* é capaz de induzir a translocação nuclear do fator de transcrição NF- $\kappa$ B com células do epitélio respiratório.

# MATERIAIS E MÉTODOS

## 1. Reagentes utilizados

Os meios de cultivo celular EMEM e DMEM-F12 High Glucose foram obtidos da GIBCO (Grand Island, NY, EUA), assim como o soro fetal bovino e a solução salina tamponada com fosfato (PBS). O kit para determinação da viabilidade bacteriana *Live-Dead Bacteria-Light* foi obtido da Invitrogen (Grand Island, NY, EUA). Para marcação da superfície do *M. leprae* vivo foi utilizado o kit PKH26 (vermelho) ou PKH67 (verde) fluorescente *Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling* (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Paraformaldeído em pó (Sigma) foi utilizado para fixação das células. Faloidina conjugada à isotiocianato de fluoresceína (FITC-Faloidina), assim como o 4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidroclorato (DAPI) foram utilizados para marcação do citoesqueleto de actina e do núcleo, respectivamente. Ambos foram adquiridos da Invitrogen. Citocalasina B e colchicina foram obtidos da Sigma e da Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, EUA), respectivamente. Os meios de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, EUA), Middlebrook 7H10 ágar (Difco) e o suplemento OADC (Becton Dickinson, Microbiology, Franklin Lakes, NJ, EUA) foram utilizados para o crescimento de *Mycobacterium smegmatis*. O anticorpo secundário anti-camundongo Alexa 555 foi obtido da Molecular Probes (Eugene, OR, EUA). Todos os anticorpos primários e secundários restantes foram obtidos da Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EUA). Entretanto, O substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) para ELISA foi obtido da LGC (São Paulo, SP, Brasil), enquanto que o substrato para revelação de western blot por quimioluminescência foi comprado da Amersham Bioscience (São Paulo, SP, Brasil).

## 2. Células epiteliais utilizadas

As células epiteliais nasais humanas da linhagem RPMI 2650 e a linhagem de pneumócitos do tipo II humana A549 foram obtidas da ATCC (Manassas, VA, USA). Também foram utilizadas nesse estudo células epiteliais nasais primárias advindas de pacientes com polipose nasal. Os pólipos foram obtidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto da UERJ, no Departamento de Otorrinolaringologia, com autorização do conselho de ética em pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP 483/08) e também do comitê de ética do hospital universitário Pedro Ernesto (CEP 2306/HUPE). A utilização

dos pólipos para fins de pesquisa foi feita mediante assinatura do termo de consentimento pelos pacientes.

### **3. Cultivo das linhagens celulares**

As células epiteliais nasais da linhagem RPMI 2650 foram cultivadas em meio EMEM suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), enquanto que a linhagem A549 foi cultivada em meio DMEM-F12 *High Glucose* também suplementado com 10% de SFB. Os procedimentos realizados para o cultivo de ambas as células foram idênticos. Inicialmente, as células foram descongeladas em banho-maria a 37 °C e, em seguida colocadas em 10 ml do meio de cultivo e centrifugadas à 1.300 x g por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio com 10% de soro e colocadas em uma garrafa de cultivo de células de 25 cm<sup>2</sup> a 37 °C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> até obter uma confluência de 90%. Após atingir a confluência desejada, o meio foi removido e as células lavadas com PBS, sendo posteriormente incubadas com 0,25% (v/v) de tripsina por 1 minuto a 37 °C. Terminado o tempo de incubação, a ação da tripsina foi bloqueada com a adição de meio contendo 10% de SFB e por fim as células foram novamente centrifugadas. Após a centrifugação, as células foram contadas em câmara de Neubauer. Por fim, 5x10<sup>5</sup> células foram inoculadas em nova garrafa para manutenção da cultura ou então plaqueadas para os experimentos.

### **4. Gel de colágeno para o cultivo de células epiteliais nasais primárias humanas**

As células primárias só podem ser cultivadas em suporte contendo gel de colágeno, visto que essas células não aderem ao plástico ou ao vidro. Logo, gel de colágeno a partir do tendão da cauda de rato foi preparado para o cultivo destas células (adaptado de Chevillard *et al.*, 1991). Primeiramente, a cauda do rato foi submetida a torção para obtenção do tendão e posteriormente 500 mg de tendão foi dissolvido em 50 ml de solução de ácido acético diluído 1:100 (1 volume de ácido acético para cada 100 volumes de água), resultando em uma solução de colágeno de 10 mg/ml. Essa solução foi incubada por 3 dias a 4 °C. Após a incubação, 1 ml da solução de colágeno foi adicionado em cada poço de placas de 24 poços e incubadas por 1 h a 37 °C em vapor de hidróxido de amônia para a polimerização do gel de colágeno. Posteriormente, foi adicionado no gel de colágeno 1 ml de meio RPMI sem soro a 37 °C em uma atmosfera

de 5% de CO<sub>2</sub> para a diminuição da alcalinidade do gel de colágeno. O meio RPMI foi trocado a cada dois dias, sendo que a incubação foi interrompida após 7 dias visto que o gel de colágeno demora este tempo para atingir um pH neutro. Para saber se o gel estava alcalino ou neutro foi observada a coloração do meio RPMI. No início, quando o gel apresentava um pH extramente alcalino, a coloração do meio, que continha vermelho de fenol, era rosado, indicando pH em torno de 9,0. Entre o quinto e o sétimo dia a coloração do meio se tornava mais avermelhada, indicando pH em torno de 7,4. Posteriormente, o meio RPMI foi removido dos poços e a placa contendo o gel de colágeno foi guardada a 4 °C até o seu uso.

### **5. Obtenção e cultivo de células epiteliais nasais primárias humanas**

As células epiteliais nasais primárias humanas foram obtidas através da remoção cirúrgica de pólipos nasais de pacientes. Após a remoção cirúrgica do pólipo nasal, o explante foi rapidamente lavado por 3 vezes com PBS para remoção do sangue e muco (Chevallard *et al.*, 1991). A seguir, os pólipos foram lavados por três vezes, por 10 minutos sob agitação, com meio RPMI suplementado com antibióticos (100 U/ml de penicilina, 500 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B). Após a lavagem, o explante foi cortado em pequenos pedaços entre 2 e 3 mm, colocados em placas de 24 poços contendo gel de colágeno (10 mg/ml) e meio RPMI suplementado com insulina (1 µg/ml), transferrina (1 µg/ml), fator de crescimento epitelial (10 ng/ml), hidrocortisona (0.5 µg/ml) e ácido retinóico (10 ng/ml), e incubados por sete dias em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Sob estas condições as células epiteliais migram do explante para o gel de colágeno, dando origem a uma área de crescimento em torno do explante. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias.

### **6. Avaliação da pureza das células epiteliais nasais primárias**

A pureza das células epiteliais nasais primárias foi determinada pela marcação com anticorpo anti-citoqueratina-19 (anti-CK19), visto que esta proteína está presente na maior parte das células epiteliais localizadas na mucosa nasal (Hicks *et al.*, 1995). Para isso, as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e fixadas com 4% (p/v) de paraformaldeído diluído em PBS a 4 °C por 20 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes por 10 minutos cada. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1% (v/v) de Triton X-100 em PBS a temperatura ambiente por 40 minutos. Após a permeabilização, as células foram incubadas *overnight* a 4 °C com

5% de soro normal de cabra em PBS contendo 0,25% (v/v) de Triton X-100 (solução de bloqueio). As células então foram incubadas por 3 horas com anticorpo monoclonal anti-CK19, diluído 1:100, em solução de bloqueio. Como controle negativo, as células foram incubadas com controle de isotipo IgG. Terminada a incubação com anticorpo as células foram lavadas por 5 vezes com PBS e, em seguida, o cultivo foi incubado com anticorpo secundário, feito em cabra, anti-camundongo conjugado a Alexa 555 (1:100) por 2 horas a temperatura ambiente também diluído em solução de bloqueio. Em seguida, o núcleo das células foi marcado com uma solução de 300 $\eta$ M de DAPI por 1 minuto. As células foram observadas em um microscópio de fluorescência LSM 510 Zeiss (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, EUA). Para visualização das células marcadas para CK19, estas foram observadas em objetiva de 40x em um filtro de excitação/emissão de 555/565 nm, respectivamente. O núcleo das células foi observado em filtro de excitação/emissão de 358/461nm, respectivamente.

## **7. Proteínas recombinantes**

Neste estudo, duas proteínas recombinantes de *M. leprae* foram utilizadas. A hemaglutinina ligante de heparina (HBHA), gentilmente cedida pelo Dr. Franck Biet (4UR1282, Infectiologie Animale, Santé Publique, Nouzilly, França), e a proteína semelhante à histona (Hlp), produzida em nosso laboratório conforme descrito em Marques *et. al.* (2000).

## **8. Micobactérias**

Amostras de *M. leprae* viáveis isoladas do coxim plantar de camundongos atímicos (nu/nu) foram gentilmente doadas pelo Dr. James Krahenbuhl (National Hansen's Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Baton Rouge, LA, EUA). Após isolamento as bactérias eram tratadas ou não com hidróxido de sódio 0,1 N por 1 minuto como descrito por Lahiri e colaboradores (Lahiri<sup>a</sup>) *et al.*, 2005). Em todos os ensaios de interação com células epiteliais, sempre foi utilizado *M. leprae* pré-tratado com NaOH. Já no estudo de proteômica, ambas as preparações foram comparadas. Neste estudo também foi utilizado *M. smegmatis* linhagem mc<sup>2</sup>155 cedido pelo Dr. Thomas Dick da Universidade de Singapura, Singapura. Antes de cada experimento as micobactérias foram passadas por 8 a 10 vezes em seringa de insulina para a remoção dos grumos bacterianos.

## 9. Cultivo de *Mycobacterium smegmatis*

*M. smegmatis* foi cultivado por 3 dias a 37 °C sob agitação em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com 10 % (v/v) da mistura de albumina bovina e glicose (ADC), além de Tween 20 a 0,05% (v/v), e 0,5% (v/v) de glicerol. Após 3 dias de cultivo obtivemos densidade óptica de 0.8 (D.O.<sub>600</sub>). Terminado o cultivo, as bactérias foram congeladas em 20% de glicerol e guardadas a – 80°C até o momento do uso. Para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC), as bactérias foram cultivadas em meio 7H11 suplementado com 10% (v/v) de OADC (ácido oleico, catalase, albumina bovina e glicose) a 37 °C por 4 dias.

## 10. Determinação da viabilidade do *M. leprae*

Antes de cada experimento realizado com *M. leprae* vivo a sua viabilidade foi determinada através da verificação da integridade da membrana bacteriana com o *kit Live-Dead Bacteria-Light* (Invitrogen) (Lahiri<sup>b</sup>) *et al.*, 2005). Após duas lavagens com PBS, os bacilos foram incubados por 15 minutos a temperatura ambiente na presença de 6 µM do fluoróforo verde Syto-9 e 30 µM de iodeto de propídeo (IP) (vermelho) em um volume de 40 µl. As bactérias foram novamente lavadas por duas vezes com PBS e ressuspendidas em 20 µl de PBS. Para contagem das bactérias vivas e mortas, 10 µl da suspensão bacteriana foram colocados sobre lâmina seguida de lamínula de vidro. Em seguida, a porcentagem de bactérias vivas e mortas foi determinada por contagem direta do bacilo marcado com Syto-9 (bactéria viva) e também contagem da bactéria marcada com iodeto de propídeo (bactéria morta). A excitação/emissão máxima para Syto9 e IP é de 480/530nm e 535/617 nm, respectivamente. Em cada experimento, duzentas bactérias foram contadas por réplica. A contagem foi realizada em duplicata.

## 11. Ensaios de interação *in vitro*

Nestes ensaios avaliamos a capacidade de *M. leprae* de aderir e invadir as linhagens epiteliais nasal (RPMI 2650) e alveolar (A549). Para esses ensaios, as bactérias foram pré-marcadas com PKH 23 (fluoróforo vermelho) conforme as instruções do fabricante (Sigma). Os tapetes celulares foram infectados a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10 bactérias por célula e mantidos a uma temperatura de 33 °C por 2, 4, 6 e 24 horas. No tempo de 24 horas, a capacidade de *M. leprae* vivo de aderir e invadir as células epiteliais foram comparadas com *M. leprae*

morto. Para atingir este objetivo, alíquotas de *M. leprae* do mesmo lote eram mortas por calor a 60°C por 30 min e a morte confirmada pelo kit *Live-Dead Bacteria-Light*. Em seguida, as células eram incubadas com *M. leprae* vivo e morto por 24 horas a 33 °C. Após a infecção das células com *M. leprae*, as células foram lavadas por 6 vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% (p/v) por 20 minutos a 4 °C. As células foram então permeabilizadas com 0,1% (v/v) de Triton X-100 por 5 minutos, lavadas por 3 vezes com PBS e bloqueadas com solução de 1% BSA (p/v) em PBS por 20 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com FITC-Faloidina diluída em PBS (1 unidade) por 20 min à temperatura ambiente e lavadas por 3 vezes com PBS. Os núcleos das células infectadas foram marcados com DAPI (300 nM) e as células foram analisadas por microscopia confocal (LSM 510 Zeiss). A quantidade de bactérias aderidas e internalizadas foi determinada em um conjunto de 300 células e em duplicata para cada experimento. As imagens foram adquiridas num aumento de 630x. O ensaio de interação com as células epiteliais nasais primárias foi realizado com *M. leprae* irradiado pré-marcado com PKH 67 (fluoróforo verde) e as células marcadas com anti-CK19 e DAPI.

## **12. Ensaios de invasão na presença dos inibidores de tubulina e actina**

Monocamadas de células epiteliais foram pré-tratadas com inibidores para actina (citocalasina B, 3µM) e tubulina (colchicina, 10 µM) 1 hora antes de serem infectadas com *M. leprae* vivo. Em seguida, as células foram infectadas com *M. leprae* vivo a 33 °C por 24 horas. As culturas controle foram incubadas com DMSO, veículo utilizado para as soluções de citocalasina e colchicina. Os inibidores estiveram presentes durante todo o ensaio. Terminado o tempo de incubação, as células foram lavadas 6 vezes com PBS, fixadas com 4% (p/v) de PFA e marcadas com FITC-Faloidina e DAPI, como descrito anteriormente. Paralelamente, o efeito citotóxico dos inibidores sobre as células foi verificado através de coloração com azul de trypan.

## **13. Aquisição de imagens no microscópio confocal**

Preparações foram examinadas com microscópio Zeiss LSM510 META equipado com objetiva plan-apochromat 63x ou 100x (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA) e câmera digital CoolSNAP-Pro CF juntamente com o programa LSM 3.2 (Carl Zeiss). As imagens foram editadas para brilho e contraste utilizando o programa AxioVision. Lasers de argônio e neon-hélio, emitindo 488, 543 e 633 nm foram

utilizados. Fotos de 20 a 40 planos focais (*z-stack*) através das células foram obtidas em uma objetiva de 630x a cada 30 segundos por 5 a 10 min utilizando o programa LSM. Para alguns experimentos, os *z-stacks* de algumas imagens foram capturados e processados utilizando o sistema de imagem LSM. Parte das imagens foi capturada na Universidade do Estado do Oregon (*CGRB labs facility*, Corvallis, Oregon, EUA), enquanto que outra parte foi obtida na plataforma de microscopia confocal da Fundação Oswaldo Cruz.

#### **14. Microscopia eletrônica de transmissão**

Monocamadas de células epiteliais infectadas com *M. leprae* vivo por 24 horas numa MOI de 10 foram processadas para visualização em microscópio eletrônico de transmissão. Para isso, as células foram lavadas por 6 vezes com PBS, descoladas dos poços utilizando um *cell scraper* e fixadas com 3% (p/v) de PFA e 1,5% (v/v) de glutaraldeído em tampão fosfato de potássio a 0,2 M, *overnight* a 4 °C. Após a fixação as células foram lavadas com o tampão fosfato por 3 vezes para remoção dos fixadores. Para cada lavagem as células foram centrifugadas por 5 minutos a 2000xg. As células foram então ressuspensas em ágar derretido, ficando as células desta forma misturadas no ágar. Posteriormente, o ágar contendo as células foi cortado com uma lâmina em forma de cubo com 1 mm de espessura. Os cubos de ágar foram rinsados com tampão fosfato por 2 vezes. Este tampão foi descartado e as células, contidas no ágar, foram pós-fixadas por 2 horas com 1% de tetróxido de ósmio em 0,2 M de fosfato de sódio pH 7,4. Após duas horas, o ósmio foi removido e os cubos de ágar rinsados com água destilada por 4 vezes. Os cubos foram então desidratados em um série de soluções de concentração crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 95%), sendo que o tempo em cada banho foi de 10 minutos. Por fim, as amostras foram incubadas por 2 vezes cada, durante 10 min, em 100% de etanol. Após a desidratação, as amostras foram incubadas com volumes iguais de etanol e óxido propileno (1:1) e, em seguida, óxido propileno puro foi adicionado e finalmente as células foram incubadas em uma solução com volumes iguais de óxido propileno e resina epon. Todas as incubações para inclusão foram feitas *overnight* sob agitação e a temperatura ambiente. Os cubos foram então transferidos para epon puro e deixados novamente *overnight* a temperatura ambiente sob agitação. No dia seguinte, os cubos foram transferidos para moldes de incorporação com resina fresca e polimerizada a 60 graus, durante 2 dias. Os blocos polimerizados contendo os cubos de ágar foram seccionados em um ultramicrotomo



LKB e recolhidas sobre grelhas de cobre revestidas com BUTVAR 0,5%. As secções foram coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e examinadas num microscópio eletrónico de transmissão G2 Tecnai FEI (FEI, Hillsboro, OR, EUA) operado a 80 Kilovolts (KV).

### **15. Comparando a capacidade fagocítica da célula epitelial alveolar (A549) e célula epitelial nasal (RPMI 2650)**

Para verificar a atividade fagocítica com as culturas celulares A549 e RPMI, utilizamos microesferas vermelhas fluorescentes de 1 µm (Molecular Probes). Basicamente, essas microesferas foram incubadas em diferentes intervalos de tempo (2, 4 e 6 horas) e em duas temperaturas distintas (37 °C e 4 °C). Enquanto que na temperatura de 37 °C as microesferas aderem e se internalizam nas células, na temperatura de 4 °C a internalização é inibida. Passado o tempo de incubação, as células foram removidas dos poços utilizando um *cell scraper*. A porcentagem de células associadas a microesferas foi determinada por citometria de fluxo (citômetro de fluxo Accuri C6, BD Biosciences, CA, EUA). As células foram analisadas quanto ao tamanho (*forward scatter*, FS) e a granulosidade (*side scatter*, SS). A fluorescência dessas células foi medida (canal FL-3) para obtenção da porcentagem de células marcadas, assim como a determinação da mediana da intensidade de fluorescência (MIF). A fluorescência das células incubadas com as microesferas foi comparada com as células incubadas na ausência de microesferas (controle não marcado). Terminado o experimento, os resultados foram analisados no programa Accuri C6. Para obtenção da porcentagem e também da MIF de células que continham esferas internalizadas utilizamos as seguintes fórmulas:

$$\% \text{ Células com esferas internalizadas} = \% \text{ células marcadas a } 37 \text{ °C} - \% \text{ células marcadas a } 4 \text{ °C}.$$

$$\text{MIF de células com esferas internalizadas} = \text{MIF}_{37 \text{ °C}} - \text{MIF}_{4 \text{ °C}}$$

## 16. Ensaio *in vitro* com as proteínas recombinantes de *M. leprae*

Monoculturas de células epiteliais foram incubadas por 1 hora a 37 °C com microesferas vermelhas fluorescentes pré-tratadas com Hlp ou HBHA recombinante de *M. leprae*. Para o tratamento de  $10^8$  das microesferas, 50 µg de Hlp ou HBHA foram utilizados, sendo este tratamento feito por 3 horas à temperatura ambiente em 0,2 M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Como controle negativo, as microesferas foram tratadas com 50 µg de BSA. Posteriormente, as microesferas foram lavadas com PBS por 3 vezes para remoção das proteínas que não se ligaram. Após as lavagens, as microesferas foram bloqueadas com 2% de BSA em PBS por 2 horas. Após o bloqueio, as esferas foram novamente lavadas com PBS e depois utilizadas para incubação com as células por 1 hora a 37 °C. As células, então, foram lavadas por 6 vezes com PBS e as amostras analisadas em microscópio de contraste de fase (Zeiss) utilizando-se luz branca e filtro fluorescente com excitação de onda de 540 nm. A quantidade de microesferas associadas às células foi determinada em um grupo de 300 células. Alternativamente, *M. smegmatis* foi pré-tratado ou não com as proteínas recombinantes HBHA ou Hlp de *M. leprae* para investigar se essas proteínas são capazes de aumentar a internalização de *M. smegmatis* nas células epiteliais. Primeiramente, *M. smegmatis* ( $10^6$  bactérias) foi lavado por 3 vezes com PBS para remoção do meio de congelamento (meio 7H9 contendo 20% de glicerol). As três lavagens foram feitas centrifugando as bactérias por 16.000xg à temperatura ambiente durante 10 minutos. e em seguida removendo o sobrenadante e ressuspensando as bactérias em PBS. Terminada a lavagem, as células foram incubadas com 50 µg de proteína recombinante de *M. leprae* a 37 °C por 2 horas. Após o tratamento com as proteínas, as bactérias foram utilizadas para infectar as células epiteliais por 2 horas a 37 °C. Posteriormente as células foram lavadas por seis vezes com PBS e lisadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS por 5 minutos. Diluições seriadas do lisado foram preparadas e incubadas em meio 7H10 ágar por 4 dias a 37 °C para a quantificação de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

## 17. Confirmando a ligação das proteínas recombinantes de *M. leprae* na superfície de *M. smegmatis*

Ensaio imunoenzimático foi realizado com *M. smegmatis* pré-tratado ou não com Hlp ou HBHA recombinante de *M. leprae* para confirmar se essas proteínas possuem a capacidade de se ligarem à superfície bacteriana. Após o tratamento de *M. smegmatis* com essas proteínas a bactéria foi novamente centrifugada a 16.000 x g por 10 min e ressuspensa em 0,1 M de tampão carbonato-bicarbonato. Em seguida, as bactérias foram incubadas em placas de 96 poços a 4 °C *overnight*. Depois, os poços foram lavados 4 vezes com PBS e bloqueados com 1% de BSA em PBS por 2 horas a 37 °C. Os poços foram lavados novamente com PBS e incubados com anticorpo monoclonal específico para cada proteína por 2 horas a 37 °C (diluído 1:1000 em 1% BSA em PBS) (Tabela 2). Terminado a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado a peroxidase por 1 hora a 37 °C (diluído 1:1000 em 1% BSA em PBS). Por fim, os poços foram novamente lavados com PBS e 100 µl de TMB foram adicionados e incubados por 20 minutos. A reação foi interrompida com 2,5 N de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a reação lida em leitor de ELISA (Spectramax 190; Molecular Devices) em um comprimento de onda de 450 nm.

**Tabela 2: Relação dos anticorpos utilizados no ensaio imunoenzimático (ELISA)**

<b>Proteína recombinante de <i>M. leprae</i></b>	<b>Anticorpo primário monoclonal</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
Proteína semelhante à histona (Hlp)	Anticorpo monoclonal 5G9 (John Spencer, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Ciências Biomédicas, Universidade do Estado do Colorado)	Anticorpo anti-camundongo conjugado à peroxidase
Proteína hemaglutinina ligante de heparina (HBHA)	Anticorpo monoclonal VF4 (Franck Biet, UR1282, Infectologia Animal, INRA, Nouzilly França)	Anticorpo anti-camundongo conjugado à peroxidase

## **18. Análise da sobrevivência do *M. leprae* dentro das células epiteliais por *live/dead***

As células epiteliais ( $10^6$  células por poço) foram infectadas com *M. leprae* vivo utilizando uma MOI de 10. Antes do início do experimento, a viabilidade do *M. leprae* foi confirmada através do kit *live/dead*, sendo considerado este valor a viabilidade no tempo zero ( $t_0$ ). A viabilidade do *M. leprae* dentro da célula foi acompanhada em diferentes intervalos de tempo: 1, 4, 8 e 10 dias. Terminado o tempo de infecção, as células foram lisadas por 5 minutos para a liberação do *M. leprae* intracelular em uma solução contendo 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de Triton X-100 e 1% (v/v) de Tween-20. Em seguida, o extrato foi centrifugado por 1 minuto a  $300 \times g$  para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante contendo *M. leprae* foi recuperado e centrifugado a  $16.000 \times g$  por 10 minutos. Posteriormente, o pellet foi lavado por 3 vezes com PBS para remoção do tampão de lise. O pellet foi ressuscitado em 20  $\mu$ l de PBS e o *M. leprae* marcado com kit *live/dead*. O resultado foi expresso em porcentagem de viabilidade após a contagem de 200 bactérias. A viabilidade do *M. leprae* intracelular foi comparada com a viabilidade do *M. leprae* extracelular (recuperada das lavagens da cultura infectada) e da bactéria mantida em meio DMEM-F12 ou EMEM com 10% SFB (*M. leprae* em meio axênico).

## **19. Estudo das quimiocinas secretadas pelas células epiteliais.**

As células epiteliais foram incubadas com *M. leprae* irradiado por 24, 48 e 72 horas. Após a incubação, o meio de cultivo foi recuperado para dosagem de quimiocinas. As quimiocinas dosadas no presente trabalho foram IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES e TNF- $\alpha$ . Foram utilizados kits de ensaios imunoenzimáticos DuoSet R&G específicos para os diferentes mediadores. As dosagens foram realizadas conforme instruções do fabricante.

## **20. Estudo da translocação do NF- $\kappa$ B**

Com o objetivo de verificar se *M. leprae* é capaz de induzir a translocação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B nas células A549, o nível de NF- $\kappa$ B no núcleo foi comparado entre células infectadas e não infectadas. O ensaio foi realizado nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, com *M. leprae* morto ou vivo numa MOI de 10. Células não tratadas foram utilizadas como controle negativo. Posteriormente, as células foram lavadas por 3

vezes com PBS gelado e em seguida removidas do poço utilizando um *cell scraper*. Em seguida, as células foram incubadas por 10 minutos a 4 °C em 1 ml de tampão contendo 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,4 mM PMSF, 0,1 µg/ml de leupeptina e 5 µg/ml de antipaina. Após a incubação, o lisado foi passado em seringa com agulha por 8 vezes e centrifugado por 20 segundos a 14.000 x g. O pellet foi ressuspendido e incubado por 20 min a 4°C em 200µl de tampão contendo 420 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 20 mM de HEPES pH 7,9, 25% de glicerol, 1 mM de DTT, 0,4 mM PMSF, 0,1 µg/ml de leupeptina e 5 µg de antipaina. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 5 min e o sobrenadante coletado, obtendo assim o extrato contendo as proteínas nucleares. Em seguida, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE em 15% de acrilamida. As proteínas foram transferidas por 18 horas para uma membrana de nitrocelulose submetida a uma corrente de 10 Volts e 400 mA. Em seguida, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em TBS/Tween 20 (TBS/T) por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio a membrana foi lavada por 3 vezes com TBS/T e incubada *por 18 horas* com anticorpo anti-p65 diluído 1:400 em solução de bloqueio. A membrana foi novamente lavada por 3 vezes, 10 minutos cada, e incubada com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase por 1 hora à temperatura ambiente (diluição de 1:40.000). Por fim a membrana foi novamente lavada, e revelado por quimioluminescência utilizando o substrato ECL (Amersham). Para normalização dos níveis de p65, a membrana foi incubada por 5 minutos com 0,2 N de hidróxido de sódio. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS/T por 3 vezes, 5 minutos cada, e incubada com anticorpo monoclonal anti-laminaA diluído 1:400 em solução de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-coelho conjugado à peroxidase 1:40.000. Posteriormente, o nível da subunidade de p65 foi determinado utilizando-se o kit de ELISA *Instant One* (&Bioscience, San Diego, CA, EUA) segundo recomendações do fabricante.

## **21. Infecção de camundongos**

*M. leprae* vivo foram inoculados em camundongos da linhagem C57BL/6 (*Jacksonville Laboratories*, FL, EUA) pela via intranasal. Os animais então foram anestesiados com isofluoreno e 10 µl de uma suspensão bacteriana ( $10^7$  bactérias) foram injetadas em cada narina com o auxílio de ponteiras para aplicação de gel em poliacrilamida. O curso da infecção foi seguido em diferentes tempos: 4 horas, 4, 10 e 20 dias. No total, 20 camundongos foram utilizados, sendo que para cada um dos dois

primeiros tempos foram usados 6 camundongos, e para os demais tempos, 4 animais por tempo. Posteriormente os camundongos foram submetidos a eutanásia foi realizada com exposição dos camundongos à CO<sub>2</sub>. A cabeça e os pulmões foram recuperados e fixados em 1% de formaldeído. Após a fixação, as cabeças foram decalcificadas e processadas como descrito em Preece, 1972. Posteriormente as cabeças e os pulmões foram embebidos em parafina e, coradas por hematoxilina e eosina (H&E) e também Ziehl-Nielsen (Kim *et al.*, 1998). Este estudo foi aprovado pela comissão de ética de uso animal da Universidade do Estado do Oregon (Corvallis, OR, EUA) (ACUP/4309).

## **22. Biotinilação das proteínas de superfície de *M. leprae***

Com o objetivo de identificar as proteínas expostas na superfície bacteriana, *M. leprae* vivo, pré-tratado ou não com hidróxido de sódio, foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos e lavado com PBS para remoção do meio de cultivo. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após a lavagem, *M. leprae* vivo foi biotinilado ou não (controle negativo) com 1 mg/ml de NHS-LC-Biotina (Pierce, Rockford, IL, EUA) em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente (como descrito em McNamara *et al.*, 2012). A reação foi interrompida com 5 mM de glicina em PBS e as bactérias lavadas mais 3 vezes com PBS. Em seguida, *M. leprae* foi ressuspensionado em 7 M uréia, 0,1% Tween 20, 0,1% deoxicolato, 150 mM de cloreto de sódio e 15 mM fosfato de sódio dibásico. Microesferas de vidro, em uma relação de 1:3 (1 parte da microesfera para 3 partes da amostra), foram adicionadas e as amostras homogeneizadas em *bead beater* por 6 vezes a uma velocidade de 3450 batidas por segundo, durante 20 segundos. No intervalo entre cada ciclo as amostras foram incubadas no gelo por 3 minutos. Posteriormente, o extrato celular foi centrifugado a 4 °C por 10 minutos a 16.000 x g e o sobrenadante recuperado e estocado a -70 °C. Para confirmar a biotinilação das proteínas, o extrato de lise de *M. leprae* biotinilado e não biotinilado foi submetido a uma corrida de gel de acrilamida a 15%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, nas mesmas condições descritas anteriormente. Para a detecção das proteínas biotiniladas, a membrana foi bloqueada com 1% BSA por 2 horas em PBS/Tween 20 (PBS/T). A membrana foi lavada com PBS/T por 3 vezes e incubada com estreptavidina conjugada a IRDye 680 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA). Após a incubação a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS/T, e as

bandas visualizadas no Scanner Licor em um comprimento de onda de 680 nm. A listagem de proteínas falso positivas estão listadas na Tabela 6 (em anexo).

### **23. Preparação das amostras para espectrometria de massa**

**a) Purificação das proteínas de superfície.** Após a confirmação de que as proteínas foram biotinizadas, 600 µl do tampão de lise (7 M uréia, 0,1% tween 20, 0,1% deoxicolato, 150 mM de cloreto de sódio e 15 mM fosfato de sódio dibásico) foi adicionado no extrato contendo as proteínas de *M. leprae* marcado ou não marcado, totalizando 1,2 ml de volume de amostra. Em seguida, as amostras foram diluídas em PBS/T (diluição 1:3) e 80 µl de microesferas magnéticas recobertas com estreptavidina (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1, Invitrogen) foram adicionadas na amostra e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente para a captura das proteínas biotinizadas. Em seguida as microesferas foram recuperadas utilizando estantes magnéticas e lavadas por 3 vezes com 2 M de uréia em PBS/T, por 10 min a temperatura ambiente. Após essa etapa, as microesferas foram lavadas novamente com PBS/T por 2 vezes, 10 minutos cada. Em seguida a lavagem foi feita apenas com PBS por 3 vezes, 30 minutos cada, e por fim 4 lavagens com 50 mM bicarbonato de amônio foram realizadas, sendo que as três primeiras foram por 30 minutos a temperatura ambiente e a última por 1 hora a 4 °C.

**b) Digestão das proteínas.** As microesferas foram ressuspensas em 50 µl de 50 mM de bicarbonato de amônio mais 3 µl de 1% ProteaseMax (Promega, Fitchburg, WI, EUA) e incubadas por 20 minutos a 37 °C sob agitação (1.800 RPM). Em seguida foram adicionados 40,5 µl de bicarbonato de amônio (50 mM) mais 1 µl de 0,5 M de DTT por 20 minutos a 60 °C e 3 µl de 0,5 M de IAA por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. As amostras por fim foram incubadas por 18 horas a 37 °C com 1 µl de Tripsina (1 µg/µl em 50 mM de ácido acético) mais 1 µl de 1% ProteaseMax. Em seguida foi adicionado 1 ml de 5% ACN e 0,1% TFA para interromper a digestão.

**c) Purificação dos peptídeos.** Os peptídeos digeridos foram desalinizados e purificados com uma micro coluna de fase reversa *Vivapure C<sub>18</sub>* (Sartorius, Goettingen, Alemanha) seguindo instruções do fabricante. Inicialmente, as colunas foram ativadas

com uma solução de acetonitrila (ACN) 95% e 0,1% ácido trifluoroacético (TFA). Em seguida foram equilibradas com 95% ACN e 0,1% TFA. Após o equilíbrio da coluna, os peptídeos digeridos foram aplicados. Posteriormente as colunas serão lavadas por 3 vezes com 200 µl de 5% ACN e 0,1% TFA. A Eluição dos peptídeos foi realizada adicionando 150 µl de 80% ACN e 0,1% TFA e as amostras foram desidratadas em *speed vaccum* por 150 minutos a 40 °C e ressuspensas em 500 ng/µl de 5% ACN /0,1% ácido fórmico. Após esta etapa as amostras foram encaminhadas para Universidade de Saúde e Ciência do Oregon , Proteômica Recursos Compartilhados, Portle, Oregon, EUA, para análise por espectrometria de massas.

#### **24. Espectrometria de Massa.**

Peptídeos digeridos foram separados por cromatografia líquida utilizando o sistema de ultraperformance LC (UPLC) NanoAcquity (Waters, Milford, MA, EUA) acoplado ao espectrômetro de massas *ion trap* linear (LTQ Velos pressure) (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) utilizando eletrospray como fonte de ionização. O software utilizado para controlar o sistema foi o XCalibur versão 2.1. O fluxo das amostras aplicadas foi de 15 µl/min por 10 minutos. Após a passagem das amostras na coluna, os peptídeos foram eluídos através de um gradiente de ACN de 7-30% durante 106 minutos em um fluxo de 300 nL/min. O gradiente de ACN foi realizado utilizando-se solução A (0,1% de ácido fórmico em água) e a solução B (ACN absoluto mais 0,1% de ácido fórmico). A energia de colisão foi normalizada para 30%.

#### **25. Análise dos dados obtidos na espectrometria de massa**

Para esta análise foi gerado um banco de dados combinando as sequências proteicas da linhagem Thai-53 de *M. leprae* (2327 sequências) com as sequências da linhagem Br4923 de *M. leprae* (1599 sequências) obtidas do UniProt (08-2011), todas as sequências duplicadas foram removidas, resultando em um base de dados com 2430 proteínas. Para estimar os limites de erros, utilizamos um banco de dados com sequências de peptídeos invertidas (Elias e Gygi, 2007). Além disto, foram anexadas 179 sequências de contaminantes comuns e de suas formas invertidas, gerando um banco de dados final contendo 5218 sequências de proteínas. O processamento dos dados, assim como a análise foi realizado conforme descrito no artigo em anexo (Silva *et. al.*, 2013). As proteínas identificadas foram funcionalmente classificadas com base no Leproma (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>). Para determinar os ortólogos em *M.*



*tuberculosis* utilizamos o banco de dados Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).

## **26. Análise estatística**

A análise dos dados foi realizada utilizando teste-t para comparar dois grupos e o teste de análise de variância (ANOVA) seguido de Bonferroni como um pós-teste para comparar três ou mais grupos em diferentes condições. A análise dos dados, assim como os gráficos, foram feitos através do software Graph Pad Prism e valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 1. *Mycobacterium leprae* adere e invade às células epiteliais nasais e alveolares

Foi utilizada microscopia confocal para determinar se o *M. leprae* é capaz de aderir e entrar em células epiteliais nasais (RPMI) e alveolares (A549). Neste ensaio, as células epiteliais foram infectadas com *M. leprae* vivo pré-marcado com PKH26 (vermelho) por 2, 4, 6 e 24 horas a 33 °C. Posteriormente, as células foram coradas com Faloidina-FITC (verde) e DAPI (azul) para marcação do filamentos de actina do citoesqueleto e núcleo, respectivamente.

Como mostrado na Figura 8, em 24 horas de infecção a bactéria foi capaz de interagir (somatório de bactérias aderidas mais internalizadas) com ambos os tipos celulares. No entanto, esta interação foi maior com as células do epitélio alveolar do que com as células epiteliais nasais. Além disso, o número de bactérias que interagiu com a célula RPMI não aumentou dentro do intervalo de 2 a 6 horas (Figura 9). Mas, curiosamente, após 24 horas de infecção ocorreu um aumento de 2 vezes na quantidade de bactérias que interagiram com a célula RPMI, sendo esse aumento estatisticamente significativo em comparação com os intervalos de tempos anteriores ( $P=0,001$ ). Com relação à cinética de adesão e entrada bacteriana, observamos um perfil semelhante no qual entre 2 e 6 horas não observamos um aumento no número de bactérias, enquanto que 24 horas depois, tanto o número de bactérias aderidas quanto o número de bactérias internalizadas praticamente duplicou, sendo que a quantidade de bactérias internalizadas foi maior do que o de bactérias aderidas ( $P=0,03$ ).

Entretanto, a quantidade de *M. leprae* associado às células A549 aumentou em função do tempo chegando a sua saturação no intervalo de 6 horas (Figura 10). Além disso, a cinética de associação foi influenciada mais pela internalização do que pela adesão bacteriana, visto que no intervalo entre 2 e 4 horas a quantidade de *M. leprae* aderido não aumentou, enquanto que o número de bacilos internalizados já apresentava um aumento. Ademais, o número de bacilos fagocitados pelas células epiteliais alveolares não aumentou após 6 horas de infecção, permanecendo praticamente o mesmo no tempo de 24 horas. Completando a análise, observamos que em 2 horas de infecção a porcentagem de células A549 infectadas estava em torno de 50%, enquanto que na linhagem de epitélio nasal RPMI 2650, 6% de células se encontravam infectadas. Por fim, em 24 horas a porcentagem de células infectadas aumentou em ambas as

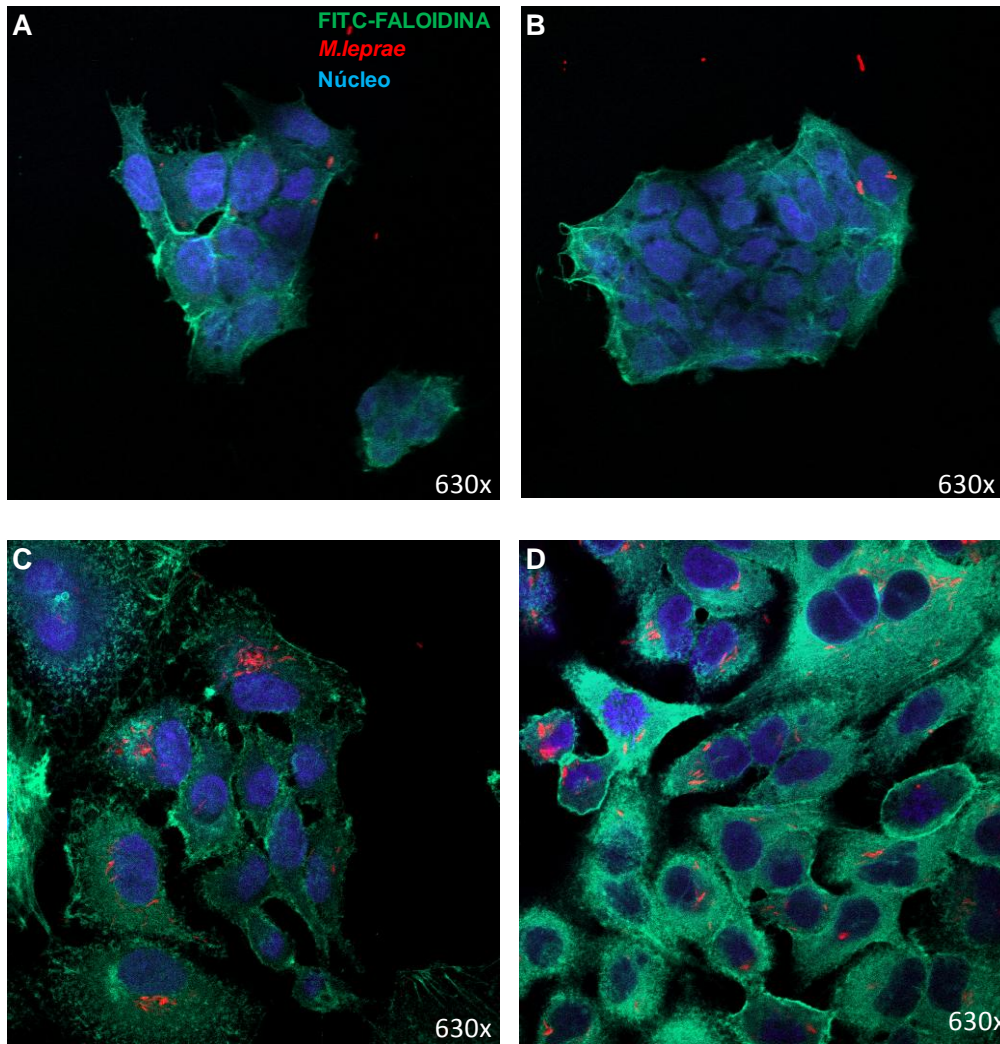
células, sendo que na célula A549 praticamente todas as células encontravam-se infectadas enquanto que apenas 15% das células RPMI 2650 continham *M. leprae*.

Além disso, a cinética de internalização do *M. leprae* foi diferente entre as células, sugerindo que esta diferença possa ser apenas devido à uma diferença na atividade fagocítica destas células. Para testar esta hipótese, as células RPMI e A549 foram incubadas com microesferas fluorescentes em diferentes intervalos de tempo e a porcentagem de células que interagiram com as microesferas foram quantificadas por citometria de fluxo. A incubação foi feita em temperaturas distintas, a 4 °C e 37 °C (Figura 11), para permitir a distinção entre a porcentagem de células que contêm microesferas aderidas (4 °C) e a porcentagem de células contendo microesferas internalizadas (% células marcadas a 37 °C - % células marcadas a 4 °C) (Figura 11A e 11B). A mediana da intensidade de fluorescência (MIF) também foi determinada com o objetivo de investigar se as células endocitavam uma quantidade semelhante de microesferas.

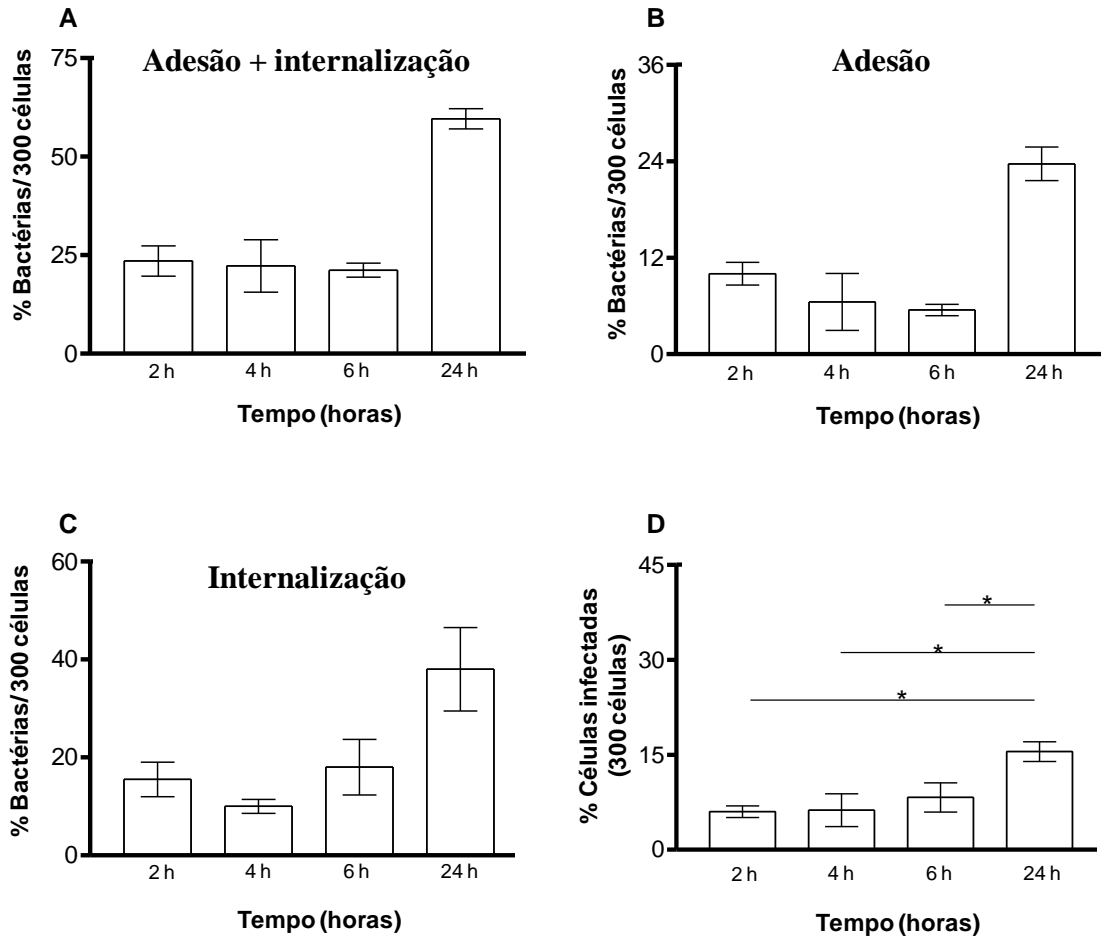
Como mostrado na Figura 11C, em 2 horas de incubação a porcentagem de células A549 marcadas foi o dobro das células RPMI. Entretanto, o valor de MIF não apresentou uma diferença estatisticamente significativa (Figura 11D). Em 6 horas não foi observada diferença na porcentagem de células marcadas e o valor MIF entre as duas células foi semelhante. Com esses dados concluímos que ambas as células são capazes de endocitar as microesferas de forma semelhante. Portanto a maior quantidade de bactérias presentes na célula A549 poderia ser explicada por uma maior afinidade do *M. leprae* a este tipo celular. A baixa taxa de internalização do *M. leprae* na célula RPMI poderia ser, por exemplo, explicada por uma baixa disponibilidade de receptores para as adesinas bacterianas na superfície da célula.

Após estabelecer que o *M. leprae* interage com as células epiteliais nasais e alveolares, sendo capaz de aderir e entrar em ambas as células, nós investigamos se o *M. leprae* é capaz de interagir com as células epiteliais nasais primárias humanas (CENPH) obtidas de pacientes com polipose nasal. Após o estabelecimento da cultura, essas células foram marcadas com anticorpo anti citoqueratina 19 (anti-CK19), observando-se um grau de pureza acima de 95% (Figura 12). As células epiteliais nasais primárias foram então incubadas com *M. leprae* morto pré-marcado com PKH67 (verde) por 2 horas a 37 °C. Como pode ser observado a bactéria foi capaz de aderir e também de ser

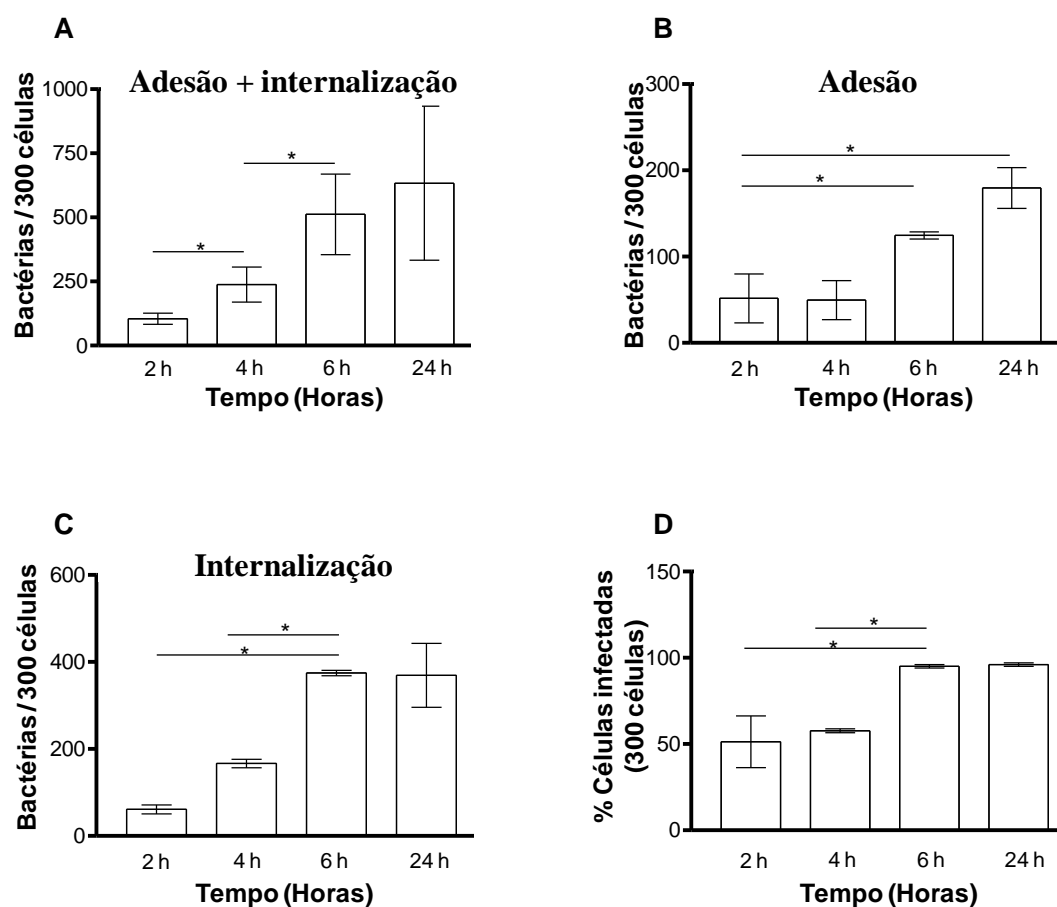
internalizada por estas células (Figura 13), confirmando, portanto, o dado anteriormente obtido com as células RPMI.



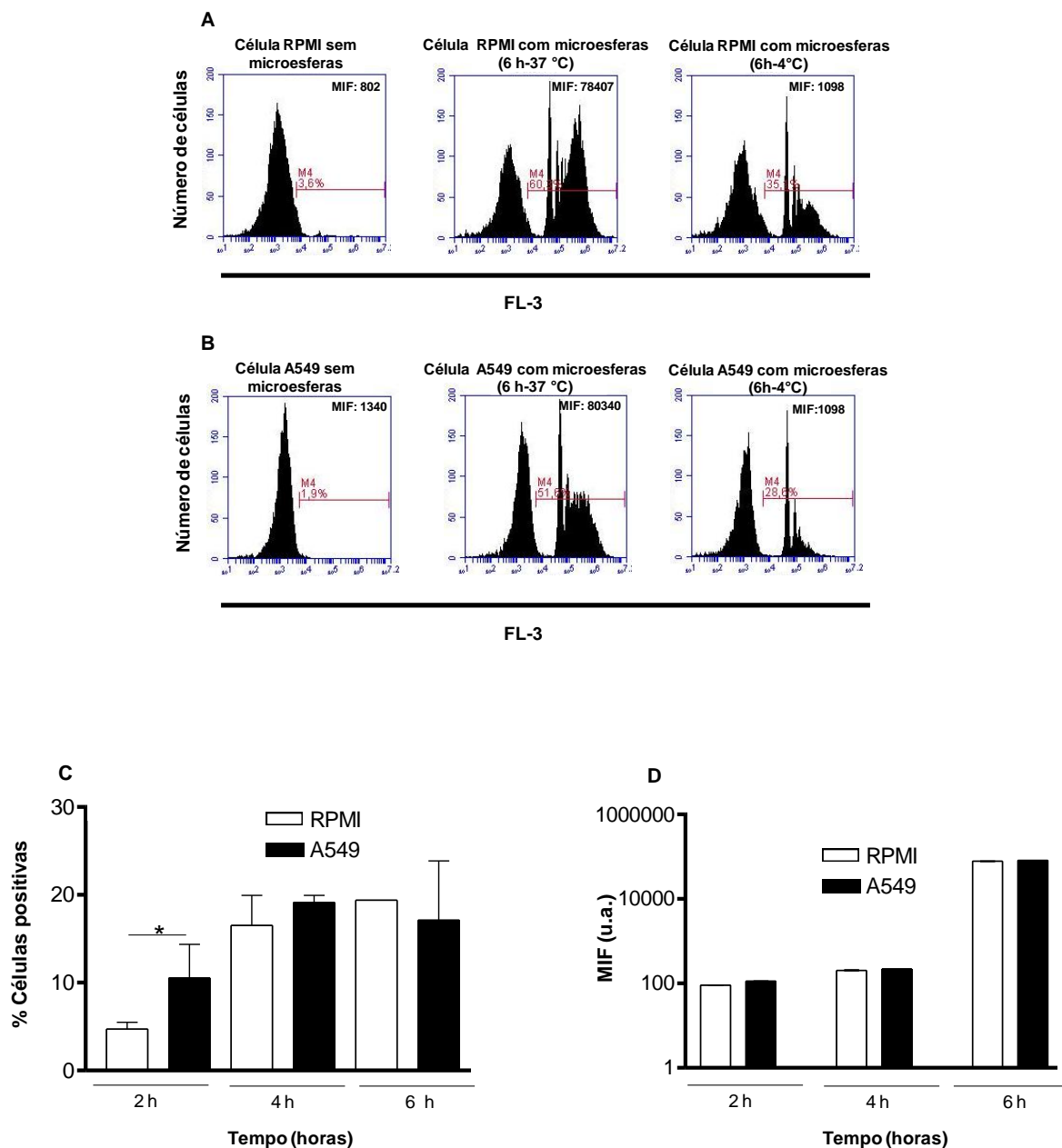
**Figura 8. Interação do *M. leprae* com células epiteliais nasais e alveolares em 24 horas de infecção.** *M. leprae* vivo foi pré-marcado com PKH 26 (vermelho) e em seguida utilizado para infectar as monocamadas das linhagens nasal (RPMI) e alveolar (A549) em diferentes intervalos de tempo a 33 °C em uma MOI 10. As células foram lavadas para remoção das bactérias não aderidas e em seguida fixadas com 4% PFA e marcadas com FITC-Faloidina (verde) e DAPI (azul). Posteriormente as amostras foram levadas para o microscópio confocal modelo LSM 510 Zeiss em aumento de 630x. (A,B) Célula RPMI. (C,D) Célula A549. Imagens representativas de 4 experimentos independentes.



**Figura 9. Cinética de interação do *M. leprae* com células epiteliais nasais.** *M. leprae* (ML) vivo foi pré-marcado com PKH 26 e em seguida utilizado para infectar monocamadas da linhagem nasal (RPMI) em diferentes intervalos de tempo a 33 °C numa MOI 10. As células foram lavadas para remoção das bactérias não aderidas e em seguida fixadas com 4% PFA e marcadas com FITC-Faloidina e DAPI. Posteriormente, as amostras foram levadas para o microscópio confocal modelo LSM 510 Zeiss em aumento de 630x, para determinar o número de bactérias associadas (A), bactérias aderidas (B), internalizadas (C) e a porcentagem de células epiteliais infectadas (D). O número de bactérias associadas às células corresponde ao somatório do número de bactérias aderidas mais internalizadas. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



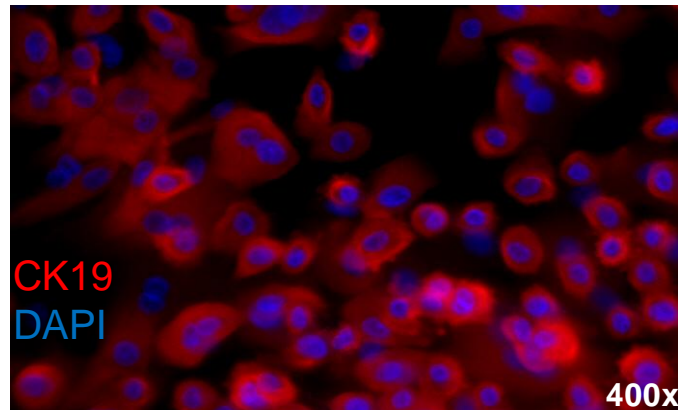
**Figura 10. Cinética de interação do *M. leprae* com células epiteliais alveolares.** *M. leprae* (ML) vivo foi pré-marcado com PKH 26 e em seguida utilizado para infectar as monocamadas da linhagem alveolar (A549) em diferentes intervalos de tempo a 33 °C numa MOI 10. As células foram lavadas para remoção das bactérias não aderidas e em seguida fixadas com 4% PFA e marcadas com FITC-Faloidina e DAPI. Posteriormente as amostras foram levadas para o microscópio confocal modelo LSM 510 Zeiss em aumento de 630x, para determinar o número de bactérias associadas (número de bactérias aderidas mais internalizadas) (A), bactérias aderidas (B), internalizadas (C) e a porcentagem de células epiteliais infectadas (D). Resultado expresso como a média de 4 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



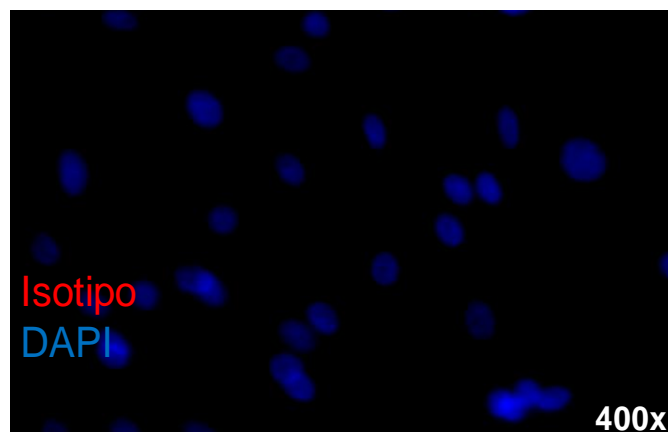
**Figura 11. Comparando a atividade fagocítica das células RPMI2650 e A549.** Monocamadas de células epiteliais foram incubadas com microesferas fluorescentes a 37 °C ou 4 °C e descoladas dos poços com um *cell scraper* e em seguida analisadas por citometria de fluxo. (A, B) Histograma das células incubadas com microesferas fluorescentes a 37 °C e a 4 °C. (A) Célula RPMI. (B) Célula A549. (C) Porcentagem de células marcadas contendo microesferas internalizadas. (D) Mediana da intensidade de fluorescência (MIF) de células epiteliais contendo esferas internalizadas. Resultado expresso como a média de 2 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



A

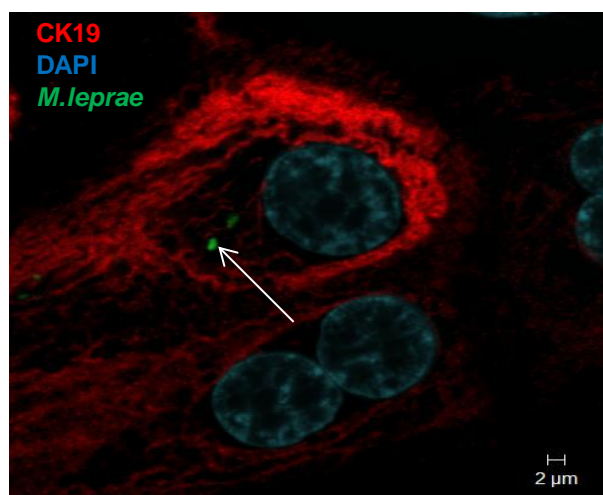


B

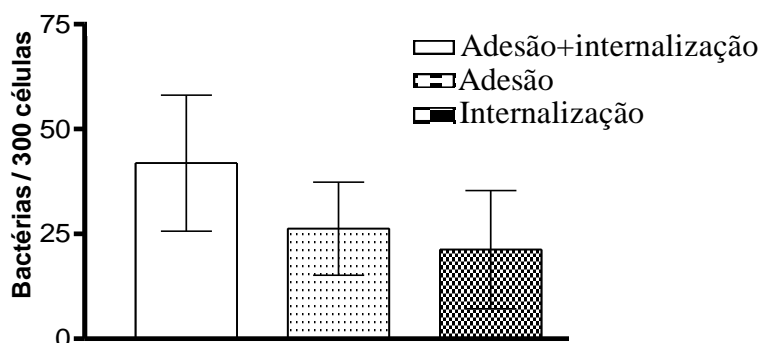


**Figura 12. Isolamento de células epiteliais nasais primárias humanas (CENPH).** Imunofluorescência para visualização da citoqueratina 19 (CK19) em CENPH. As culturas foram fixadas em 4% de paraformaldeído, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% e depois marcadas com anticorpo primário contra CK19 (1:100) e em seguida incubadas com anticorpo secundário conjugado a Alexa 555 (1:100). (A) marcação com anticorpo anti-CK19 monoclonal IgG; (B) marcação com isotipo IgG controle. Imagens representativas de 5 experimentos independentes. As imagens foram capturadas em um aumento de 400x.

A



B

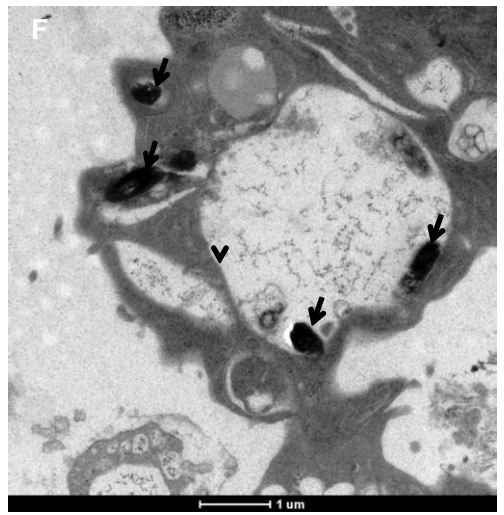
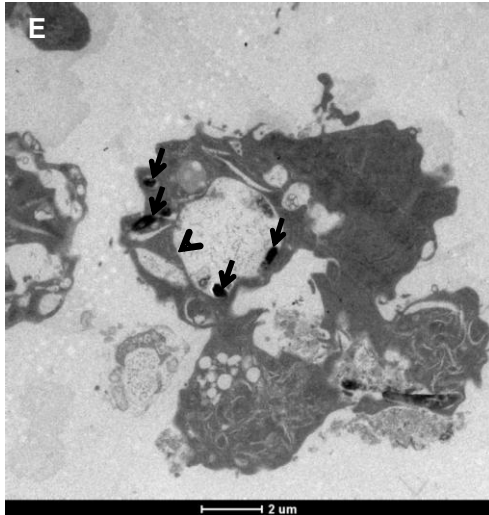
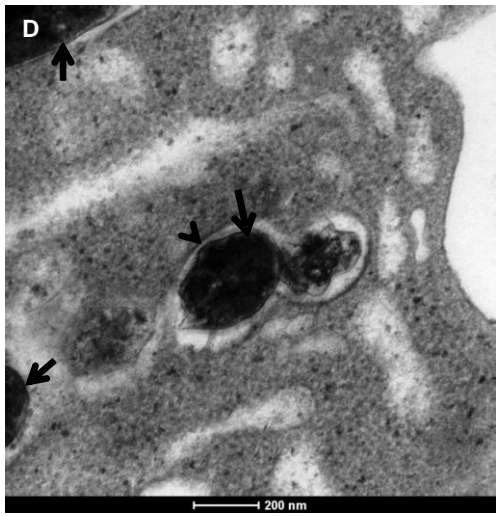
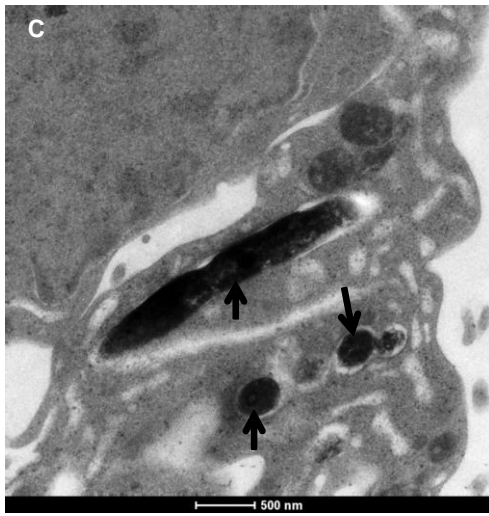
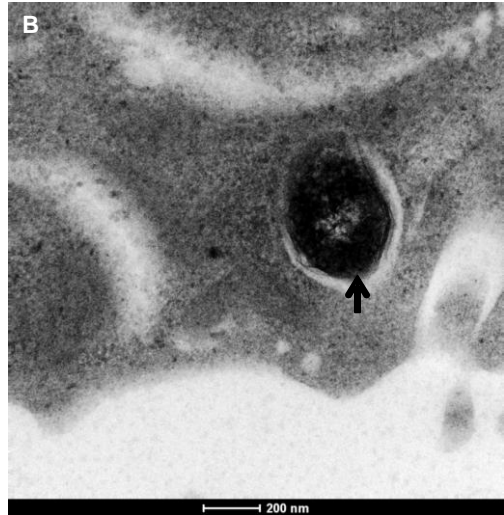
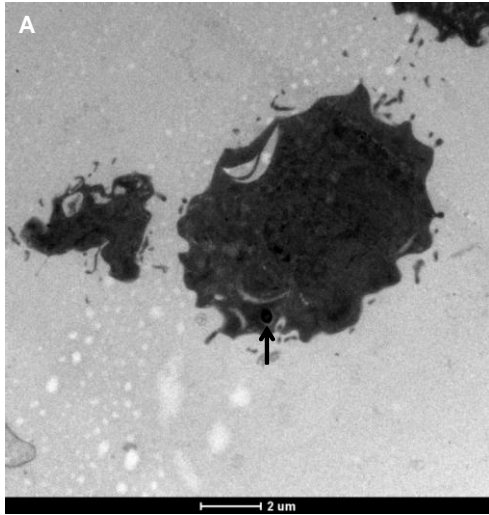


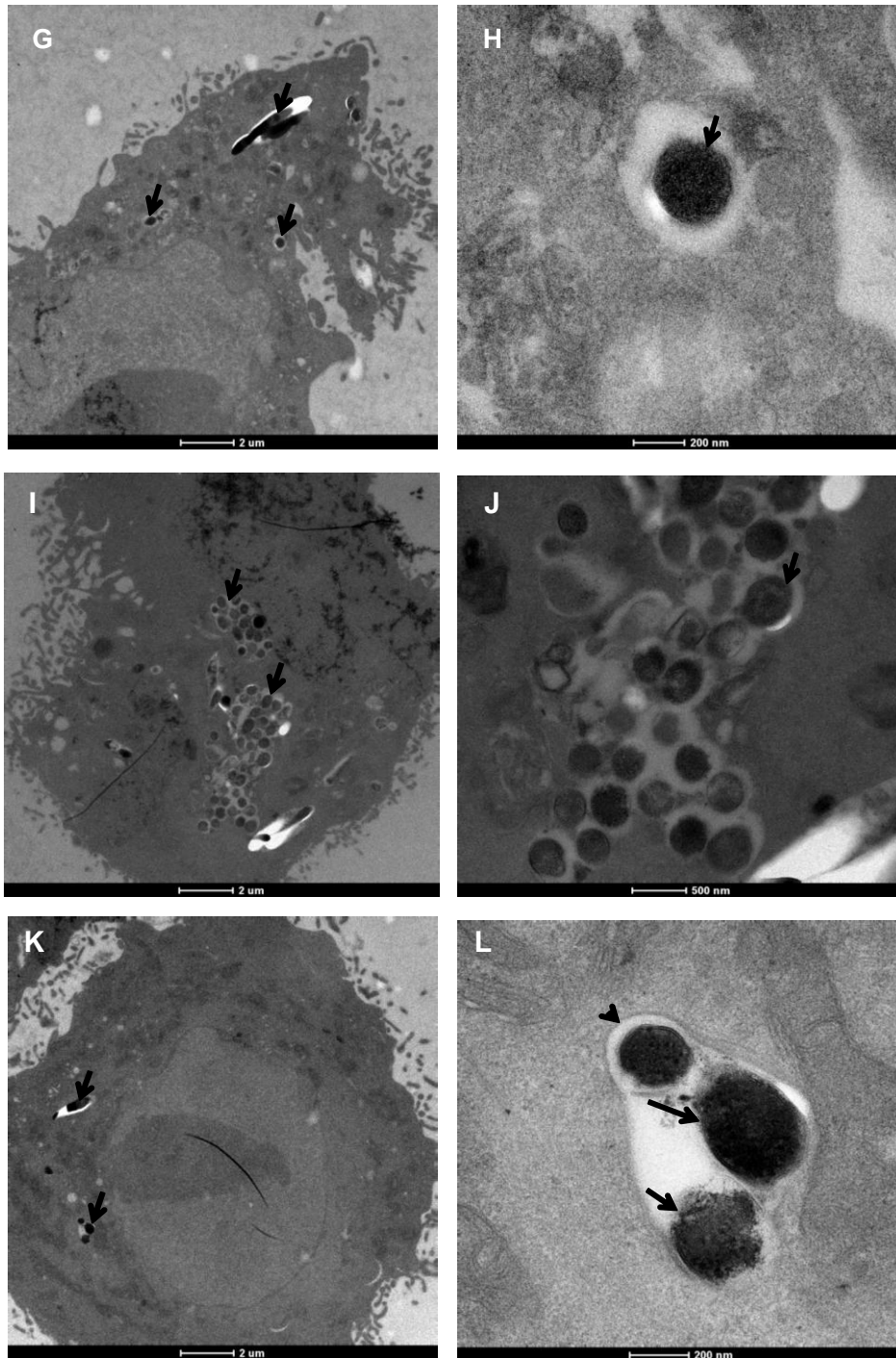
**Figura 13. *M. leprae* interage com células epiteliais nasais primárias humanas (CENPH).** *M. leprae* irradiado foi pré-marcado com PKH 67 (verde) e utilizado para incubações com as células epiteliais nasais primárias por 2 horas em uma MOI de 10 a 37 °C. Posteriormente as células foram fixadas com 4% paraformaldeído por 20 minutos e depois lavadas. O epitélio primário foi incubado com anticorpo anti-CK19 e posteriormente com anticorpo secundário marcado com Alexa 555 (vermelho). O núcleo das células foi marcado com DAPI (azul). As imagens foram capturadas em um aumento de 630x e a quantidade de bactérias aderidas e internalizadas às células foram obtidas de um conjunto de 300 células. (A) Imagem representativa de 4 experimentos independentes. (B) Quantificação da interação de *M. leprae* com as CENPH. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes ± desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **2. Microscopia eletrônica das células epiteliais infectadas com *M. leprae***

Microscopia eletrônica de transmissão foi realizada com o objetivo de confirmar se o *M. leprae* encontrava-se dentro das células epiteliais. As células foram infectadas por 24 horas, pois neste intervalo de tempo, segundo os dados obtidos no confocal, as células epiteliais apresentavam uma maior quantidade de bactérias internalizadas do que aderidas. Após a infecção, as amostras foram fixadas e em seguida processadas para observação em microscópio eletrônico (Figura 14).

Na linhagem RPMI pode-se observar um pequeno número de bactérias (setas) dentro de vacúolos (cabeças de seta), com uma ou duas bactérias por vacúolo, estando esses vacúolos estreitamente associados à bactéria (Figura 14D). No entanto, é interessante notar a presença também de enormes vacúolos contendo uma ou duas bactérias (Figura 14E, 14F). Na célula A549, o número de bactérias encontradas no interior de vacúolos foi variável (de 1 a 6) (Figura 14L). Esses dados, portanto, confirmam os resultados obtidos na microscopia confocal, mostrando que o *M. leprae* está dentro das células epiteliais, residindo dentro de vacúolos.

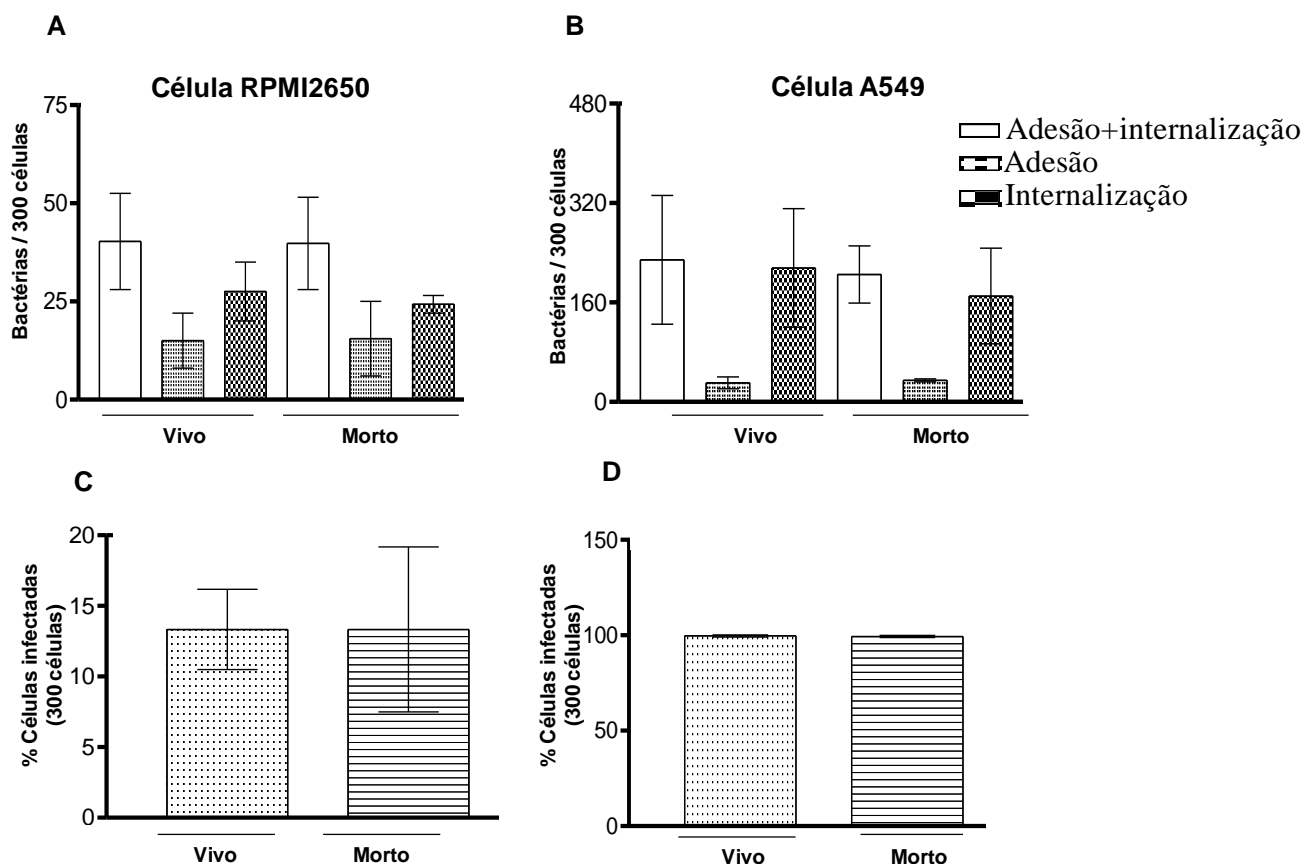




**Figura 14. *M. leprae* reside dentro de vacúolos nas células epiteliais.** Monocamadas de células epiteliais foram infectadas com *M. leprae* vivo por 24 horas. Em seguida as células foram fixadas com PFA e glutaraldeído, processadas e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão. (A, B, C, D, E e F), célula RPMI. (G, H, I, J, K e L), célula A549. As setas apontam para as bactérias. Cabeças de seta apontam para os vacúolos. Imagens representativas de 2 experimentos independentes.

### **3. A entrada do *M. leprae* nas células epiteliais independe da viabilidade bacteriana.**

Para testar se a entrada do *M. leprae* nas células RPMI e A549 ocorre de forma passiva ou ativa, alíquotas de *M. leprae* foram mortas a 60 °C por 30 minutos (baseado em Lahiri<sup>b)</sup> *et al.*, 2005). Este tratamento foi escolhido pelo fato de não causar muitos prejuízos à superfície bacteriana. Posteriormente, as bactérias foram marcadas com PKH26 e utilizadas para infectar as células por 24 horas a 33 °C. A Figura 15 demonstra que não há diferença estatística quando comparamos o número de bactérias, tanto aderidas quanto internalizadas, entre o *M. leprae* vivo e o morto na célula RPMI (Figura 15A). Com relação à célula A549, apesar de uma aparente queda na aderência e também internalização do *M. leprae* morto na célula, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 15B). Ademais, a porcentagem de células com bactérias associadas não diferiu entre aquelas tratadas com *M. leprae* vivo e com bactéria morta (Figura 15C, 15D). Estes resultados sugerem que o *M. leprae* depende de moléculas pré-existentes na sua superfície para aderir e penetrar em células epiteliais. Também, esse dado sugere a existência de antígenos de superfície insensíveis ao calor que participam da adesão e entrada do *M. leprae*.



**Figura 15. *M. leprae* vivo e morto possuem a mesma capacidade de aderir e invadir as células epiteliais.** *M. leprae* vivo ou morto foi pré-marcado com PKH 26 e utilizado para infectar as monocamadas das linhagens nasal RPMI (A) e alveolar A549 (B) por 24 horas a 33 °C numa MOI 10. Bactérias não aderidas foram lavadas com PBS, e as células fixadas com PFA 4% e marcadas com FITC-Faloidina e DAPI. O número de bactérias aderidas e internalizadas em 300 células foi determinado em microscópio confocal modelo LSM 510 Zeis em aumento de 630x. (C,D) Porcentagem de células epiteliais infectadas com *M. leprae* vivo ou morto. (C) Célula RPMI2650. (D) Célula A549. Resultado expresso como a média de 4 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

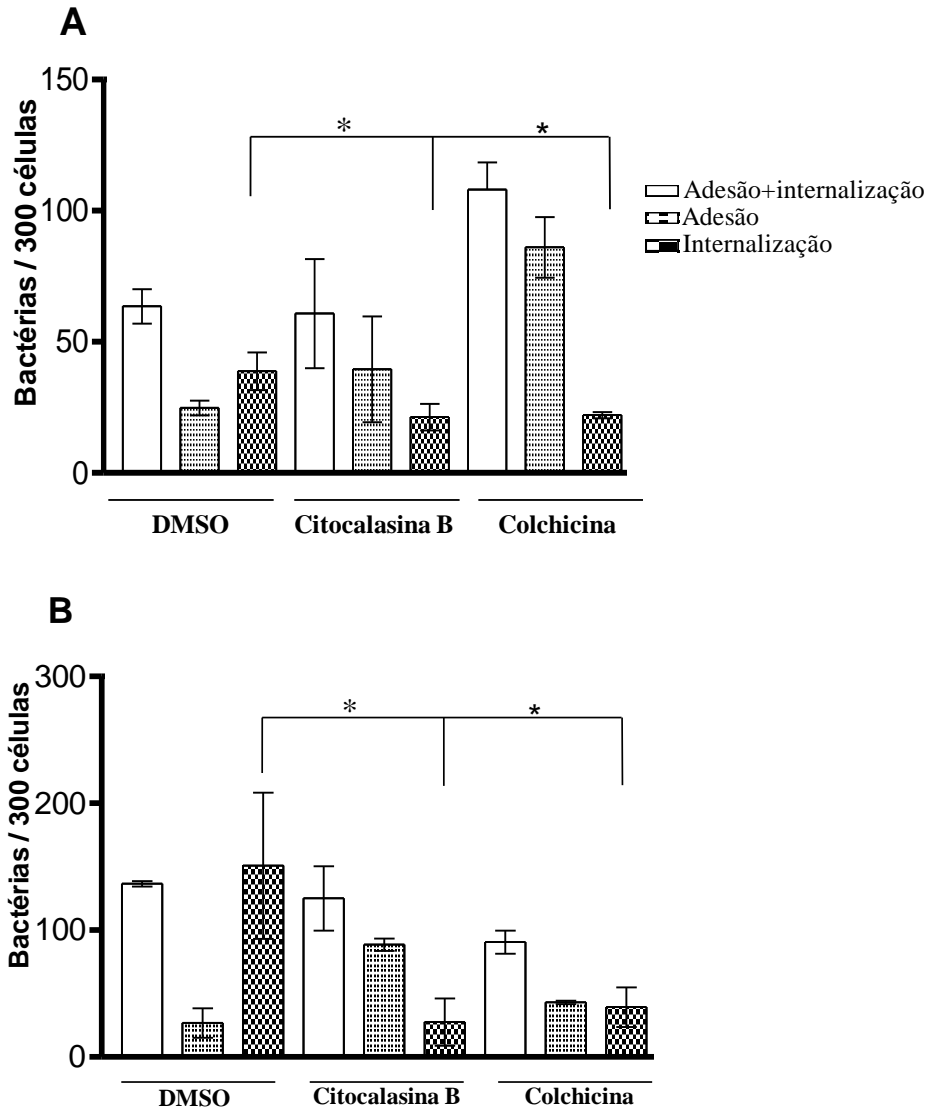
#### **4. O efeito de inibidores do citoesqueleto na invasão em células epiteliais por *M. leprae*.**

Com o objetivo de determinar os componentes do citoesqueleto que participam da internalização do *M. leprae* pelas células epiteliais, as células foram pré-tratadas com duas drogas capazes de atuar sobre o citoesqueleto, citocalasina B e colchicina. A citocalasina B é um metabólito fúngico capaz de inibir o processo de polimerização e despolimerização de actina (Cooper, 1987). Por sua vez, a colchicina é um alcalóide que inibe o processo de auto-montagem do microtúbulo (Olmsted and Borisy, 1973). Essas drogas foram extensivamente usadas para investigar o papel da actina e tubulina na invasão de células hospedeiras por patógenos (Finlay and Falkow, 1997).

Nesse contexto, as células epiteliais foram tratadas com citocalasina B ou de colchicina ou apenas o veículo (DMSO). Após o tratamento, as células foram infectadas por 24 horas com *M. leprae* vivo já que a maior parte das bactérias encontra-se dentro da célula neste intervalo de tempo. A Figura 16A mostra que a quantidade de bactérias que interagem com a célula RPMI cai pela metade quando a célula é pré-tratada com citocalasina B (RPMI+DMSO,  $38 \pm 3.0$  bactérias /300 células; RPMI + citocalasina B,  $20 \pm 2.5$  bactérias /300 células). O mesmo efeito foi observado quando a célula foi tratada com colchicina (RPMI+DMSO,  $38 \pm 3.5$  bactérias /300 células; RPMI + colchicina,  $22 \pm 0.5$  bactérias / 300 células).

Nas células A549 a citocalasina B e a colchicina também inibem a internalização bacteriana (Figura 16B). Também é interessante notar que tanto a célula A549 quanto a célula RPMI, quando tratadas com citocalasina, não tiveram a aderência das bactérias às células diminuída, mostrando que esses inibidores atuam apenas sobre o processo fagocítico e não na adesão do *M. leprae* a estas células. Em células tratadas com colchicina também não ocorreu mudança no número de bactérias aderidas. Também, não foi observado efeito citotóxico sobre as células após o tratamento com esses inibidores. A entrada do *M. leprae* nas células epiteliais, portanto, é uma consequência da interação entre as moléculas da superfície da bactéria com os receptores das células hospedeiras, que vão levar à reorganização do citoesqueleto celular, sendo que os filamentos de actina e também os microtúbulos desempenham um importante papel.





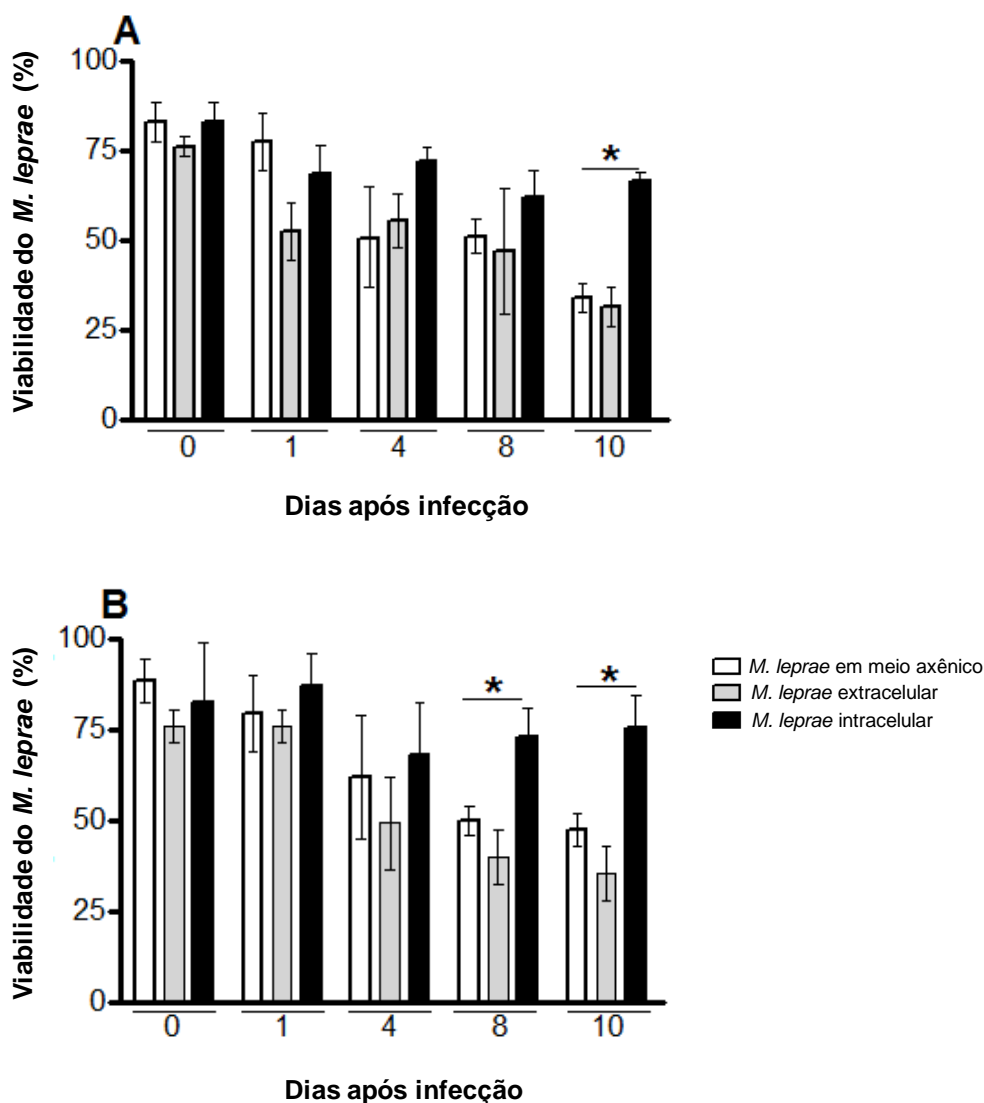
**Figura 16. Efeito de inibidores do citoesqueleto na internalização de *M. leprae*.** As células foram tratadas com o veículo (DMSO), citocalasina B e colchicina 1 hora antes de serem infectadas as células com *M. leprae*. As células foram infectadas por 24 horas a 33 °C e em seguida lavadas com PBS, fixadas com PFA 4% e marcadas com FITC-Faloidina (verde) e DAPI (azul). (A) Célula RPMI. (B) Célula A549. O número de bactérias aderidas e internalizadas em 300 células foi determinado em microscópio confocal modelo LSM 510 Zeis em aumento de 630x. Os dados representam a média e o desvio padrão de 4 experimentos realizados em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. A ausência de \* significa que não houve diferença estatística.

## 5. O *M. leprae* é capaz de sobreviver nas células epiteliais.

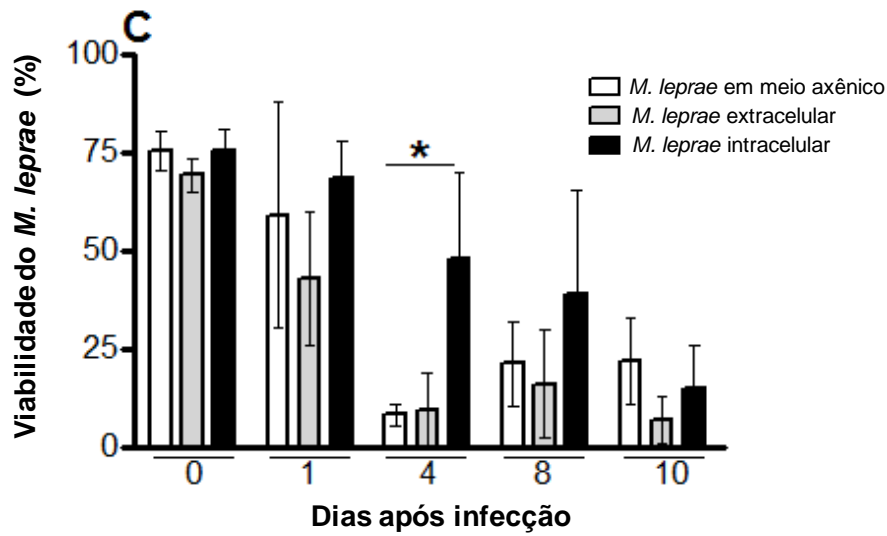
Para determinar a viabilidade do *M. leprae* dentro das células epiteliais, utilizamos o kit *live/dead* (Figura 17 e 18). Neste ensaio, a viabilidade das bactérias intracelulares foi determinada e comparada com as bactérias incubadas em poços contendo apenas o meio de cultivo celular, sem células (meio axênico). Além disso, também comparamos a viabilidade do *M. leprae* intracelular com as bactérias recuperadas após lavagem com PBS (*M. leprae* extracelular).

Como mostrado na Figura 17A, a viabilidade do *M. leprae* intracelular na célula RPMI, precisamente no décimo dia, foi maior do que a viabilidade da bactéria mantida apenas em meio. O ensaio de *live/dead* mostrou que o *M. leprae* intracelular apresenta uma viabilidade de  $66\% \pm 3.2\%$ , enquanto que a viabilidade da bactéria em meio axênico estava em torno de  $33\% \pm 2.2\%$  ( $P=0,0001$ ). Importante mencionar que o *M. leprae* extracelular também apresentou uma menor porcentagem de viabilidade quando comparado com a bactéria dentro da célula.

Exatamente o mesmo ocorreu com o *M. leprae* dentro da célula A549, em que a viabilidade do *M. leprae* intracelular no oitavo e décimo dia estavam em torno de 77%, enquanto que os bacilos mantidos em meio apresentavam uma viabilidade de  $47\% \pm 1.5\%$  ( $P=0,002$ ), enquanto que as bactérias recuperadas após lavagem com PBS tinha viabilidade em torno de  $44\% \pm 2.5\%$  ( $P=0,003$ ). Posteriormente, a viabilidade do *M. leprae* intracelular, na célula A549, foi determinada a uma temperatura de 37 °C, o que pode desfavorecer a sobrevivência do bacilo. A viabilidade intracelular do *M. leprae* foi comparada com o *M. leprae* mantido em meio (Figura 18). É interessante notar a diferença marcante de viabilidade; no quarto dia de infecção o *M. leprae* continuava vivo dentro da célula enquanto que fora da célula ocorria uma maior perda de viabilidade (*M. leprae* intracelular com viabilidade de  $47.3\% \pm 12.7\%$  versus *M. leprae* em meio com viabilidade de  $7.6\% \pm 1.4\%$  ;  $P=0,003$ ). Por outro lado, nos intervalos de tempo mais tardios, ou seja 8° e 10° dia, a sobrevivência do *M. leprae* intracelular foi igualmente diminuindo, não sendo mais possível obter uma diferença estatística entre a bactéria mantida em meio e a intracelular. Portanto, mesmo nessa condição a sobrevivência do *M. leprae* intracelular é favorecida em comparação com a bactéria extracelular. Esses dados, portanto, mostram que as células epiteliais favorecem a sobrevivência do *M. leprae*.



**Figura 17. O *M. leprae* sobrevive no ambiente intracelular de células epiteliais.** As células epiteliais foram infectadas com *M. leprae* vivo numa MOI 10 e incubadas nos seguintes tempos: 1, 4, 8 e 10 dias. Paralelamente, *M. leprae* foi incubado em meio de cultivo sem células. Posteriormente, as células foram lavadas 6 vezes com PBS e em seguida lisadas com 10% (v/v) de glicerol, 1% (v/v) de Triton X-100 e 1% (v/v) de Tween-20, obtendo, assim, as bactérias intracelulares. A viabilidade do *M. leprae* intracelular e mantido em meio axênico foi determinado pelo kit *live/dead*. (A) célula RPMI. (B) célula A549. Os dados representam a média e o desvio padrão de 5 experimentos realizados em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo em relação à bactéria mantida em meio axênico.



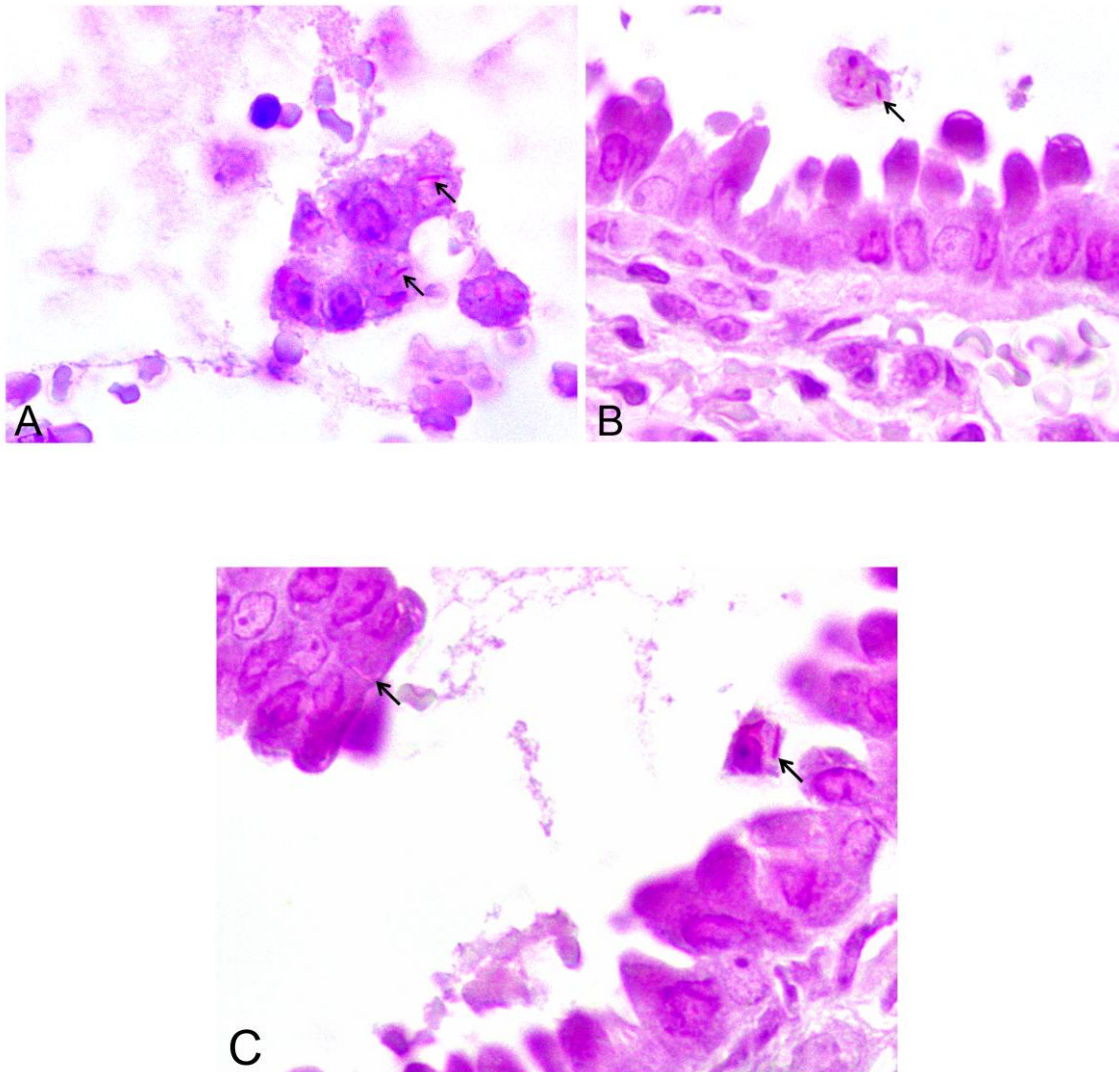
**Figura 18. Sobrevivência do *M. leprae* intracelular na célula A549 na temperatura de 37 °C.** Monocamadas de células foram infectadas com *M. leprae* numa MOI 10 e incubadas nos seguintes tempos: 1 dia, 4 dias, 8 dias e 10 dias. Paralelamente, *M. leprae* foi incubado em meio DMEM-F12 sem células. Posteriormente, as células foram lavadas 6 vezes com PBS e em seguida lisadas, obtendo assim as bactérias intracelulares. A viabilidade do *M. leprae* intracelular e extracelular foi determinada pelo kit *live/dead*. Os dados representam a média e o desvio padrão de 5 experimentos realizados em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo em relação à bactéria mantida em meio axênico.

## 6. Infecção intranasal de camundongo

Com o objetivo de verificar se o *M. leprae* era capaz de infectar células do trato respiratório *in vivo*, infectamos camundongos da linhagem C57BL/6 pela via intranasal e em seguida os camundongos foram sacrificados em diferentes intervalos de tempo. Posteriormente, a cabeça e os pulmões foram recuperados, embebidos em parafina e submetidos à coloração de Ziehl-Nielsen e H&E. Como mostrado na tabela 3, bacilos álcool-ácido resistentes foram encontrados em 2 camundongos após 4 horas de infecção e em 1 camundongo após 4 dias de infecção. Entretanto nesses dois camundongos só foram encontrados micobactéria nos pulmões, enquanto que no nariz não foi possível encontrar bacilos. Além disso, não foram encontrados sinais de lesões tanto no nariz quanto nos pulmões (Figura 19). Também não foram encontrados sinais de reação inflamatória. *M. leprae* foi observado interagindo com células epiteliais e também com macrófagos alveolares. Logo, esses resultados reforçam a hipótese de que o pulmão pode vir a ser a porta de entrada para o *M. leprae*.

**Tabela 3. Análise da presença de *M. leprae* no trato respiratório de camundongos C57BL/6 infectados pela via intranasal.**

Tempo de infecção	Números de animais utilizado em cada tempo	Número de animais com bactérias encontradas nos pulmões	Número de animais com bactérias encontradas no nariz	Tecidos e células infectadas	Resultados de H&E
4 horas	6	2	0	Células epiteliais e macrófagos, lúmen bronquíolar e parabronquiolar, bronquíolos terminais.	Não foram encontradas lesões visíveis
4 dias	6	1	0	Macrófagos infectados	Não foram encontradas lesões visíveis
10 dias	4	0	0	-	Não foram encontradas lesões visíveis
20 dias	4	0	0	-	Não foram encontradas lesões visíveis



**Figura 19. Coloração álcool-ácido para detecção de *M. leprae* no epitélio alveolar.** Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com *M. leprae* e, o epitélio nasal e o epitélio alveolar foram monitorados para a presença de lesões e também de bacilos álcool-ácido resistentes. (A,B,C) A imagem mostra o tecido pulmonar circunjacente e o bronquíolo terminal após 4 h de infecção. Os bacilos (ver seta) são mostrados em células epiteliais descamadas (A), em macrófagos luminares (B,C) e células epiteliais colunares (C).

## 7. Proteoma da superfície de *M. leprae*

A interação do *M. leprae* com a célula hospedeira depende, em parte, de interações, específicas e inespecíficas, entre as moléculas do hospedeiro com as moléculas do patógeno (Wilson *et. al.*, 2002). Este conhecimento pode levar a medidas terapêuticas eficazes, pois uma vez conhecendo as moléculas bacterianas que participam da interação, seremos capazes de intervir nesse primeiro e crucial estágio da interação patógeno-hospedeiro. Os nossos dados demonstraram que a invasão de *M. leprae* nas células epiteliais independe de sua viabilidade, sugerindo que as moléculas pré-existentes na superfície da bactéria são por si só suficientes para promover a entrada do *M. leprae*. Logo, a identificação das proteínas de superfície do *M. leprae* se mostra relevante, visto que podem fornecer informações importantes sobre a interação do patógeno com o hospedeiro.

Para atingir tal objetivo, *M. leprae* vivo foi incubado com Biotina e em seguida as bactérias foram lisadas. As proteínas biotinizadas de superfície foram purificadas através da incubação do lisado de *M. leprae* com as microesferas recobertas com estreptavidina. Como controle negativo, uma alíquota de *M. leprae* foi submetida a este mesmo procedimento, mas omitindo a incubação com a biotina. É importante mencionar que nesse experimento foi utilizado *M. leprae* vivo pré-tratado ou não com hidróxido de sódio (NaOH), como descrito em Lahiri<sup>a)</sup> *et al.* (2005) com o objetivo de aumentar as chances de detecção de proteínas que podem se soltar da superfície de *M. leprae* após o tratamento com NaOH. Ademais, em estudos feitos com *M. leprae* vivo derivado de camundongo nude é altamente recomendável o tratamento com NaOH para remoção de pedaços de tecido do camundongo. Tecidos de camundongo presentes no inóculo bacteriano podem diminuir a efetividade da biotinilação. Também o tratamento com hidróxido de sódio pode eliminar as proteínas contaminantes de camundongo. Portanto, o tratamento com NaOH pode permitir a identificação de uma maior quantidade de proteínas presentes na parede do *M. leprae*.

Para confirmar se as proteínas de superfície de *M. leprae* foram realmente biotinizadas, as amostras foram submetidas à SDS-PAGE e em seguida as proteínas biotinizadas foram detectadas através de western blot revelado com estreptoavidina conjugado ao fluoróforo IRDye 680 (Figura 20). Bactérias não marcadas também foram

utilizadas como controle negativo. Como pode ser visto na Figura 20, não foi observado um padrão de bandas biotiniladas no controle negativo, enquanto que nas bactérias tratadas com biotina foi possível a visualização das proteínas biotiniladas. Após isso, as proteínas biotiniladas de *M. leprae* foram purificadas, digeridas e processadas para o espectrômetro de massas como descrito na seção de materiais e métodos.

No total, 280 proteínas foram identificadas, sendo que 85 proteínas foram encontradas apenas nas bactérias não tratadas, enquanto que 79 foram achadas somente nas bactérias tratadas com NaOH (Figura 21). Além disso, 115 proteínas foram identificadas em ambas as amostras. Com relação às diferenças encontradas entre o *M. leprae* tratado e o não tratado com NaOH, observamos um enriquecimento de proteínas classificadas como de parede celular e processos celulares nas bactérias tratadas com hidróxido de sódio (Figura 21). Ainda, ocorreu uma queda na porcentagem de proteínas envolvidas com metabolismo intermediário e respiração, mas um aumento daquelas envolvidas em metabolismo lipídico nas bactérias tratadas com NaOH. Duas proteínas não encontradas em estudos prévios de proteoma foram identificadas em nosso trabalho: uma possível oxidoreductase (ML2276c, *ml2276c*) e uma proteína hipotética conservada (ML2309, *ml2309*) (Tabela 4).

Um considerável número de enzimas previamente caracterizadas como citosólicas e que não possuem sequência sinal ou mesmo regiões de ancoramento à membrana foram encontradas na superfície do *M. leprae*. Entre estas estão a malato desidrogenase e o gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase (em anexos, Tabela 7). De fato, enzimas glicolíticas e outras citosólicas tem sido identificadas na parede celular de vários patógenos, desempenhando funções de adesinas ou invasinas, que facilitam a colonização do hospedeiro e também o estabelecimento da infecção (Chhatwal, 2002; Pancholi & Chhatwal, 2003), sugerindo que o *M. leprae* apresenta uma grande quantidade de proteínas envolvidas na adesão e invasão (Anexos, Tabela 7). A Tabela 5 mostra algumas dessas proteínas identificadas na superfície do *M. leprae* que podem ser importantes para a adesão e a invasão. Estas proteínas foram escolhidas com base na literatura e também na sua homologia com proteínas de *M. tuberculosis*. A proteína Hlp, também conhecida como HupB (ML1683c), assim como a proteína ligante de heparina (HBHA) (ML2454c), foram confirmadas na superfície do *M. leprae*. Além disso, a proteína Hlp foi encontrada tanto na bactéria não tratada quanto na bactéria tratada, enquanto que a HBHA foi identificada apenas na bactéria com NaOH.

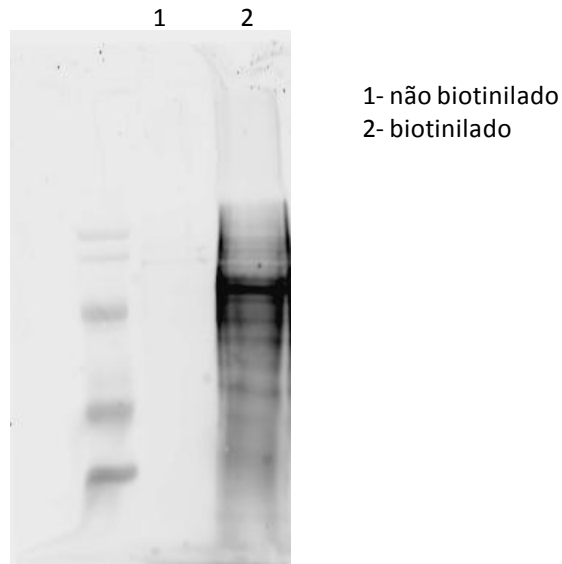


Outro achado interessante na superfície de *M. leprae* foi a presença de duas proteínas que participam do complexo de entrada em células de mamíferos (Mce), a proteína Mce 1A (ML2589) e Mce 1C (ML2591) (Tabelas 5 e 7), sendo ambas encontradas apenas no *M. leprae* tratado com NaOH. A proteína malato sintase também foi encontrada na superfície do *M. leprae*, tanto na bactéria tratada quanto na bactéria não tratada com NaOH. Esta é uma enzima envolvida no ciclo do glioxilato, e também foi encontrada na superfície de *M. tuberculosis*, sendo capaz de interagir com a laminina, atuando assim como adesina no contexto da célula A549 (Kinhikar *et al.*, 2006). Nesse contexto, outra enzima chamada Ag 85B ou FbpB (ML2028) foi apontada na Tabela 5 como uma provável adesina ou mesmo invasina. Também identificada em *M. leprae* tratado e não tratado com NaOH, Ag85 é descrito como uma proteína ligante de fibronectina (Fbp) envolvida na transferência de ácidos micólicos, sendo importante para a biossíntese da parede celular (Belisle *et al.*, 1997; Ronning *et al.*, 2000).

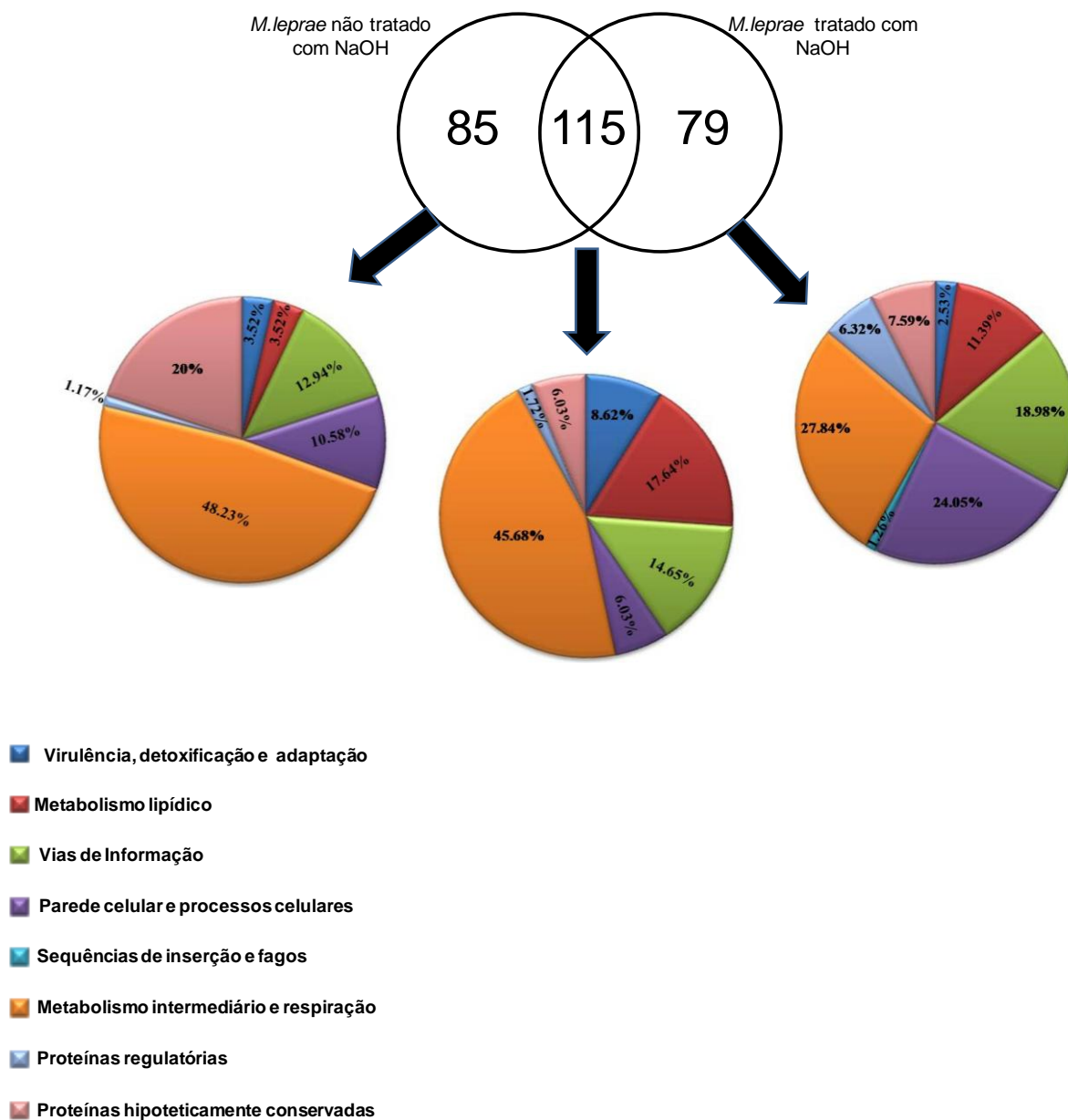
É interessante notar também que existe uma amostra considerável de chaperonas na superfície do *M. leprae* (Tabela 7, em Anexos). Vários estudos têm revelado que as chaperonas podem ser importantes na adesão e invasão de patógenos (Henderson & Martin, 2011). A GroEL 2 de *M. tuberculosis* é capaz de se ligar ao receptor CD46, atuando como adesina no contexto de macrófago (Hickey *et al.*, 2010). Em outros patógenos, como a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *S. enterica* e *H. pylori* as chaperonas Hsp 60 (GroEL1) e Hsp 70 (Dna K) parecem atuar como adesinas (De Jesus *et al.*, 2005; Huesca *et al.*, 1998; Ensgraber & Loos, 1992). Outro interessante achado na superfície de *M. leprae* é uma provável enolase (ML0255), identificada apenas no bacilo não tratado com NaOH. Enolases são metalo enzimas capazes de catalisar a reação de fosfo-glicerato em enolpiruvato durante a glicólise. O *Plasmodium* possui enolases em sua superfície e foi mostrado que estas são capazes de se ligar ao plasminogênio (Ghosh & Jacobs-Lorena, 2011).

Finalmente, outra proteína que pode participar da interação com as células epiteliais do hospedeiro humano é o fator de alongamento Tuf (ML1877c), com similaridade de 95% com a proteína EF-Tu de *M. tuberculosis*. Esta proteína também está presente em outros patógenos tais como *Mycoplasma pneumoniae*, responsável por causar pneumonia atípica e também traqueobronquite. Em *M. pneumoniae*, esta proteína também se localiza na superfície e é capaz de se ligar à fibronectina (Dallo *et al.*, 2002). O agente etiológico da tularemia, chamado *Francisella tularensis*, também possui esta

proteína em sua superfície e esta possui o papel de promover a aderência em células THP-1 (Barel *et al.*,2008).



**Figura 20. Controle de biotinição das proteínas de *M. leprae*.** *M. leprae* vivo foi incubado com NHS-LC Biotina por 20 minutos à temperatura ambiente em PBS. Posteriormente o *M. leprae* biotinilado foi lavado com PBS e em seguida lisado. Para obtenção do controle negativo, *M. leprae* vivo foi incubado apenas com PBS, sem biotina, e processado da mesma forma que a bactéria marcada. Após a lise das bactérias, 20 µg de proteína dos extratos foram submetidos a SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com estreptoavidina conjugada à IRDye 680 e padrões de biotinição foram visualizados utilizando-se o Odyssey Scanner (Licor).



**Figura 21. Classificação funcional do proteoma de superfície de *M. leprae*.** Diagrama de Venn mostrando a distribuição numérica das proteínas identificadas na superfície das bactérias tratadas com NaOH, bactérias não tratadas com NaOH e proteínas identificadas simultaneamente nas bactérias tratadas e não tratadas com NaOH. Abaixo do diagrama mostramos a classificação funcional das proteínas encontradas na superfície de *M. leprae*, obtida através de análise no site <http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>.

**Tabela 4. Novas proteínas de *M. leprae* identificadas no presente estudo.**

Leproma ID*	Nome do gene	Função proteica	<i>M. tuberculosis</i> Sanger ID**
ML2276c***	<i>ml2276c</i>	Oxidoreductase ligado à FAD	Rv0561c
ML2309***	<i>ml2309</i>	Proteína hipotética conservada	Rv3683

\* Análise realizada no Leproma (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma>)

\*\* Análise realizada no Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>)

\*\*\*Proteínas identificadas apenas em *M. leprae* tratado com NaOH.

**Tabela 5. Proteínas identificadas na superfície do *M. leprae* envolvidas provavelmente em adesão e/ou invasão.**

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Sanger ID**</b>
Classe 0 – Virulência, detoxificação e adaptação			
ML0072c <sup>a)</sup>	<i>sodA</i>	Possível superóxido dismutase SodA	Rv3846
ML0317 <sup>a)</sup>	<i>groEL2</i>	Proteína <i>Heat-shock</i> da família Hsp65	Rv3417
ML0381 <sup>a)</sup>	<i>groEL1</i>	60 kDa chaperonina 1 GroEL1	Rv3417
ML2589 <sup>c)</sup>	<i>mce1A</i>	Família de proteínas MCE	Rv0169
ML2490c <sup>a)</sup>	<i>clpB</i>	Proteína <i>heat-shock</i>	Rv0384c
ML2496c <sup>a)</sup>	<i>dnaK</i>	Provável chaperona DnaK	Rv0350
Classe I- Metabolismo lipídico			
ML2028 <sup>a)</sup>	<i>fbpB</i>	Antígeno Secretado 85B	Rv1886c
Classe II- Vias de informação			
ML1683c <sup>a)</sup>	<i>hupB</i>	Provável proteína ligante de DNA	Rv2986c
ML1877c <sup>a)</sup>	<i>tuf</i>	Fator de alongamento regulado pelo ferro	Rv0685
Classe III- Parede celular e processos celulares			

ML2454 <sup>c)</sup>	<i>hbhA</i>	Possível hemaglutinina	Rv0475
Classe VII- Metabolismo lipídico			
ML2069 <sup>a)</sup>	<i>glcB</i>	Malato sintase	Rv1837c
ML0255 <sup>b)</sup>	<i>eno</i>	Provável enolase	Rv1023

\* Análise realizada no Leproma (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma>)

\*\* Análise realizada no Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>)

a) Proteínas identificadas simultaneamente em *M. leprae* tratado e não tratado com NaOH

b) Proteínas identificadas apenas em *M. leprae* não tratado com NaOH.

c) Proteínas identificadas apenas em *M. leprae* tratado com NaOH.

## 8. O papel das proteínas HBHA e Hlp na interação entre o *M. leprae* e as células epiteliais nasais e alveolares

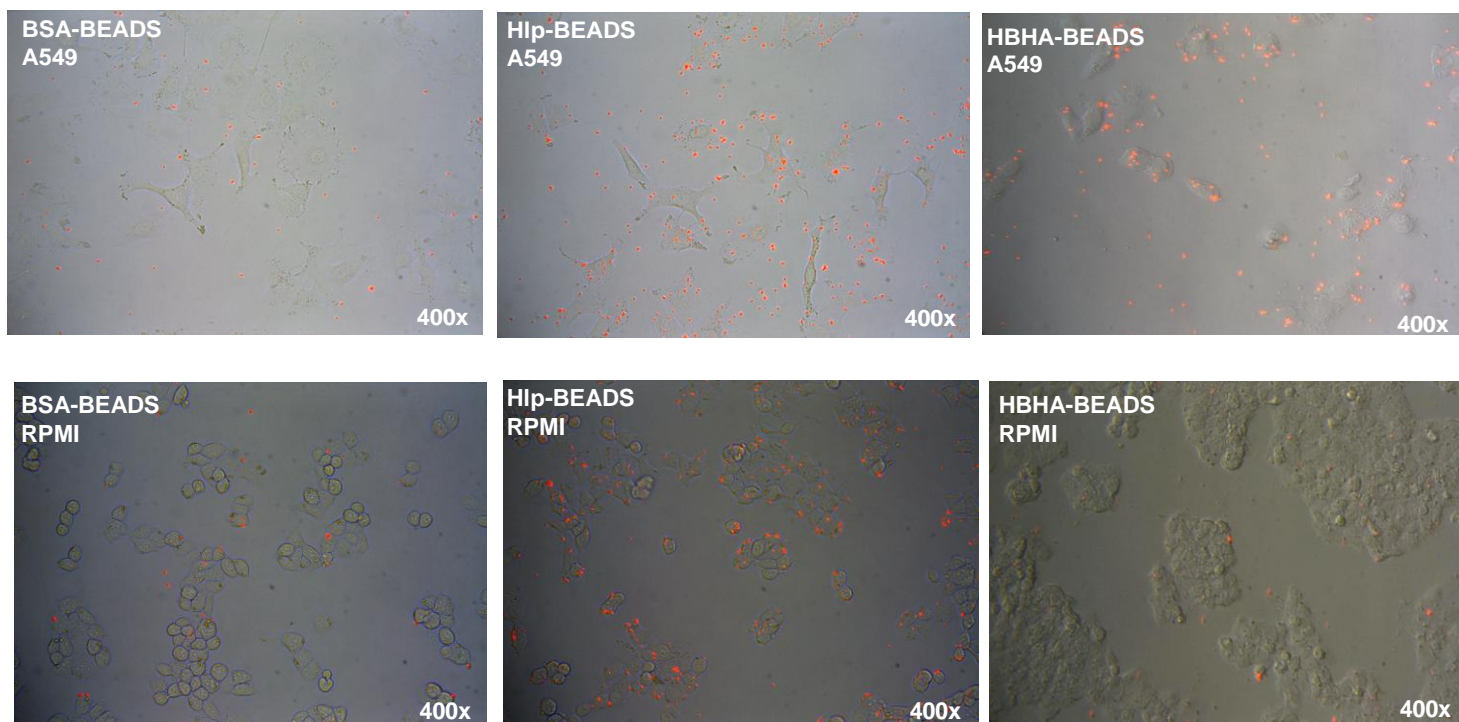
Confirmando a presença das proteínas Hlp e a HBHA na superfície de *M. leprae*, investigamos o possível papel dessas proteínas na adesão de *M. leprae* às células epiteliais. Para isso, microesferas (*beads*) fluorescentes recobertas com as proteínas recombinantes de *M. leprae* ou com BSA (controle negativo), foram incubadas com as células RPMI e A549. Como pode ser visto na Figura 22, as microesferas pré-tratadas com Hlp se associaram às células RPMI e também às células A549 em maior quantidade do que quando comparamos com as esferas pré-tratadas com BSA. Com relação à HBHA, também encontramos uma grande quantidade de esferas associadas às células A549 em comparação com as esferas tratadas com BSA. Por outro lado, na célula RPMI não encontramos diferença entre a proteína HBHA e o BSA.

Para confirmar estas observações, a quantidade de microesferas associadas às células foi quantificada em um conjunto de 300 células. Como visto na Figura 23, quando comparamos a proteína Hlp com a proteína controle (BSA) observamos que 280 esferas incubadas com Hlp estavam associadas às células A549, enquanto que quando as esferas foram tratadas com BSA, apenas 120 estavam associadas às células. Com relação às células RPMI, quantificamos em torno de 394 esferas tratadas com Hlp e 113 após a incubação com BSA. Finalmente, quando comparamos a proteína HBHA com BSA observamos um aumento na associação das esferas com as células A549; 813 esferas encontravam-se aderidas às células quando estas foram incubadas com HBHA e apenas 248 esferas estavam aderidas às células após o tratamento destas com BSA (Figura 23B). Entretanto 336 esferas estavam associadas às células RPMI quando as esferas foram incubadas com BSA e 432 esferas foram observadas quando estas foram tratadas com HBHA. Apesar do aumento este resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P=0,175$ ).

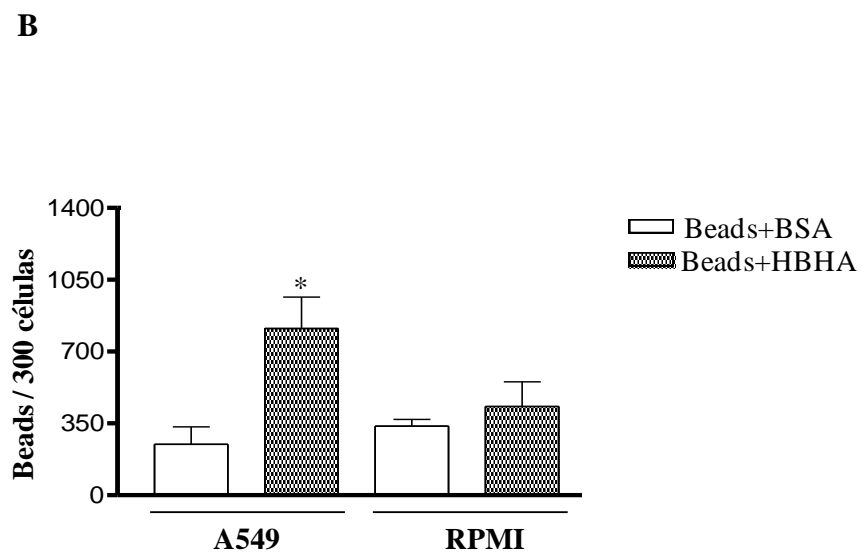
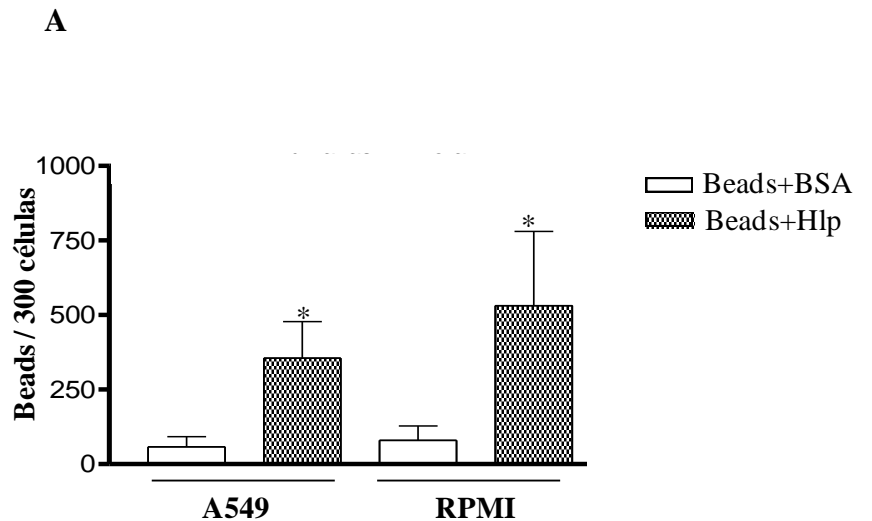
Quando comparamos a aderência das esferas incubadas com as proteínas HBHA e Hlp nas células alveolares observamos uma diferença entre a associação das esferas tratadas com a Hlp e as esferas tratadas com HBHA (Figura 24). O efeito da Hlp foi duas vezes maior do que a HBHA. Entretanto, quando as esferas foram pré-tratadas ao mesmo tempo com a HBHA e a Hlp não observamos efeito aditivo e os níveis de aderência foram similares aos obtidos apenas com a Hlp.

*Mycobacterium smegmatis* (MS) foi pré-tratado com a Hlp (MS+Hlp) e a HBHA (MS+HBHA) para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC) em células epiteliais, com o objetivo de confirmar os dados obtidos com as microesferas (Figura 26). Para verificar se as proteínas podem realmente se ligar na superfície de *M. smegmatis* foi feito em paralelo um ensaio de ELISA para detectar a presença de Hlp e HBHA de *M. leprae* na superfície de *M. smegmatis* após o tratamento com as proteínas (Figura 25). A Figura 25 mostra que tanto a Hlp quanto a HBHA de *M. leprae* são capazes de se ligar à superfície de *M. smegmatis*. Logo, após o tratamento das bactérias com as proteínas recombinantes de *M. leprae* estas foram usadas para infectar por 2 horas as células epiteliais a 37 °C. Como esperado, a quantidade de MS+Hlp associadas às células foi maior do que a de MS nas células A549, sendo que o mesmo ocorreu nas células RPMI (Figura 26). Ainda, *M. smegmatis* pré-tratado com HBHA também apresentou um aumento na adesão nas células A549. Entretanto, no contexto da célula RPMI a bactéria tratada com HBHA não exibiu níveis aumentados de aderência (Figura 26).

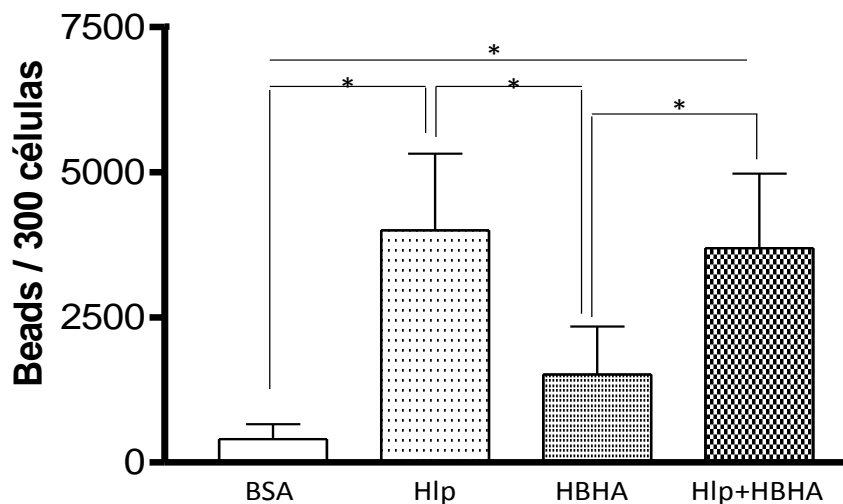




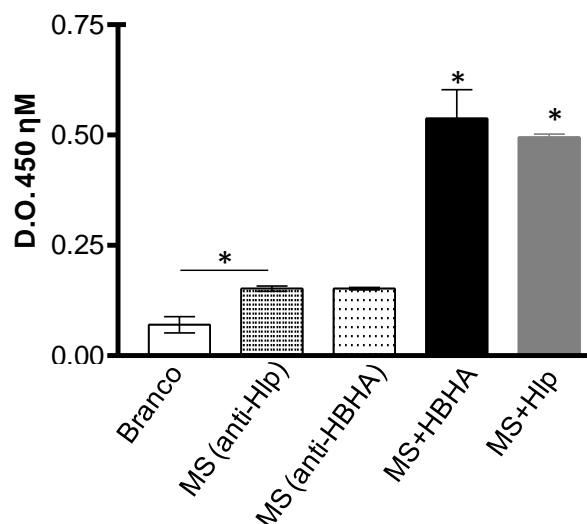
**Figura 22. Efeito das proteínas HBHA e Hlp recombinantes de *M. leprae* na interação de microesferas (*beads*) com células epiteliais alveolares (A549) e nasais (RPMI).** As microesferas foram pré-tratadas com as proteínas HBHA, Hlp e BSA (controle negativo). Em seguida, as células epiteliais foram incubadas com as microesferas por 1 hora a 37 °C e em seguida lavadas por seis vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% por 20 minutos a 4 °C. As imagens foram capturadas em microscópio invertido com fluorescência em um aumento de 400x. Para visualização das microesferas fluorescentes utilizou-se uma excitação de 580 nm e emissão de 605 nm. Imagem representativa de 5 experimentos independentes.



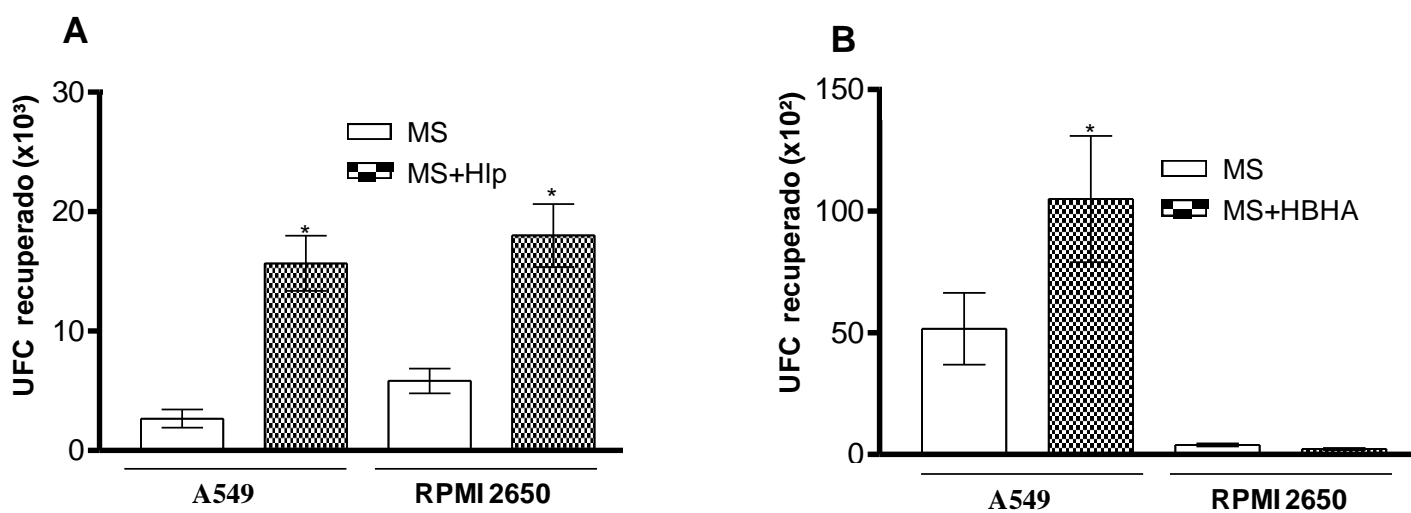
**Figura 23. Quantificação da interação de microesferas (*beads*) pré-tratadas com Hlp ou HBHA com células epiteliais.** As microesferas foram tratadas com as proteínas Hlp (Beads+Hlp) (A), HBHA (Beads+HBHA) (B), ou BSA (Beads+BSA) (controle negativo). Em seguida, as células epiteliais foram incubadas com as microesferas pré-tratadas por 1 hora a 37 °C e em seguida lavadas com PBS e fixadas. As imagens foram capturadas em microscópio invertido com fluorescência em um aumento de 400x. Para visualização das microesferas fluorescentes utilizou-se uma excitação de 580 nm e emissão de 605 nm. Resultado expresso como a média de 5 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



**Figura 24. A proteína Hlp interage mais com células A549 do que a HBHA.** As microesferas (beads) foram tratadas com as proteínas HBHA, Hlp ou BSA (controle negativo). Em seguida as células epiteliais foram incubadas com as microesferas pré-tratadas por 1 hora a 37 °C e então lavadas com PBS e fixadas. As imagens foram capturadas em microscópio invertido com fluorescência em um aumento de 400x. Para visualização das microesferas fluorescentes utilizou-se uma excitação de 580 nm e emissão de 605 nm. (A) Microesferas recobertas com Hlp. (B) Microesferas recobertas com HBHA. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \* $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



**Figura 25. A proteína HBHA e Hlp se ligam à superfície de *M. smegmatis*.** *M. smegmatis* (MS) foi pré-tratado com Hlp (MS+Hlp) ou HBHA (MS+HBHA) recombinante de *M. leprae* por 2 horas a 37°C. Em seguida, as bactérias foram lavadas com PBS e adsorvidas em placa de 96 poços Maxisorp (Nunc) a 4°C overnight para realizar ensaios de ELISA. Após bloqueio, os poços foram lavados e incubadas com anticorpo primário específico para Hlp ou HBHA. Os poços foram novamente lavados e incubados com anticorpo secundário. Em seguida os poços foram novamente lavados e posteriormente revelados com TMB. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. MS+HBHA foi comparado com MS (anti-HBHA) enquanto que MS+Hlp foi comparado com MS (anti-Hlp). MS (anti-HBHA) e MS (anti-Hlp) foram também comparados com o branco e tiveram diferença estatística.



**Figura 26. Efeito da proteína Hlp sobre a interação do *M. smegmatis* com as células epiteliais alveolares e nasais.** *M. smegmatis* (MS) foi pré-tratado com Hlp (MS+Hlp) (A) ou HBHA (MS+HBHA) (B) recombinante de *M. leprae* por 2 horas a 37 °C. Em seguida, as bactérias foram lavadas com PBS e utilizadas para infectar as monocamadas de células epiteliais por 2 horas a 37 °C. Após o tempo de infecção, as células foram lavadas e depois lisadas com 0,1% de Triton X-100. O número de bactérias internalizadas foi determinado através da contagem de UFC realizada em meio 7H11. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 9. As células epiteliais primárias nasais e alveolares respondem ativamente à infecção por *M. leprae*.

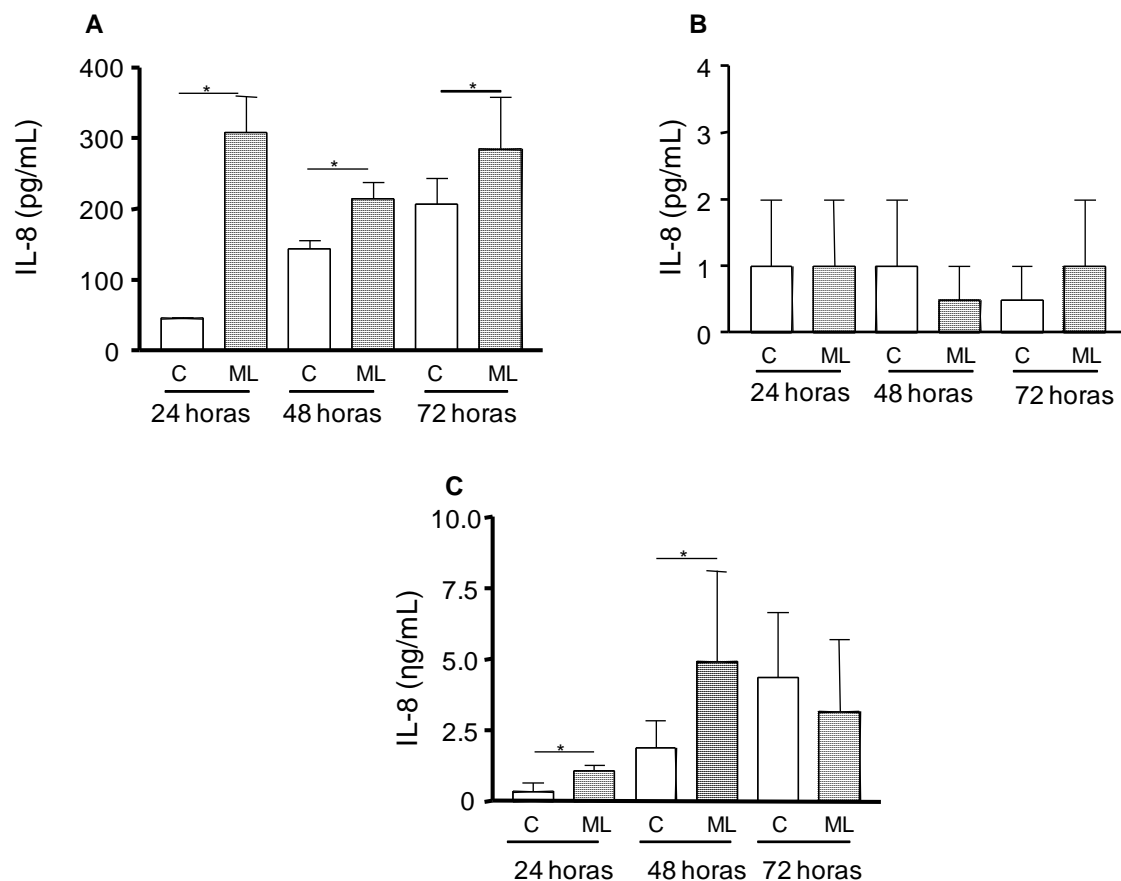
As células epiteliais participam de forma ativa na defesa contra vários patógenos. Estas células secretam várias moléculas capazes de eliminar microrganismos, como mucinas, espécies reativas de oxigênio e quimiocinas capazes de recrutar e ativar fagócitos no sítio da infecção. Logo, monocamadas de células epiteliais foram infectadas com *M. leprae* irradiado em diferentes intervalos de tempo com o objetivo de estudar se a bactéria induz a produção de quimiocinas em células epiteliais.

Como mostrado na Figura 27A, as células epiteliais alveolares da linhagem A549 mostraram um aumento na produção de IL-8 em resposta ao *M. leprae* em 24 horas de infecção, sendo que em 48 e também 72 horas ocorreu uma maior produção de IL-8. Também observamos um aumento na produção de MCP-1 nas células A549 após a infecção com *M. leprae* (Figura 28). Nas células epiteliais nasais, linhagem RPMI, o *M. leprae* não induziu a produção de IL-8 em nenhum dos intervalos de tempo testados (Figura 27B). Entretanto, o contrário ocorreu com as células epiteliais nasais primárias, pois em 24 horas é observada diferença estatisticamente significativa entre células infectadas e não infectadas (células não infectadas 150 pg/ml; células infectadas 1250 pg/ml;  $P=0,0001$ ) (Figura 27C). Ainda, em 48 horas o sobrenadante das células não estimuladas mostrou uma concentração em torno de 2,5 ng/ml, enquanto que no sobrenadante das células incubadas com *M. leprae* foi detectada uma concentração de 7,5 ng/ml ( $P=0,0002$ ). No entanto, em 72 horas não foi observado diferença nos níveis de secreção de IL-8.

Com relação às outras citocinas/quimiocinas, não foi observado diferença em relação ao controle (Figura 28). A citocina IL-8 é regulada pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), sendo a sua principal forma o heterodímero p65/p50 de 65 e 50 kDa, respectivamente (Mukaida *et al.*, 1993). Este fator está constitutivamente presente no citoplasma das células, podendo se deslocar para o núcleo após certos estímulos tais como: mitógenos, citocinas, vírus e bactérias. Portanto, indução da expressão de IL-8 por *M. leprae* pode ser regulada pelo fator de transcrição NF- $\kappa$ B. Para verificar se o *M. leprae* é capaz de promover o deslocamento de p65/p50 para o núcleo, extratos nucleares de células A549 infectadas ou não, foram obtidas para a determinação dos níveis de p65 por immunoblotting e ensaio imunoenzimático (ELISA) (Figuras 29 e 30, respectivamente).

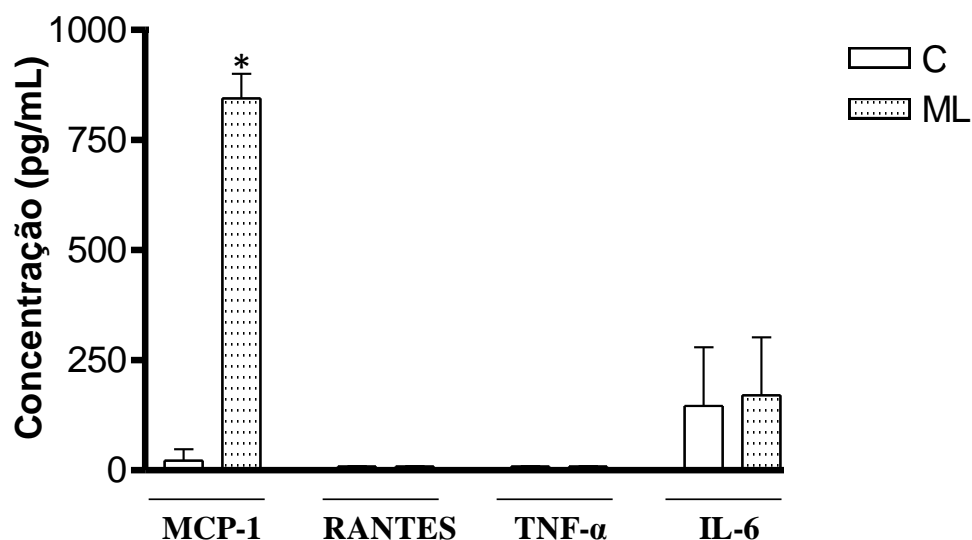
Como visto na Figura 29, *M. leprae* irradiado foi capaz de aumentar os níveis de p65 no núcleo, principalmente em 30 e 60 minutos após a infecção, com os níveis de p65 voltando ao normal após 2 horas. O mesmo ocorreu com *M. leprae* vivo, em que após 30 minutos de infecção observa-se um aumento nos níveis de NF- $\kappa$ B, sendo este aumento estatisticamente significativo em relação às células não infectadas. Entretanto, os níveis de p65 em 1 hora de infecção não apresentam diferença em relação ao controle ( $p=0,1$ ) (Figura 30). Com relação ao pólipó nasal os níveis de p65 no núcleo não foram determinados devido ao fato de que não dispomos de quantidade de células suficientes para realizar o ensaio. Por outro lado os níveis de p65 no núcleo da célula RPMI não foram quantificados por não termos tido nenhuma evidência de que essas células respondem ao *M. leprae*.

Concluindo, esses dados mostram que células epiteliais nasais primárias e alveolares são capazes de responder ativamente à infecção por *M. leprae*, sendo capazes, portanto, de contribuir na resposta imune contra o patógeno.

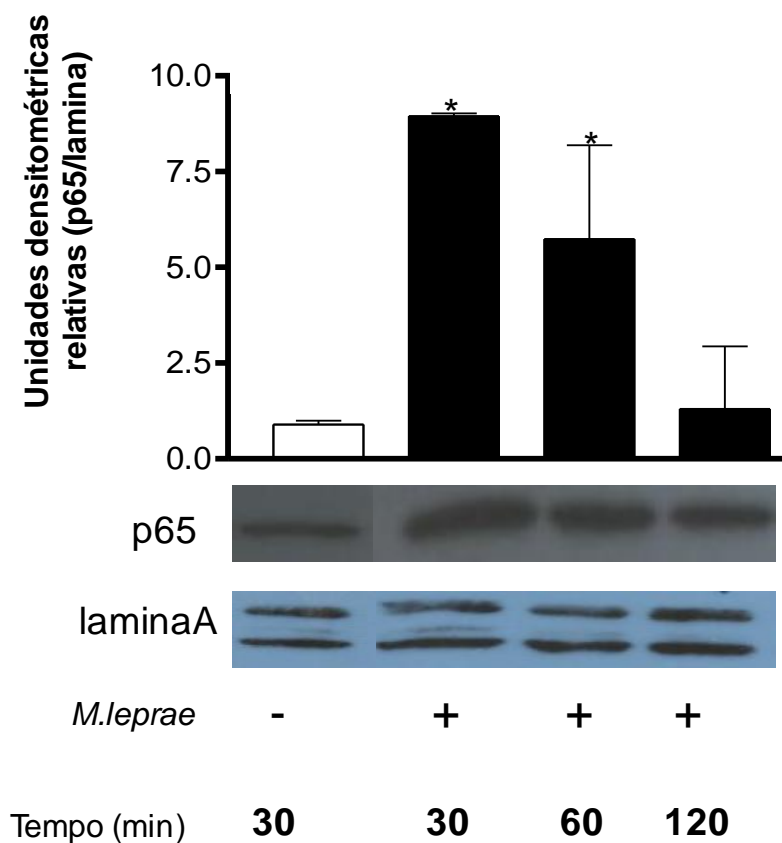


**Figura 27. *M. leprae* morto induz a expressão de IL-8 em células epiteliais primárias nasais e alveolares.** As células epiteliais foram incubadas com *M. leprae* morto por 24, 48 e 72 horas. Terminado o tempo de incubação o meio de cultivo foi recuperado e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos para remover restos celulares. Após este procedimento, o sobrenadante foi recuperado e os níveis de IL-8 quantificados por ELISA. (A) Célula A549. (B) Célula RPMI. (C) Células epiteliais nasais primárias. C: controle; ML: *M. leprae*. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

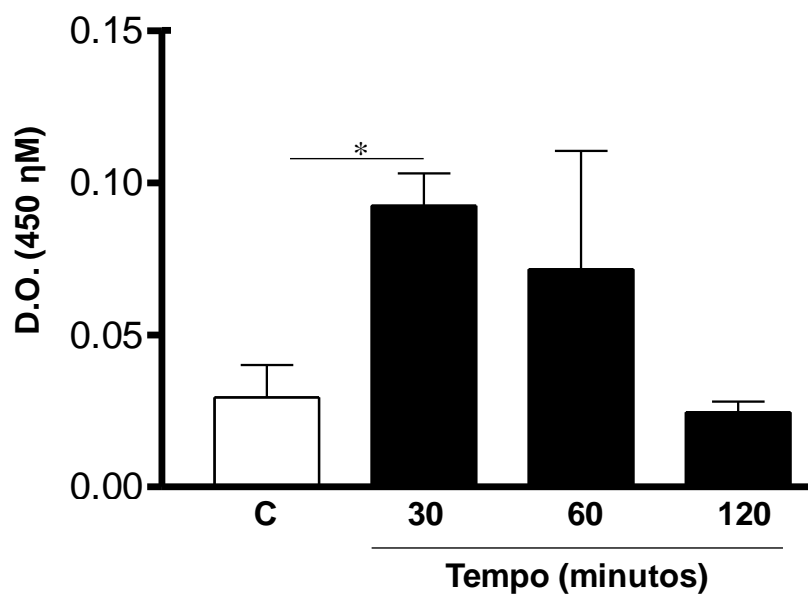




**Figura 28. *M. leprae* irradiado induz a expressão de MCP-1 em células epiteliais alveolares.** As células epiteliais foram incubadas com *M. leprae* irradiado por 24 h. Terminado o tempo de incubação o meio de cultivo foi recuperado e centrifugado a 14.000xg por 10 min para remover restos celulares. Após este procedimento, o sobrenadante foi recuperado e os níveis de MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e RANTES foram quantificados por ELISA. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



**Figura 29. *M. leprae* morto induz a translocação da subunidade p65 para o núcleo em células epiteliais alveolares.** Células alveolares foram tratadas com *M. leprae* morto em diferentes intervalos de tempo. O controle negativo consiste de células não tratadas. Após a infecção, extratos nucleares foram obtidos e utilizados para quantificação dos níveis de p65/p50 no núcleo. Para isso os extratos nucleares foram submetidos a SDS-PAGE e transferidos para uma membrana de nitrocelulose. A subunidade p65 de NF- $\kappa$ B foi revelada por quimioluminescência com o substrato ECL (Thermo Scientific) e normalizada pelos níveis de laminaA. As unidades densitométricas são unidades arbitrárias. Os dados representam a média dos valores  $\pm$  desvio padrão de três experimentos. \*  $P < 0,05$  são médias consideradas estatisticamente significativas.



**Figura 30. *M. leprae* vivo aumenta os níveis nucleares de p53 nas células epiteliais alveolares.** Células epiteliais alveolares foram tratadas com *M. leprae* vivo em diferentes intervalos de tempo. Após a infecção os extratos nucleares foram obtidos e os níveis de p53 foram determinados por ELISA. O controle negativo consistiu de células não tratadas. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes  $\pm$  desvio padrão. Cada experimento foi realizado em duplicata. \*  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Microrganismos patogênicos adotam várias estratégias para superar a barreira epitelial. Patógenos de mucosa são conhecidos por aderir, invadir e sobreviverem nas células epiteliais. O *M. avium*, por exemplo, é capaz de se multiplicar dentro de células epiteliais respiratórias e também gastrointestinais (Bermudez & Young, 1994; Mapother *et al.*, 1984).

Outro trabalho mostrou que a matriz extracelular é um dos principais componentes do hospedeiro utilizado por essa micobactéria para colonização do pulmão, ocasionando episódios inflamatórios nos brônquios dos indivíduos infectados (Middleton *et al.*, 2000). Esse mesmo estudo também mostrou que a bactéria é capaz de aderir diretamente às células epiteliais brônquicas. *M. tuberculosis* também é capaz de interagir com o epitélio brônquico e também com o epitélio alveolar (Bermudez & Goodman, 1996), sendo capaz de invadir e se multiplicar nestas células. As células epiteliais, portanto, constituem um importante ambiente para as micobactérias sobreviverem. No entanto raros são os estudos sobre a interação entre o *M.leprae* e as células epiteliais.

Acredita-se que o *M.leprae* utilize o epitélio nasal para colonizar e subsequentemente invadir o hospedeiro, visto que pode ser encontrado DNA do bacilo em *swab* nasal de contatos (Witt *et al.*, 1993 ). No entanto, a hanseníase é uma doença silenciosa e o fato de encontrarmos DNA de *M.leprae* na mucosa nasal de contatos não significa necessariamente que o *M.leprae* está aderindo no epitélio nasal para posteriormente invadir o hospedeiro, mas sim que este contato pode já estar infectado e a presença da bactéria na mucosa nasal seria apenas uma consequência da disseminação do bacilo pelo corpo. Logo, o *M.leprae* poderia utilizar outra via para invadir o hospedeiro.

Em um minucioso trabalho realizado por Rees e McDougall em 1977, camundongos foram expostos a aerossóis contendo *M.leprae* advindo de biópsias de pacientes com hanseníase lepromatosa não tratada (Rees & McDougall, 1977). Após a infecção, um grupo de camundongos foi imediatamente sacrificado e os pulmões e o nariz foram homogeneizados para contagem de bacilos álcool-ácido resistentes. Curiosamente, não foram encontrados bacilos álcool-ácidos resistentes no homogenato

de nariz. Entretanto nos pulmões obteve-se uma contagem relativamente alta ( $1,1 \times 10^5$ ) de bacilos. Apenas após 20 meses de infecção foi possível encontrar bacilos álcool-ácido resistente no homogenato de nariz, enquanto que poucos camundongos contendo *M.leprae* no pulmão foram encontrados nos tempos mais tardios de infecção. Entretanto, os autores não investigaram quais tipos celulares estavam infectados pela micobactéria.

Baseado nesses dados, portanto, os autores consideraram os pulmões como a principal porta de entrada do *M. leprae* após sua inalação pelas vias aéreas. Entretanto, esses dados não excluem ainda a possibilidade do *M.leprae* entrar no hospedeiro via epitélio nasal, visto que a bactéria tem a capacidade de aderir à este epitélio (Byrd *et al.*, 1993; Sethna *et al.*, 1997). Apesar disso, não foram realizados estudos que mostrem que *M.leprae* é capaz de entrar no epitélio nasal ou o alveolar. Além disso, comparar a interação do *M.leprae* entre as células epiteliais nasais e alveolares pode fornecer informações interessantes acerca dos eventos iniciais que ocorrem durante a interação entre o patógeno e o hospedeiro. Logo, o nosso estudo teve como objetivo estudar a interação de *M.leprae* com as células epiteliais pulmonares e nasais.

Nossos resultados mostraram que *M. leprae* tem a capacidade de aderir e entrar em linhagens celulares humanas epiteliais nasais e alveolares, entretanto a célula alveolar (A549) se mostrou mais suscetível à infecção. A baixa interação observada entre a bactéria e as células da linhagem RPMI 2650 também se repetiu no contexto do epitélio nasal primário, reforçando, portanto a hipótese previamente levantada de que os pulmões seriam a principal porta de entrada para *M.leprae* e que a interação da bactéria com a mucosa nasal seria um evento que ocorre apenas após a infecção ter sido estabelecida.

Nossos dados com camundongo também reforçam esses achados, visto que não foi possível encontrar *M.leprae* na mucosa nasal mesmo em tempos precoces de infecção. Ainda, nossos resultados com camundongos reforçam a importância do epitélio pulmonar na invasão do hospedeiro pela micobactéria. Entretanto, como mostrado nos dados *in vitro*, a quantidade de bactérias que interage com o epitélio nasal é muito baixa e, portanto seria difícil encontrar bacilos álcool-ácido resistentes no epitélio nasal dos camundongos. Além disso, *M.leprae* poderia interagir com o epitélio brônquico para invadir o ser humano, visto que um trabalho do nosso grupo mostrou

que o patógeno interage com células epiteliais brônquicas da linhagem 16HBE, provavelmente através de sua ligação a heparina/heparan sulfato (De Lima *et al.*, 2009). Sendo assim, podemos sugerir que *M. leprae* utilizaria pelo menos duas prováveis rotas de entrada: (1) epitélio nasal no qual uma pequena quantidade de bacilos serão retidos e (2) o epitélio pulmonar o qual possivelmente apresenta a maior carga bacteriana. Ainda com relação às portas de entrada, constatamos que *M. leprae* pode residir e sobreviver dentro de vacúolos nas células epiteliais.

A diferença entre o número de bactérias que interagem com células epiteliais nasais e alveolares pode ser parcialmente explicada pelo fato da HBHA não interagir com as células epiteliais nasais, enquanto que no contexto da célula A549 a HBHA foi capaz de aumentar a aderência de *beads* recobertas com essa proteína. Por outro lado, a proteína Hlp aumentou a aderência das microesferas tanto nas células A549 quanto nas células RPMI, e desta forma a maior afinidade do *M. leprae* pela célula alveolar não parece ser devido a uma maior afinidade da Hlp pela célula A549.

Ademais, a diferença não parece também ser devido a uma maior atividade fagocítica da célula A549 visto que a capacidade fagocítica da célula RPMI se mostrou semelhante ao da célula A549. A proteína Hlp é capaz de se ligar a várias moléculas que compõem a matriz extracelular Além de se ligar a heparan sulfato e heparina, a Hlp também é capaz de se ligar à laminina-2, ácido hialurônico e a vários tipos de colágeno (Melo Marques *et al.*, 2000, Aoki *et al.*, 2004, Dias *et al.*, 2012). Por sua vez, a HBHA interage apenas com heparan sulfato e heparina (Menozzi *et al.*, 1996). Isso também pode explicar o porquê da Hlp possuir uma capacidade de interagir com as células epiteliais, visto que muito dessas moléculas também são expressas na membrana celular. Concluindo, podemos sugerir que um dos motivos para *M. leprae* possuir uma maior afinidade pela célula A549 reside no fato da HBHA não ser capaz de interagir com a célula RPMI.

Com relação ao processo de entrada, não encontramos diferença entre o *M. leprae* vivo e morto, sugerindo que apenas as moléculas da superfície bacteriana seriam suficientes para induzir a internalização. Trabalhos anteriores mostraram que a invasão de *M. tuberculosis* em células epiteliais é dependente da viabilidade bacteriana (Sharma *et al.*, 2007; García-Pérez *et al.*, 2003), assim como ocorre para *M. avium* (Mapother & Songer, 1984), sugerindo que fatores secretados pelas duas micobactérias

podem disparar a endocitose. Com relação ao *M.leprae*, pode-se concluir que esta bactéria não necessita secretar moléculas para induzir a endocitose.

O processo de endocitose requer a participação do citoesqueleto celular. Alguns patógenos tais como a *Salmonella* são extremamente dependentes dos filamentos de actina para atingir o ambiente intracelular, não sendo dependente de microtúbulos (Finlay & Falkow, 1988). Outros, como o fungo *Aspergillus fumigatus* também é dependente de microtúbulo (Wasylnka & Moore, 2002). Algumas cepas de *Campylobacter jejuni*, causador de gastroenterite, tem a sua invasão inibida apenas por citocalasina D, enquanto que outras cepas tem a sua invasão inibida apenas por colchicina, inibidor de microtúbulos. Nossos dados mostram que o *M.leprae* possui sua invasão inibida por citocalasina e também por colchicina, sugerindo que este microrganismo pode invadir a célula epitelial por dois mecanismos distintos.

Nossos dados ainda sugerem que *M.leprae* pode residir nas células epiteliais por até 10 dias em cultivo *in vitro*. Entretanto não existem evidências que mostrem *M. leprae* em pulmões de pacientes com hanseníase o que pode ser explicado pelo fato da bactéria não ser capaz de sobreviver por muito tempo a 37°C (Lahiri<sup>b</sup>) *et al.*, 2005), temperatura encontrada nos pulmões. Nossos dados mostram que o bacilo consegue sobreviver a 37 °C por até quatro dias dentro das células epiteliais. No entanto, a viabilidade cai rapidamente quando *M. leprae* se encontra no ambiente extracelular. Desta forma, é plausível sugerir que quando *M.leprae* atingisse os pulmões, a bactéria sofreria uma enorme queda em sua viabilidade e, necessitaria migrar rapidamente para as partes mais frias do corpo para sobreviver, visto que na temperatura de 33°C o patógeno consegue sobreviver por até 10 dias *in vitro* no ambiente intracelular.

Os dados de proteoma obtidos no nosso estudo indicam que a superfície de *M. leprae* possui várias proteínas na superfície capazes de mediar a adesão da bactéria às células hospedeiras. Estudos prévios de nosso laboratório identificaram 104 proteínas localizadas na fração de parede celular (Marques *et al.*, 2008). Entretanto, a localização de uma proteína na fração de parede não necessariamente significa que a mesma está exposta, apontando a necessidade de se realizar um estudo focando nas proteínas de superfície, importante para compreender a interação entre *M. leprae* e ser humano. No presente trabalho, o objetivo foi descobrir a identidade das possíveis adesinas presentes na superfície de *M.leprae*. Para atingir este objetivo, *M.leprae* vivo, com viabilidade em

torno de 90%, foi incubado com Sulfo-NHS-LC-Biotina. Essa biotina não é capaz de atravessar a parede celular ou mesmo membrana, resultando em marcação seletiva das proteínas de superfície em células eucarióticas e procarióticas (Garcia *et al.*, 2009; Hempel *et al.*, 2010; Chhatwal 2002). Além disso, estudo anterior confirmou a biotinação seletiva das proteínas de superfície em *M. avium* utilizando a mesma metodologia (McNamara *et al.*, 2012).

Como foi explicado na introdução, *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro* até os dias atuais, sendo necessário o uso de animais para o crescimento dessa bactéria. No presente trabalho, utilizamos *M. leprae* cultivado na pata de camundongo atímico nude, capaz de produzir bilhões de bacilos viáveis. No entanto, o *M. leprae* isolado da pata de camundongo nude possui uma grande quantidade de tecidos contaminantes do animal (Lahiri<sup>a</sup>) *et al.*, 2005). Tais contaminações são problemáticas para diversos estudos, inclusive estudos de interação patógeno-hospedeiro. Ainda, essa contaminação pode também ser um obstáculo ao processo de biotinação, visto que as proteínas menos abundantes podem não ser biotiniladas devido à alta concentração de contaminantes. Para solucionar este problema, Lahiri e colaboradores incubaram a bactéria com hidróxido de sódio para remoção dos contaminantes. Ainda é importante mencionar que este tratamento não reduz a viabilidade bacteriana (Lahiri<sup>a</sup>) *et al.*, 2005).

Nossos dados mostraram diferenças no perfil protéico entre a bactéria tratada e a bactéria não tratada com hidróxido de sódio. No caso das proteínas encontradas apenas em bactérias tratadas os resultados indicam que essas proteínas apesar de estarem presentes na superfície são, possivelmente, menos abundantes. Ademais, as proteínas encontradas apenas na bactéria não tratada podem ser provenientes de bactérias que sofreram lise celular visto que o tratamento com NaOH remove uma grande quantidade de proteínas envolvidas com o metabolismo intermediário e respiração. Além disso, ocorre um enriquecimento de proteínas localizadas na parede celular após a incubação com NaOH. Estes dados sugerem, portanto que o tratamento com NaOH remove as proteínas advindas de bactérias mortas e conseqüentemente facilita a biotinação das proteínas que estão expostas mas são menos abundantes.

Nossos dados de proteômica ainda identificaram duas proteínas novas na superfície de *M. leprae*. Análise de *blast* mostraram domínios conservados em ambas proteínas mas que aparentemente não possuem qualquer ligação com propriedades



adesivas ou mesmo invasivas. A proteína ML2276c possui domínios conservados com proteínas da família geranyl redutases, importante para atividade fotossintética de várias plantas. A proteína ML2309 por sua vez possui domínios conservados com proteínas da família das metalo-fosfatases e também de fosfoesterase e fosfohidrolase. Portanto, o alinhamento leva a crer que essas proteínas são possivelmente enzimas que não possuem nenhuma relação com adesinas, entretanto estudos mais aprofundados serão necessários para conhecer a função dessas proteínas.

Além disso, a Tabela 5 mostra algumas proteínas que possuem potencial papel na adesão e/ou invasão de células epiteliais. A Mce 1A recombinante de *M. tuberculosis* promove a invasão de *E. coli* em células epiteliais quando esta bactéria expressa esta proteína em sua superfície (Casali *et al.*, 2002). Estudos anteriores, utilizando Mce1A de *M. leprae*, mostraram que essa proteína aumenta a interação de microesferas de poliestireno com células epiteliais nasais e brônquicas, mas não em queratinócitos da derme, reforçando a idéia de que a proteína Mce1A medeia a entrada de *M. leprae* em células epiteliais respiratórias (Sato *et al.*, 2007). Ainda, as proteínas do complexo mce nunca foram identificadas na parede de *M. leprae*, apesar de terem sido encontradas na parede de *M. tuberculosis* (Chitale *et al.*, 2001). Estudos prévios mostraram ainda que esse complexo é expresso em pacientes lepromatosos (Santhosh *et al.*, 2005). Portanto, a identificação de Mce1A na parede de *M. leprae* reforça a idéia de que o complexo mce participe da interação entre *M. leprae* e as células epiteliais nasais. Além disso, é possível que este complexo seja importante na interação entre *M. leprae* e o epitélio alveolar.

A proteína malato sintase, como mencionado anteriormente, também foi encontrada na superfície de *M. leprae*. *M. smegmatis* que expressa malato sintase de *M. tuberculosis* tem sua aderência em células epiteliais alveolares aumentada, sendo encontrada em filtrados de cultura de *M. tuberculosis* (Laal *et al.*, 1997; Samanich *et al.*, 2001). Esta proteína possui 82% de identidade com a sua correspondente em *M. leprae*, sugerindo que possa realmente ter um papel na interação entre *M. leprae* e as células epiteliais. Ainda, este achado reforça a idéia de que várias enzimas localizadas na superfície de bactérias possam ter um papel na adesão e também na invasão do patógeno. Outro achado foi a confirmação da proteína Ag85B na superfície de *M. leprae*. Essa proteína é encontrada também em soro de pacientes com tuberculose complexada à fibronectina (Abou-Zeid *et al.*, 1988; Godfrey *et al.*, 1992). Estudo prévio

com células epiteliais nasais da linhagem RPMI2650 mostrou que o pré-tratamento de *M. leprae* com fibronectina aumenta a aderência da bactéria à célula (Byrd *et al.*, 1993). Nesse mesmo estudo, cadeias de integrina  $\beta$ -1 estão também envolvidas com a ligação de *M. leprae* às células epiteliais nasais (Byrd *et al.*, 1993).

Finalmente observamos uma quantidade considerável de chaperonas na superfície, tais como a HSP 70. A proteína HSP 70 de *H. pylori* tem como receptor as moléculas de sulfatídeos, enquanto que a Hsp 60 de *S. enterica* interage com o muco (Huesca *et al.*, 1998; Engraber & Loos, 1992). A Hsp70 de EPEC se liga a uma molécula de sulfogalactosilceramida (De Jesus *et al.*, 2005). Nesse estudo foi mostrado que quando a bactéria é submetida a um ambiente no qual o pH é baixo ocorre o aumento da adesão da bactéria à célula Hep-2. Ainda nesse estudo foi visto que a acidez aumenta a expressão de Hsp70. Por fim os autores mostraram que o anticorpo anti-Hsp70 inibe o aumento da adesão provocado pela queda no pH.

Algumas chaperonas tais como a DnaK possuem a capacidade de interagir com o plasminogênio humano. Ainda foi encontrado na superfície de *M. leprae* uma provável enolase, metalo enzimas capazes de se ligar ao plasminogênio e convertê-lo em plasmina. Posteriormente, este é convertido em plasmina a qual tem a capacidade de degradar a matriz extracelular alcançando desta forma o epitélio. O *M. tuberculosis* também é capaz de ligar e ativar o plasminogênio (Monroy *et al.*, 2000). Além da enolase nossos dados mostram que *M. leprae* possui outras proteínas capazes de se ligar ao plasminogênio tais como: DnaK e Ag85B (Xolalpa *et al.*, 2007). Juntamente com os nossos dados de proteoma isto sugere que *M. leprae* tem a capacidade de se ligar ao plasminogênio, podendo utilizá-lo para se disseminar pelo hospedeiro.

Levando em consideração que o epitélio nasal e o alveolar são as portas de entrada para *M. leprae*, é plausível sugerir que esses locais sejam os sítios primários de resposta ao patógeno, através da produção de quimiocinas por parte de algumas células, incluindo as células epiteliais. As quimiocinas são capazes de controlar a migração dos tipos celulares existentes para o local da infecção.

As células epiteliais humanas são consideradas importantes fontes de quimiocinas, podendo guiar as respostas inflamatórias em locais como os pulmões, a mucosa nasal e a região intestinal. Trabalhos mostram que o epitélio nasal primário é capaz de produzir RANTES após estimulação com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Altman *et al.*,

1997). Além disso, resultados com células epiteliais nasais primárias advindas de pacientes com polipose nasal mostraram que o meio condicionado dessas culturas possui uma alta concentração de IL-8 (em torno de 31 ng/ml) e uma pequena produção de RANTES (11.06 pg/ml) (Shin *et al.*, 2003). Ainda, outras quimiocinas tais como IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 também são expressos em células epiteliais (Mullou *et al.*, 1995; Comer *et al.*, 2012; McDougall *et al.*, 2008).

Com relação ao epitélio alveolar, estudos mostram que as células A549 também são capazes de produzir IL-8, MCP-1, IL-6, RANTES e TNF- $\alpha$  em respostas à infecção (Borger *et al.*, 1999; Rao *et al.*, 2000; Levitz *et al.*, 2012). Para nesse estudo, testar se as células epiteliais são capazes de responder à infecção com *M.leprae*, quantificamos a concentração das quimiocinas/citocinas citadas por ELISA. As células A549 produziram IL-8 e MCP-1 em resposta ao *M.leprae*. Entretanto não foi detectada indução da produção de outros fatores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$  e RANTES. O pólipso nasal, por outro lado, apresentou um grande aumento na produção de IL-8, mas não de MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e RANTES (dados não mostrados) em resposta à *M. leprae*.

Curiosamente, na célula RPMI não foi detectada diferença nos níveis de IL-8 após infecção com *M.leprae*, e os seus níveis encontravam-se muito baixos. Esses dados podem ser explicados pelo fato do epitélio primário vir de um ambiente onde o contato com diversos microrganismos é frequente, enquanto que a linhagem RPMI encontra-se durante muito tempo em um ambiente estéril, sugerindo que o epitélio nasal necessita ser pré-estimulado para responder a *M.leprae*. Entretanto mais estudos serão necessários para testar essa hipótese. Outra possível explicação seria que as células epiteliais primárias apresenta uma atividade inflamatória mais intensa (Mullou *et al.*, 1995). Nesse estudo os autores mostraram que as células epiteliais nasais advindo de pacientes com polipose apresentam um nível aumentado de IL-8 e GM-CSF quando comparado com células epiteliais nasais normais.

Este é o primeiro estudo mostrando que células epiteliais nasais e alveolares produzem IL-8 após infecção com *M.leprae*. Além disso, também mostramos que as células A549 produzem MCP-1 em resposta à micobactéria. Estudos prévios mostraram que monócitos de pacientes lepromatosos apresentam uma alta expressão espontânea de IL-8, mas não de TNF- $\alpha$  (Hasan *et al.*, 2004), sugerindo que a IL-8 pode ter um papel crucial no recrutamento de leucócitos em pacientes lepromatosos, Apesar

disso, é observada uma grande quantidade de monócitos e neutrófilos nos locais de infecção, indicando que quimioatraentes de leucócitos estão realmente envolvidos no recrutamento celular tanto nas fases iniciais quanto nas fases crônicas da infecção (Hasan *et al.*, 2004).

Estudos com *M. tuberculosis* sugerem que as células epiteliais alveolares podem ser uma importante fonte de IL-8 e também MCP-1 (Wickremasinghe *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1998). Logo, podemos sugerir que as células epiteliais alveolares e nasais podem desempenhar um papel importante no recrutamento de células de defesa em pacientes com hanseníase. As quimiocinas são importantes na formação de granuloma durante a infecção por *M. tuberculosis*. Estudos envolvendo lavados bronco-alveolares de pacientes com tuberculose ativa mostraram um aumento na concentração de algumas quimiocinas tais como RANTES, MCP-1, IFN $\gamma$  e IL-8, entretanto, ainda não é possível sugerir funções específicas para cada quimiocina na formação do granuloma (Saunders & Cooper, 2000). Portanto os nossos dados indicam que durante o processo de estabelecimento da infecção do *M.leprae* as células epiteliais podem exercer um papel na contenção da infecção através do recrutamento dos leucócitos para o local da infecção.

Com relação ao epitélio alveolar, especificamente, podemos sugerir que esta região possa agir como um filtro no processo de disseminação do *M.leprae*, pois além da temperatura desfavorável para a sua sobrevivência é bem provável que o epitélio recrute macrófagos alveolares para combater a infecção visto que IL-8 e MCP-1 são induzidas após a infecção por *M.leprae*. Estudo realizado por McDermott-Lancaster e McDougall (1990) mostrou que após a inoculação de *M. leprae*, via traquéia, em camundongos normais e nude, foi possível recuperar bacilos álcool-ácidos resistentes pelo menos em 75 dias após a inoculação (McDermott-Lancaster & McDougall, 1990). Ainda, não foi observado sinais de disseminação mesmo em tempos tardios. Esses resultados indicam que a infecção pode ser contida no pulmão, sendo essa contenção em parte resultado do recrutamento de monócitos pelo epitélio alveolar. Entretanto, mais estudos serão necessários para elucidar estas questões. Desta forma, sugerimos que os epitélios alveolares e nasais possam ser importantes na defesa do hospedeiro durante o estabelecimento da infecção pelo *M.leprae*.

Por fim, foi mostrado que o *M.leprae* aumenta os níveis de p65 no núcleo do epitélio alveolar, por blotting e ELISA. Em 30 minutos de infecção os níveis de p65 aumentam em mais de 3 vezes, tanto com *M.leprae* vivo quanto com o morto, sugerindo que moléculas da superfície bacteriana são responsáveis pela ativação do heterodímero. O *M.leprae* irradiado mantém a estrutura de sua parede celular, preservando desta forma a antigenicidade do bacilo (Adams *et al.*, 2000). Os resultados com a bactéria viva reforçam, portanto, o uso de *M. leprae* morto como uma ferramenta confiável para a investigação da resposta imune da célula hospedeira contra o patógeno. Estudos mostram que a ativação de NF- $\kappa$ B por IL-1 $\beta$  advindo de macrófagos induz a expressão de IL-8 nas células A549. Entretanto, não foi investigado se a produção de IL-8 devido à infecção por *M. tuberculosis* é também dependente de NF- $\kappa$ B (Wickremasinghe *et al.*, 1999). Logo, estudos futuros serão necessários para relacionar a ativação de NF-  $\kappa$ B com a produção de IL-8 e /ou MCP-1 nas células epiteliais. Além disso, outras vias de sinalização terão de ser investigadas para uma melhor compreensão das bases moleculares da interação entre o *M.leprae* e as células epiteliais.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permite emitir as seguintes conclusões:

1) *M. leprae* é capaz de aderir e infectar linhagens humanas de células epiteliais tanto nasais como alveolares *in vitro*. Contudo, a linhagem de células epiteliais alveolares se mostrou muito mais susceptível à infecção bacteriana, do que a proveniente de mucosa nasal;

2) Após 24 horas de infecção, a maior parte das bactérias intracelulares é encontrada residindo dentro de vacúolos no citoplasma das células epiteliais;

3) A viabilidade de *M. leprae* não interfere com o processo de internalização do bacilo nas células epiteliais, indicando que a internalização de *M. leprae* nestas células depende de moléculas pré-existentes na sua superfície sendo um processo passivo;

4) Células epiteliais humanas isoladas de pólipos nasais são igualmente susceptíveis à infecção por *M. leprae*;

5) Experimentos *in vivo* utilizando modelo de camundongo, mostraram que o tecido pulmonar, incluindo células epiteliais e macrófagos, é susceptível à infecção bacteriana após inoculação intranasal de *M. leprae*;

6) A internalização de *M. leprae* nas células epiteliais respiratórias é um processo dependente do citoesqueleto celular com a participação de microtúbulos e microfilamentos;

7) Ensaios de infecção com até 10 dias de duração indicam que o ambiente intracelular das células epiteliais respiratórias favorece a sobrevivência bacteriana;

8) O proteoma de superfície de *M. leprae* contém pelo menos 279 proteínas identificadas, sendo a maioria funcionalmente classificada como de metabolismo intermediário e respiração, sugerindo que o envelope celular é um local ativo, envolvido em distintos processos metabólicos e celulares. Também, diversas proteínas previamente descritas como potencias adesinas, incluindo as proteínas HBHA e Hlp, fazem parte do proteoma de superfície de *M. leprae*;

9) Ensaios *in vitro* com as formas recombinantes das proteínas Hlp e HBHA de *M. leprae* indicam que estas proteínas são capazes de mediar a ligação de micobactérias a células epiteliais respiratórias, podendo atuar como adesinas neste contexto;

10) As células epiteliais nasais primárias e a linhagem alveolar A549 produzirem níveis aumentados de IL-8 em resposta à infecção por *M. leprae*;

11) *M. leprae* é capaz de induzir a translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB em células epiteliais alveolares A549;

Concluindo, nossos dados reforçam a ideia de que a interação de *M. leprae* com as células epiteliais das vias respiratórias representam um evento inicial importante no curso natural da infecção no ser humano. Assim, uma compreensão detalhada dos mecanismos envolvidos nesta interação pode contribuir no desenvolvimento de novas estratégias de controle da hanseníase e outras micobacterioses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedsen J, Rook GA. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1988; 56: 3046–3051.

Achtman M, Neibert M, Crowe BA, Strittmatter W, Kusecek B, Weyse E, Walsh MJ, Slawig B, Morelli G, Moll A, Blake M. Purification and characterization of eight class 5 outer membrane protein variants from a clone of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J Exp Med* 1988; 168:507–525.

Adams LB, Soileau NA, Battista JR, Krahenbuhl JL. Inhibition of metabolism and growth of *Mycobacterium leprae* by gamma irradiation. *Int J Lepr Mycobact Dis* 2000; 68:1–10.

Altman GB, Altman LC, Luchtel DL, Jabbour AJ, Baker C. Release of RANTES from nasal and bronchial epithelial cells. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13(3):205-213.

Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domenech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, Kobayashi K. Extracellular mycobacterial-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem* 2004; 279:39798-39806.

Barel M, Hovanessian AG, Meibom K, Briand JP, Dupuis M, Charbit A. A novel receptor - ligand pathway for entry of *Francisella tularensis* in monocyte-like THP-1 cells: interaction between surface nucleolin and bacterial elongation factor Tu. *BMC Microbiol* 2008; 8.

Barnes PJ, Chung KF, Page CP. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 1998; 50:515-596.



Belisle JT, Vissa VD, Sievert T, Takayama K, Brennan PJ and Besra GS. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* 1997; 276:1420–1422.

Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* Invades and Replicates within Type II Alveolar Cells. *Infect and Immun* 1996; 64:1400–1406.

Bermudez LE, Sangari FJ. Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria by host cells. *Microbes and Infection* 2001; 3(1):37–42.

Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P., Petrofsky M., Goodman J. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 2002; 70(1):140–146.

Bermudez LE, Young LS. Factors affecting invasion of HT-29 and HEp-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun* 1994; 62(5):2021-2026.

Bliska JB, Galan JE, Falkow S. Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell* 1993; 73:903–920.

Borger P, Koëter GH, Timmerman JA, Vellenga E, Tomee JF, Kauffman HF. Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce interleukin (IL)-6 and IL-8 production in airway epithelial cell lines by transcriptional mechanisms. *J Infect Dis* 1999; 180(4):1267-1274.

Brasil. Ministério da Saúde. Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro: DNDS/NUTES, 1989.

Breeze RG, Wheeldon EB. The cells of the pulmonary airways. *Am Rev Respir Dis* 1977; 116(4):705-777.

Brennan, PJ. *Mycobacterium leprae*-the outer lipoidal surface. *J Biosci* 1984; 6:685–689.

Brennan, PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2003; 83: 91-97.

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

Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; 363:1209—1219.

Bunge MB, Bunge RP. Linkage between Schwann cell extracellular matrix production and ensheathment function. *Annal NY Acad Sci* 1996; 486:241–247.

Byrd SR, Gelber R, Bermudez LE. Roles of soluble fibronectin e  $\beta$ -1 integrin receptors in the binding of *Mycobacterium leprae* to nasal epithelial cells. *Clinic Immunol Immunopathol* 1993; 69(3):266-271.

Casali N, Konieczny M, Schmidt MA, Riley LW. Invasion activity of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by the *Escherichia coli* AIDA autotransporter. *Infect Immun* 2002; 70:6846—6852.

Chan J, Fujiwara T, Brennan P, McNeil M, Turco SJ, Sibille JC, Snapper M, Aisen P, Bloom BR. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2453–2457.

Chevillard M, Hinnrasky J, Zahm JM, Plotkowski MC, Puchelle E. Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture. *Cell. Tiss. Res.* 1991; 264:49-55.

Chhatwal GS. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol* 2002; 10:205–208.

Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, Lu S, Cohen-Gould L, Riley LW. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol* 2001; 3:247–254.

Choi AM, Jacoby DB. *Influenza* virus A infection induces interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *FEBS Lett* 1992; 14:327-329.

Clement S, Vaudaux P, Francois P, Schrenzel J, Huggler E, Kampf S, Chaponnier C, Lew D, Lacroix JS. Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* 2005; 192(6):1023-1028.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, 393:537-544 .

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T,

Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajeream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; 409(6823):1007-1011.

Colston MJ & Hilson GRF. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature* 1976; 262: 399 – 401.

Comer DM, Elborn JS, Ennis M. Comparison of nasal and bronchial epithelial cells obtained from patients with COPD. *PLoS One* 2012;7(3):e32924.

Conover MS, Sloan GP, Love CF, Sukumar N, Deora R. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol.* 2010;77(6):1439-1455.

Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 1987; 105:1473-1478.

Cox JS, McNeil M, Jacobs WR Jr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999; 402: 79–83.

Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glicobiol* 2001; 11(9):107R-118R.

Cunha C S, Griffiths NJ, Murillo I, Virji M. *Neisseria meningitidis* Opc invasin binds to the cytoskeletal protein alpha-actinin. *Cell Microbiol.* 2009;11(3):389-405.

**Deibel, C., Kramer, S., Chakraborty, T., and Ebel, F. (1998). EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. Mol Microbiol 28: 463–474.**

Daffe M, Draper P. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microbiol Physiol* 1998; 39:131-203.

Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB. Elongation factor Tu and E1  $\beta$  subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microb* 2002; 46(4):1041–1051.

Davey TF and Rees RJ. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr. Rev* 1974; 45:121–134.

de Jesus MC, Urban AA, Marasigan ME, Barnett Foster DE. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *J Infect Dis* 2005; 192(8):1430-1440.

de Lima CS, Marques MA, Debie AS, Almeida EC, Silva CA, Brennan PJ, Sarno EN, Menozzi FD, Pessolani MC. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection e enhances bacterial adherence to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 292:162-169.

de Meirelles MN, de Araújo Jorge TC, de Souza W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages in vitro: dissociation of the attachment e internalization phases by low temperature e cytochalasin B. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 1982; 68 (1):7–14.

Devinney, R., Nisan, I., Ruschkowski, S., Rosenshine, I., and Finlay, B.B. (2001) Tyrosine phosphorylation and pedestal formation are delayed in enteropathogenic *Escherichia coli* sepZ:: TnpH mutant 30-5-1(3). *Infect Immun* 69:559–563.

Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev* 2000; 173: 27-38.

Dias AA, Raze D, Soares de Lima C, Melo Marques MA, Drobecq H, Debie AS, Guimarães MLR, Biet F and Pessolani MCV. Mycobacterial laminin-binding histone-like protein mediates collagen-dependent cytoadherence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(Suppl. I): 174-182.

Draper P. The anatomy of mycobacteria. In: The biology of mycobacteria. Ratledge C., Stanford J.L. Academic Press Ltd. London 1982; (1).

Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade* 2004; 13:76-88.

Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* 2007; 4: 207-214.

Engraber M, Loos M. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun* 1992; 60(8):3072-3078.

Finlay BB, Falkow S. Comparison of the invasion strategies used by *S.choleraesuis*, *Shigella flexneri*, and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* 1988; 70:1089–1099.

Fleury, RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. *Hansenologia internationalis* 1989; 14:101-106.

Fokkens WJ, Nolst Trenite GJ, Virmond M, KleinJan A, Andrade VL, van Baar NG, Naafs B. The nose in leprosy: immunohistology of the nasal mucosa. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998;66(3):328-339.

Fuerst JA & Hayward AC. Surface appendages similar to fimbriae (pili) on *Pseudomonas* species. *Journal of General Microbiology* 1969; 58: 227-237.

Garcia J, Faca V, Jarzembowski J, Zhang Q, Park J and Hanash S. Comprehensive profiling of the cell surface proteome of Sy5Y neuroblastoma cells yields a subset of proteins associated with tumor differentiation. *J Proteome Res* 2009; 8:3791-3796.

García-Pérez BE, Mondragón-Flores R, Luna-Herrera J. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microb Pathog* 2003; 35(2):49-55.

Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2011; 106(1):85-90.

Glück U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and beta-hemolytic streptococci). *Am J Clin Nutr* 2003; 77(2):517-520.

Godfrey HP, Feng ZH, Mandy S, Mandy K, Huygen K, De Bruyn J, Abou-Zeid C, Wiker HG, Nagai S and Tasaka H. Modulation of expression of delayed hypersensitivity by mycobacterial antigen 85 fibronectin-binding proteins. *Infect Immun* 1992; 60:2522–2528.

Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35(4): 365-375.

Green CA, Katoch VM, Desikan KV. Quantitative estimation of *Mycobacterium leprae* in exhaled nasal breath. *Lepr Rev* 1983; 54(4):337-340.

Harkema JR, Carey SA, Wagner JG. The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol* 2006; 34(3):252-69.

Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72(1):35-44.

Heijink IH, Marcel Kies P, van Oosterhout AJ, Postma DS, Kauffman HF, Vellenga E. Der p, IL-4, and TGF-beta cooperatively induce EGFR-dependent TARC expression in airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:351-359. Hempel K, Pané-Farré J, Otto A, Sievers S, Hecker M, Becher D. Quantitative cell surface proteome profiling for SigB-dependent protein expression in the human pathogen *Staphylococcus aureus* via biotinylation approach. *J Proteome Res* 2010; 9:1579-1590.

Hicks W Jr, Ward R, Edelstein D, Hall L 3rd, Albino A, Hard R, Asch B. Cytokeratin expression in human respiratory epithelium of nasal polyps and turbinates. *Cell Biol. Internat.* 1995; 19: 301-306.

Hsu AC, Parsons K, Barr I, Lowther S, Middleton D, Hansbro PM, Wark PA. Critical role of constitutive type I interferon response in bronchial epithelial cell to influenza infection. *PLoS One* 2012, 7:e32947.

Huang YC, Su LH, Wu TL, Lin TY. Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from a teaching hospital in Northern Taiwan. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2268-2270.



Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998; 66(9):4061-4067.

Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 1990; 60(5):861-871.

Job CK, Drain V, Truman R, Deming AT, Sanchez RM, Hastings RC. The pathogenesis of leprosy in the nine-banded armadillo e the significance of IgM antibodies to PGL-1. *Indian J Lepr* 1992; 64(2):137-151.

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(3):518-21.

Job CK, Sanchez RM, Hastings RC. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34(1):151-61.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2: 123–140.

Kim SY, Goodman JR, Petrofsky M and Bermudez LE. *Mycobacterium avium* infection of gut mucosa in mice associated with late inflammatory response and intestinal cell necrosis. *J. Med. Microbiol* 1998; 47:725–731.

Kinhikar AG, Vargas D, Li H, Mahaffey SB, Hinds L, Belisle JT, Laal S. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Mol Microbiol* 2006; 60(4):999–1013.

Kirchheimer WF, Storrs EE, Binford CH. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1972; 40:229-242.

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

Kluytmans JA, Mouton JW, Ijzerman EP, Vandenbroucke-Grauls CM, Maat AW, Wagenvoort JH, Verbrugh HA. Nasal carriage of *S. aureus* as a major risk factor for wound infections after cardiac surgery. *J Infect Dis* 1995; 171:216–219.

Kluytmans JA, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10:505–520.

Krogfelt KA. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev Infect Dis* 1991; 13:721–735.

Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Zolla-Pazner S, Phadtare JM, and Belisle JT. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 1997; 4:49–56.

Lahiri R<sup>a)</sup>, Rehawa B, Krahenbuhl J L. Effects of purification and fluorescent staining on viability of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2005; 73(3):194-202.

Lahiri R<sup>b</sup>), Rehawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. J Med Microbiol 2005; 54: 235–242.

Lee H M, Yuk J M, Shin D M and Jo E K. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. J Clin Immun 2009; 29,6:795-805.

Lee HM, Shin DM, and Jo EK. *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and CXCL8 in pulmonary epithelial cells through reactive oxygen species-dependent mitogen-activated protein kinase activation. J Bacteriol and Virol 2009; 39(1): 1–10.

Leininger E, Ewanowich CA, Bhargava A, Peppler MS, Kenimer JG, Brennan MJ. Comparative roles of the Arg-Gly-Asp sequence present in the *Bordetella pertussis* adhesins pertactin and filamentous hemagglutinin. Infect Immun 1992; 60:2380–2385.

Levitz R, Wattier R, Phillips P, Solomon A, Lawler J, Lazar I, Weibel C, Kahn JS. Induction of IL-6 and CCL5 (RANTES) in human respiratory epithelial (A549) cells by clinical isolates of respiratory syncytial virus is strain specific. Virol J 2012;9:190.

Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. Nat Rev Immunol 2002; 2: 725- 734.

Lin Y, Zhang M, and Barnes PF. Chemokine Production by a Human Alveolar Epithelial Cell Line in Response to *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1998; 66(3): 1121–1126.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(2):194-222.

Mapother ME, Songer JG. In vitro interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 1984;45(1):67-73.

Marques MA, Espinosa BJ, Xavier da Silveira EK, Pessolani MC, Chapeaurouge A, Perales J, Dobos KM, Belisle JT, Spencer JS, Brennan PJ. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *Proteomics* 2004; 4:2942–2953.

Marques MA, Mahapatra S, Nean D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Vidal Pessolani MC. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human schwann cells. *Microbes Infect* 2000; 2:1407-1417.

Marques MAM, Neves-Ferreira AGC, Xavier da Silveira E.K., Valente RH, Chapeaurouge A, Perales J, Bernardes RS, Dobos KM, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MCV. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics* 2008; 8: 2477–2491.

Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Bühner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(5):579-87.

Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M. Expression of IL-6, IL-8, e RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by *influenza virus A*. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:1080-1087.

Mattos KA, Oliveira VGC, Avila HD, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EM, Pessolani MCV, PT Bozza. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* 2011; 187(5):2548-2558.

McDermott-Lancaster R.D. and McDougallt A.C. Mode of transmission and histology of *M. leprae* infection in nude mice. *Int J Exp Path* 1990; 71, 689-700.

McDougall AC, Rees RJ, Weddell AG, Kanan MW. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. *J Pathol* 1975; 115(4):215-26.

McDougall CM, Blaylock MG, Douglas JG, Brooker RJ, Helms PJ, Walsh GM. Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39(5):560-568.

McNamara M, Tzeng SC, Maier C, Zhang L, Bermudez LE. Surface proteome of "*Mycobacterium avium* subsp. hominissuis" during the early stages of macrophage infection. *Infect Immun* 2012; 80(5):1868-1880.

Mehra V, Brennan PJ, Rada E, Convit J, Bloom BR. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. *Nature* 1984; 308:194–196.

Méndez-Samperio P, Miranda E, Trejo A. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulates human beta-defensin-2 gene transcription in human epithelial cells. *Cell Immunol.* 2006; 239(1):61-66.

Méndez-Samperio P, Pérez A, Rivera L. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced activation of PI3K/Akt and NF-κB signaling pathways regulates expression of CXCL10 in epithelial cells. *Cell Immunol.* 2009;256(1-2):12-8.

Menzio FD, Bischoff R, Fort E, Brennan MJ, Locht C. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(21):12625-12630.

Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, Raze D, Debrie AS, Dehouck MP, Cecchelli R, Locht C. *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microbes Infect* 2006; 8(1):1-9.

Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M., Muller J., Bischoff R., Brennan MJ, Locht C. Identification of a heparin binding hemagglutinin present in *Mycobacteria*. *J Exp Med* 1996; 184(3):993-1001.

Meyer-Hoffert U, Lezcano-Meza D, Bartels J, Montes-Vizuet AR, Schroder JM, Teran LM. Th2- and to a lesser extent Th1-type cytokines upregulate the production of both CXC (IL-8 and gro-alpha) and CC (RANTES, eotaxin, eotaxin-2, MCP-3 and MCP-4) chemokines in human airway epithelial cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2003; 131: 264-271.

Michgehl S, Heusipp G, Greune L, Rüter C, Schmidt MA. Esp-independent functional integration of the translocated intimin receptor (Tir) of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) into host cell membranes. *Cell Microbiol*. 2006 Apr;8(4):625-33.

Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, Wilson R. The role of *Mycobacterium avium* complex fibronectin attachment protein in adherence to the human respiratory mucosa. *Mol Microbiol*. 2000;38(2):381-391.

Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, Ratliff TL, Wilson R. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory mucosa. *Tuberculosis (Edinb)* 2002;82:69-78.

Mijares LA, Wangdi T, Sokol C, Homer R, Medzhitov R, Kazmierczak BI. Airway epithelial MyD88 restores control of *Pseudomonas aeruginosa* murine infection via an IL-1-dependent pathway. *J Immunol* 2011; 186:7080-7088.

Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E, Bentzmann S. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun* 2002; 70(2):620–630.

Monroy V, Amador A, Ruiz B, Espinoza-Cueto P, Xolalpa W, Mancilla R, Espitia C. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000; 68(7):4327-4330.

Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima. Cooperative interaction of nuclear factor kB and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activation the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1993; 265:21128-21133.

Mullou J, Xaubet A, Gaya A, Roca-ferrer J, López E, Fernández JC, Fernández MD, Picado C. Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps. *Clinic and Experim Allergy* 1995; 25(7):607–615.

Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 266–272.

Neill MA, Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimycobacterial activity of human macrophages. *J Exp Med* 1988; 167: 30–42.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts J F, Salzer J L, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Cell 2000; 103: 511–524.

Olmsted JB and Borisy GG. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. Biochemistry 1973; 12: 4282-4289.

Opromolla, DVA. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 1981.

Opromolla, DVA. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

Klatser PR, van Beers S, Madjid B, Day R, de Wit MY. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. J Clinical Microbiology 1993; 31(11): 2947-2951.

Pancholi V, Chhatwal GS. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. Int J Med Microbiol 2003; 293: 391–401.

Pedley JC. The nasal mucus in leprosy. Lepr Rev 1973; 44: 33-35.

Pereira RM, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MCV, Sarno EN, Sampaio EP, Lopes UG. *Mycobacterium leprae* induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human schwann cells. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 335(1):20-26.

Pethe<sup>a)</sup> K, Puech V, Daffe M, Josenhans C, Drobecq H, Loch C, Menozzi FD: *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with



*Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. Mol Microbiol 2001; 39:89-99.

Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Locht C, Menozzi FD. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. Nature 2001; 412:190-4.

Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debrie AS, Locht C, Menozzi FD. *Mycobacterial* heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share Antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(16):10759-10764.

Pethe K, Aumercier M, Fort E, Gatot C, Locht C, Menozzi FD. Characterization of the heparin-binding site of the *Mycobacterial* heparin-binding hemagglutinin adhesin. J Biol Chem 2000; 275 (19): 14273-14280.

Hardwidge PR, Deng W, Vallance BA, Rodriguez-Escudero I, Cid VJ, Molina M, Finlay BB. Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* effector protein EspG. Infect Immun 2005; 73 (5): 2586-2594.

Polito AJ, Proud D. Epithelial cells as regulators of airway inflammation. J Allergy Clin Immunol 1998; 102: 714-718.

Portugal M L, Todeschini A R, Lima C S, Silva CAM, Borges R M, Ottenhoff THM, Previato LM, Previato JO e Pessolani MCV. Characterization of two heparan sulphate-binding sites in the *Mycobacterial* adhesin Hlp. BMC Microbiology 2008; 8:75.

Prabhakar S, Annapurna PS, Jain NK, Dey AB, Tyagi JS, Prasad HK. Identification of an immunogenic histone-like protein (HLPMT) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1998; 79:43-53.

Preece A. *A Manual for Histologic Technicians*, 3rd edition. Little, Brown & Co., Boston, 1972.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell* 1997; 88(6):811-821.

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 1998; 282(5396):2076-2079.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science* 2002; 296(5569):927-931.

Rao SP, Hayashi T, Catanzaro A. Release of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 by a human alveolar epithelial cell line in response to mycobacterium avium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29(1):1-7.

Rao SP, Ogata K, Catanzaro A. *Mycobacterium avium-M.intracellulare* binds to the integrin receptor alpha v beta 3 on human monocytes e monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 1993; 61:663-670.

Rastogi NC, Frehel C, David HL. Triple-layer structure of mycobacterial cell wall: evidence for the existence of a polysaccharide-rich outer layer in 18 mycobacterial species. *Curr Microbiol* 1986; 13: 237-242.

Raymond J, Armengaud JB, Cosnes-Lambe C, Chalumeau M, Bosdure E, Reglier-Poupet H, El Hajje MJ, Iniguez JL, Moulin F, Poyart C, Gendrel D. *Pertussis* in young infants: apnoea and intra-familial infection. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(2):172-175.

Reddy VM & Kumar B. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181:1189–1193.

Rees RJW. Comparison of the modes of spread and the incidence of tuberculosis and leprosy. *The Lancet* 1974; 12:47-48.

Rees R J W & McDougall A C. Airborne infection with *M. leprae* in mice. *J Med Microbiol* 1977; 10:63-68.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity—a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact. Dis* 1966; 34:255–273.

Ronning DR, Klabunde T, Besra GS, Vissa VD, Belisle JT and Sacchettini JC. Crystal structure of the secreted form of antigen 85C reveals potential targets for *Mycobacterial* drugs and vaccines. *Nat Struct Biol* 2000; 7: 141–146.

Rosenshine I, Finlay BB. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. *Bioessays* 1993; 15(1):17-24.

Rubin EJ. The granuloma in tuberculosis — friend or foe? *N Engl J Med* 2009; 360:2471-2473.

Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins *Science* 1987; 238 (4826): 491-497.

Sachse F, Becker K, von Eiff C, Metze D, Rudack C. *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells *in vitro*. *Allergy* 2010; 65:1430-1437.

Samanich K, Belisle JT and Laal S. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2001; 69: 4600–4609.

Sangari FJ, Petrofsky M, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* infection of epithelial cells results in inhibition or delay in the release of Interleukin-8 and Rantes. *Infect Immun*. 1999; 67(10): 5069–5075.

Santhosh RS, Pandian SK, Lini N, Shabaana AK, Nagavardhini A, Dharmalingam K. Cloning of *mce1* locus of *Mycobacterium leprae* in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 SMR5 and evaluation of expression of *mce1* genes in *M. smegmatis* and *M. leprae*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2005; 45 (2):291–302.

Sato N, Fujimura T, Masuzawua M, Yogi Y, Kanoh M, Riley LW, Katsuoka K. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. *J Dermatol Science* 2007; 46:101—110.

Saunders BM, Cooper AM. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunology and Cell Biology* 2000; 78:334–341.

Sauty A, Dziejman M, Taha RA, Iarossi AS, Neote K, Garcia-Zepeda EA, Hamid Q, Luster AD. The T Cell-Specific CXC Chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 1999; 162:3549-3558.

Schenkman S, Mortara RA. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Cell Sci*. 1992; 101(4):895-905.

Schlesinger LS, Horwitz, MA. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. J Exp Med 1991; 174,1031–1038.

Schmitz ML, Bacher S, Dienz O. NF- $\kappa$ B activation pathways induced by T cell costimulation. FASEB J 2003;17(15):2187-2193.

Schulte R, Kerneis S, Klinke S, Bartels H, Preger S, Kraehenbuhl JP, Pringault E, Autenrieth IB. Translocation of *Yersinia enterocolitica* across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by *Yersinia* invasin binding to beta1 integrins apically expressed on M-like cells. Cell Microbiol 2000; 2(2):173-185.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Kraehenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin. Microbiol. Rev 2006; 19(2):338-381.

Seros J, Tuomanen E. Attachment factors of *Bordetella pertussis*: mimicry of eukaryotic cell recognition molecules. Trends Microbiol 1993; 1:192–196.

Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(9):991-998.

Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. Clin Microbiol Rev 2001; 14:336–363.

Sethna KB, Birdi TJ, Antia NH. Adherence of *Mycobacterium leprae* to the nasal mucosa is influenced by surface integrity and viability. J Biosci 1997; 22 (5):575-583.

Sharma M, Sharma S, Roy S, Varma S, Bose M. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Immunol

Cell Biol 2007; 85(3):229-37. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa Surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:9857-9862.

Shin SH, Lee SH, Jeong HS, Kita H. The effect of nasal polyp epithelial cells on eosinophil activation. Laryngoscope. 2003;113(8):1374-1377.

Shittu AO, Nübel U, Udo EE, Lin J, Gaogakwe S: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from hospitals in KwaZulu-Natal (KZN) province, Republic of South Africa. J Med Microbiol 2009; 58:1219-1226.

Shuter J, Hatcher VB, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. Infect Immun 1996; 64(1):310-318.

Soane MC, Jackson A, Maskell D, Allen A, Keig P, Dewar A, Dougan G, Wilson R. Interaction of *Bordetella pertussis* with human respiratory mucosa *in vitro*. Respir Med 2000; 94(8):791-799.

Soares de Lima C, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, Menozzi FD, Ottenhoff TH, Brennan PJ, Pessolani MC. Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. Microbes Infect 2005; 7:1097-1109.

Stanciu LA, Bellettato CM, Laza-Stanca V, Coyle AJ, Papi A, Johnston SL. Expression of programmed death-1 ligand (PD-L) 1, PD-L2, B7-H3, and inducible costimulator ligand on human respiratory tract epithelial cells and regulation by respiratory syncytial virus and type 1 and 2 cytokines. J Infect Dis 2006;193:404-412.

Strebel P, Nordin J, Edwards K, Hunt J, Besser J, Burns S, Amundson G, Baughman A, Wattigney W. Population-based incidence of pertussis among adolescents and adults, Minnesota, 1995-1996. *J Infect Dis* 2001; 183(9):1353-9.

Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr Rev* 1998; 69(4):358-366.

Swanson J, McCarty M. Electron microscopic studies on opaque colony variants of group A streptococci. *J Bacteriol* 1969; 100: 505-551.

Swanson J, Goldschneider I. The serum bactericidal system: ultrastructural changes in *Neisseria meningitidis* exposed to normal rat serum. *J Exp Med* 1969; 129:51-80.

Temmerman S, Pethe K, Parra M, Alonso S, Rouanet C, Pickett T, Drowart A, Debrie AS, Delogu G, Menozzi FD, Sergheraert C, Brennan MJ, Mascart F, Loch C. Methylation-dependent T cell immunity to *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding hemagglutinin. *Nat Med*. 2004; 10(9):935-41.

Thomassen MI, Demko CA, Doershuk CF. Cystic fibrosis: a review of pulmonary infections and interventions. *Pediatr Pulmon* 1987;3: 334-351.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia – Artmed*. Rio de Janeiro 2005.

Truman, R. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev* 2005; 76:198-208.

Tweedy J.M, Park R W A, Hodgkiss W. Evidence for the presence of fimbriae (pili) on *Vibrio* species. *J Gen Microbiol* 1968; 51, 235-244.

Uliczka F, Pisano F, Schaake J, Stolz T, Rohde M, Fruth A, Strauch E, Skurnik M, Batzilla J, Rakin A, Heesemann J, Dersch P. Unique cell adhesion and invasion

properties of *Yersinia enterocolitica* O:3, the most frequent cause of human *Yersiniosis*. PLoS Pathog. 2011 Jul;7(7):e1002117.

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJP, Achtman M, Sarkari J, Moxon ER. Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol 1992; 6: 2785–2795.

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Watt SM. Carcinoembryonic Antigen (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. Mol Microbiol. 1996; 22(5):941-950.

Vries F P, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JPM. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. Molecular Microbiology 1998; 27(6): 1203–1212.

Wasylnka JA and Moore MM. Uptake of *Aspergillus fumigatus* Conidia by phagocytic and nonphagocytic cells *in vitro*: quantitation using strains expressing green fluorescent protein. Infect and Immun 2002; 70: 3156–3163.

Webster HD, Martin JR, O'Connell MF. The relationship between interphase schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. Dev Biol 1973; 32: 401–416.

Wertheim HF, Vos MC, Ott A, van Belkum A, Voss A, Kluytmans JA, van Keulen PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meester MH, Verbrugh HA. Risk and outcome of nosocomial *Staphylococcus aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers. Lancet 2004; 364:703–705.

Westerlund B, Korhonen TK. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. Mol Microbiol 1993; 9(4):687-94.



Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedle JS. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network. *J Immunol* 1999; 163:3936-3947.

Wilson MD, McNab R, Henderson B. Bacterial disease mechanisms: an introduction to cellular microbiology. Cambridge University Press 2002.

Witt MYL, Douglas JT, McFadden J, Klatser PR. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 502-506.

World Health Organization (WHO). Guide to eliminate leprosy as a public health problem. 1st ed. Geneva: World Health Organization; 1995.

World Health Organization (WHO). WHO Technical Report Series, no. 874. Geneva: World Health Organization; 1998. WHO Expert Committee on Leprosy: 7th report.

Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics*. 2007;7(18):3332-3341.

Yanagawa R, Otsuki K. Some properties of the pili of *Corynebacterium renale*. *J Bacteriol* 1970; 101(3):1063-1069.

Tabela 6. Listagem de proteínas falso-positivas

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Sanger ID **</b>
<b>Classe I – Metabolismo lipídico</b>			
ML0726c	<i>accA3</i>	Provável proteína bifuncional acetil-propionil-coenzima A carboxilase	Rv3285
ML0731c	<i>accD5</i>	Provável propionil-CoA carboxilase	Rv3280
<b>Classe II – Vias de informação</b>			
ML0540	<i>mihF</i>	Provável fator de integração ao hospedeiro	Rv1388
ML0853	<i>rpsO</i>	Proteína ribossomal 30S	Rv2785c
ML0987	<i>recA</i>	Proteína recombinase	Rv2737c
ML1133	<i>rpmE</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv1298
ML1854c	<i>rpsQ</i>	Provável proteína ribossomal 30s	Rv0710
ML1863c	<i>rplC</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv0701
ML1960c	<i>rpsM</i>	Provável proteína ribossomal 30s	Rv3460c
<b>Classe III – Processos celulares e da parede celular</b>			
ML0234	<i>lsr2</i>	Antígeno de 15 kDa	Rv3597c

<b>Classe VII – Metabolismo lipídico e respiração</b>			
ML0150c	<i>pgi</i>	Fosfoglicose isomerase	Rv0946c
ML0450c	<i>snzP</i>	Envolvido na biossíntese de piridoxina	Rv2606c
ML1712c	<i>fixA</i>	Provável flavoproteína de transferência de elétrons	Rv3029c
<b>Classe IX- Proteínas regulatórias</b>			
ML2440c	<i>senX3</i>	Sensor de dois componentes histidina quinase	Rv0490

\* - Análise realizada no servidor Leproma (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma>)

\*\* – Análise realizada no servidor Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).

**Tabela 7. Proteínas totais identificadas da superfície do *M. leprae*.**

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID **</b>
<b>Classe 0 – virulência, detoxificação, adaptação</b>			
ML0072c	<i>sodA</i>	Provável superóxido dismutase SodA	Rv3846
ML0317	<i>groEL2</i>	Família de proteínas <i>heat shock</i> Hsp65	Rv0440
ML0380	<i>groES</i>	Chaperonina de 10 kDa GroEs	Rv3418c
ML0381	<i>groEL1</i>	Chaperonina de 60 kDa GroEL1	Rv3417
ML0625 <sup>a)</sup>	<i>dnaJ2</i>	Provável chaperona DnaJ2	Rv2373c
ML0862	<i>ephD</i>	Provável oxidoreductase	Rv2214c
ML1623	<i>htpG</i>	Família das proteínas <i>heat shock</i> Hsp90	Rv2299c
ML1795	<i>hsp18</i>	Antígeno 18kDa Hsp18	-
ML2015c <sup>a)</sup>	<i>cinA</i>	Provável proteína semelhante à cinA	Rv1901c
ML2042	<i>ahpC</i>	Alquil hidroperóxido redutase	Rv2428

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML2254	<i>otsA</i>	Provável trehalose fosfato sintase	Rv3490
ML2490c	<i>clpB</i>	Proteína <i>heat shock</i>	Rv0384c
ML2496c	<i>dnaK</i>	Provável chaperona DnaK	Rv0350
ML2589 <sup>b)</sup>	<i>mce1A</i>	Proteína da família MCE	Rv0169
ML2591 <sup>b)</sup>	<i>mce1C</i>	Proteína da família MCE	Rv0171
<b>Classe I- Metabolismo lipídico</b>			
ML0100 <sup>b)</sup>	<i>fadD32</i>	Provável sintetase CoA de ácidos graxos	Rv3801c
ML0101	<i>pks13</i>	Policetídeo sintase	Rv3800c
ML0120c <sup>b)</sup>	<i>echA1</i>	Possível enoyl-CoA hidratase	Rv3774
ML0135 <sup>b)</sup>	<i>pks1</i>	Provável policetídeo sintase	Rv2946c/Rv2947c
ML0138c	<i>fadD28</i>	Provável sintetase-CoA de ácidos graxos	Rv2941
ML0139	<i>mas</i>	Sintase do ácido micocerósico	Rv2940c

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID **</b>
ML0660c	<i>fadE23</i>	Provável acil-CoA desidrogenase	Rv3140
ML0737	<i>fadE25</i>	Provável acil-CoA desidrogenase	Rv3274c
ML0887c	<i>fadD15</i>	Provável ligase CoA de cadeia longa de ácidos graxos	Rv2187
ML1158	<i>fadA4</i>	Provável acetil-coa acetiltransferase	Rv1323
ML1191 <sup>b)</sup>	<i>fas</i>	Provável sintase de ácidos graxos	Rv2524c
ML1229	<i>pks4</i>	β-cetoacil sintase de policetídeos	Rv1180/Rv1181
ML1654	<i>acpM</i>	Envolvida na extensão de meromicolato	Rv2244
ML1807c <sup>b)</sup>	<i>fabG1</i>	Ácidos micólicos biossíntese	Rv1483
ML2028	<i>fbpB</i>	Antígeno secretado 85B	Rv1886c

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID **</b>
ML2161c	<i>fadB</i>	Oxidação dos ácidos graxos	Rv0860
ML2162c	<i>fadA</i>	Acil-CoA tiolase	Rv0859
ML2185 <sup>a)</sup>	<i>desA1</i>	Acil-dessaturase	Rv0824c
ML2353c	<i>ppsE</i>	Provável beta-ketoacil sintase de policetídeos	Rv2935
ML2354c	<i>ppsD</i>	Sintase de policetídeos para a síntese de fenolftiocerol tipo-I	Rv2934
ML2355c <sup>b)</sup>	<i>ppsC</i>	Envolvida na biossíntese de fenolftiocerol e dimicocerosato ftiocerol (DIM)	Rv2933
ML2356c <sup>b)</sup>	<i>ml2356</i>	Sintase de policetídeos para a síntese de fenolftiocerol tipo-I	Rv2932
ML2402	<i>echA8</i>	Provável enoil-coa hidratase	Rv1070c
ML2426	<i>cmaA2</i>	Ciclopropano fosfolípido sintase	Rv0503c

<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID **</b>
ML2461c	<i>fadB2</i>	Provável 3-hidroxi-butiril-coa desidrogenase	Rv0468
ML2546c	<i>fadD2</i>	Provável coA ligase de ácidos graxos	Rv0270
ML2563	<i>fadE5</i>	Provável acil-CoA desidrogenase	Rv0244c
ML2564c <sup>b)</sup>	<i>fadA2</i>	Provável acetil-coA aciltransferase	Rv0243
ML2565	<i>fabG4</i>	Oxoacil-redutase	Rv0242c
<b>Classe II-Vias de informação</b>			
ML0002 <sup>a)</sup>	<i>dnaN</i>	Provável DNA polimerase	Rv0002
ML0006 <sup>b)</sup>	<i>gyrA</i>	Provável DNA girase	Rv0006
ML0032 <sup>b)</sup>	<i>leuS</i>	Provável leucil-tRNA sintetase	Rv0041
ML0155a	<i>sucC</i>	Succinil-CoA-sintetase	Rv0951
ML0245c <sup>b)</sup>	<i>rplY</i>	Provável proteína ribossomal 50S	Rv1015c
ML0364 <sup>b)</sup>	<i>rplM</i>	Provável proteína ribossomal 50S	Rv3443c
ML0778	<i>ml0778</i>	Proteína hipotética	Rv3241c



		conservada	
<b>Leproma ID *</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M.tuberculosis</i> Tuberculist ID **</b>
ML0826 <sup>a)</sup>	<i>glyS</i>	Provável t-RNA sintetase	Rv2357c
ML0854	<i>gpsI</i>	degradação de RNA	Rv2783c
ML1014c	<i>sigB</i>	Fator sigma da RNA polimerase	Rv2710
ML1022 <sup>b)</sup>	<i>sigA</i>	Fator sigma da RNA polimerase	Rv2703
ML1132	<i>rho</i>	Provável fator de terminação da transcrição	Rv1297
ML1174 <sup>a)</sup>	<i>rphA</i>	Provável ribonuclease	Rv1340
ML1351 <sup>b)</sup>	<i>mpg</i>	Possível 3-metil-adenina dna glicosilase	Rv1701
ML1352 <sup>b)</sup>	<i>tyrS</i>	Provável tirosil-tRNA sintase TyrS	Rv1689
ML1382	<i>rpsA</i>	Provável proteína ribossomal	Rv1630
ML1392 <sup>b)</sup>	<i>uvrA</i>	Provável exonuclease abc	Rv1638
ML1394	<i>infC</i>	Fator de iniciação-3	Rv1641
ML1553 <sup>a)</sup>	<i>proS</i>	Provável proil tRNA sintetase	-

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML1556c <sup>a)</sup>	<i>infB</i>	Fator de iniciação da tradução	Rv2839c
ML1597c	<i>tsf</i>	Fator de alongamento	Rv2889c
ML1598c	<i>rpsB</i>	Proteína ribossomal 30s	Rv2890c
ML1683c	<i>hupB</i>	Provável proteína ligante de DNA	Rv2986c
ML1688c <sup>a)</sup>	<i>gltS</i>	Provável glutamil-tRNA sintetase	Rv2992c
ML1700c <sup>a)</sup>	<i>gatB</i>	Provável glutamil-tRNA sintetase	Rv3009c
ML1731c <sup>a)</sup>	<i>nrdF</i>	Replicação do DNA	Rv3048c
ML1840c <sup>b)</sup>	<i>rplO</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv0723
ML1842 <sup>b)</sup>	<i>rpsE</i>	Provável 30s ribossomal proteína	Rv0721
ML1845 <sup>b)</sup>	<i>rpsH</i>	Provável proteína ribossomal 30s	Rv0718
ML1847c <sup>b)</sup>	<i>rplE</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv0716

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M.tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML1857c <sup>b)</sup>	<i>rpsC</i>	Provável proteína ribossomal 30s	Rv0707
ML1860c <sup>a)</sup>	<i>rplB</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv0707
ML1864c <sup>b)</sup>	<i>rpsJ</i>	Proteína ribossomal 30s	Rv0700
ML1877c	<i>tuf</i>	Fator de alongamento regulado pelo ferro	Rv0685
ML1878c	<i>fusA1</i>	Provável fator de alongamento	Rv0684
ML1879c <sup>a)</sup>	<i>rpsG</i>	Proteína ribossomal 30s	Rv0683
ML1890c	<i>rpoC</i>	RNA polimerase	Rv0668
ML1891c	<i>rpoB</i>	RNA polimerase	Rv0667
ML1895 <sup>b)</sup>	<i>rpIL</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv0652
ML1905c	<i>rplK</i>	Provável proteína ribossomal 50s	Rv0640
ML1906c	<i>nusG</i>	Provável fator de transcrição anti-término	Rv0639
ML1957c	<i>rpoA</i>	Provável RNA polimerase	Rv3457c
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b><i>M. tuberculosis</i></b>

		<b>Protéica</b>	<b>Tuberculist ID**</b>
ML1958c	<i>rpsD</i>	Proteína ribossomal 30s	Rv3458c
ML2697c <sup>a)</sup>	<i>pcnA</i>	Provável polimerase	Rv3907c
<b>Classe III- Processos envolvendo a parede celular e a célula bacteriana</b>			
ML0093 <sup>b)</sup>	<i>glfT</i>	Proteína bifuncional UDP-transferase galactofuranose	Rv3808c
ML0178c <sup>b)</sup>	<i>mscL</i>	Possível canais condutores de ions mecanossensíveis	Rv0985c
ML0201c <sup>b)</sup>	<i>ml0201c</i>	Proteína transmembrana conservada	Rv3645
ML0487 <sup>b)</sup>	<i>secD</i>	Proteína de membrana de exportação	Rv2587c
ML0640c <sup>b)</sup>	<i>ml0640c</i>	Provável proteína conservada ligante de ATP	Rv3197
ML0644	<i>ml0644</i>	Proteína transmembrana conservada	Rv3193c
ML0841	<i>mmpI</i>	Proteína de membrana majoritária	-
ML0872c <sup>b)</sup>	<i>ml0872c</i>	Proteína de membrana	Rv2203

		conservada	
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML0914 <sup>b)</sup>	<i>murG</i>	Síntese de peptidoglicana	Rv2153c
ML0922	<i>wag31</i>	Desconhecido	Rv2145c
ML1096c <sup>b)</sup>	<i>ml1096c</i>	Provável proteína de membrana	Rv1249c
ML1244 <sup>b)</sup>	<i>ml1244</i>	Desconhecido	Rv2484c
ML1248 <sup>b)</sup>	<i>ml1248</i>	Proteína transportadora de ATP do tipo ABC	Rv2477c
ML1316 <sup>a)</sup>	<i>mpa</i>	Provavelmente faz parte de proteassoma	Rv2115c
ML1367 <sup>a)</sup>	<i>ml1367</i>	Provável proteína inibidora de iniciação	Rv1708
ML1481c <sup>a)</sup>	<i>tig</i>	Proteína fator <i>trigger</i>	Rv2462c
ML1622c <sup>a)</sup>	<i>ffh</i>	Proteína de exportação extra-citoplasmática	Rv2916c
ML1633c <sup>a)</sup>	<i>ml1633c</i>	Protease exportada	Rv2224c
ML1839c	<i>sppa</i>	Possível protease	Rv0724
ML1892c	<i>mkl</i>	Transporte ativo de ribonucleotídeo	Rv0655

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML2082c <sup>a)</sup>	<i>secA2</i>	Provável ATPase	Rv1821
ML2188 <sup>a)</sup>	<i>phoY2</i>	Provável sistema de transporte de fosfato	Rv0821c
ML2228 <sup>b)</sup>	<i>ml2228</i>	Proteína trans membrana conservada	Rv0779c
ML2306 <sup>b)</sup>	<i>ml2306</i>	Provável ATPase aniônica transportadora	Rv3680
ML2347 <sup>b)</sup>	<i>ml2347</i>	Provável proteína de membrana	-
ML2352 <sup>a)</sup>	<i>drrA</i>	Resistência a antibióticos	Rv2936
ML2395c <sup>b)</sup>	<i>pra</i>	Desconhecido	Rv1078
ML2400c <sup>b)</sup>	<i>ml2400c</i>	Proteína transmembrana conservada	Rv1072
ML2454c <sup>b)</sup>	<i>hbhA</i>	Provável hemaglutinina	Rv0475
ML2489c	<i>ml2489c</i>	Desconhecido	Rv0383c
ML2535c <sup>b)</sup>	<i>ml2535c</i>	Proteína de membrana	Rv0284
ML2581 <sup>b)</sup>	<i>ML2581</i>	Provável proteína de membrana conservada	Rv0227c
ML2671 <sup>b)</sup>	<i>ctpI</i>	Provável cation-transporter	Rv0107c

		ATPaseI	
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML2706c <sup>a)</sup>	<i>parB</i>	Provável proteína de particionamento do cromossoma	Rv3917c
<b>Classe V-Sequências de inserção e fagos</b>			
ML1365 <sup>b)</sup>	<i>ml1365</i>	Provável integrase ou recombinase	Rv1701
<b>Classe VII – Metabolismo intermediário e respiração</b>			
ML0065 <sup>b)</sup>	<i>ethA</i>	Monoxigenase	Rv3854c
ML0093 <sup>b)</sup>	<i>glfT</i>	Proteína bifuncional UDP- transferase galactofuranose	Rv3808c
ML0125 <sup>b)</sup>	<i>ml0125</i>	Glicosiltransfer ase	Rv2962c
ML0127	<i>ml0127</i>	Possível metiltransferase	Rv2959c
ML0130c <sup>a)</sup>	<i>ml0130c</i>	Provável metiltransferase	Rv2952
ML0131	<i>ml0131</i>	Possível oxidoreductase	Rv2951c
ML0155 <sup>a)</sup>	<i>sucC</i>	Succinil-Coa sintase	Rv0951
ML0161	<i>purH</i>	Biossíntese de purina	Rv0957
ML0183	<i>moeA1</i>	Provável proteína envolvida na biossíntese de	Rv0994

		molibdopterina	
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função proteica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML0210c <sup>a)</sup>	<i>ppa</i>	Pirofosfato inorgânico	Rv3628
ML0248c <sup>b)</sup>	<i>prsA</i>	Provável pirofosfoquinas e ribose-fosfato	Rv1017c
ML0255 <sup>a)</sup>	<i>eno</i>	Provável enolase	Rv1023
ML0269c <sup>a)</sup>	<i>fdg1</i>	Provável glucose-6-fosfato desidrogenase F420-dependente	Rv0407
ML0275c <sup>b)</sup>	<i>metZ</i>	Biossíntese de metionina	Rv0391
ML0286c <sup>a)</sup>	<i>fba</i>	Provável frutose bifosfato aldolase	Rv0363c
ML0315c	<i>ml0315c</i>	Oxidoreductase	Rv0068
ML0348 <sup>a)</sup>	<i>ml0348</i>	Possível oxidoreductase dependente da coenzima F420	Rv3520c
ML0387	<i>guaB2</i>	Inosine-5'-monofosfato desidrogenase	Rv3411c
ML0418 <sup>a)</sup>	<i>ml0418</i>	Possível oxidoreductase	Rv3368c
ML0458c <sup>b)</sup>	<i>ml0458c</i>	Possível oxidoreductase	-
ML0485c	<i>gabT</i>	Provável 4 - aminotransferas	Rv2589



		e aminobutirato	
<b>Leproma ID**</b>	<b>Gene</b>	<b>Função proteica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML0544	<i>metK</i>	S-adenosilmetioni na sintase	Rv1392
ML0551 <sup>a)</sup>	<i>ml0551c</i>	Metiltransferase	Rv1405c
ML0570	<i>gap</i>	Provável gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Rv1436
ML0572 <sup>a)</sup>	<i>tpi</i>	Possível triosefosfato	Rv1438
ML0578	<i>ppc</i>	Fosfoenolpiruvato carboxilase	-
ML0582c	<i>tal</i>	Transaldolase	Rv1448c
ML0583c	<i>tkt</i>	Provável transcetolase	Rv1449c
ML0611 <sup>a)</sup>	<i>lepA</i>	Proteína ligante de GTP	Rv2404c
ML0666c <sup>b)</sup>	<i>fprA</i>	Provável ferredoxina redutase NADPH	Rv3106
ML0674	<i>folD</i>	Envolvida na biossíntese de purina	Rv3356c
ML0696c	<i>sdhB</i>	Provável succinato desidrogenase	Rv3319
ML0697c	<i>sdhA</i>	Succinato desidrogenase	Rv3318
ML0771	<i>sahH</i>	Provável S-adenosil-L-	Rv3248c

		homocisteína hidrolase	
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML0839c <sup>a)</sup>	<i>cysK</i>	Provável cysteine sintase	Rv2334
ML0861c	<i>sucB</i>	Dihidrolipoamida succiniltransferase	Rv2215
ML0866 <sup>a)</sup>	<i>ilvE</i>	Provável transaminase	Rv2210c
ML0873	<i>adk</i>	Provável adenosina quinase	Rv2202c
ML0874 <sup>b)</sup>	<i>asnB</i>	Asparagina sintetase	Rv2201
ML0875 <sup>a)</sup>	<i>ctaC</i>	Proteína transmembrana citocromo c oxidase	Rv2200c
ML0896 <sup>a)</sup>	<i>aroG</i>	Possui participação na biossíntese de corismato	Rv2178c
ML0925	<i>glnA</i>	Glutamina sintetase	Rv2220
ML0961c	<i>metE</i>	Provável metiltransferase	Rv1133c
ML0996 <sup>a)</sup>	<i>dapF</i>	Diaminopimelato e epimerase	Rv2726c
ML1023c <sup>a)</sup>	<i>ppgK</i>	Polifosfato glicoquinase	Rv2702
ML1078 <sup>b)</sup>	<i>htrA</i>	Serina protease	Rv1223

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML1091	<i>mdh</i>	Malato desidrogenase	Rv1240
ML1095c	<i>sucA</i>	2-oxoglutarato desidrogenase	Rv1248c
ML1129	<i>thrA</i>	Homoserina desidrogenase	Rv1294
ML1130 <sup>a)</sup>	<i>thrC</i>	Threonina sintase	Rv1295
ML1142 <sup>b)</sup>	<i>atpH</i>	ATP sintetase	Rv1307
ML1143 <sup>a)</sup>	<i>atpA</i>	Provável ATP sintase	Rv1308
ML1144	<i>atpG</i>	ATP sintase	Rv1309
ML1145	<i>atpD</i>	ATP sintase	Rv1310
ML1159	<i>ml1159</i>	Tioredoxina	Rv1324
ML1272 <sup>a)</sup>	<i>trpB</i>	Triptofano sintase	Rv1612
ML1273 <sup>a)</sup>	<i>trpA</i>	Triptofano sintase	Rv1613
ML1310 <sup>a)</sup>	<i>hisG</i>	ATP fosforibosiltrans ferase	Rv2121c
ML1322 <sup>a)</sup>	<i>prcB</i>	Proteassoma	Rv2110c
ML1323	<i>prcA</i>	Proteasoma	Rv2109c
ML1340 <sup>b)</sup>	<i>ribD</i>	Possível enzima bifuncional envolvida na biossíntese de riboflavina	Rv2671
ML1363 <sup>a)</sup>	<i>pyrG</i>	CTP sintase	Rv1699
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b><i>M. tuberculosis</i></b>

		<b>protéica</b>	<b>Tuberculist ID**</b>
ML1363 <sup>a)</sup>	<i>pyrG</i>	CTP sintase	Rv1699
ML1412	<i>argG</i>	Provável Arginino succinato sintase	Rv1658
ML1479c <sup>a)</sup>	<i>clpP2</i>	Provável protease	Rv2460c
ML1480c	<i>clpP1</i>	Clp protease dependente de ATP	Rv2461c
ML1532 <sup>a)</sup>	<i>ald</i>	L-alanina desidrogenase	Rv2780
ML1651 <sup>a)</sup>	<i>aceE</i>	Piruvato desidrogenase	Rv2241
ML1684c <sup>b)</sup>	<i>leuD</i>	Biossíntese de leucina	Rv2987c
ML1692c	<i>serA1</i>	Fosfoglicerato desidrogenase	Rv2996c
ML1694c	<i>ilvC</i>	Provável ceto-ácido redutoisomerase	Rv3001c
ML1701c <sup>a)</sup>	<i>pfkA</i>	Fosfo frutoquinase	Rv3010c
ML1794	<i>ml1794</i>	Provável amidotransferase	Rv2294
ML1814	<i>acn</i>	Aconitato hidratase	Rv1475c
ML1832c <sup>a)</sup>	<i>kad</i>	Possível adenilato sintase	Rv0733
ML1947c	<i>fum</i>	Fumarase	Rv1098c
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b><i>M. tuberculosis</i></b>

		<b>Protéica</b>	<b>Tuberculist ID**</b>
ML1953c	<i>glyA1</i>	Serina hidroximetil transferase	Rv1093
ML1985	<i>aceA</i>	Isocitrato liase	Rv1916
ML2038 <sup>a)</sup>	<i>bfrA</i>	Bacterioferritina	Rv1876
ML2046	<i>lldD2</i>	L-lactato desidrogenase	Rv1872c
ML2053c <sup>a)</sup>	<i>adhA</i>	Provável álcool desidrogenase	Rv1862
ML2059 <sup>a)</sup>	<i>ml2059</i>	Possível oxodoredutase	Rv1856c
ML2061 <sup>b)</sup>	<i>ndh</i>	Provável NADH desidrogenase	Rv1854c
ML2065 <sup>a)</sup>	<i>gnd1</i>	Provável 6-fosfogliconato desidrogenase	Rv1844c
ML2066	<i>guaB1</i>	Inosine-5'-monofosfato desidrogenase	Rv1843c
ML2069	<i>glcB</i>	Malato sintase	Rv1837c
ML2088c <sup>b)</sup>	<i>ML2088c</i>	Citocromo P450	-
ML2130c	<i>gltA2</i>	Provável citrato sintase	Rv0896
ML2136 <sup>a)</sup>	<i>serC</i>	Fosfoserina aminotransferase	Rv0884c
ML2167 <sup>a)</sup>	<i>pdh</i>	Indol-3-piruvato descarboxilase	Rv0853c
ML2198 <sup>b)</sup>	<i>cysA2</i>	Provável sulfotransferase tiosulfato	Rv0815c

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função Protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML2226c <sup>a)</sup>	<i>ptrB</i>	Provável protease	Rv0781/Rv0782
ML2230 <sup>b)</sup>	<i>purB</i>	Biossíntese de Purina	Rv0777
ML2263c	<i>menB</i>	Provável naftoato sintase	Rv0548c
ML2276c <sup>b)</sup>	<i>ml2276c</i>	Oxidoredutase	Rv0561c
ML2277	<i>grcC1</i>	Provável poliprenil-difosfato sintase	Rv0562
ML2322 <sup>b)</sup>	<i>asd</i>	Semi aldeído aspartato desidrogenase	Rv3708c
ML2387 <sup>a)</sup>	<i>lpd</i>	Desidrogenase dihidrolipoamida	Rv0462
ML2394c <sup>a)</sup>	<i>metB</i>	Biossíntese de metionina	Rv1079
ML2396c <sup>a)</sup>	<i>cbs</i>	Provável cistationina $\beta$ -sintase	Rv1077
ML2419 <sup>b)</sup>	<i>hemB</i>	Biossíntese de porfirina e heme	Rv0512
ML2420 <sup>b)</sup>	<i>hemD</i>	Provável uroporfirina-III c-metiltransferase	Rv0511
ML2430c <sup>a)</sup>	<i>proC</i>	Pyrroline-5-carboxilato redutase	Rv0500
ML2441c <sup>a)</sup>	<i>gpm1</i>	Fosfoglicerato mutase 1	Rv0489

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML2501 <sup>b)</sup>	<i>ml2501</i>	Proteína redutase ligante a Ferro-enxofre	Rv0338c
ML2502	<i>aspC</i>	Provável aspartato aminotransferas e	Rv0337c
ML2573 <sup>a)</sup>	<i>gabD</i>	Provável succinato semi aldeído desidrogenase	Rv0234c
ML2703 <sup>a)</sup>	<i>trxC</i>	Tioredoxina	Rv3914
ML2608c	<i>ilvD</i>	Envolvida na biossíntese de valina e isoleucina	Rv0189c
ML2613c <sup>a)</sup>	<i>ml2613</i>	Zinco metalo protease	Rv0198c
ML2624 <sup>a)</sup>	<i>pckA</i>	Fosfoenolpiruva to carboxiquinase regulado pelo ferro	Rv0211
ML2634c	<i>pntB</i>	Transidrogenase	Rv0157
ML2636c	<i>pntAa</i>	Transidrogenase	Rv0155
ML2639c	<i>ml2639c</i>	Provável aldeído desidrogenase	Rv0147
ML2659 <sup>b)</sup>	<i>pepA</i>	Serina protease	Rv0125
ML2672c	<i>icd2</i>	Provável isocitrato desidrogenase	Rv0066c

<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
<b>Classe IX-Proteínas regulatórias</b>			
ML0565 <sup>b)</sup>	<i>whiA</i>	Proteína regulatória transcricional	Rv1423
ML0773	<i>mtrA</i>	Ativador transcricional, de um sistema regulatório de dois componentes.	Rv3246c
ML1286 <sup>b)</sup>	<i>ml1286</i>	Sistema de dois componentes	Rv1626
ML1753c <sup>b)</sup>	<i>ml1753c</i>	Transcricional regulatória proteína	Rv1358
ML1810	<i>moxR1</i>	Proteína regulatória transcricional	Rv1479
ML2123 <sup>a)</sup>	<i>prrA</i>	Proteína regulatória transcricional	Rv0903c
ML2124 <sup>b)</sup>	<i>prrB</i>	Sensor do sistema de dois componentes	Rv0902c
ML2302 <sup>b)</sup>	<i>ml2302</i>	Provável proteína regulatória transcricional	Rv3676
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b><i>M. tuberculosis</i></b>



		<b>protéica</b>	<b>Tuberculist ID</b>
<b>Class X- Proteínas hipotéticas conservadas</b>			
ML0055c	<i>ml0055c</i>	Proteína hipotética conservada	Rv3868
ML0129c	<i>ml0129</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2953
ML0564 <sup>a)</sup>	<i>ml0564</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1422
ML0593 <sup>a)</sup>	<i>ml0593</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1461
ML0594 <sup>a)</sup>	<i>ml0594</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1462
ML0703 <sup>a)</sup>	<i>ml0703</i>	Proteína hipotética conservada	Rv3311
ML0798c <sup>b)</sup>	<i>ml0798c</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2787
ML0860c	<i>ml0860</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2216
ML0901 <sup>a)</sup>	<i>ml0901</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2172c
ML1041 <sup>a)</sup>	<i>ml1041c</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2680
ML1045 <sup>a)</sup>	<i>ml1045</i>	Proteína hipotética	Rv2676c

		conservada	
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML1052c <sup>a)</sup>	<i>ml1052c</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1194c
ML1149 <sup>a)</sup>	<i>ml1149c</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1314c
ML1369 <sup>b)</sup>	<i>ml1369</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1710
ML1391 <sup>a)</sup>	<i>ml1391</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1637c
ML1423 <sup>a)</sup>	<i>ml1423</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2037c
ML1444 <sup>a)</sup>	<i>ml1444</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2054
ML1540 <sup>a)</sup>	<i>ml1540</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1794
ML1661	<i>ml1661</i>	Proteína hipotética conservada	Rv2927c
ML1751c <sup>a)</sup>	<i>ml1751</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1356c
ML1809 <sup>b)</sup>	<i>ml1809</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1480
ML1898	<i>ml1898</i>	Proteína	Rv0647c

		hipotética conservada	
<b>Leproma ID*</b>	<b>Gene</b>	<b>Função protéica</b>	<b><i>M. tuberculosis</i> Tuberculist ID**</b>
ML2020 <sup>a)</sup>	<i>ml2020</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1896c
ML2031 <sup>b)</sup>	<i>ml2031</i>	Proteína hipotética conservada	Rv1883c
ML2203 <sup>a)</sup>	<i>ml2203</i>	Proteína hipotética conservada	Rv0811c
ML2309 <sup>b)</sup>	<i>ml2309</i>	Proteína hipotética conservada	Rv3683
ML2333 <sup>b)</sup>	<i>ml2333</i>	Proteína hipotética conservada	Rv3719
ML2336 <sup>a)</sup>	<i>ml2336</i>	Proteína hipotética conservada	Rv3722c
ML2346c	<i>ml2346</i>	Proteína hipotética conservada	-
ML2427 <sup>c)</sup>	<i>ml2427</i>	Proteína hipotética conservada	Rv0502
ML2465	<i>ml2465</i>	Proteína hipotética conservada	Rv0464c
ML2627 <sup>a)</sup>	<i>ml2627</i>	Proteína hipotética conservada	Rv0216

a) – Proteínas identificadas apenas em *M. leprae* não tratado com NaOH.

b) – Proteínas identificadas apenas em *M. leprae* tratado com NaOH.

As proteínas não indicadas com as letras a ou b são proteínas que foram encontradas simultaneamente em *M. leprae* tratado com NaOH e *M. leprae* não tratado com NaOH.

\* - Análise realizada no servidor Leproma (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma>)

\*\*–Análise realizada no servidor Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).





# Interaction of *Mycobacterium leprae* with Human Airway Epithelial Cells: Adherence, Entry, Survival, and Identification of Potential Adhesins by Surface Proteome Analysis

AQ: au Carlos A. M. Silva,<sup>a,b</sup> Lia Danelishvili,<sup>b</sup> Michael McNamara,<sup>b,c</sup> Márcia B. P. Moreira,<sup>a</sup> Robert Bildfell,<sup>b</sup> Franck Biet,<sup>d</sup> Luciana S. Rodrigues,<sup>a</sup> Albanita V. Oliveira,<sup>e</sup> Luiz E. Bermudez,<sup>b,c,f</sup> Maria C. V. Pessolani<sup>a</sup>

Laboratory of Cellular Microbiology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>a</sup>; Department of Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA<sup>b</sup>; Molecular and Cellular Biology Program, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA<sup>c</sup>; UR1282, Infectiologie Animale, Santé Publique (IASP-311), INRA Centre de Tours, Nouzilly, France<sup>d</sup>; Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil<sup>e</sup>; Department of Microbiology, College of Science, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA<sup>f</sup>

This study examined the *in vitro* interaction between *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, and human alveolar and nasal epithelial cells, demonstrating that *M. leprae* can enter both cell types and that both are capable of sustaining bacterial survival. Moreover, delivery of *M. leprae* to the nasal septum of mice resulted in macrophage and epithelial cell infection in the lung tissue, sustaining the idea that the airways constitute an important *M. leprae* entry route into the human body. Since critical aspects in understanding the mechanisms of infection are the identification and characterization of the adhesins involved in pathogen-host cell interaction, the nude mouse-derived *M. leprae* cell surface-exposed proteome was studied to uncover potentially relevant adhesin candidates. A total of 279 cell surface-exposed proteins were identified based on selective biotinylation, streptavidin-affinity purification, and shotgun mass spectrometry; 11 of those proteins have been previously described as potential adhesins. *In vitro* assays with the recombinant forms of the histone-like protein (Hlp) and the heparin-binding hemagglutinin (HBHA), considered to be major mycobacterial adhesins, confirmed their capacity to promote bacterial attachment to epithelial cells. Taking our data together, they suggest that the airway epithelium may act as a reservoir and/or portal of entry for *M. leprae* in humans. Moreover, our report sheds light on the potentially critical adhesins involved in *M. leprae*-epithelial cell interaction that may be useful in designing more effective tools for leprosy control.

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an acid-fast, rod-shaped obligate intracellular bacillus. The disease remains a major health problem in several developing countries, with new cases being documented every year (1). *M. leprae* mainly affects the coldest parts of the human body such as the skin, nasal mucosa, and peripheral nerves. The disease manifests as a spectrum of clinical forms, with the tuberculoid and lepromatous leprosy forms occupying the opposite poles. Patients with tuberculoid leprosy, also known as paucibacillary leprosy, develop a strong, specific cell-mediated immunity to *M. leprae* antigens which is able to confine the disease to a few well-defined lesions with well-developed granuloma and rare acid-fast bacilli. At the other end of the spectrum, however, the lepromatous/multibacillary patients show no apparent immunological resistance to *M. leprae*, resulting in numerous nodular lesions. Biopsy specimens of these lesions reveal abundant foamy dermal macrophages containing a large amount of bacilli (2).

The nose and skin are considered the main routes of *M. leprae* infection and transmission (3–5). Nasal mucosa involvement is observed in early leprosy even before lesions become apparent in the skin, nerves, and other parts of the body (6), suggesting that the airways are the primary infection sites. In support of this idea, *M. leprae* DNA has been detected by PCR in nasal swabs and nasal mucosa biopsy specimens of healthy individuals living in areas of endemicity (7–9). Moreover, the presence of acid-fast bacilli in the lungs of mice after *M. leprae* airborne infection implies that the lungs may also be a portal of entry (10). In lepromatous patients with a high bacteriological index (BI), the nasal mucosa is typically so heavily colonized that these patients are known to shed large

numbers (an average of 10<sup>7</sup> per day) of viable bacteria through their nasal passages (11).

Thus, since it is likely that *M. leprae* interaction with airway epithelial cells plays a relevant role during the natural course of leprosy, studies on this subject deserve far more attention. Epithelial cells are important contributors to the mucosal innate response by producing an array of signal molecules responsible for modulating the adaptive immune response to microbial pathogens (for a review, see reference 12). A greater understanding of *M. leprae* interaction with these cells could lead to the design of more effective preventive tools to control the spread of the disease.

In the present study, the *in vitro* *M. leprae* infection of human alveolar cells, nasal epithelial cell lines, and human primary nasal epithelial cells was performed. It was seen that *M. leprae* actually invades these cells and that epithelial cells are capable of sustaining

Received 4 February 2013 Returned for modification 13 March 2013

Accepted 3 May 2013

Published ahead of print ●●●

Editor: J. L. Flynn

Address correspondence to Maria C. V. Pessolani, cpessola@ioc.fiocruz.br or Luiz E. Bermudez, luiz.bermudez@oregonstate.edu.

M.C.V.P. and L.E.B. contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00147-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.00147-13

bacterial survival. The surface proteome of nude mouse-derived *M. leprae* was determined, allowing the identification of potentially relevant molecules for *M. leprae*-epithelial cell interaction. Among these proteins, it was confirmed that the heparin-binding hemagglutinin (HBHA) and the histone-like protein (Hlp), previously described as two major mycobacterial adhesins (13, 14), are exposed on the surface of *M. leprae* and mediate bacterial adhesion to epithelial cells.

## MATERIALS AND METHODS

**Cell lines and culture conditions.** The A549 human alveolar pneumocyte type II cell line (ATCC CCL185; ATCC, Manassas, VA) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-F12 (ATCC) supplemented with 10% (vol/vol) serum-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco, Grand Island, NY). The RPMI 2650 human epithelial nasal septal cell line (ATCC CCL30) was grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM; Gibco) with 10% FBS. Cells were maintained in culture and, for the assays, were detached from the plastic via the use of Tryple Express (1×) with phenol red (Gibco) at 37°C. The cells were then centrifuged at  $2,000 \times g$  for 10 min at 4°C, counted in a Neubauer chamber, and plated onto tissue culture wells or flasks at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

**Isolation of human primary nasal epithelial cells.** The procedures described in this study were approved by the Pedro Ernesto University Hospital, the State University of Rio de Janeiro, and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) Ethical Committee located in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. All participants provided their written consent. Primary nasal epithelial cells were isolated from the nasal polyps of patients undergoing polypectomy for nasal clearing. These cells were then cultured as previously described (15). Briefly, the explants were washed with RPMI 1640 medium (Gibco) plus an antibiotic combination of 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 25 µg/ml amphotericin B. Next, the explants were cut into 2-to-3-mm-thick specimens and seeded onto type I collagen-coated circular glass coverslips in 24-well culture plates containing a defined RPMI 1640 medium (supplemented with 1 µg/ml insulin, 1 µg/ml transferrin, 10 ng/ml epithelial growth factor, 0.5 µg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml retinoic acid).

Cultures were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>-air mixture. Under these conditions, epithelial cells migrated from the explants, forming an outgrowth area around them. In 7 days, the cultures were ready for use. The medium was replaced every 2 days of culture. To determine culture purity, the cells were labeled with cytokeratin-19 (CK-19) (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) since this protein is present in the vast majority of the epithelial cells in the nasal cavity (16). Primary cells were fixed with 4% (wt/vol) paraformaldehyde (PFA) for 20 min at 4°C and permeabilized with 0.25% (vol/vol) Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 40 min at room temperature (RT). The cells were subsequently blocked with 5% (vol/vol) normal goat serum-PBS (blocking solution) overnight at 4°C. Afterwards, the cells were incubated with IgG1 mouse monoclonal primary antibody against human CK-19 (1:100) in blocking solution for 3 h at RT, washed 5 times with PBS, and then incubated for 2 h at RT with anti-mouse secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 555 goat IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) at a dilution rate of 1:100 in blocking solution. A control isotype (IgG1) was used as the control. Cell nuclei were labeled with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes) (1:10,000) for 1 min. The purity of epithelial cells was assessed on an Observer.Z1 inverted fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) in a set of 300 cells.

**Bacterial strains and growth conditions.** Live *M. leprae* (Thai-53 strain) isolated from infected nude mouse food pads was kindly provided by James Krahenbuhl (National Hansen's Disease Program, Laboratory Research Branch, Louisiana State University, Baton Rouge, LA) through the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) (Bethesda, MD) (contract no. 155262). For proteomic analysis, the bacteria were treated or not with 0.1 N sodium hydroxide (NaOH) before shipment, as previously described (17). In the other assays, only NaOH-

treated bacteria were used. The *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 strain was grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit) with 0.05% (vol/vol) Tween 80 and supplemented with 10% (vol/vol) OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). The mycobacteria were grown at 37°C under conditions of agitation until they reached an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.8. To determine CFU, the bacteria were cultivated in Middlebrook 7H11 (Difco) supplemented with 10% OADC and 0.5% (vol/vol) glycerol at 37°C for 4 days.

**Mycobacterium staining.** *M. leprae* was stained with fluorescent dyes using a PKH26/67 fluorescent cell linker minikit for general cell membrane labeling according to the recommendation of the manufacturer (Sigma, St. Louis, MO). Briefly, *M. leprae* bacilli ( $1 \times 10^9$ ) were suspended in 1.0 ml of the provided "diluent C" and then stained for 2 min at RT with a 1:250 dilution of either PKH26 (red) or PKH67 (green) dye. The staining was halted after 2 min by adding an equal volume of PBS. The suspension was washed ( $10,000 \times g$  for 5 min) twice in PBS, and the numbers of bacteria were recounted following staining by the Shepard's direct count method (18).

**Determination of *M. leprae* viability.** The membrane integrity of individual *M. leprae* bacteria in suspension was evaluated via the use of a Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes). *M. leprae* bacteria ( $2 \times 10^7$ ) were washed twice ( $10,000 \times g$  for 5 min) in PBS and incubated for 15 min at RT in 6 µM Syto9 (green dye) and 30 µM propidium iodide (PI) (red dye). The bacteria were washed twice with PBS, and the pellet was suspended in 20 µl of 10% (vol/vol) glycerol in normal saline solution followed by placement of 5 µl of the suspension on a glass slide with an 18-mm<sup>2</sup> glass coverslip. The dead and live bacteria were enumerated by direct counting of the fluorescent green and red bacilli under a fluorescence microscope using the appropriate single-bandpass filter sets. The excitation/emission maxima are 480 nm/500 nm for Syto9 and 490 nm/635 nm for PI. A total of 200 bacteria were counted in duplicate.

**In vitro binding and invasion assays.** RPMI 2650 and A549 cells were infected with live *M. leprae* at a multiplicity of infection (MOI) of 10 at different time intervals: 2 h, 4 h, 6 h, and 24 h. Unless otherwise mentioned, all experiments performed with live *M. leprae* were conducted at 33°C to preserve bacterial viability (19). The cells were then washed 6 times with PBS and fixed with 4% PFA, after which they were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA)-PBS for 30 min. Cells were labeled for 20 min with fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (Sigma) (1:40 dilution)-1% BSA-PBS and washed 3 times with PBS to remove the excess dye. Cell nuclei were stained with DAPI (1:10,000). The ability of *M. leprae* to invade and attach epithelial cells was investigated by confocal microscopy. At a determined time point, the sum of the numbers of adherent and internalized bacteria represented the total number of bacteria that interacted with the cells. A set of 300 cells was examined for the presence of *M. leprae*. In addition, the percentage of infected cells was calculated as follows: number of infected cells/300 cells  $\times$  100. Live and dead bacteria were compared with respect to their ability to bind and invade epithelial cells.

Prior to these experiments, an aliquot of freshly harvested *M. leprae* was heat killed at 60°C for 30 min (19). The cells were infected with live and dead bacteria at 33°C for 24 h at an MOI of 10. *M. leprae* binding and invasion in epithelial cells were determined by confocal microscopy after FITC-phalloidin and DAPI staining. To evaluate the effect of the cytoskeleton inhibitors on bacterial internalization, monolayers of A549 and RPMI 2650 cells were pretreated with 3 µM cytochalasin B (Sigma) or 10 µM colchicine (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) 1 h prior to infection. Next, the cells were infected with *M. leprae* for 24 h at 33°C. The inhibitors were present during the entire assay. Control cultures were treated with dimethyl sulfoxide (DMSO), the vehicle used for cytochalasin B and colchicine solutions. Subsequently, the cells were washed 6 times, fixed with 4% PFA, and labeled with FITC-phalloidin and DAPI as described above.

Finally, to determine whether *M. leprae* is able to bind and invade human primary nasal epithelial cells, they were incubated with gamma-irradiated bacteria for 2 h at 37°C at an MOI of 10. For analysis by confocal microscopy, the cells were both immune labeled with anti-CK19 and labeled with DAPI as described above.

**Determination of cellular phagocytic activity.** To verify the uptake activity of RPMI 2650 and A549 cells, 1- $\mu$ m-diameter red fluorescent beads were used (Molecular Probes). Briefly, the beads were incubated with cells for 2 to 6 h at two different temperatures: 4°C and 37°C. The cells were then washed 6 times with PBS and detached with a cell scraper. The percentages of labeled cells were determined by flow cytometry (BD Accuri C6 flow cytometer; BD Biosciences, San Jose, CA). Labeled cells at 4°C were considered to have attached beads only, while labeled cells at 37°C were considered to have both attached and internalized beads. To determine the percentage of cells with internalized beads, the following formula was used: % cells with internalized beads = % labeled cells at 37°C - % labeled cells at 4°C. Moreover, the median fluorescence intensity (MFI) of cells with internalized beads was determined as follows:  $MFI_{\text{internalized beads}} = MFI_{37^{\circ}\text{C}} - MFI_{4^{\circ}\text{C}}$ .

**M. leprae survival assays within epithelial cells.** RPMI 2650 and A549 cells ( $2 \times 10^6$  per well of a 6-well plate) were infected with live *M. leprae* at 33°C at an MOI of 10 at different time points: 1, 4, 8, or 10 days. By the same token, A549 cells were infected with *M. leprae* at 37°C at the same time points. Prior to infection, *M. leprae* viability (also referred to as “initial viability”) was determined. *M. leprae* bacilli were simultaneously incubated in cell-free media as a control. Cells were washed 6 times with PBS to remove any noninternalized bacteria and then lysed with 10% glycerol–1% Triton X-100–1% Tween 20 (lysis buffer) for 5 min to release intracellular bacteria. In addition, unattached bacteria were recovered during the washing steps (extracellular *M. leprae*). A broken-cell extract was centrifuged for 1 min at  $300 \times g$  to remove cell debris. The supernatant was harvested and centrifuged again at  $13,500 \times g$  for 10 min and the pellet washed 3 times to remove the lysis buffer. Finally, *M. leprae* cells were stained using a Live/Dead BacLight bacterial viability kit. The percentage of *M. leprae* intracellular viability was compared with the viability of extracellular bacteria and *M. leprae* cell-free media. A total of 200 bacteria were counted in duplicate to calculate viability.

**Assays with recombinant M. leprae proteins.** The recombinant *M. leprae* proteins heparin-binding hemagglutinin (HBHA) and histone-like protein (Hlp) were obtained as described previously (20, 21). Red polystyrene fluorescent beads (1.0  $\mu$ m diameter) were coated with recombinant *M. leprae* Hlp (50  $\mu$ g/ml), *M. leprae* HBHA (50  $\mu$ g/ml), or BSA (50  $\mu$ g/ml) for 3 h at RT in 0.2 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The beads were washed 3 times to remove unbound protein and then blocked with 2% BSA for 2 h. A549 and RPMI 2650 cells ( $7 \times 10^4$  cells per well) were cultured in 24-well plates containing glass slips. The beads were then added to the cells (100:1 ratio) for 1 h at 37°C. Cells were washed 6 times with PBS and fixed with 4% PFA for 20 min at 4°C. The cells were observed using phase-contrast microscopy and white light to visualize the cells and a fluorescence filter with appropriate single-bandpass filter sets to see the beads. The excitation/emission maxima were 480 nm/500 nm. In this assay, 300 cells were counted in duplicate. Alternatively, *M. smegmatis* bacteria were pretreated with these proteins. The bacteria were first centrifuged at  $16,000 \times g$  for 10 min and then washed with PBS to remove any remaining media. This procedure was performed 2 more times. The bacteria were subsequently treated with 50  $\mu$ g/ml of Hlp or HBHA for 2 h at 37°C and then centrifuged at  $16,000 \times g$  for 10 min and washed with PBS to remove unbound proteins. The washing step was repeated 2 more times. Confluent cells ( $10^5$  per well in 24-well plates) were infected with  $10^6$  CFU bacteria at 37°C. The bacteria were released after incubation with 500  $\mu$ l of 0.1% Triton X-100–PBS for 5 min. The viable bacteria were serially diluted in PBS and then plated onto 7H11 agar plates at 37°C for 4 days for CFU quantification. To check whether Hlp and HBHA of *M. leprae* were able to bind to the cell surface of *M. smegmatis*, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed. The bacteria were

suspended with carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6), and 100  $\mu$ l was added to 96-well plates at 4°C overnight. Untreated bacteria were used as controls. The wells were washed 4 times with PBS and blocked with 2% BSA–PBS for 2 h at 37°C. After blocking, the wells were washed four times and then incubated with primary mouse monoclonal antibody VEF4 against HBHA (1:1,000) in a blocking solution for 2 h at 37°C. To detect Hlp, the wells were incubated with 5G9 primary mouse monoclonal antibody under the same conditions described for antibody VEF4. Subsequently, secondary anti-mouse peroxidase (1:1,000) was used to detect the immunocomplex for 1 h at 37°C. Secondary antibody was diluted in the blocking solution. Tetramethyl benzidine (TMB; 100  $\mu$ l) was added to the wells, and the reaction was stopped with 50  $\mu$ l of 2.5 N sulfuric acid. The plates were read at a wavelength of 450 nm by using an automatic microplate-scanning spectrophotometer (Spectramax 190; Molecular Devices).

**Transmission electron microscopy.** For electron microscopy, RPMI 2650 and A549 monolayers infected with *M. leprae* at 24 h were washed 6 times with PBS and then detached with a cell scraper. Subsequently, the cells were washed 3 times with cold 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) and fixed with 2.5% (vol/vol) glutaraldehyde and 1.5% PFA (diluted in the potassium phosphate buffer) overnight at 4°C. After the fixation process, the cells were washed again in the same buffer. The samples were postfixed in cold 1% osmium tetroxide–phosphate buffer for 90 min and dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections (80 nm) were cut out of blocks, mounted on grids, and stained with uranyl acetate and lead citrate before examination via the use of a FEI Tecnai G2 transmission electron microscope operating at 80 kV. The images were captured at the Oregon University High Tech Extension Service (Corvallis, OR).

**Confocal microscopy.** Preparations were examined using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope equipped with a Plan Apochromat 40 $\times$  or 100 $\times$  objective (Carl Zeiss, Thornwood, NY) and a CoolSNAP-Pro CF digital camera in conjunction with Axion Vision Version 4.7.2 software (Carl Zeiss). The images were edited using AxioVision software. Images were acquired, colored, and merged via the use of LSM 510 Zeiss software. Argon and neon-helium lasers (Melles Griot) emitting at 488, 543, and 633 nm were used. Pictures of 20 to 40 confocal planes through the cell (z-stack) with a step size of 0.2 to 0.3  $\mu$ m were taken with a 1,000 $\times$  objective every 30 s for 5 to 10 min via the use of LSM image software. For some experiments, z-stacks of images were captured, processed, and rendered by the use of an LSM imaging system (Carl Zeiss).

**Mouse infection.** C57BL/6 strain mice were briefly anesthetized with isoflurane, and 10  $\mu$ l of bacterial suspension ( $10^7$  cells) was delivered to each nostril with a protein gel-loading tip. The course of infection was followed at different time points: 4 h, 4 days, 10 days, and 20 days. Euthanasia was performed using CO<sub>2</sub> exposure. A total of 20 mice were used in this study: 6 mice were used for each of the first 2 time points and 4 mice were used for each of the latter time points. The heads and lungs were recovered and fixed in 1% formaldehyde. Following fixation, the heads were decalcified and processed as described previously (22). Then, the head and lung tissues were embedded in paraffin and stained using Ziehl-Neelsen stain and hematoxylin and eosin (H&E), as previously reported (23). This study was approved by Oregon State University Animal Care and Use Proposal (ACUP/4309).

**Biotinylation and purification of M. leprae cell surface-exposed proteins.** Live, freshly harvested *M. leprae* bacilli were treated or not with 0.1 N NaOH and then incubated with 1 mg/ml of NHS-LC-biotin (Pierce) for 20 min at 23°C. The reaction was stopped by the use of 5 mM glycine–PBS, and bacterial cells were washed 3 times with PBS. Bacteria were lysed, and biotinylated proteins were purified with streptavidin-magnetic microspheres, as previously described (24). Samples were resuspended in 50  $\mu$ l ammonium bicarbonate and digested with Trypsin Gold and ProteaseMAX (Promega, Madison WI), according to the manufacturer's instructions. Nonbiotinylated bacteria were included as negative controls to eliminate unspecific background and endogenously biotinyl-



ated proteins. Data from negative controls were pooled to create a master list of false-positive identifications. These proteins were then subtracted from the experimental data sets. The negative-control master list is included as Table S4 in the supplemental material.

**Peptide purification and LC-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis.** Digested peptides were purified and desalted on Vivapure C<sub>18</sub> microspin columns according to the instructions of the manufacturer (Sartorius, Goettingen, Germany). The samples were dehydrated by the use of a speed vacuum and suspended in 500 ng/μl of 5% acetonitrile (ACN)–0.1% formic acid (FA). Peptides were separated using liquid chromatography (LC) with a NanoAcquity UltraPerformance LC (UPLC) system (Waters) and then delivered to an LTQ Velos dual-pressure linear ion-trap mass spectrometer (Thermo Fisher) by electrospray ionization with a captive spray source (Microm Biosciences). A binary gradient system consisting of solvent A (0.1% aqueous FA) and solvent B (ACN containing 0.1% FA) was used as described previously (24). A normalized collision energy value of 30% was adopted.

**Database search.** An *M. leprae* database was created by combining protein sequences from *M. leprae* (taxon no. 1769; 2,327 sequences) and *M. leprae* strain Br4923 (taxon no. 561304; 1,599 sequences) obtained from UniProt (2011.08). The duplicate entries were removed, resulting in a total of 2,430 proteins. Reversed databases were used to estimate error thresholds (25). The database sequences along with their reversed sequences were appended to 179 common contaminant sequences and their reversed forms to create a final database of 5,218 sequences. Database processing was performed via the use of the python scripts available at <http://www.ProteomicAnalysisWorkbench.com>. The average parent ion-mass tolerance value was 2.5 Da. The monoisotopic fragment ion-mass tolerance value was 1.0 Da. The ion series used in scoring were b and y. A static modification of +57 Da was added for all cysteine residues. Variable modifications of +16 Da on methionine residues and 339.2 Da (biotin) on lysine residues were also allowed, with a maximum of 3 modifications per peptide. RAW data from the mass spectrometer were converted into DTA files representing individual MS2 spectra using extract\_msn.exe (version 5.0; Thermo Fisher). The group scan minimum count was 1, and a minimum of 25 ions were required while the mass tolerance for combining DTAs was set at a very small value (0.0001 Da). A linear discriminant transformation was used to improve the identification sensitivity of the SEQUEST analysis (25, 26); SEQUEST scores were combined with the linear discriminant function scores; and discriminant score histograms were created separately for each peptide charge state (1+, 2+, and 3+), number of tryptic termini (0, 1, or 2), and modification state (unmodified or M +16 modified). The score histograms for reversed matches were used to estimate the peptide false-discovery rates (FDR) and set score thresholds for each peptide class that achieved the desired peptide FDR (typically 1% unless noted otherwise). Peptide-to-protein mapping and protein filtering were performed using PAW\_results\_6.py (version 6.1). The in-house Python scripts have been described previously (27). The overall probability of protein identification was calculated by dividing the total number of MS/MS spectra matching the protein by the total number of matching MS/MS spectra unique to the protein. The surface-exposed *M. leprae* proteins were functionally classified according to the Leproma database annotations. The Tuberculist database was also used to determine *M. tuberculosis* homologs.

**Statistical analysis.** To compare three or more groups under different conditions, one-way analysis of variance (ANOVA) was used followed by the Bonferroni *posttest*. For conducting comparisons between two sets of conditions, a Student *t* test was used. Data analysis was performed using the GraphPad InStat program (GraphPad Software, San Diego, CA), and *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

***M. leprae* attaches to and enters nasal and alveolar epithelial cells.** Confocal microscopy was used to investigate whether *M. leprae* is able to interact with nasal epithelial cells (RPMI 2650)

and alveolar epithelial cells (A549). The results are expressed as the numbers of associated (adherent plus internalized) bacteria in a set of 300 cells (Fig. 1 and 2). Live *M. leprae* bacilli were able to attach to and enter both cell types. However, while only very few bacilli were able to interact with RPMI 2650 cells even after 24 h of incubation (61.6 bacteria ± 2.3/300 cells), the amount of associated bacteria in A549 cells was much greater at the same time point (633.2 bacteria ± 134.3/300 cells) (Fig. 1B and 2B). In RPMI 2650 cells, no increase in binding or invasion was observed between 2 h and 6 h of incubation, even though the number of internalized as well as adherent bacteria roughly doubled at 24 h (Fig. 1). On the other hand, the number of bacteria that adhered to and entered A549 cells significantly increased over the same time period, reaching saturation as early as 6 h postinfection (Fig. 2D). Similar results were obtained when the percentages of cells with associated bacteria were determined. At 2 h postinfection, 6% ± 0.9% and 51.3% ± 8.6% of bacterium-associated RPMI 2650 and A549 cells, respectively, were observed. An increase in the level of RPMI 2650 cells with associated bacteria was seen only 24 h postinfection (15.5% ± 1.5%), whereas most A549 cells showed associated bacteria at 6 h after infection (95% ± 0.5%) (Fig. 1E and 2E).

It was then decided to compare the interactions of inert particles of latex beads with RPMI 2650 and A549 cells. Both the nasal and alveolar cells were incubated with fluorescent beads at 37°C and 4°C followed by the determination of the percentages of cells with adherent (4°C) as well as internalized beads (% labeled cells at 37°C – % labeled cells at 4°C) by flow cytometry. A significant difference was observed only after 2 h of incubation, and the difference dissipated at 6 h (see Fig. S1A and C in the supplemental material). Similar results were obtained when the median fluorescence intensity (MFI) was determined (Fig. S1D). A549 and RPMI 2650 cells displayed similar levels of MFI after 2 and 6 h of incubation, indicating that the two types of cells engage in similar endocytic activities. Thus, the higher association of *M. leprae* to alveolar epithelial cells at 6 h and later time points cannot be explained by the higher endocytic activity of these cells, suggesting higher intrinsic affinity on the part of this pathogen with these cells.

Finally, transmission electron microscopy was performed to visualize intracellular *M. leprae*. A549 and RPMI 2650 cells were infected with live *M. leprae* for 24 h and then processed for electron microscopy. As shown in Fig. 3, *M. leprae* (arrows) can be seen inside membrane-bound compartments (arrowheads) in both cell types but was present at higher numbers in the A549 cells. In some images, bacteria were seen to apparently float freely within the cytoplasm. Therefore, these data confirm the results obtained by confocal microscopy showing that *M. leprae* is indeed able to effectively enter airway epithelial cells.

***Ex vivo* and *in vivo* *M. leprae* infection of airway epithelial cells.** As a next step, human primary nasal epithelial cells were successfully isolated from nasal polyps (Fig. 4A and B), and the ability of *M. leprae* (arrow) to interact with these cells was investigated by confocal microscopy (Fig. 4C). *M. leprae* was able to enter primary nasal epithelial cells after 2 h of interaction (21.2 ± 7 bacteria/300 cells) (Fig. 4D). Longer incubation times (6 h and 24 h) did not increase the number of associated bacteria (data not shown).

To further validate these *in vitro* findings, C57BL/6 mice were challenged intranasally with *M. leprae* to evaluate whether the bacteria interact *in vivo* with airway epithelial cells. As summarized in

F1-2

F3

F4

AQ: G

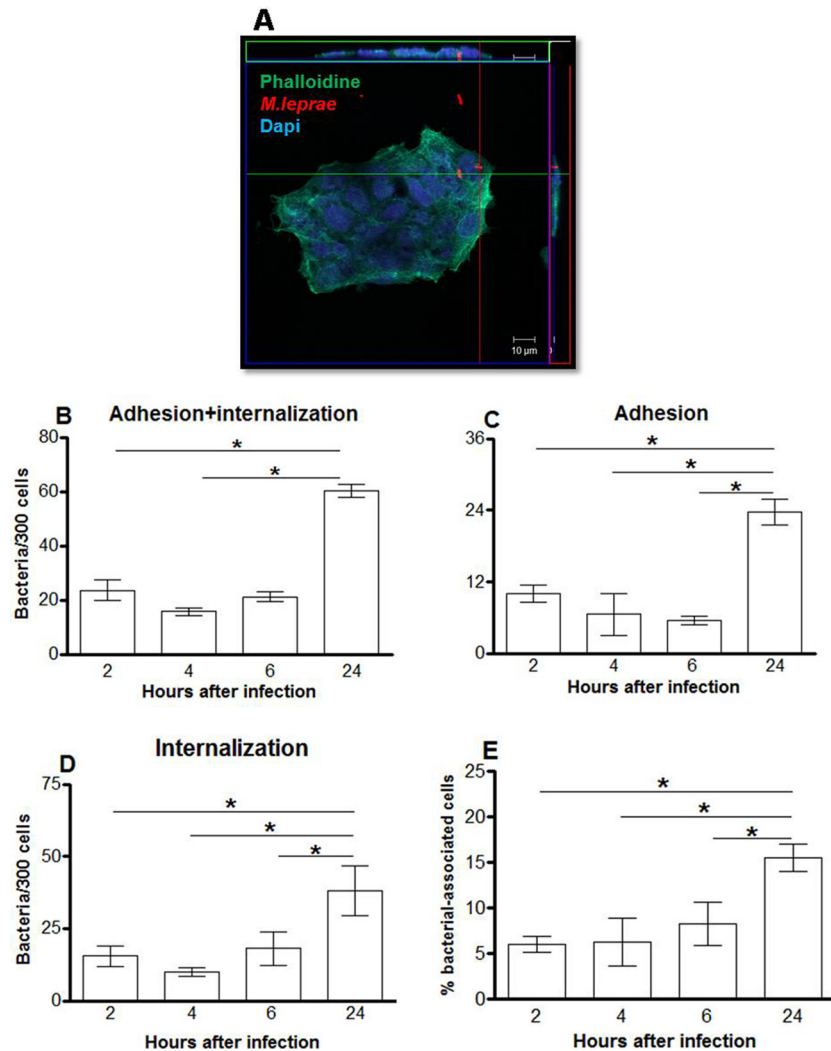


FIG 1 *M. leprae* enters the nasal epithelial cell lineage RPMI 2650. Nasal epithelial cells were infected with live *M. leprae* at an MOI of 10 at 33°C at different time points. The bacteria were labeled with PKH26 (red), and the monolayers were stained with DAPI (blue) and FITC-phalloidin (green). (A) Representative confocal image of 4 independent experiments showing live *M. leprae* bacilli interacting with RPMI 2650 cells at 24 h of infection. (B, C, and D) Numbers of bacteria that interact with (B), adhere to (C), and enter (D) nasal epithelial cells. (E) Percentages of bacterium-associated cells. Data represent the means  $\pm$  standard deviations (SD) of the results of 4 experiments performed in duplicate. \*,  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

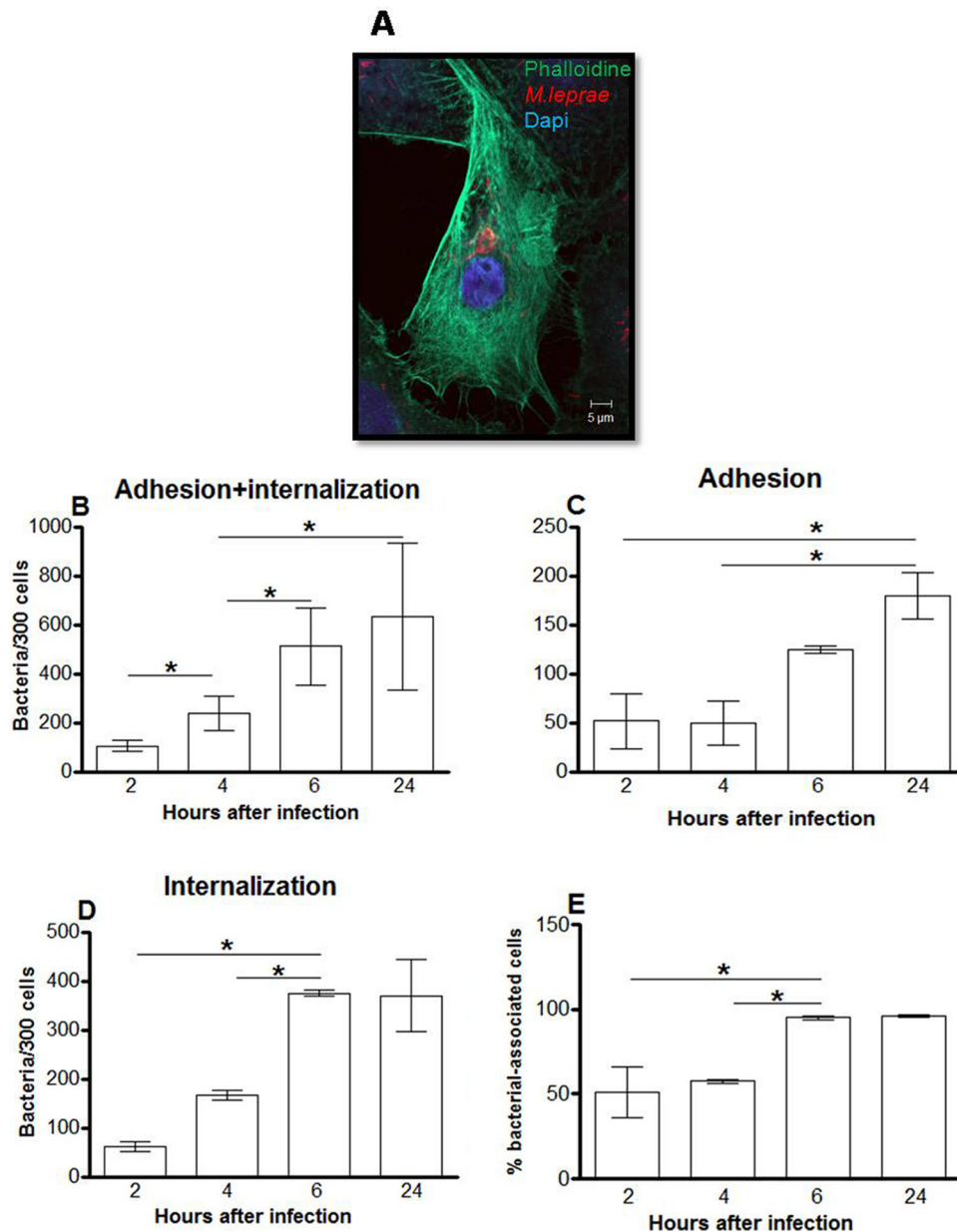
ROLOG

T1 Table 1, only a few bacteria were observed in only a couple of animals at early postinfection time points. *M. leprae* was found in 2 of 6 mice in parabronchiolar and bronchiole lumens and also in terminal bronchioles at 4 h of infection and in 1 of 6 mice on day 4 of infection. Interestingly, some acid-fast bacteria (arrows) were observed inside macrophages and, apparently, in pulmonary epithelial cells (Fig. 5). At later time points, no acid-fast bacilli were found in the lungs. However, no mycobacteria were seen in nasal mucosa even at earlier time points and, in fact, no visible lesions were found in the nose or lungs at any time point. These results suggest that airway epithelial cells, especially lung cells, are susceptible to infection during *in vivo* airborne exposure to *M. leprae*.

F5 ***M. leprae* internalization is a passive process dependent on host-cell cytoskeleton machinery.** Since *M. leprae* is able to enter epithelial cells, which seems to occur during the early stages of airborne exposure to the pathogen, the mechanisms involved in the *M. leprae* entrance process were investigated. To determine

whether *M. leprae* internalization in epithelial cells is an active or passive process, *M. leprae* was heat killed at 60°C for 30 min and then used to interact with nasal and alveolar cells. After 24 h of infection, the samples were analyzed by confocal microscopy and the numbers of binding and internalized bacteria in 300 cells were determined (Fig. 6). It was shown that *M. leprae* viability did not affect bacterial attachment and uptake, since the differences between live and dead bacteria were not statistically significant in these sets of cells ( $P = 0.3068$  for RPMI 2650 cells [Fig. 6A] and  $P = 0.6267$  for A549 cells [Fig. 6B]). In addition, the percentage of cells infected with live or dead *M. leprae* was calculated (Fig. 6C and D). However, no difference between the percentages of cells associated with live and with dead bacteria was found. In the context of RPMI 2650 cells, 12.5%  $\pm$  2.8% were infected with live *M. leprae* whereas 13.3%  $\pm$  5.8% showed internalized dead bacteria ( $P = 0.846$ ) (Fig. 6C). In the context of A549 cells, practically all cells showed (either live or dead) internalized *M. leprae* ( $P =$

F6

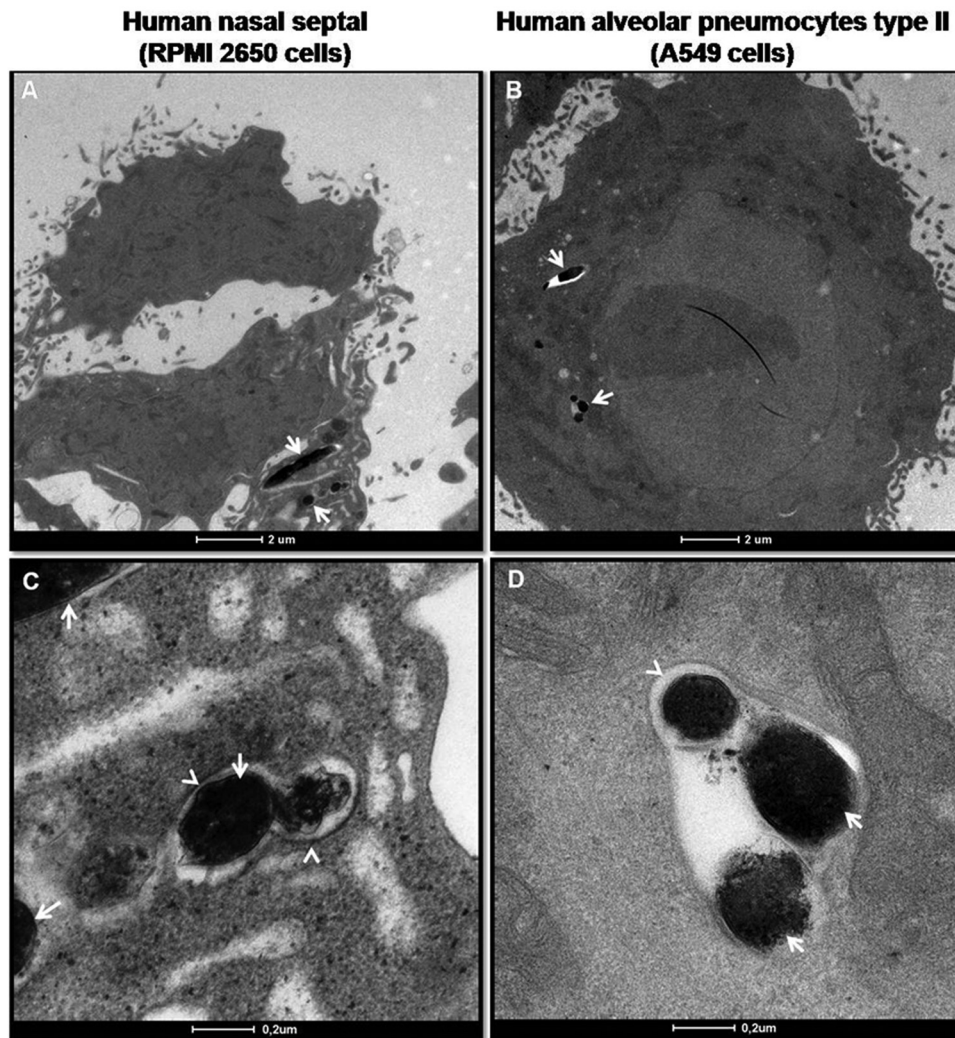


**FIG 2** *M. leprae* enters the alveolar epithelial cell lineage A549. Alveolar epithelial cells were infected with live *M. leprae* at an MOI of 10 at 33°C at increasing incubation times. The bacteria were labeled with PKH26 (red), and the cells were stained with DAPI (blue) and FITC-phalloidin (green). (A) Representative fluorescent image of 4 independent experiments showing live *M. leprae* bacilli interacting with A549 cells at 24 h of infection. (B, C, and D) Numbers of bacteria that interact with (B), adhere to (C), and enter (D) alveolar epithelial cells. (E) Percentages of bacterium-associated cells. Data represent the means  $\pm$  standard deviations of the results of 4 experiments performed in duplicate. \*,  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

0.5185) (Fig. 6D). These results indicate that *M. leprae* enters epithelial cells through a passive process that depends on its ability to adhere to these cells via the use of preexisting surface bacterial components.

The host-cell cytoskeletal involvement in the bacterial uptake process was then examined by treating these cells with the drugs cytochalasin B and colchicine. Cytochalasin B is a fungal metabolite that binds to actin, causing inhibition of polymerization and depolymerization (28). Likewise, colchicine is an alkaloid that completely inhibits microtubule self-assembly (29). These drugs have been extensively administered in an attempt to more fully

understand the roles played by actin and tubulin in bacterial invasion (30–32). The effect of these drugs was observed at 24 h of infection since at that time point most of the bacteria would be located inside the cells. Our data showed that the number of *M. leprae* inside the cells decreased by half when the RPMI 2650 lineage was treated with cytochalasin B (Fig. 6E; RPMI 2650 + DMSO = 48 bacteria  $\pm$  2.7/300 cells and RPMI 2650 + cytochalasin B = 21.25 bacteria  $\pm$  2.5/300 cells [ $P = 0.002$ ]). The same effect was also observed when the cells were treated with colchicine (Fig. 6E; RPMI 2650 + DMSO = 48 bacteria  $\pm$  2.7/300 cells and RPMI 2650 + colchicine = 22 bacteria  $\pm$  0.5/300 cells [ $P =$



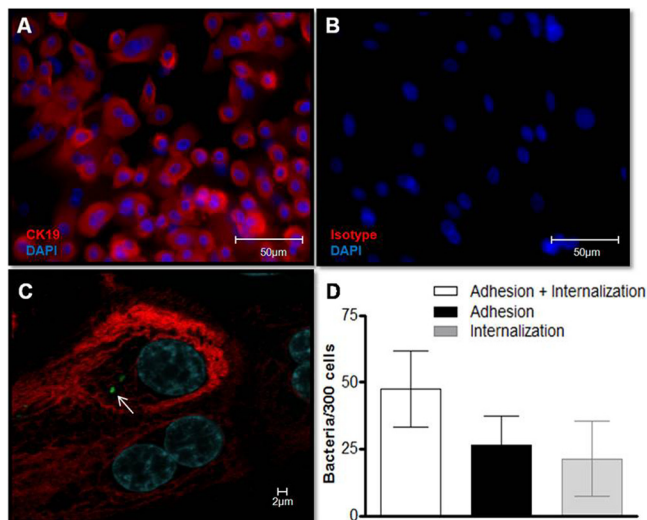
**FIG 3** Transmission electron micrographs of *M. leprae*-infected epithelial cells. Epithelial cells were infected with live *M. leprae* for 24 h at 33°C. RPMI 2650 (A and C) and A549 (B and D) cells were fixed, processed, and visualized by transmission electron microscopy. The arrows point to bacteria; the arrowheads point to the membrane-bound compartments.

0.001]). In A549 cells, treatment with these inhibitors also decreased *M. leprae* entry (Fig. 6F; A549 + DMSO = 150.8 bacteria  $\pm$  28.8/300 cells and A549 + cytochalasin B = 27.5 bacteria  $\pm$  9.2/300 cells [ $P = 0.001$ ]; A549 + colchicine = 39.2 bacteria  $\pm$  7.7/300 cells [ $P = 0.001$ ]). In summary, *M. leprae* adhesion was not affected by the inhibitors, showing that their use affected only bacterial internalization. Moreover, as monitored by trypan blue staining, no toxic effect of the inhibitors was observed (data not shown). These results are strong indicators that *M. leprae* enters nasal and alveolar epithelial cells in a microtubule- and microfilament-dependent manner.

**The intracellular environment of nasal and alveolar epithelial cells supports *M. leprae* survival.** Another important issue to investigate in the context of *M. leprae* interaction with epithelial cells was the capacity of these cells to support bacterial survival. Cultures were infected with live *M. leprae*, and bacterial viability was monitored for up to 10 days via the use of a Live/Dead BacLight bacterial viability kit. The viability of intracellular bacteria was compared with that of bacteria recovered from the washing steps (extracellular *M. leprae*) and with that of bacteria kept in

cell-free medium (axenic medium). These assays were performed at 33°C since this temperature has been shown to be optimal for *in vitro* *M. leprae* survival (19).

Intracellular *M. leprae* in RPMI 2650 cells showed significantly higher viability on day 10 of infection than the *M. leprae* kept in a cell-free medium (66.4%  $\pm$  2.5% viability versus 33.76%  $\pm$  3.9%;  $P = 0.0004$ ) (Fig. 7A). The viability of extracellular *M. leprae* was the same as that of *M. leprae* incubated in a cell-free medium. In A549 cells, on days 8 and 10, the viability of intracellular *M. leprae* was significantly higher than the viability of extracellular bacteria (77.29%  $\pm$  4.2% viability versus 52%  $\pm$  4.8% [ $P = 0.017$ ] and 77.48%  $\pm$  4.87% versus 47.2%  $\pm$  4.6% [ $P = 0.0014$ ], respectively) (Fig. 7B). Again, similar viability results were observed when extracellular *M. leprae* and *M. leprae* kept in axenic medium were compared. No differences were observed at earlier time points of incubation. Moreover, when the viability of intracellular bacteria on day 10 was compared with the viability on day 1 of infection, no significant difference ( $P = 0.1$ ) was found, suggesting that the epithelial cells were able to maintain *M. leprae* viability for at least 10 days.



**FIG 4** *M. leprae* enters human primary nasal epithelial cells. (A) Primary nasal epithelial cells were isolated from nasal polyps, and culture purity was determined by immunostaining with anti-cytokeratin-19 (CK-19) (red). Cell nuclei were labeled with DAPI (blue). (B) Isotype control. (C and D) Cells were infected with pre-labeled PKH67 gamma-irradiated *M. leprae* at an MOI of 10 at 37°C for 2 h. (C) Representative confocal image of 4 independent experiments showing nasal primary cells infected with *M. leprae* (green; arrow). (D) The numbers of bacteria that interact with, adhere to, and enter primary nasal epithelial cells were determined. Data represent the means  $\pm$  standard deviations of the results of 4 experiments performed in duplicate.

These data suggest that the airway epithelial cells may act as a reservoir and/or portal of entry for *M. leprae*. However, the normal temperature in human lungs is 37°C, an unfavorable condition for *M. leprae* survival (19). So, to validate the pulmonary epithelial cells as a colonizable tissue during *M. leprae* infection, identical viability assays with A549 cells were conducted at 37°C instead of 33°C (Fig. 7C). Interestingly, the viability of both intracellular and extracellular *M. leprae* bacilli was close to zero on day 10 of infection at 37°C. However, about 47.7%  $\pm$  9.5% of intracellular bacteria remained viable after 4 days of incubation, in contrast to the viability of 7.7%  $\pm$  4.9% ( $P = 0.02$ ) displayed by extracellular bacteria under the same conditions. Bacteria in a cell-free medium also presented a faster decrease in viability than intracellular *M. leprae*.

Altogether, our data suggest that nasal epithelial cells may constitute an appropriate intracellular niche for *M. leprae* survival whereas pulmonary epithelial cells may act as a portal of entry but also as a bacterial reservoir.

**The *M. leprae* cell-surface proteome reveals an array of potential adhesin candidates.** Bacteria express adhesive molecules on their surfaces that promote interaction with host-cell receptors or with soluble macromolecules and their subsequent attachment to and successful colonization of the host. Due to their critical role in infection, the molecular characterization of adhesins has been a successful strategy in designing new therapeutic tools and/or vaccine candidates for the control of several infectious diseases (33).

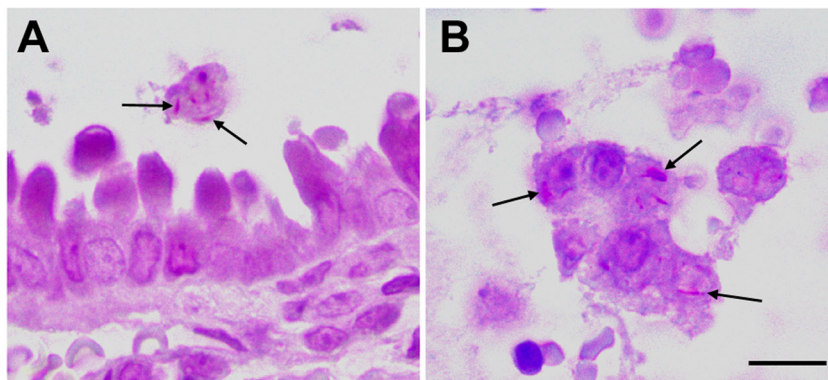
So, to identify the potential *M. leprae* adhesins involved in the interaction with nasal and alveolar epithelial cells, a cell-surface proteomic analysis of *M. leprae* isolated from nude mice footpads was performed. Both crude and NaOH-treated *M. leprae* bacilli were submitted to analysis. A total of 279 surface proteins were identified. Among these proteins, 85 were found solely in crude *M. leprae*, 79 were detected only in the NaOH-treated bacteria, and 115 were identified in both samples (Fig. 8). The identified proteins are listed in Tables S1, S2, and S3 in the supplemental material.

Seven of the identified proteins, ML0458c, ML1553, ML1795, ML2088c, ML2346, ML2347 and ML2498, do not have homologs in *M. tuberculosis* (34). Two proteins not previously described in the *M. leprae* proteomic analysis were identified: a possible oxidoreductase (ML2276c; *ml2276c*) and a conserved hypothetical protein (ML2309; *ml2309*) (see Table S3 in the supplemental material). Figure 8 also details the functional categories of these proteins. Note the greater enrichment of proteins categorized as participants in the cell wall and cell processes in addition to lipid metabolism as opposed to those classified as being involved in the intermediary metabolism and respiration observed in NaOH-treated versus crude bacteria.

Table 2 lists 11 *M. leprae* surface-exposed proteins previously identified as potential mycobacterial adhesins. Most (8 proteins) were identified in both crude and NaOH-treated bacteria. Of note was the confirmed presence of 2 well-known mycobacterial adhesins, Hlp (ML1683c; *hupB*) and HBHA (ML2454c; *hbhA*), on the *M. leprae* surface. Another interesting finding was the presence of mammalian cell entry 1A (*mce1A*) (ML2589; *mce1A*) on the surface of *M. leprae*. In contrast to the wild-type phenotype, recombinant *Escherichia coli* expressing the *M. tuberculosis* *mce1A* protein has been shown to invade epithelial cells (35). Furthermore, previous studies with recombinant *mce1A* of *M. leprae* showed that this protein increased polystyrene-bead interaction with nasal and bronchial epithelial cells but not with dermal keratinocytes, reinforcing the idea that the *mce1A* gene product has the capacity to mediate *M. leprae* entry into respiratory epithelial

**TABLE 1** Detection of *M. leprae* in the respiratory tract of C57BL/6 mice after intranasal challenge with 10<sup>7</sup> bacilli

Time of infection	Total no. of mice	No. of mice infected with visible acid-fast bacilli	Infected tissues and cells (Ziehl-Nielsen staining)	H&E staining result
4 h	6	2	Acid-fast bacilli in terminal bronchioles and circumjacent lung tissue; bacilli were observed inside epithelial cells and macrophages	No visible lesions
4 days	6	1	Infected macrophages in lung tissue	No visible lesions
10 days	4	0		No visible lesions
20 days	4	0		No visible lesions

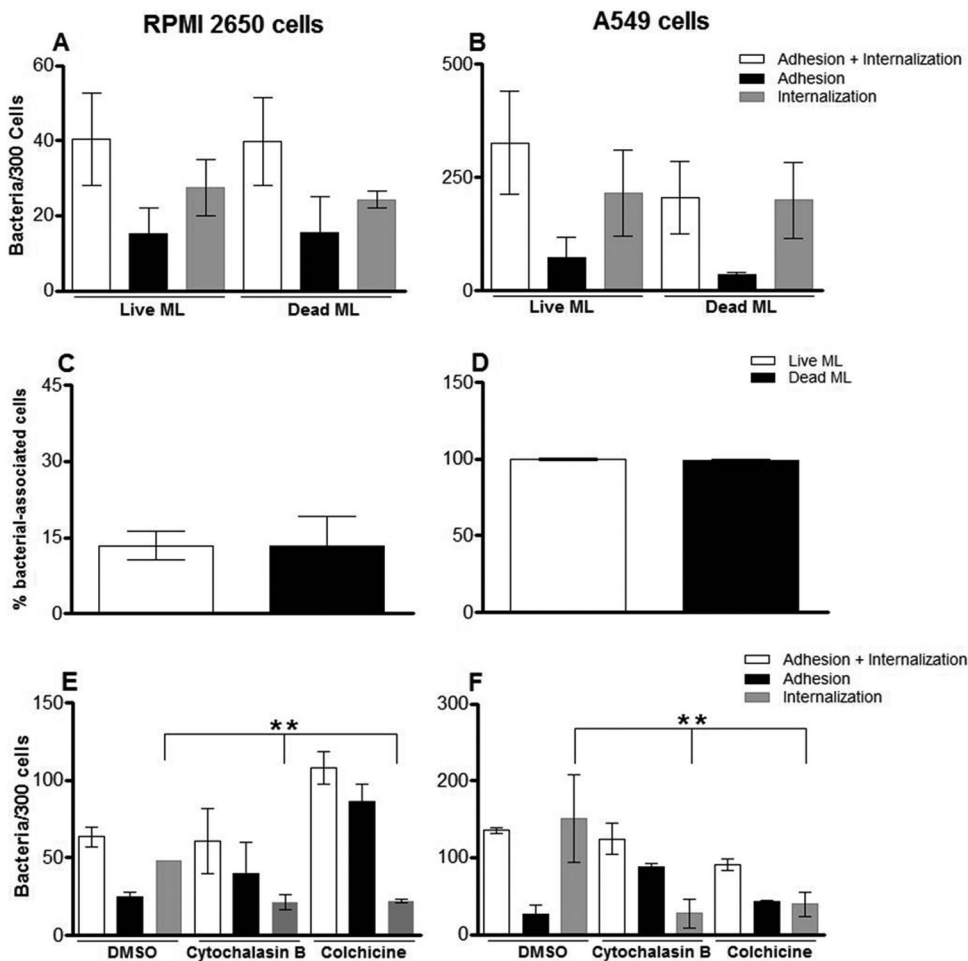


**FIG 5** *M. leprae* infects respiratory tract cells *in vivo*. C57BL/6 mice were intranasally challenged with *M. leprae*. Airway and lungs were monitored by histological examination for detection of bacteria and lesions. The images show terminal bronchiole and circumjacent lung tissue after 4 h of infection. Acid-fast bacilli (arrows) in luminal macrophages (A) and in shed epithelial cells (B) are shown. Bars, 10  $\mu$ m (A) and 5  $\mu$ m (B).

cells (36). Superoxide dismutase (ML0072c; *sodA*) has also been suggested to be potentially able to interact with human respiratory epithelial cells in the context of *M. avium* (37).

Malate synthase (ML2069), an enzyme involved in the glyoxy-

late pathway, was also found on the *M. leprae* surface. This protein has been shown to localize on the *M. tuberculosis* cell surface and to bind laminin acting as an adhesin (38–41). Antigen 85B (ML2028), also detected on the *M. leprae* surface in confirmation



**FIG 6** *M. leprae* enters airway epithelial cells in a passive cytoskeleton-dependent manner. (A to D) Live and heat-killed *M. leprae* interaction with RPMI 2650 (A and C) and A549 (B and D) cells for 24 h at 33°C. The bacteria were labeled with PKH26, and the numbers of bacteria interacting with the cells and the percentages of bacterium-associated cells were determined by fluorescence microscopy. (E and F) Effect of cytoskeleton inhibitors on *M. leprae* uptake by RPMI 2650 cells (E) and A549 cells (F). Cells were pretreated with DMSO (drug vehicle), colchicine, or cytochalasin B for 1 h and during the 24 h of the assay at 33°C. Data represent the means  $\pm$  standard deviations of the results of 3 experiments performed in duplicate. \*\*,  $P < 0.01$ .

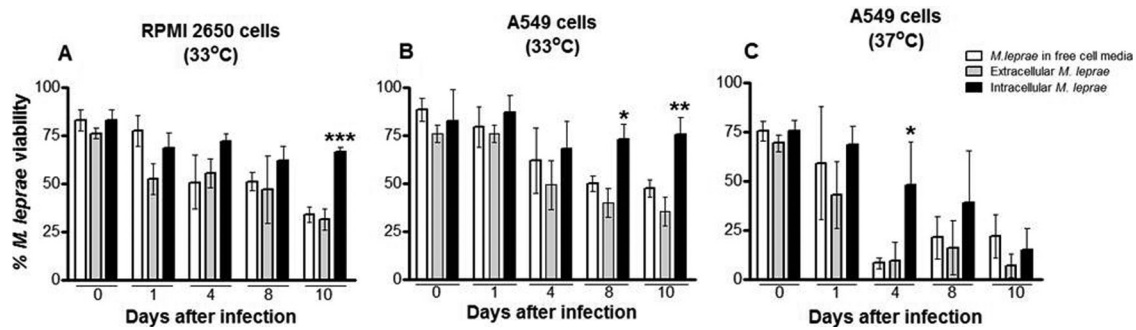


FIG 7 *M. leprae* survives inside epithelial cells. Intra- and extracellular *M. leprae* viability in RPMI 2650 and A549 cells was determined by the use of a Live/Dead kit. (A) RPMI 2650 cells at 33°C. (B) A549 cells at 33°C. (C) A549 cells at 37°C. Intracellular *M. leprae* bacilli (black bars) were recovered by lysing buffer, while extracellular bacteria (gray bars) were recovered after washing steps. In parallel, *M. leprae* bacilli were incubated in cell-free medium (white bar). Bacteria were stained by the use of a Live/Dead BacLight Bacterial Viability kit and enumerated by direct counting via fluorescence microscopy at a magnification of  $\times 1,000$ . The data represent the mean values  $\pm$  SD of the results of five experiments with duplicate samples from each one. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

of previous findings (42, 43), has been described as a fibronectin-binding protein (FBP) (44, 45). A study using the nasal epithelial cell RPMI 2650 lineage showed that treatment with fibronectin increased *M. leprae* adherence to this cell. In addition, the  $\beta 1$  chain of integrins is also implicated in the binding of *M. leprae* to nasal epithelial cells (46).

Several chaperones with potential adhesion properties were also found on the *M. leprae* surface (Table 2). Besides binding to human monocytes, the GroEL2 homologue was found on both the cell wall and surface of *M. avium* (47). DnaK and GroEL1 have been described as being involved in mediating *M. bovis* BCG adhesion to dendritic and macrophages cells via interaction with a C-type lectin known as DC-SIGN (48). DnaK and GroEL2 have also been shown to be present within the *M. tuberculosis* capsule (49), but only GroEL2 was found to bind to macrophages. In another study, it was shown that *M. tuberculosis* DnaK, Ag85B, and the iron-regulated elongation factor Tu (Ef-Tu) were able to bind and activate plasminogen (50). Plasminogen can be converted into plasmin, which, in turn, is capable of degrading the extracellular matrix and basal membrane components. Many bacteria are able to bind and convert plasminogen into plasmin, thereby facilitating pathogen dissemination (51). Finally, ML0255, a probable enolase, was found on the *M. leprae* surface

and was included as a potential adhesion, based on recent findings indicating that *Plasmodium* spp. are able to bind plasminogen (52).

***M. leprae* Hlp and HBHA can mediate mycobacterial entry into epithelial cells.** Two mycobacterial proteins, HBHA and Hlp, have been intensely studied and shown to mediate bacterial adhesion to epithelial cells (13, 20, 53). Since we confirmed by proteomic data that HBHA and Hlp are surface-exposed proteins in *M. leprae*, we investigated whether recombinant *M. leprae* proteins would be able to bind to A549 and RPMI 2650 cells.

As a first step, assays with fluorescent beads coated with the recombinant forms of Hlp (Hlp-Beads) and HBHA (HBHA-Beads) were done. As negative controls, the beads were treated with BSA (BSA-Beads). As shown in Fig. 9A, the capacity of Hlp-Beads to bind to nasal epithelial RPMI 2650 cells was significantly higher than the binding capacity of BSA-Beads ( $280.0 \pm 26.27$  Hlp-beads versus  $120.9 \pm 17.76$  BSA-Beads). Similarly, while only  $113.3 \pm 31.18$  BSA-Beads were found to be attached to A549 cells,  $394.8 \pm 49.15$  Hlp-Beads were found in association with these cells in identical assays. The differences in the numbers of Hlp-Beads attached to RPMI 2650 and A549 cells were not statistically significant ( $P = 0.89$ ). Independent assays were then performed with HBHA-coated beads. Interestingly, HBHA was able to en-

P9

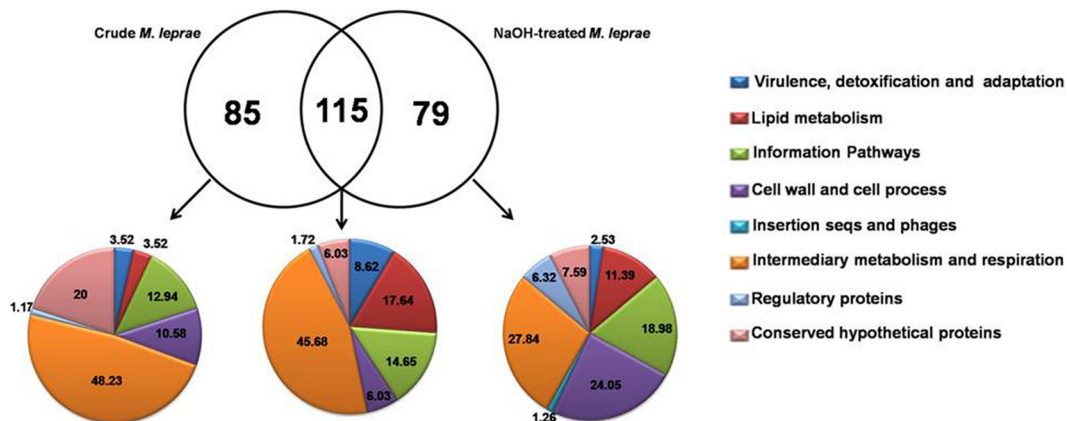


FIG 8 Functional grouping and intercross of surface-exposed proteins identified in crude and NaOH-treated *M. leprae*. A Venn diagram illustrating overlap between surface proteins identified in NaOH-treated and crude *M. leprae* is shown. Proteins identified exclusively in the NaOH-treated bacilli, only in the crude bacilli, or simultaneously found in both samples were functionally classified according to the Leproma database (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>). Functional categories are expressed in percentages. seqs, sequences.

TABLE 2 Putative surface-exposed adhesins identified in crude and NaOH-treated *M. leprae* bacilli<sup>a</sup>

Leproma ID	Gene	Protein description	FC
ML0072c	<i>sodA</i>	Probable superoxide dismutase, SodA	0
ML0317	<i>groEL2</i>	Heat shock protein Hsp65 family	0
ML0381	<i>groEL1</i>	60-kDa chaperonin 1 GroEL1	0
ML2589	<i>mce1A</i>	MCE family protein	0
ML2496c	<i>dnaK</i>	Probable chaperone protein DnaK	0
ML2028	<i>fbpB</i>	Secreted antigen 85B	1
ML1683c	<i>hupB</i>	Probable DNA-binding protein	2
ML1877c	<i>tuf</i>	Iron-regulated elongation factor	2
ML2454c	<i>hbhA</i>	Possible hemagglutinin	3
ML2069	<i>glcB</i>	Malate synthase	7
ML0255	<i>eno</i>	Probable enolase	7

<sup>a</sup> The leproma identification (ID) number and the functional category (FC) data were obtained from the Leproma World-Wide Web Server (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>).

hance bead interaction only with A549 cells ( $813 \pm 76.05$  HBHA-Beads versus  $248.3 \pm 48.7$  BSA-Beads) and not with RPMI 2650 cells ( $432.5 \pm 60$  HBHA-Beads versus  $336 \pm 16.6$  BSA-Beads) (Fig. 9B). Moreover, when assays were run to compare the adhesive properties of HBHA- and Hlp-coated beads in relation to A549 cells simultaneously, Hlp was significantly more adhesive than HBHA (Fig. 9C).

To confirm these results, similar assays were then conducted with *Mycobacterium smegmatis* precoated with Hlp (MS + Hlp) or with HBHA (MS + HBHA). The binding of Hlp and HBHA to the *M. smegmatis* surface was confirmed by an ELISA performed with specific antibodies against these proteins (Fig. 9D). Subsequently, the levels of binding of precoated and control bacteria to RPMI 2650 and A549 cells at 2 h were determined (Fig. 9E). As expected, MS + Hlp bacteria showed an enhanced ability to bind to nasal epithelial cells in contrast to the untreated bacteria ( $MS = 5.8 \pm 0.6 \times 10^2$  bacteria;  $MS + Hlp = 156.7 \pm 21.3 \times 10^2$  bacteria [ $P =$

0.0008]) (Fig. 9E). The same was observed in the context of A549 cells ( $MS = 2.6 \pm 0.4 \times 10^2$  bacteria;  $MS + Hlp = 190.3 \pm 8 \times 10^2$  bacteria [ $P = 0.0018$ ]) (Fig. 9E). Regarding HBHA, precoated bacteria also showed a higher adhesive capacity with respect to A549 ( $MS = 2.6 \pm 0.4 \times 10^2$  bacteria;  $MS + HBHA = 99.0 \pm 10 \times 10^2$  bacteria [ $P = 0.0014$ ]). However, in similarity to the results obtained with coated beads, HBHA-coated *M. smegmatis* did not show any enhanced adherence capacity compared to control bacteria in the context of RPMI 2650 cells ( $MS = 5.8 \pm 0.6 \times 10^2$  bacteria;  $MS + HBHA = 2.2 \pm 0.1 \times 10^2$  bacteria [ $P = 0.389$ ]) (Fig. 9E). In addition, as previously shown with beads, Hlp displayed a higher binding capacity to A549 cells than HBHA, confirming that Hlp seems to interact more avidly with A549 cells than HBHA.

Collectively, these results show that Hlp and HBHA may act as adhesins during *M. leprae*-mucosal airway interaction. Additionally, while Hlp may mediate interaction with both nasal and alveolar epithelia, HBHA seems to be restricted to mediating the bacterial attachment to alveolar epithelial cells.

## DISCUSSION

Studies regarding the interaction of *M. leprae* with airway epithelial cells, although rare to date, are of great interest since they could shed more light on the critical events occurring during the early stages of *M. leprae*-human host interaction.

In the present study, *in vitro* assays were performed to investigate the capacity of *M. leprae* to both infect and survive within nasal and alveolar epithelial cells. Moreover, the capacity of *M. leprae* to colonize the respiratory tract after intranasal infection of mice was analyzed. For the first time, a proteomic analysis of nude mouse-derived *M. leprae* was carried out using a biotinylation approach to selectively identify surface-exposed molecules for the purpose of mapping potential adhesin candidates.

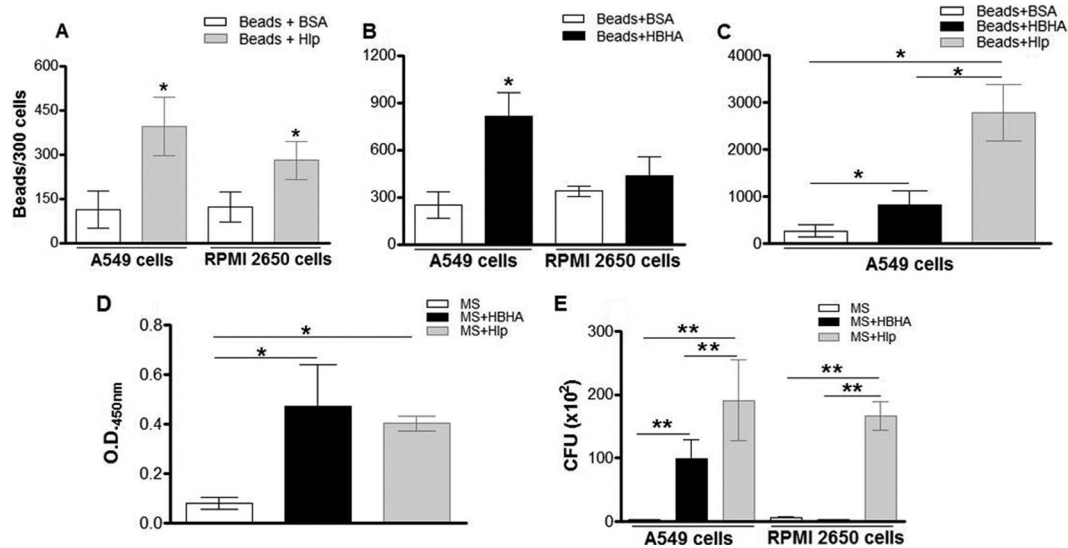


FIG 9 *M. leprae* recombinant Hlp and HBHA mediate the mycobacterial attachment to airway epithelial cells. (A and B) Fluorescent beads coated with Hlp (A), with HBHA (B), or with BSA (negative control) were incubated with RPMI 2650 and A549 cells for 1 h at 37°C. Cells were then washed and fixed. The numbers of beads associated with these cells were counted in a fluorescence microscope in a set of 300 cells using a magnification of  $\times 400$ . (C) Fluorescent beads coated with Hlp, HBHA, or BSA were incubated simultaneously with A549 cells for 1 h at 37°C. (D) *M. smegmatis* (MS) was pretreated or not with Hlp (MS+Hlp) or HBHA (MS+HBHA), and an ELISA was performed with anti-Hlp or anti-HBHA, respectively, in order to monitor the binding of these proteins to the bacterial surface. (E) MS and Hlp or MS and HBHA were used to infect epithelial cells for 2 h at 37°C. Internalized bacteria were released with lysis buffer for CFU counting. The data represent the mean values  $\pm$  SD of the results of at least three experiments performed in duplicate. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .



In our view, the most significant findings of our study are the following: (i) *M. leprae* was able to invade both nasal and alveolar epithelial cell lineages, but alveolar cells were infected more efficiently; (ii) *ex vivo* and *in vivo* studies, respectively, performed with primary human nasal epithelial cells and intranasal-infected immunocompetent mice confirmed the capacity of *M. leprae* to interact with respiratory tract cells during the early stages of airborne exposure; (iii) epithelial cells were able to sustain bacterial viability for at least 10 days postinfection; and (iv) the proteome of the *M. leprae* surface was defined, revealing a complex profile of proteins, including a group of potential adhesin candidates such as HBHA and Hlp, which may play a major role in the interaction of the pathogen with the respiratory tract.

Although *M. leprae* was able to interact with the nasal RPMI 2650 cell lineage as well as primary nasal cells, the number of bacteria capable of binding to and invading these cells was very small compared to the number of those binding to A549 cells. While this discrepancy is not due to differences in the intrinsic endocytic activities of these cells, which were shown to be similar, there is a suggestion that *M. leprae* itself may display a higher capacity to enter the alveolar epithelial cells than to enter their nasal counterparts. Likewise, the kinetics involved in the invasion of nasal cells appears to be slower than that of the A549 cells, especially in view of the fact that an increased bacterial association during the first 6 h of interaction did not materialize and a decidedly clear increase in A549 at early time points did occur. Nonetheless, *M. leprae* numbers inside RPMI 2650 cells doubled at 24 h of infection, suggesting a possible modulation of cell receptor expression. The capacity of *M. leprae* to interact with RPMI 2650 cells has been previously described (46). Interestingly, in a previous study, the percentage of *M. leprae*-infected A549 cells was similar to the percentage of cells infected with *M. tuberculosis* (54), suggesting that *M. leprae* is as efficient as *M. tuberculosis* at binding to and entering these cells. In addition, a previous study suggests that the *M. tuberculosis* binding and invasion capacities in alveolar epithelial cells might reflect mycobacterial virulence (55). As seen with *M. tuberculosis*, intracellular *M. leprae* bacteria were observed both as isolated individual cells and in clusters in membrane compartment structures, suggesting that, in A549 cells, the bacteria are located inside vesicles.

The present study also showed that heat-killed *M. leprae*, similarly to live bacteria, was able to bind and invade nasal and alveolar epithelial cells. This suggests that *M. leprae* entry into epithelial cells does not require newly synthesized bacterial products but that the molecules already present on the surface are sufficient. Interestingly, previous studies have shown that *M. avium* invades epithelial cells through mechanisms that depend on bacterial viability (56).

Furthermore, similarly to what has been observed in the context of *M. tuberculosis* (54), it was shown that *M. leprae* enters epithelial cells in microfilament- and microtubule-dependent manners. This differs from some invasive bacterial entry mechanisms in the epithelium, in which the actin cytoskeleton, but not the microtubule network, has been shown to play a major role (30, 57, 58), raising the speculation that *M. leprae* displays at least two different mechanisms of epithelium invasion.

Our data also show that the bacilli are able to survive within nasal epithelial cells, suggesting that these cells may constitute an important niche and source of *M. leprae* infection. Using a mouse model, the capacity of *M. leprae* to interact with respiratory tract

cells during the early stages of airborne exposure was confirmed in our study. However, this activity was observed only during early time points of infection when acid-fast bacilli were found in the lungs but not in the nose.

This observation is also in correlation with the higher affinity of *M. leprae* for alveolar epithelial cells than for nasal epithelial cells observed in our *in vitro* assays. Similar results were detected after the airborne infection of the thymectomized-irradiated CBA mouse strain with *M. leprae* (10). In that study, bacilli were undetectable in the nasal homogenates, although bacteria were found in the lungs of 100% of the mice immediately after exposure to *M. leprae* aerosols. After 24 months of infection, one-third of the mice developed disseminated infection, implying that the lungs are the primary portal of entry of *M. leprae* after airborne exposure (10). Indeed, based on our survival assays, it is speculated that, due to the 37°C temperature of human lungs, *M. leprae* can survive there for a relatively short period of time and that the alveolar epithelial cells and macrophages may primarily serve as a portal of entry and not as a residing niche for *M. leprae* multiplication. This hypothesis takes into account the absence of lung involvement in clinically established lepromatous leprosy.

In contrast, histopathological studies of the septum and turbinates of lepromatous leprosy patients have amply confirmed the density of bacilli in these tissues, the nose being the major escape route for the bacilli (59). As demonstrated in our survival experiments, the nasal mucosa temperature of 33°C favors *M. leprae* survival. Even so, the evidence has so far sustained the idea that nasal infection arises from the systemic spread of *M. leprae* instead of from the small numbers of bacilli retained during airborne infection (10). Nonetheless, the nose cannot be excluded as a possible portal of entry, and it is noteworthy that several reports using the mouse model favor this possibility (60, 61).

The present study also made an important contribution in defining the surface proteomics of *M. leprae*. An extensive *M. leprae* study in proteomics has included the mapping of cell-wall-associated proteins (62), but all were performed with preparations of *M. leprae* isolated from frozen tissues of infected armadillos, which typically display low viability. Therefore, a new proteomic study focusing on surface-exposed proteins became imperative in order to identify molecules with potentially relevant roles in bacterial pathogenesis located at the interface of *M. leprae* and the human being.

Our idea was to identify the specific adhesins and molecules involved in the entry of *M. leprae* in airway epithelial cells. Investigations were carried out with high-quality, freshly isolated *M. leprae* bacteria from athymic nude-mouse footpads having over 90% viability in conjunction with a biotinylation approach that had been successfully applied to selective labeling and purification of surface-exposed proteins of *M. avium* (24). For comparison, NaOH-treated and crude *M. leprae* preparations were analyzed. The former was used to remove contaminant proteins derived from mouse tissues and the cytosol of lysed bacteria (17). Moreover, NaOH treatment might favor the biotinylation of less abundant cell-surface proteins, which are sometimes masked by contaminant proteins.

Indeed, in NaOH-treated versus crude bacteria, our results showed an enrichment of the proteins involved in cell wall and cell processes and lipid metabolism over those involved in intermediary metabolism and respiration. Moreover, most proteins on the surface of NaOH-treated bacteria have been previously described

AQ: H

in the cell wall fraction of *M. leprae*, while most proteins in crude bacteria have been previously described in the cytosolic fraction (see Tables S1 and S3 in the supplemental material) (62, 63). In addition, a small set of proteins related to cell wall processes and lipid metabolism was identified only in crude bacteria, suggesting that these proteins are somehow affected and lost during treatment with NaOH.

The proteomic analysis presented here revealed that the *M. leprae* surface is composed of a highly complex mixture of proteins. Many of these are cytosolic proteins with no predictive signal peptide or cell-wall anchoring motif (see Tables S1, S2, and S3 in the supplemental material). These results are in agreement with a previous characterization of the *M. avium* surface proteome that also revealed an abundance of cytosolic proteins represented on the bacterial surface (24). In addition, the cell surface proteome of *M. smegmatis* likewise revealed a solid set of cytosolic proteins such as ribosomal proteins, the Ef-Tu, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (64).

Glycolytic and other cytosolic enzymes have also been shown to localize on the surface of several other pathogens, and postulations regarding possible alternative functions of these proteins at this location have been made. As such, as listed in Table 2, several enzymes found on the *M. leprae* surface have been shown to mediate the pathogen colonization of host cells and facilitate the establishment of infection (65–70).

Among the many identified adhesin candidates on the surface of *M. leprae*, the potential roles of two of them, i.e., Hlp and HBHA, in bacterium-epithelial cell interactions were further explored. Hlp and HBHA are well known as extracellular matrix-binding proteins. While HBHA binds heparan sulfate (13, 20), Hlp has been described as a multifunctional adhesin able to interact with laminin, hyaluronic acid, heparan sulfate, and collagen (14, 53, 71–73). Previous studies have shown the *in vivo* expression of both proteins by *M. leprae* (62, 71). A previous study also showed the presence of Hlp in armadillo-derived *M. leprae* by immunoelectron microscopy (14). But, to our knowledge, this is the first time they have been shown to be surface exposed in freshly isolated *M. leprae* from athymic nude-mice as originally speculated.

The present study also confirmed that Hlp and HBHA *M. leprae* recombinant homologs are able to mediate the interaction of beads and mycobacteria with airway epithelial cells, as had been previously shown in the context of *M. bovis* BCG (53, 74). The higher capacity of Hlp but not HBHA to bind both A549 and RPMI 2650 cells may be explained by the capacity of Hlp to interact with a larger number of host-cell proteins than HBHA. It is also possible to infer that RPMI 2650 cells express a small amount of heparan sulfate on the cell surface, justifying the inability of the HBHA protein to interact with these cells.

In conclusion, based on the considerations mentioned above, we hypothesize that during the subclinical infection and early stages of leprosy, respiratory epithelial cells may constitute a niche for bacterial retention and survival and a potential portal of entry for *M. leprae*. Although our data indicate that Hlp and HBHA can potentially mediate the *M. leprae* attachment to airway epithelial cells, the complex proteome of the bacterial surface demonstrated here suggests that *M. leprae* displays an armamentarium of adhesins involved in its interaction with epithelial cells. In reality, such cell-surface glycolipids as PGL-I have been seen to play a role as adhesins (75) but may also contribute to *M. leprae*-epithelial

cell interaction. Altogether, our data suggest that the airway epithelium plays an important role as a primary site of *M. leprae* infection in humans. A clearer understanding of *M. leprae* interaction with these cells could contribute to the design of more effective preventive tools for leprosy control.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by CNPq/Brazil (individual grants to M.C.V.P.; C.A.M.S. was a recipient of fellowships from CNPq and Capes/Fulbright). This work was also supported by the Foundation for Microbiology and Infectious Diseases (L.E.B.).

We are grateful to James Krahenbuhl for providing viable *M. leprae* and Anne-Marie Girard of the Confocal Microscopy Facility, Center for Genome Research and Biocomputing, Oregon State University, Corvallis, OR, for furnishing the assisted images. Mass spectrometric analysis was performed by the Oregon Health and Science University, Proteomics Shared Resources, with partial support from the NIAID (core grants no. P30EY01572 and P30CA069533). We also thank Thais Almeida and Rodrigo Avellar for providing the nasal polyps, Ashok Reddy of Proteomics Shared Resources for his technical support, and Judy Grevan for editing the text.

## REFERENCES

1. WHO. 2012. Global leprosy situation, August. Wkly. Epidemiol. Rec. 87:317–328.
2. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. 2006. The continuing challenges of leprosy. Clin. Microbiol. Rev. 19:338–381.
3. McDougall AC, Rees RJ, Weddell AG, Kanan MW. 1975. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. J. Pathol. 115:215–226.
4. Job CK. 1990. Nasal mucosa and abraded skin are the two routes of entry of *M. leprae*. Star 49:1.
5. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. 2008. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78:518–521.
6. Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. 1998. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in nasal mucosa. Lepr. Rev. 69:358–366.
7. Klatser PR, van Beers S, Madjid B, Day B, de Wit MY. 1993. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. J. Clin. Microbiol. 31:2947–2951.
8. Chan PC, Reyes LM, Demerre-Lopez B, Gonzaga EM, De los Santos MFA, Gillis TP. 1997. Leprosy infection and disease in the national capital region. Philippine J. Microbiol. Infect. Dis. 26:159–162.
9. Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. 2005. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 44:311–316.
10. Rees RJW, McDougall AC. 1977. Airborne infection with *M. leprae* in mice. J. Med. Microbiol. 10:63–68.
11. Davey TF, Rees RJ. 1974. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. Lepr. Rev. 45:121–134.
12. Mayer AK, Dalpke AH. 2007. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz) 55:353–362.
13. Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Sharp ML, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Loch C. 1996. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. J. Exp. Med. 184:993–1001.
14. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. 1999. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:9857–9862.
15. Chevillard M, Hinnrasky J, Zahm JM, Plotkowski MC, Puchelle E. 1991. Proliferation, differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary culture. Cell Tissue Res. 264:49–55.
16. Hicks W, Jr, Ward R, Edelstein D, Hall L, III, Albino A, Hard R, Asch B. 1995. Cytokeratin expression in human respiratory epithelium of nasal polyps and turbinates. Cell Biol. Int. 19:301–306.
17. Lahiri R, Randwana B, Krahenbuhl J. 2005. Effects of purification and fluorescent staining on viability of *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. Other Mycobact Dis. 73:194–202.

18. Shepard CC, McRae DHA. 1968. Method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 36:78–82.
19. Lahiri R, Randwana B, Krahenbuhl J. 2005. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J. Med. Microbiol.* 54:235–242.
20. de Lima CS, Marques MA, Debrise AS, Almeida EC, Silva CA, Brennan PJ, Sarno EN, Menozzi FD, Pessolani MC. 2009. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 292:162–169.
21. de Melo Marques MA, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Vidal Pessolani MC. 2000. Bacterial and host derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes Infect.* 2:1407–1417.
22. Preece A. 1972. A manual for histologic technicians, 3rd ed. Little, Brown & Co., Boston, MA.
23. Kim SY, Goodman JR, Petrofsky M, Bermudez LE. 1998. *Mycobacterium avium* infection of gut mucosa in mice associated with late inflammatory response and intestinal cell necrosis. *J. Med. Microbiol.* 47:725–731.
24. McNamara M, Tzeng SC, Maier C, Zhang L, Bermudez LE. 2012. Surface proteome of “*Mycobacterium avium* subsp. hominissuis” during the early stages of macrophage infection. *Infect. Immun.* 80:1868–1880.
25. Elias JE, Gygi SP. 2007. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat. Methods* 4:207–214.
26. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* 74:5383–5392.
27. Wilmarth PA, Riviere MA, David LL. 2009. Techniques for accurate protein identification in shotgun proteomic studies of human, mouse, bovine, and chicken lenses. *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.* 2:223–234.
28. Cooper JA. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105:1473–1478.
29. Olmsted JB, Borisy GG. 1973. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *Biochemistry* 12:4282–4289.
30. Finlay BB, Falkow S. 1988. Comparison of the invasion strategies used by *S. choleraesuis*, *Shigella flexneri*, and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. *Biochimie* 70:1089–1099.
31. Moulder JW. 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol. Rev.* 49:298–333.
32. Fleiszig SMJ, Zaidi TS, Pier GB. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* invasion of and multiplication within corneal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 63:4072–4077.
33. Kline KA, Fälker S, Dahlberg S, Normark S, Henriques-Normark B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5:580–592.
34. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, III, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544.
35. Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261:1454–1457.
36. Sato N, Fujimura T, Masuzawa M, Yogi Y, Kanoh M, Riley LW, Katsuoka K. 2007. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. *J. Dermatol. Sci.* 46:101–110.
37. Reddy VM, Kumar B. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 181:1189–1193.
38. Laal S, Samanich KM, Sonnenberg MG, Zolla-Pazner S, Phadtare JM, Belisle JT. 1997. Human humoral responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: immunodominance of high-molecular-mass antigens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4:49–56.
39. Sonnenberg MG, Belisle JT. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing and electrospray mass spectrometry. *Infect. Immun.* 65:4515–4524.
40. Samanich K, Belisle JT, Laal S. 2001. Homogeneity of antibody responses in tuberculosis patients. *Infect. Immun.* 69:4600–4609.
41. Kinshikar AG, Vargas D, Li H, Mahaffey SB, Hinds L, Belisle JT, Laal S. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* malate synthase is a laminin-binding adhesin. *Mol. Microbiol.* 60:999–1013.
42. Rambukkana A, Das PK, Burggraaf JD, Faber WR, Teeling P, Krieg S, Thole JE, Harboe M. 1992. Identification and characterization of epitopes shared between the mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein and the actively secreted antigen 85 complex: their in situ expression on the cell wall surface of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 60:4517–4527.
43. Pessolani MC, Brennan PJ. 1992. *Mycobacterium leprae* produces extracellular homologs of the antigen 85 complex. *Infect. Immun.* 60:4452–4459.
44. Abou-Zeid C, Ratliff TL, Wiker HG, Harboe M, Bennedson J, Rook GA. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 56:3046–3051.
45. Kitaura H, Ohara N, Naito M, Kobayashi K, Yamada T. 2000. Fibronectin-binding proteins secreted by *Mycobacterium avium*. *APMIS* 108:558–564.
46. Byrd SR, Gelber R, Bermudez LE. 1993. Roles of soluble fibronectin and beta-1 integrin receptors in the binding of *Mycobacterium leprae* to nasal epithelial cells. *Clinic Immunol. Immunopathol.* 69:266–271.
47. Rao SP, Ogata K, Morris SL, Catanzaro A. 1994. Identification of a 68 kd surface antigen of *Mycobacterium avium* that binds to human macrophages. *J. Lab. Clin. Med.* 123:526–535.
48. Carroll MV, Sim RB, Bigi F, Jäkel A, Antrobus R, Mitchell DA. 2010. Identification of four novel DC-SIGN ligands on *Mycobacterium bovis* BCG. *Protein Cell* 1:859–870.
49. Hickey TBM, Ziltener HJ, Speert DP, Stokes RW. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* employs Cpn60.2 as an adhesin that binds CD43 on the macrophage surface. *Cell. Microbiol.* 12:1634–1647.
50. Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C. 2007. Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 7:3332–3341.
51. Lähteenmäki K, Edelman S, Korhonen TK. 2005. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 13:79–85.
52. Ghosh AK, Jacobs-Lorena M. 2011. Surface-expressed enolases of *Plasmodium* and other pathogens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 106(Suppl 1):85–90.
53. Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, Kobayashi K. 2004. Extracellular mycobacterial-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J. Biol. Chem.* 279:39798–39806.
54. Bermudez LE, Goodman J. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect. Immun.* 64:1400–1406.
55. Ashiru OT, Pillay M, Sturm AW. 2010. Adhesion to and invasion of pulmonary epithelial cells by the F15/LAM4/KZN and Beijing strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Microbiol.* 59(Pt 5):528–533.
56. Mapother ME, Songer JG. 1984. In vitro interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 45:67–73.
57. Finlay BB, Ruschkowski S, Dedhar S. 1991. Cytoskeletal rearrangement accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. *J. Cell Sci.* 99:283–296.
58. Jones BD, Paterson HF, Hall A, Falkow S. 1993. *Salmonella typhimurium* induces membrane ruffling by a growth factor receptor independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:10390–10394.
59. Job CK, Karat AB, Karat S. 1966. The histopathological appearance of leprosy rhinitis and pathogenesis of septal perforation in leprosy. *J. Laryngol. Otol.* 80:718–732.
60. McDermott-Lancaster RD, McDougall AC. 1990. Mode of transmission and histology of *M. leprae* infection in nude mice. *Int. J. Exp. Pathol.* 71:689–700.
61. Sethna KB, Birdi TJ, Antia NH. 1997. Adherence of *Mycobacterium leprae* to the nasal mucosa is influenced by surface integrity and viability. *J. Biosci.* 22:575–583.
62. Marques MA, Neves-Ferreira AG, da Silveira EK, Valente RH, Cha-

- peaurouge A, Perales J, da Silva Bernardes R, Dobos KM, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MC. 2008. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics* 8:2477–2491.
63. Marques MA, Espinosa BJ, Xavier da Silveira EK, Pessolani MC, Chapeaurouge A, Perales J, Dobos KM, Belisle JT, Spencer JS, Brennan PJ. 2004. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *Proteomics* 4:2942–2953.
64. He Z, De Buck J. 2010. Cell wall proteome analysis of *Mycobacterium smegmatis* strain MC2 155. *BMC Microbiol.* 10:121. doi:10.1186/1471-2180-10-121.
65. Pancholi V, Chhatwal GS. 2003. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 293:391–401.
66. Pancholi V, Fischetti VA. 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* 176:415–426.
67. Pancholi V, Fischetti VA. 1997. Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. *J. Exp. Med.* 186:1633–1643.
68. Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorin I, Renau-Piqueras J, Martinez JP, Gil ML. 1998. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.* 66:2052–2059.
69. Chhatwal GS. 2002. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol.* 10:205–208.
70. Bergmann S, Rohde M, Chhatwal GS, Hammerschmidt S. 2001. Alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* 40:1273–1287.
71. Soares de Lima C, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, Menozzi FD, Ottenhoff TH, Brennan PJ, Pessolani MC. 2005. Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. *Microbes Infect.* 7:1097–1109.
72. Portugal ML, Todeschini AR, de Lima CS, Silva CA, Mohana-Borges R, Ottenhoff TH, Mendonça-Previato L, Previato JO, Pessolani MC. 2008. Characterization of two heparan sulphate-binding sites in the mycobacterial adhesin Hlp. *BMC Microbiol.* 8:75. doi:10.1186/1471-2180-8-75.
73. Dias AA, Raze D, de Lima CS, Marques MA, Drobecq H, Debie AS, Ribeiro-Guimarães ML, Biet F, Pessolani MC. 2012. Mycobacterial laminin-binding histone-like protein mediates collagen-dependent cytoadherence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107(Suppl 1):174–182.
74. Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Loch C, Menozzi FD. 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 412:190–194.
75. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* 103:511–524.

## AUTHOR QUERIES

### AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

1

AQau—Please confirm the given-names and surnames are identified properly by the colors.

■ = Given-Name, ■ = Surname

AQA—“Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM)” as meant? If not, please correct. (Please check similar introductions of abbreviations throughout.)

AQB—“2-to-3-mm-thick” as meant for “2-to-3-mm size”? If not, please specify unit of measurement. (Please check similar changes throughout.)

AQC—“Alexa Fluor 555 goat IgG” as meant for “Alexa Fluor 555 goat”? If not, please correct.

AQD—The use of italics for emphasis has been disallowed throughout per ASM style.

AQE—Please specify the strain designation for the first of the two *M. leprae* strains mentioned here.

AQF—Please explain what “(2011.08)” represents.

AQG—Dashes have been deleted from tables per ASM style. If needed, please define.

AQH—“In that study” as meant for “In this study”? If not, please change to “In the present study.”

AQI—Please check the publication details for references 4, 8, 29, and 61 (not found in PubMed).

---