

Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* E PRODUÇÃO DE CEPA
TRANSGÊNICA DE *Mycobacterium leprae* EM
LINHAGEM IDE8 DE *Ixodes scapularis***

DIEGO AUGUSTO SOUZA OLIVEIRA

Rio de Janeiro

Abril de 2021

Oliveira, Diego Augusto Souza.

Propagação *in vitro* e produção de cepa transgênica de *Mycobacterium leprae* em linhagem IDE8 de *Ixodes scapularis* / Diego Augusto Souza Oliveira. - Rio de Janeiro, 2021.
xiii, 65 f.

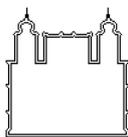
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Flavio Alves Lara.

Bibliografia: f. 59-65

1. Células de carrapato. 2. Hanseníase. 3. IDE-8. 4. Carrapato. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DIEGO AUGUSTO SOUZA OLIVEIRA

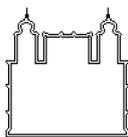
Propagação *in vitro* e produção de cepa transgênica de *Mycobacterium leprae* em linhagem IDE8 de *Ixodes scapularis*

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

ORIENTADOR: Dr. Flávio Alves Lara

Rio de Janeiro

Abril de 2021



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Diego Augusto Souza Oliveira

Propagação *in vitro* e produção de cepa transgênica de *Mycobacterium leprae*
em linhagem IDE8 de *Ixodes scapularis*

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca, UFRRJ

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro, IOC/FIOCRUZ - **Presidente**

Prof. Dra. Teca Calcagno Galvão, IOC/FIOCRUZ

Prof. Dra. Lucia Helena Pinto da Silva, UFRRJ

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira, IOC/FIOCRUZ

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação
de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
(CAPES) - Código de Financiamento 001

Rio de Janeiro, abril de 2021

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus agradecimentos as pessoas que estiveram comigo todos esses anos da minha carreira científica, primeiramente aos meus pais, Arlindo dos Reis e Dayse de Castro, assim como minha madrinha Norma Castro e meu padrinho Romário Coelho, devo a eles tudo que me tornei hoje em dia. Agradeço por sempre estarem ao meu lado nos momentos que mais precisei e serem a minha maior fonte de inspiração.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Flávio Alves Lara, por guiar meu caminho científico desde a iniciação científica até agora o mestrado e por abrir diversas oportunidades para mim durante toda essa caminhada. Agradeço também a todos os integrantes do laboratório de Microbiologia Celular (LAMICEL). Em especial aos meus amigos Débora Santos, João Pedro, Karina Girardi e Sabrina Alves, e dentre muitos outros.

À banca examinadora, obrigada por terem aceito o convite e por compartilharem seus conhecimentos para a discussão do trabalho. Agradeço em especial ao Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca por me fornecer as células utilizadas nesse trabalho e por toda ajuda, agradeço igualmente a revisora Dra. Veronica Schimtz, pela ajuda durante os ajustes da minha dissertação. À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pela bolsa de estudos fornecida nesses anos. E por fim ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fiocruz, por todo conhecimento oferecido durante as disciplinas nesses dois anos de mestrado.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular que infecta principalmente macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos. A Hanseníase representa um problema de saúde pública no Brasil, por apresentar uma alta prevalência. A impossibilidade do seu cultivo *in vitro* até o momento torna análises fundamentais como a determinação da sensibilidade do bacilo a novos antibióticos em tarefas árduas, pois o método atual de cultivo baseia-se na infecção de camundongos atímicos estéreis, consistindo em um procedimento caro, demorado, impreciso, que demanda grandes quantidades de moléculas candidatas, realizado através do custo de vidas animais e não aplicável em protocolos de transformação. Nosso grupo demonstrou que carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense*, em condições controladas, podem atuar na transmissão do *M. leprae*, indicando potencialidade em linhagens de células de carrapato no cultivo desse bacilo *in vitro*. Nossos dados demonstram que o *M. leprae* não só é capaz de infectar com sucesso inúmeras linhagens de células de carrapatos, como de se multiplicar *in vitro* no interior de ao menos uma delas, a linhagem IDE8, originária de embriões de *Ixodes scapularis*. Através dessa linhagem de células foi possível transformar um isolado clínico do bacilo, tornando-o fluorescente através da expressão da proteína fluorescente Cherry. Através da criação de cepas de *M. leprae* transformadas seremos capazes de monitorar a viabilidade e a taxa metabólica do patógeno *in vivo*. Este trabalho aponta para o grande potencial do uso das linhagens de células de carrapatos como método de cultivo *in vitro* do *M. leprae* e a partir dessa nova metodologia a possibilidade de desenvolvimento de novas abordagens e ferramentas para estudo da hanseníase como testes mais econômicos, rápidos e precisos para a identificação de novas drogas para o controle da doença.

Palavras-chave: Células de carrapato, hanseníase, IDE-8, carrapato

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an intracellular bacillus that mainly infects skin macrophages and Schwann cells in peripheral nerves. Leprosy represents a public health problem in Brazil, due to its high prevalence. The impossibility of its *in vitro* cultivation so far makes fundamental analyzes such as determining the sensitivity of the bacillus to new antibiotics in arduous tasks, as the current method of cultivation is based on the infection of sterile athymic mice, consisting of an expensive and time-consuming procedure, imprecise, which demands large amounts of candidate molecules, carried out at the cost of animal lives and not applicable to transformation protocols. Our group demonstrated that ticks of the species *Amblyomma cajennense*, under controlled conditions, could act in the transmission of *M. leprae*, indicating potential in tick cell lines in the cultivation of this bacillus *in vitro*. Our data demonstrate that *M. leprae* is not only able to successfully infect tick cell lines, but also to multiply *in vitro* within at least one of them, the IDE8 lineage, originating from *Ixodes scapularis* embryos. Through this cell line, it was possible to transform a clinical isolate of the bacillus, making it fluorescent through the expression of the fluorescent protein Cherry. By creating transformed strains of *M. leprae* we will be able to monitor the pathogen's viability and metabolic rate *in vivo*. This work points to the great potential of using tick cell lines as a method of *in vitro* cultivation of *M. leprae* and from this new methodology the possibility of developing new approaches and tools for the study of leprosy as faster, faster tests and accurate for identifying new drugs to control the disease.

Keywords: Tick cell lines, leprosys, IDE-8, tick.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. HANSENÍASE	12
1.1.1. Características gerais	12
1.1.2. Aspectos gerais de epidemiologia	13
1.1.3. Classificações clínicas	14
1.1.4. Aspectos gerais de diagnóstico	16
1.1.5. Aspectos gerais de tratamento	17
1.1.6. Agente etiológico	18
1.1.7. Cultivo <i>in vitro</i>	19
1.1.8. Cultivo e manutenção de <i>M. leprae</i> em animais	20
1.1.9. Associação entre <i>M. leprae</i> e Artrópodes	22
1.1.10. Cultivo de células de carrapato	23
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 GERAL	27
3.2 ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 CÉLULAS UTILIZADAS E CULTIVOS	28
4.2 COLORAÇÃO DE KINYOUN E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE	30
4.3 OBTENÇÃO DE <i>M. leprae</i> CULTIVADO IN VIVO.	30
4.4 MARCAÇÃO COM PKH	31
4.5 ANÁLISE POR CITOMETRIA	31
4.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DA MARCAÇÃO COM PKH	32
4.7 CULTIVO DE <i>M. leprae</i> IN VITRO	32

4.7.1 Utilizando placas de 24 poços	33
4.7.2 Utilizando tubos falcons	33
4.7.3 Utilizando garrafas pequenas e tubos de cultura	33
4.8 TESTE DE VIABILIDADE UTILIZANDO MODELO SHEPARD DO <i>M. leprae</i> CULTIVADO EM IDE8	34
4.9 COMPARAÇÃO DO EFEITO DO <i>M. leprae</i> DE CAMUNDONGO E DE CÉLULAS DE CARRAPATO POR HCS (high content screening)	35
4.10. GENOTIPAGEM POR ANÁLISE DE NÚMERO DE VARIÁVEL DE MULTIPLOS LOCUS (MVLA)	35
4.11 TRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO O PLASMÍDEO pCHERRY3	36
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS	38
5.1. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE CÉLULAS DE CARRAPATO E <i>M. leprae</i>	38
5.2. TESTE DO POTENCIAL DAS CÉLULAS DE CARRAPATO PARA CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>M. leprae</i>	39
5.3. TESTE DO POTENCIAL DE OUTRAS LINHAGENS PARA O CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>M. leprae</i>	41
5.4. <i>M. leprae</i> SE MANTEM VIÁVEL EM CULTIVO DE IDE8 POR PELO MENOS 2 MESES	42
5.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE EM MODELO SHEPARD DO <i>M. leprae</i> DE IDE8	43
5.6. GENOTIPAGEM POR MVLA	44
5.7. TESTE PARA OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE <i>M. leprae</i> EM IDE8.	44
5.8. AUMENTO DA ESCALA DE PRODUÇÃO DE <i>M. leprae</i> <i>IN VITRO</i>	46
5.9. TESTE DE ANTIBIÓTICOS DE <i>M. leprae</i> MANTIDOS EM IDE8	47
5.10. EFEITO DE GÁLIO NA CULTURA DE <i>M. leprae</i>	48
5.11. EXPERIMENTOS COMPARATIVOS ENTRE <i>M. leprae</i> DE COXIM PLANTAR DE CAMUNDONGOS NUDE E DE CULTURAS DA LINHAGEM IDE8.	49
5.12. <i>M. leprae</i> TRANSGÊNICO	51
5.13. GENOTIPAGEM POR MVLA DO <i>M. leprae</i> TRANSGÊNICO	53
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. HANSENÍASE

1.1.1. Características gerais

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa sistêmica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório que tem afinidade por macrófagos e células de *Schawnn* (KAPLAN, COHN, 1986) se manifesta por sinais e sintomas dermatoneurológicos como: degeneração do axônio, desmielinização e fibrose dos nervos periféricos, o que leva a perda de sensibilidade e posteriormente perda de função motora (revisto por SCOLLARD *et al.*, 2006).

Os primeiros relatos sobre esta doença demonstram a sua existência a muitos séculos, tendo suas mais antigas citações em textos da Ásia (660 a.C.), da Grécia (400 a.C.), da China (300 a.C.) e da Itália (100 a.C.). Estes textos apontam sintomas da doença encontrados atualmente em pacientes acometidos pela hanseníase, como manchas brancas e avermelhadas pelo corpo, ulcerações e deformações físicas (TRAUTMAN, 1984; ROBBINS *et al.*, 2009)

O aparecimento da hanseníase no Brasil deu-se após a chegada dos colonizadores portugueses, relatando-se os primeiros casos no ano de 1600, no Rio de Janeiro. Somente em 1873, houve a identificação do *M. leprae*, descoberta feita pelo médico norueguês Gerhard Amauer Hansen, através da presença de estruturas em formas de bastões em amostras de nódulos de pacientes com hanseníase, por meio de análise microscópica (GARCIA JRL, 2001; HASTINGS R, OPROMOLLA D., 1994). Em 1976 no Brasil a nomenclatura Lepra, anteriormente relacionada à patologia, foi alterada para hanseníase em homenagem ao descobridor do patógeno Gerhard Hansen.

O mecanismo de transmissão da doença ainda não é totalmente conhecido e são necessários mais estudos para comprovar e demonstrar a dinâmica de transmissão dessa doença. Acredita-se que a transmissão se dá de

contato prolongado com pacientes com hanseníase, principalmente com os indivíduos com a forma multibacilar da doença (JOB *et al.*, 2005). Publicações demonstraram que o trato respiratório superior, seja a mucosa oral ou a nasal, tem um importante papel na fisiopatogenia da hanseníase, sendo considerado a porta de entrada e saída do bacilo (Martinez *et. al*, 2011; Melo N. *et al.*, 2009; Beyene *et al.*, 2003).

1.1.2. Aspectos gerais de epidemiologia

Embora seja uma doença extremamente antiga, a hanseníase ainda é um problema de saúde pública em diversos países localizados nos continentes americano, asiático e africano. O Brasil em 2018 foi considerado o país com a situação mais alarmante nas Américas, contribuindo com 93% da quantidade de novos casos (fig. 1), tendo um aumento significativo com relação aos casos reportados em 2017 (OMS, 2019).

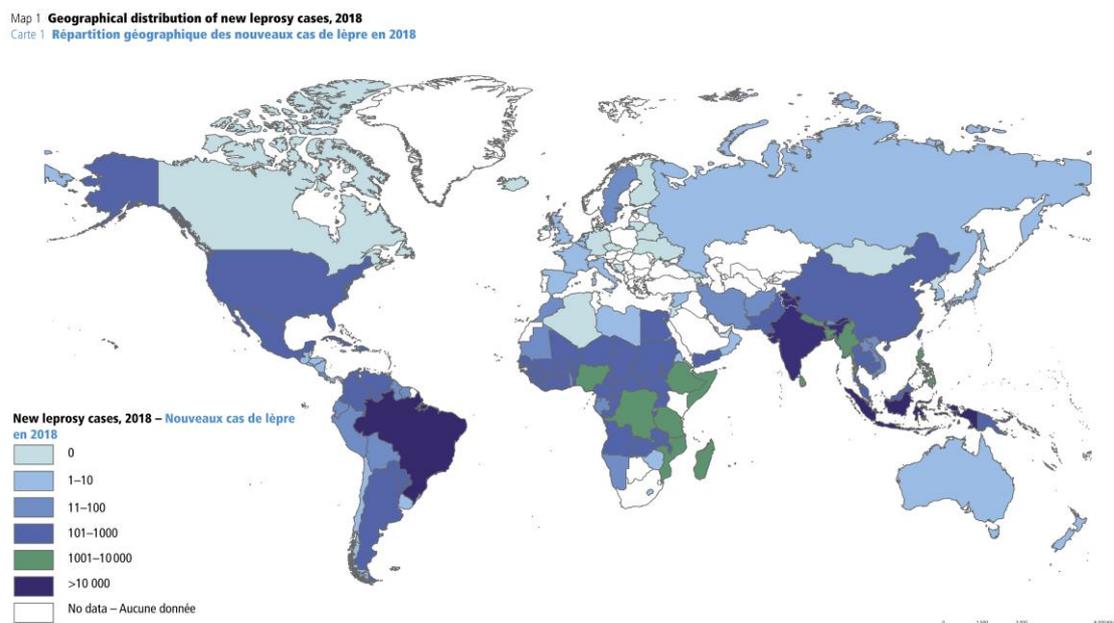
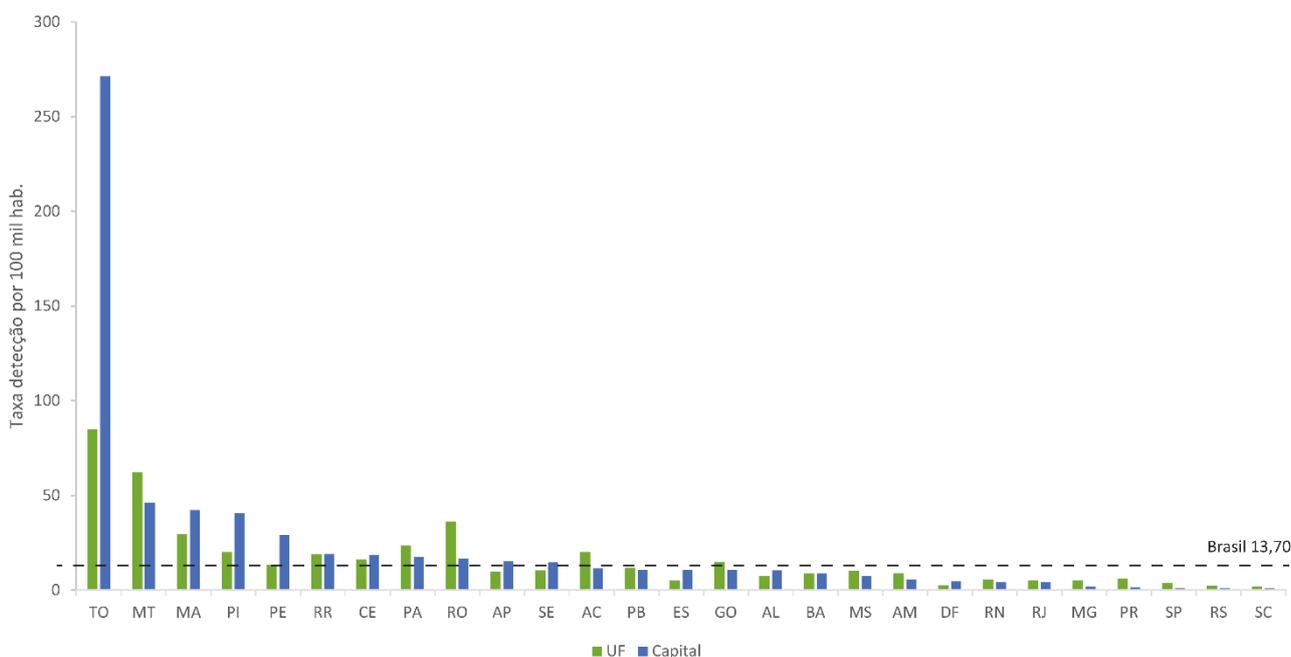


Figura 1: Detecção de novos casos de Hanseníase no mundo reportados à OMS, no ano de 2018. As taxas de novos casos referem-se a cada 100.000 habitantes (adaptado da organização mundial de saúde, 2019)

Podemos observar na Figura 2 diferenças no número de novos casos reportados da doença entre os estados. Não existe uma associação clara entre a epidemiologia da doença e as condições socioeconômicas da população afetada. Em 2020, o Ministério da Saúde publicou dados da distribuição da doença no país em 2018 (fig. 2), esses dados demonstraram uma grande prevalência da doença principalmente nos estados de Mato Grosso (8º maior IDH nacional), Tocantins (13º) e Maranhão (26º), compreendendo principalmente áreas ao longo do arco de desmatamento (ministério da saúde, 2020), tendência que vem se mantendo a anos.



Fonte: Sinan/SVS-MS.

Figura 2: Taxas de detecção geral de casos novos de hanseníase por 100mil em estados do Brasil, referente ao ano de 2018 (ministério da saúde, 2020)

1.1.3. Classificações clínicas

A hanseníase pode afetar indivíduos de todas as faixas etárias e não há predileção entre os sexos. Estima-se que 95% da população adulta tenha

imunidade natural contra o *M. leprae* (LAZARO FP et al, 2010). A doença apresenta diferentes formas clínicas, separadas por características diversas, cujo desenvolvimento de cada uma delas é dependente de mecanismos imunológicos do hospedeiro (revisto por SCOLLARD *et al.*, 2006)

Ridley e Jopling em 1966 propuseram uma classificação baseada nos aspectos clínicos, imunológicos, bacteriológicos e histológicos da doença. A classificação é formada por dois grandes polos, e três formas intermediárias (fig. 3). Em um dos polos os pacientes lepromatoso-lepromatoso (LL) onde a doença apresenta as manifestações clínicas mais severas, com múltiplas lesões pelo corpo, macrófagos espumosos, e elevado número de bacilos devido à baixa eficiência da resposta imune humoral (tipo Th2) contra o patógeno. No outro polo encontram-se os pacientes tuberculóide-tuberculóide (TT) em que a doença se apresenta na sua forma mais branda, lesões granulomatosas em menor número, com frequentemente apenas uma lesão e com menor carga bacilar devido à forte resposta imune celular ao patógeno (tipo Th1). Entre esses dois polos encontram-se as formas intermediárias bordeline-tuberculóide (BT), bordeline-bordeline (BB) e bordeline-lepromatosa (BL), e são definidos de acordo com a proximidade a cada polo. Além dessas classificações existe a forma indeterminada (I) que foi proposta como um estágio inicial da doença, que pode ou não evoluir para uma das cinco formas clínicas da doença (JOPLING, MC DOUGALL, 1988)

A fim de facilitar a aplicação clínica das classificações e delimitando os esquemas terapêuticos da doença, a OMS dividiu as classificações em dois grupos baseando-se na avaliação do número de lesões esses grupos foram: o grupo multibacilar (MB), indivíduos com seis ou mais lesões que isso inclui os pacientes LL, BL e BB e o grupo paucibacilar (PB), paciente com menos de cinco lesões e incluindo os pacientes TT e BT (WHO, 1998).

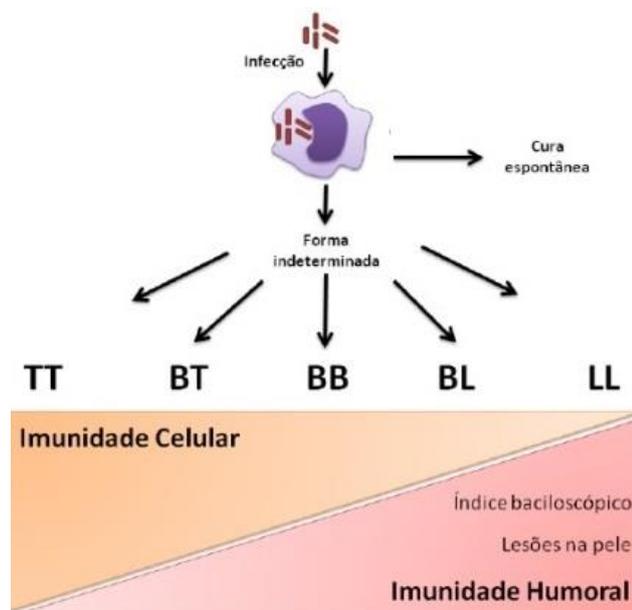


Figura 3: Esquema baseado na classificação de Ridley e Jopling, mostrando as diferentes formas clínicas da hanseníase associada às respectivas respostas imune para cada forma (RIDLEY, JOPLING, 1966).

1.1.4. Aspectos gerais de diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase, de acordo com o ministério da saúde, baseia-se primariamente em critérios clínicos como sinais dermatoneurológicos como: identificação de lesões de pele com alteração de sensibilidade, identificação de neurites, incapacidades e deformidades. Como sugerido pela OMS, na ausência de recursos laboratoriais, o diagnóstico passa a ser baseado somente em características clínicas como sintomas dermatológicos, exames de sensibilidade de nervos periféricos e no histórico epidemiológico do paciente. Os sinais clássicos da hanseníase são lesões cutâneas, nervos espessados e sensibilidade alterada em 70% dos casos (GALLO et al., 2005). Em outros casos é necessário o uso de exames laboratoriais complementares como a baciloscopia, teste da lepromina (reação de Mitsuda) normalmente utilizados e PCR (do inglês Polymerase Chain Reaction) sendo usada apenas em casos mais raros.

A baciloscopia é a análise microscópica de esfregaços cutâneos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões) com a intenção de detectar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) através da coloração pelo método de Ziehl-Nilsen. Para os exames histopatológicos são utilizadas biópsias cutâneas ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos. Nesse caso, os bacilos presentes nas biópsias podem ser detectados através da coloração pelo método de Wade (COCITO, DELVILLE, 1985). São testes fáceis de executar, rápidos e de baixo custo, utilizados como ferramentas complementares para a confirmação do diagnóstico clínico. No entanto, a baciloscopia não apresenta especificidade e sensibilidade adequada para detecção de todas as formas clínicas da doença (STEFANI, 2008)

No teste de Mitsuda é aplicada uma injeção intradérmica de lepromina e após 21 a 28 dias, a reação é medida através do diâmetro da inflamação, podendo ser negativa, ausência de elemento visível (-), inflamação discreta quando menor que 3 mm de diâmetro, com mais de 3 mm e menos que 5mm de diâmetro (+), mais de 5 mm (++) ou uma infiltração nodular ulcerada (+++) (Bechelli LM et al, 1959; IV Congresso Internacional de Hanseníase Madrid, 1953).

O sequenciamento do genoma do *M. leprae* possibilitou maiores avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase, como o uso da PCR. O diagnóstico da hanseníase por PCR se baseia na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Estudos já foram capazes de detectar a presença de genes específicos de *M. leprae* em biópsias de pacientes utilizando essa técnica (Martinez N. et al 2011), incluindo pacientes do polo tuberculóide, mostrando que essa técnica pode ser uma ferramenta para contribuir no diagnóstico de casos atípicos (Barbieri et al., 2014).

1.1.5. Aspectos gerais de tratamento

O tratamento utilizado contra a hanseníase indicado pelo Ministério da Saúde é a poliquimioterapia (PQT). A PQT baseia-se na administração, por 6 meses, de três medicamentos associados, sendo estes a rifampicina, a dapsona

e a clofazimina, foi introduzida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1982 (Ministério da Saúde 2014), após a evidência de resistência ao tratamento unicamente com Dapsona (Pettit & Rees, 1964), que revelou a necessidade de padronização do tratamento em combinação com outras drogas. Entretanto o tratamento de pacientes multibacilares tem duração de 12 meses, além disso a eficiência do tratamento é bastante comprometida tendo em vista que cerca de 15% dos pacientes não apresentam cura após esse período, havendo a necessidade de se repetir, algumas vezes de forma indefinida, o tratamento.

O tratamento do paciente com hanseníase é reconhecido como fundamental para bloquear uma das fontes conhecidas de transmissão da doença, sendo assim uma importante medida para contribuir na eliminação da doença.

1.1.6. Agente etiológico

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que apresenta predileção por dois tipos de células humanas: macrófagos da pele e células de Schawnn (KAPLAN, COHN, 1986), essa afinidade do patógeno explica as lesões dermatológicas e neurológicas observadas nos pacientes, que se não tratadas podem evoluir para incapacidades físicas permanentes. O *M. leprae* foi caracterizado pela primeira vez por Gerhard Hansen em 1873. Ao fazer análise de amostras de nódulos de pacientes utilizando o microscópio, Hansen percebeu a presença dos primeiros bacilos de *M. leprae*. Entretanto até hoje, após um século de tentativas, não foi possível ainda estabelecer um cultivo *in vitro* do patógeno, o que dificulta seu estudo.

O *M. leprae* é uma micobactéria gram-positiva, embora não seja corado muito bem pelo método de gram, tem a forma de bastonete, na maioria das vezes reto ou ligeiramente curvado, podendo ser encontrado isolado ou agrupado em cortes histopatológicos possuindo as seguintes dimensões: 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura, e a temperatura perfeita para o crescimento desta micobactéria é em torno de 33°C, o que explica sua

restrição às extremidades do corpo humano. Nas lesões dos pacientes, os bacilos podem ser encontrados isolados ou agrupados em globias. Por ser uma micobactéria é considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois é corado pela fucsina em vermelho, e não perde sua coloração após o uso de solução álcool-ácido quando corado pelo método de Ziehl-Nilsen ou pelo método de Kinyoun (REES, 1985; revisto por SCOLLARD, 2006).

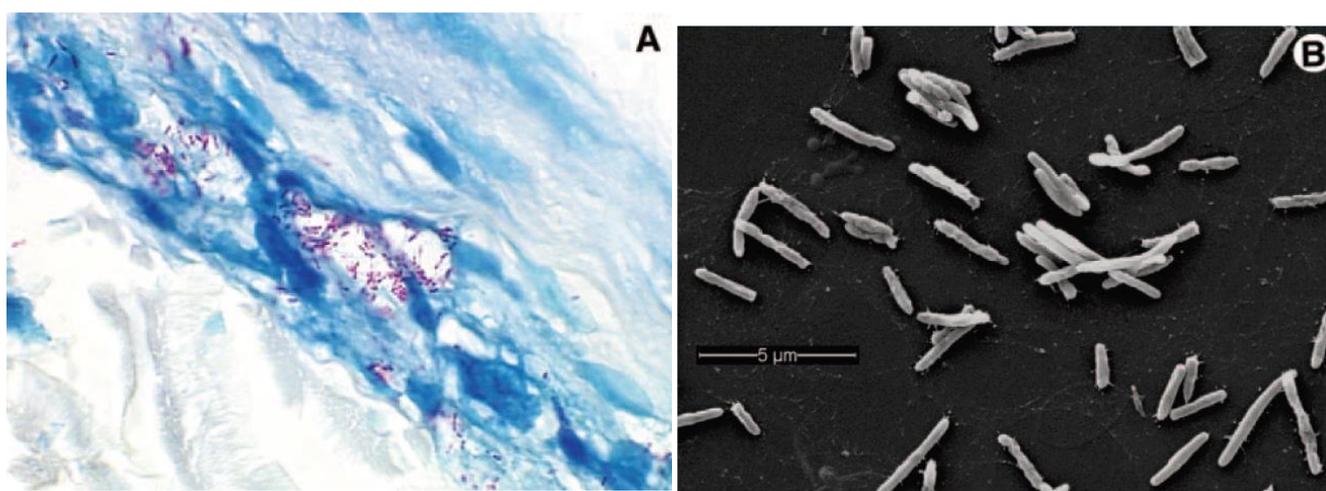


Figura 4: Morfologia do *Mycobacterium leprae*. A) Bacilos corados pelo método de Ziehl Nilsen, aumento de 100x. B) Microscopia eletrônica de varredura da micobactéria (SCOLLARD *et al.*, 2006).

1.1.7. Cultivo *in vitro*

Apesar do fato de ser um patógeno humano identificado à mais de um século (Chapman H 1953), ainda não foi descoberta uma forma de cultivo *in vitro* para o *M. leprae*. Embora diversas tentativas já tenham sido feitas, aonde muitos estudos alegaram o sucesso de diversos tipos de cultivos de *M. leprae*, como cultivos em meio axênico (KAYo, L. 1965), cultivos utilizando biopsia de pacientes (SOUZA ARAUJO, H. C. DE, 1956), assim como diversas tentativas de cultivo em culturas de células (Matsuo Y. 1976), no entanto nenhuma dessas “descobertas” conseguiram ser reproduzidas

novamente, muito provavelmente devido a existência de contaminação por outras bactérias (revisto por Pattyn SR. 1973).

Além do exposto acima, uma das maiores dificuldades no cultivo do *M. leprae* em células baseia-se no fato de que muitas das células conhecidas se multiplicam mais rapidamente que o bacilo, causando uma diluição do inóculo (revisto por Pattyn SR. 1973; HASTINGS R, OPRMOLLA D., 1994). Dessa forma, embora não tenha sido comprovado o crescimento de *M. leprae in vitro*, já foi demonstrada a manutenção da viabilidade do bacilo por diversas semanas em culturas de macrófagos incubados na presença de interleucina-10 (Matsuo Y. 1976, Fukutomi Y, 2004).

A causa mais frequentemente atribuída à essa impossibilidade do cultivo *in vitro* pode ser justificada pela grande perda de genes funcionais sofrida pelo *M. leprae*, que apresenta apenas cerca de 49,5% de genes funcionais, comparado ao *Mycobacterium tuberculosis*, que possui 90,8% dos genes funcionais (tabela 1). Essa redução demonstra uma longa adaptação ao ambiente intracelular, e explica sua impossibilidade de crescer *in vitro*, devido a necessidade de uma série de vias metabólicas da célula hospedeira para concluir seu metabolismo (COLE et al., 2001).

Características do genoma	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho (pb)	3.268.203	4.441.532
Proteínas codificadas (%)	49,5	90,8
Genes codificantes	1.604	3.959
Pseudogenes (no.)	1.116	6

Tabela 1 – Comparação das características do genoma do *M. leprae* e do *M. tuberculosis*
(adaptado de COLE et al, 2001)

1.1.8. Cultivo e manutenção de *M. leprae* em animais

O modelo utilizado para o cultivo foi descrito pela primeira vez em 1960 por Charles Shepard onde foi possível observar o crescimento local e limitado do patógeno em coxim plantar de camundongos CFW (fig. 5). Esse crescimento limitado do bacilo ocorreu devido à resposta do sistema imunológico do modelo experimental utilizado (SHEPPARD, 1962). Assim, já que os camundongos comuns eliminam os bacilos, foi estabelecido um modelo de cultivo com a inoculação de *M. leprae* proveniente de biopsias de pacientes em coxim plantar de camundongos com timo retirado cirurgicamente. Atualmente é feito uso de camundongos BalbC Foxn1^{-/-} (nu/nu) atímico (fig. 5) que demonstraram um melhor crescimento do bacilo (TRUMAN, KRAHENBUHL., 2001; LAHIRI et al., 2005, revisto por SCOLLARD, 2006) sendo assim, é possível a produção de bacilos viáveis para o uso experimental, entretanto este uso ainda é bastante limitado já que esse cultivo *in vivo* leva de seis a nove meses para a obtenção de uma quantidade de bacilo adequado para o uso na pesquisa, além da manutenção desses camundongos ser cara e muito específica por serem animais imunossuprimidos, logo o desenvolvimento de uma forma alternativa para o cultivo desse bacilo representaria um avanço tecnológico de extremo valor.



Figura 5 – A) Camundongos BalbC Foxn1 nu/nu. **B)** Pata do camundongo 6 meses após a inoculação com o *M. leprae* (SCOLLARD et al., 2006)

Além dos camundongos, em 1971 foi descrito que tatus da espécie *Dasytus novemcintus*, conhecidos como tatus de nove bandas, desenvolvem a doença após inoculação intravenosa, com lesões de pele e danos nos nervos periféricos (KIRCHHEIMER, STORRS, 1971). Posteriormente foi também observado uma significativa prevalência da hanseníase em tatus selvagens desta mesma espécie nos Estados Unidos (SMITH et al, 1983) assim como no Brasil (Deps et al, 2002; 2008), e mais recentemente foram descritos esquilos vermelhos nas ilhas Britânicas com lesões características da hanseníase na cabeça e membros, e através de ferramentas genômicas e histopatológicas foi possível confirma que esquilos da ilha Brownsea estavam infectados pelo *M. leprae* (AVANZI C et al, 2016)

1.1.9. Associação entre *M. leprae* e Artrópodes

Uma possível associação entre a hanseníase e artrópodes já havia sido especulada por Adolpho Lutz, médico e sanitaria brasileiro, em “Estudos sobre lepra”, escritos em Limeira, em 1885-1886, onde ele especula sobre o papel de outros elementos no cenário epidemiológico da hanseníase, como os artrópodes (BENCHIMOL et al, 2003). Esta teoria foi reforçada por Souza-Araújo, que em 1941 publicou o primeiro trabalho sobre a possibilidade da transmissão da hanseníase por carrapatos, identificando bacilos álcool ácido resistentes em macerados de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Essa associação foi demonstrada mais recentemente em carrapatos da espécie *Amblyomma canjennense* aqui no Brasil, aonde foi possível observar através de análises por PCR que o *M. leprae* se manteve viável no trato digestivo dos carrapatos por até 15 dias, tornando-se capazes de gerar proles infectantes (FERREIRA et al, 2013).

Além dessa associação as células de carrapatos possuem várias características que as tornam particularmente interessantes para o cultivo de *M. leprae*. Células de carrapatos já foram utilizadas com sucesso na propagação de

outros patógenos intracelulares como *Anaplasma marginali* (BLOUIN EF, 2002). São células de crescimento lento e podem sobreviver por vários meses sem a necessidade de um subcultivo, crescem em temperatura entre 28-30°C, próxima à ideal para a manutenção do *M. leprae*, e não possuem a necessidade de atmosfera de CO₂ o que contribui para a produção em larga escala a baixo custo (BELL-SAKYI L, 2007).

1.1.10. Cultivo de células de carrapato

O cultivo de células de carrapato são ferramentas importantes para a análise da interação do vetor-patógeno assim como o uso para a propagação de patógenos. O registro mais antigo de cultivo de tecidos de carrapatos foi realizado em 1952 por Weyer, onde foi feita a manutenção de rickettsias obtidas a partir de intestino de piolhos infectados, em um tecido não infectado do carrapato *Rhipicephalus Bursa* cultivado *in vitro*, mantendo a cultura por aproximadamente oito dias, o meio de cultivo utilizado era constituído de baço, plasma, testículo de coelho e extrato de piolhos (YUNKER, 1987).

Em 1969, Řeháček e Brzostowski formularam um meio para cultivo de células de carrapatos baseado na composição bioquímica da hemolinfa do carrapato, e em 1972 foi estabelecido o primeiro cultivo primário de células embrionárias do carrapato *Hyalomma asiaticum* (Medvedeva et al, 1972), enquanto Pudney, em 1973, estabeleceu o cultivo com ovos de *Rhipicephalus microplus*. Com o aperfeiçoamento das técnicas de cultivo de células de carrapato, foi estabelecida a primeira linhagem contínua através de tecidos de carrapatos marrons africanos, *Rhipicephalus appendiculatus* (VARMA et al., 1975).

Embora Řeháček e Brzostowski tenham formulado um meio, a maioria das células eram cultivadas num meio basal composto basicamente por Leibovitz's L-15, que foi originalmente formulado para células de mamíferos. Com a intenção de otimizar este cultivo, o meio L-15 foi suplementado com soro

fetal bovino e caldo de triptose fosfatada, permitindo assim o isolamento e a manutenção de células de diversas espécies de ixodídeos (KURTTI et al., 1982).

Após a identificação de alguns dos importantes componentes para o crescimento celular de carrapatos *in vitro*, o meio L-15 foi modificado pela adição de traços de minerais, vitaminas, aminoácidos, ácido α -cetoglutárico e glicose, formando o meio Leibovitz's L-15B (MUNDERLOH; KURTTI, 1985), que supriu as deficiências nutricionais presentes no Leibovitz's L-15 (MUNDERLOH; KURTTI, 1989).

Atualmente células de carrapato já são utilizadas para a propagação de patógenos que não puderam ser cultivados em nenhum outro sistema de cultivo *in vitro*, assim como microrganismos que não são transmitidos por carrapatos (Bell-Sakyi et al., 2007, Pudney, 1987; Lawrie et al., 2004; Bell-Sakyi, 2004).

A propagação de patógenos em linhagens de células de carrapato mais significantes são *Ehrlichia* e *Anaplasma* (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2002). Diversos membros desse gênero de bactérias intracelulares obrigatórias têm sido cultivados em linhagens de células de carrapato desde 1995, sendo a *Anaplasma marginale* a mais extensivamente explorada (MUNDERLOH et al., 1996; BLOUIN et al., 2002). Cultivos contínuos desses patógenos têm sido realizados em linhagens celulares de várias espécies de carrapatos, predominantemente *Ixodes scapularis* (BELL-SAKYI et al., 2007).

A maioria das linhagens celulares de carrapato existentes foi estabelecida a partir de células embrionárias, usando metodologia simples e sem selecionar tipos de tecidos específicos (KURTTI et al., 1988b; BELL-SAKYI, 1991; MUNDERLOH et al., 1994). Desse modo, as linhagens geralmente são compostas de dois ou mais tipos celulares presentes em proporções variadas, sendo essencial para a sobrevivência do cultivo (YUNKER, 1987). Culturas de células de carrapato são extremamente duradouras, podendo crescer em três dimensões, embora seu crescimento seja relativamente devagar, podem sobreviver com apenas uma mudança de meio de cultura por semana, assim como não é necessário realizar subculturas com uma grande frequência (Bell-Sakyi et al., 2007). A maioria das células de carrapato crescem em meios

suplementados com soro e em temperatura entre 28°C e 34°C em condições de pH entre 6,5 e 6,8, mas existem aquelas que conseguem se propagar em pH neutro ou alcalino (Munderloh *et al.*, 1996).

2. JUSTIFICATIVA

A hanseníase, causada pelo *M. leprae*, afeta a humanidade a séculos. Entretanto, até o momento, ainda não há um protocolo de cultivo *in vitro* para o patógeno causador dessa doença, tendo os cientistas que depender exclusivamente do seu cultivo em animais. Essa deficiência vem sendo um grande empecilho para as pesquisas, atrasando o entendimento de diversos mecanismos do *M. leprae*. O desenvolvimento de um cultivo *in vitro* do bacilo é extremamente necessário, já que existem diversas lacunas que seriam facilmente respondidas se houvesse a possibilidade de estudar o patógeno de uma forma mais eficiente, limpa e direta. Com uma associação recentemente encontrada entre carrapatos e o *M. leprae*, abre-se uma porta para uma nova linha de abordagem para a tentativa do cultivo do bacilo. Devido a essa possibilidade, no presente estudo nos propomos a estabelecer uma forma de cultivo de *M. leprae* utilizando células de linhagens oriundas de embriões de carrapatos.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Analisar o potencial de linhagens de células de carrapatos como uma plataforma de cultivo de *M. leprae*, assim como possíveis aplicações em ensaios de eficácia de drogas e geração de cepas transgênicas.

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver um sistema de cultura *in vitro* de *M. leprae* em pequena escala, utilizando uma ou mais linhagens de células de carrapato;
- Estabelecer uma plataforma *in vitro* para análise de novos antibióticos e agentes micobactericidas;
- Comparar a resposta celular e a infectividade do patógeno gerado *in vitro* e *in vivo*;
- Utilizar o cultivo de *M. leprae in vitro* para a produção de uma cepa transgênica expressando o fluoróforo mCherry a partir do plasmídeo *pCherry3*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CÉLULAS UTILIZADAS E CULTIVOS

As células de linhagem de carrapatos, **AVL17**, **BMBR-1** **BMRBR-2**, **IDE8**, **ISE6** e **HAE8**, foram utilizadas para os testes de cultivo e associação e todas foram obtidas do Tick Cell Biobank - Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, sendo obtidas através da colaboração com o Dr. Adivaldo Fonseca do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, do Instituto de Veterinária da UFRRJ e a Dra. Lesley Bell-Sakyi (Universidade de Liverpool, Reino Unido). Todas as culturas foram mantidas a 28-30°C, em garrafas de cultura de 25cm (Kasvi) ou em tubos de cultura Nunc™ Cell Culture Tubes (ThermoFisher). Todas as linhagens de células de carrapatos são oriundas de embriões, provavelmente contendo mais de um tipo celular. As células foram mantidas com rotina de substituição dos meios uma vez por semana. Os meios utilizados para manutenção das culturas de células de carrapato foram: o meio L-15, suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado, 10% de caldo de triptose fosfatada, 1% de L-glutamina (200mM), utilizado para o cultivo das células BMBR-1 e 2 provenientes do carrapato *Rhipicephalus microplus*; L-15B, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 10% de caldo de triptose fosfatada, 0,1% de lipoproteína bovina concentrada, 1% de L-glutamina, utilizado no cultivo das células da linhagem IDE8 e ISE6 (carrapato *Ixodes scapularis*); o meio de cultura H-Lac, utilizado em uma mistura com o L15 (1:1) para o cultivo da HAE8 (carrapato *Hyalomma anatolicum*) e em uma outra mistura de meios com L15b e L15 (1:1:1) para o cultivo da AVL17 (carrapato *Amblyomma variegatum*).

Linhagem	Espécie de carrapato	Meio de cultivo	Temperatura de incubação
AVL/CTVM17	<i>Amblyomma variegatum</i>	L15b + L15 + H-Lac	30°C
BMBR-1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	L15	30°C
BMBR-2	<i>Rhipicephalus microplus</i>	L15	30°C
IDE-8	<i>Ixodes scapularis</i>	L15b	29°C
ISE-6	<i>Ixodes scapularis</i>	L15b	29°C
HAE/CTVM8	<i>Hyalomma anatolicum</i>	L15 + H-Lac	30°C

Tabela 2 – Células de carrapato utilizadas nos experimentos. Tabela referente as células de carrapato demonstrando o carrapato de origem, meio de cultura e temperatura de manutenção.

HepG2 e ST8814 – Para análise comparativa entre o *M. leprae* produzido em coxim plantar de camundongos nude e o gerado em células de carrapato, foram feitos testes de captação de glicose (NBDG) e potencial elétrico da membrana mitocondrial (TMRM) no qual foram utilizadas duas linhagens, sendo elas células de Schwann (ST8814) e hepatocarcinoma humano ou carcinoma hepatocelular (HepG2). Todas as células foram adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, EUA), todas as culturas foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ para o cultivo de ST8814 utilizando o meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Brasil) suplementado de 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo 2 mM L-Glutamina. Para o cultivo da célula HepG2 foi utilizado o meio DMEM *High Glucose* completo suplementado com 10% SFB.

As culturas citadas, quando não infectadas, eram suplementadas com 1% da solução de antibióticos penicilina (10.000 UI) e estreptomicina (10mg/mL).

Linhagem	Origem	Meio de cultivo	Incubação
HepG2	Hepatocarcinoma	DMEM high glucose	37°C - 5% CO ₂
ST9914	Células de Schwann	RPMI1640	37°C - 5% CO ₂

Tabela 3 – Células de humanos utilizadas nos experimentos. Tabela referente as células demonstrando a origem, meio de cultura e temperatura de manutenção.

4.2 COLORAÇÃO DE KINYOUN E DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE

A coloração de Kinyoun foi utilizada para a quantificação das curvas de crescimento de *M. leprae* nas células de carrapato, através das contagens dos bacilos marcados por carbol-fucsina. O material obtido a partir da lise das células foi mantido em formol leite e colocados em lâmina para serem fixados a fogo por aproximadamente 10 segundos, após isso a lâmina foi corada com carbol-fucsina por 5 minutos, lavada levemente com água corrente, em seguida coberta por um descorante álcool-ácido, lavada com água corrente novamente, por último foi coberta por azul de metileno por 1 minuto e lavada uma última vez. (revisto por MARISE A., ANNE Z. 2008) Após secar essa lâmina foi analisada por microscopia onde foi feito a contagem dos bacilos corados em 10 diferentes campos para a obtenção da quantidade de bacilo naquela amostra. A viabilidade foi avaliada por exclusão de PI e foi feito seguindo as instruções do fabricante do Kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability (Thermo Fisher), após o preparo da lâmina foi feito a análise de 10 campos por microscopia de fluorescência.

4.3 OBTENÇÃO DE *M. leprae* CULTIVADO *IN VIVO*.

As cepas de *M. leprae* utilizadas foram a Thai-53 e a PA-84 ambas foram cedidas pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), proveniente do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*). As patas infectadas por cerca de 6-9 meses foram enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular (FIOCRUZ, RJ) para processamento e purificação dos bacilos. Os bacilos foram quantificados por contagem por coloração de Kinyoun. A viabilidade foi determinada através da coloração das bactérias com fluorocromos utilizando o método Live/Dead BacLight bacterial viability kit (Life Technologies, EUA). Realizou-se um esfregaço em lâmina de vidro e através da microscopia de fluorescência,

bactérias vivas e mortas foram quantificadas por contagem dos bacilos verdes e vermelhos, respectivamente. Nos experimentos, foi utilizado *M. leprae* com viabilidade acima de 70%

4.4 MARCAÇÃO COM PKH

A marcação do *M. leprae* para ensaios de imunofluorescência e citometria foi realizada utilizando o kit PKH2 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich, EUA), de acordo com instruções do fabricante. 10^7 bacilos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Após isso o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 100 μ L do diluente A, contendo 1 μ L do corante PKH2, incubado e protegido da luz por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de SFB e incubado por 1 minuto para a neutralização. Foi então centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet de bactérias foi lavado três vezes com meio RPMI-1640 para a retirada do excesso de fluorocromo. Ao final, as bactérias foram ressuspensas em meio e utilizadas para infecção das linhagens para as análises de citometria e microscopia.

4.5 ANÁLISE POR CITOMETRIA

Linhagens celulares de carrapatos (AVL17, IDE8, HAE) foram plaqueadas em placas de cultivo de 24 poços (2×10^5 células/poço) e infectadas com *M. leprae* em multiplicidade de infecção (MOI) 50:1 marcados com PKH2 (Green Fluorescent Cell Linker), sendo incubadas a 33°C, temperatura ideal para o bacilo. Após 24h de inoculação dos bacilos, os meios de cultivo foram retirados dos poços e os poços lavados gentilmente com HBSS para retirada dos bacilos livres. Depois desse procedimento, as células foram ressuspensas com 1mL de HBSS por poço e colocadas em tubos de 1,5mL para centrifugação por 14.000

rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado, os pellets foram ressuspensos em solução de 1% de paraformaldeído e os tubos acondicionados em geladeira a 4°C, até a análise. O aparelho utilizado para análise foi o BD Accuri C6 - Beckton & Dickinson® no canal FL1-A, com leitura de 10.000 eventos, do Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz.

4.6 ANÁLISE POR MICROSCOPIA DA MARCAÇÃO COM PKH

Linhagens celulares de carrapatos (AVL17, IDE8, HAE) foram plaqueadas em placas de cultivo de 24 poços (2×10^5 células/poço), contendo lamínulas de vidro estéreis e infectadas com *M. leprae* durante 24 horas a 33 °C utilizando uma MOI de 50:1 marcados com PKH2 (Green Fluorescent Cell Linker). Após as 24 horas de infecção o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X (LGC biotecnologia, Brasil) e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min à temperatura ambiente. Depois do período de fixação, as células foram novamente lavadas com PBS 1X. DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma-Aldrich) foi utilizado na marcação do DNA nuclear das células seguindo recomendações do fabricante. Por fim, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X por 5 min, montadas em lâminas de vidro contendo 3 µL de solução ProLong® Gold Antifade (Life Technologies, EUA) e seladas com Entellan® (Merck, Alemanha).

Para análise foi utilizado o microscópio de fluorescência Axio Observer.Z1 (Zeiss, Alemanha), com a objetiva Plan-neofluar com aumento de 63x utilizando filtro Zeiss 50, excitação por led de 530nm, captura por câmera controlada pelo software Axiovision (Zeiss, Alemanha). A quantificação das imagens foi feita com programa ImageJ

4.7 CULTIVO DE *M. leprae* IN VITRO

4.7.1 Utilizando placas de 24 poços

As culturas de células de carrapato foram infectadas com *M. leprae* proveniente de coxim plantar de camundongos com o objetivo de verificar associação e a propagação do *M. leprae* nas células de carrapato, na multiplicidade de infecção (MOI) de 1:50 e mantidas em placas de 24 poços (2×10^5 células e 1 mL de meio) por 24 horas, 10 dias e 20 dias à 28-32°C em tubos selados. Nos tempos determinados as células foram lisadas utilizando 1 ml de Triton X100 (0,1%), esse lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em formol leite, sendo essa suspensão utilizada para contagem dos bacilos por microscopia óptica através da coloração de Kinyoun.

4.7.2 Utilizando tubos falcons

Para o teste de viabilidade as células IDE8 foram semeadas em tubo do tipo falcon de 15mL, infectadas com *M. leprae* e mantidas sob agitação por 24 horas, para que as células pudessem aderir na parede do tubo, e semanalmente foi retirado o meio utilizando uma pipeta pasteur, esse meio foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos e o pellet foi lisado com 1 ml de Triton X100 (0,1%) e centrifugado novamente, após isso foi feita a coloração para viabilidade bacteriana por Syto9 e exclusão de iodeto de propidium (Live/Dead BacLight kit), seguindo as instruções do Kit.

4.7.3 Utilizando garrafas pequenas e tubos de cultura

Para o aumento da escala do cultivo de *M. leprae* foi utilizado garrafas de cultura de 25cm (Kasvi) e Nunc™ Cell Culture Tubes (ThermoFisher). As

culturas de IDE8 foram infectadas com bacilo proveniente de camundongos nude na multiplicidade de *infecção* (MOI) de 1:50 e mantidas com trocas de meios semanais por dois meses. Ao final de dois meses as células foram lisadas utilizando 1 ml de Triton X100 (0,1%), esse lisado foi centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em formol-leite para armazenamento, após isso essa suspensão foi usada para contagens dos bacilos por microscopia através da coloração de Kinyoun, a quantidade de bacilo obtida foi utilizada para outros experimentos ou reinfecção de novos tubos de IDE8.

4.8 TESTE DE VIABILIDADE UTILIZANDO MODELO SHEPARD DO *M. leprae* CULTIVADO EM IDE8

Uma cultura de células IDE8 foi infectada com *M. leprae* Thai-53 cepa a um MOI de 50: 1 a 30°C. Após 20 dias de incubação o *M. leprae* purificado foi quantificado por coloração de Kinyoun. Para o experimento foram utilizados quinze camundongos BALB/c divididos em três grupos de 5 animais. Dois grupos foram inoculados com 20 µL da Suspensão de *M. leprae* contendo 10⁴ bacilos colhidos da cultura IDE8 em um Modelo de infecção de Shepard. Um controle negativo foi gerado em um dos dois grupos que receberam bacilos de IDE8 tratando os animais com rifampicina 10mg/kg por semana. Como controle positivo, o terceiro grupo foi inoculado com o mesmo número de *M. leprae* recentemente purificado a partir de coxim plantar de Imofadas das patas de camundongos nude. Após seis meses, os ratos foram sacrificados por uma overdose intraperitoneal de cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg) e os bacilos no coxim plantar foram purificados e marcados com coloração de Kinyoun para contagem.

4.9 COMPARAÇÃO DO EFEITO DO *M. leprae* DE CAMUNDONGO E DE CÉLULAS DE CARRAPATO POR HCS (high content screening)

Para comparar o efeito do *M. leprae* proveniente do cultivo *in vitro* em camundongo e o mantido em células de carrapato foram feitas análises de captação de glicose e do potencial elétrico da membrana mitocondrial utilizando células humanas. A captação de glicose foi monitorada usando o análogo de glicose fluorescente 2-NBDG (Sigma). As células foram expostas ao fluoróforo a uma concentração de 500nM por 30 min. O potencial elétrico da membrana mitocondrial foi determinado pela exposição das células IDE8 à TMRM a 0,5 nM (Sigma), corante que acumula em mitocôndrias com potencial de membrana intacto, os resultados do TMRM foram obtidos pela razão do sinal de fluorescência para o mesmo sinal em uma cultura pré-incubada com indutor de mitofagia, CCCP (Sigma). Para marcação de núcleos foi utilizado Hoeschst 33342 (Sigma), foi utilizado a concentração de 10ug/mL por 40 minutos. As análises foram feitas automaticamente por microscopia HCS (high content screening), utilizando aparelho GE Cytell™, controlado pelo software Cell Imaging System, foi criado um protocolo de análise selecionando os comprimentos de onda desejados para a análise assim como a placa utilizada, nesse caso uma placa de 96 poços, foram feitas 6 fotos de 6 quadrantes aleatórios em cada poço e analisadas automaticamente pelo software

4.10. GENOTIPAGEM POR ANÁLISE DE NÚMERO DE VARIÁVEL DE MÚLTIPLOS LOCUS (MVLA)

O DNA das culturas de células de carrapatos infectados com *M. leprae* foram submetidos à MLVA de 16 loci. Para cada amostra, foram realizadas quatro reações de PCR multiplex que geraram 16 amplicons e o número de cópias do alelo foi determinado por desnaturação dos amplicons e eletroforese em gel capilar no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer, usando os padrões de tamanho de peso molecular interno LIZ 500 (Thermo Fisher

Scientific, MA, EUA) e definição do número de cópias com o software Peak Scanner (Applied Biosystems, MA, EUA).

4.11 GERAÇÃO DA CEPA TRANSGÊNICA UTILIZANDO O PLASMÍDEO pCHERRY3

A transformação do *M. leprae* foi feita no Laboratório de microbiologia celular no Instituto Oswaldo Cruz na FIOCRUZ Rio de Janeiro (LAMICEL IOC) e foram utilizados 10^9 bacilos da cepa PA-84 e 6 μg de DNA do plasmídeo pCherry3 doado pela Dra. Suzie Hingley-Wilson (Universidade de Surrey, Reino Unido). pCherry3 é um plasmídeo que não se integra ao DNA da bactéria com tamanho de 6.3 kb contendo gene reporter mCherry com o promotor Psmyc de *Mycobacterium smegmatis* e resistência a antibiótico (canamicina ou higromicina B) (Carrol P, 2010). O eletroporador BioRad Micropulser (Hercules, CA, USA) foi ajustado em 2.5kV e tensão elétrica de 1000 Ω . A solução contendo *M. leprae* purificado de camundongo foi centrifugada à 14000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet dissolvido em 200uL de água MilliQ estéril com Tween 80 (0,05%). Depois de adicionarmos o DNA do plasmídeo nessa suspensão de bacilo e DNA foi transferida para a cubeta de eletroporação. Após a eletroporação a suspensão foi utilizada para infectar a cultura de células IDE8, após uma semana de cultivo foi adicionado antibiótico para promover a seleção das micobactérias fluorescentes e nas semanas seguintes a cultura foi analisada por microscopia de fluorescência.

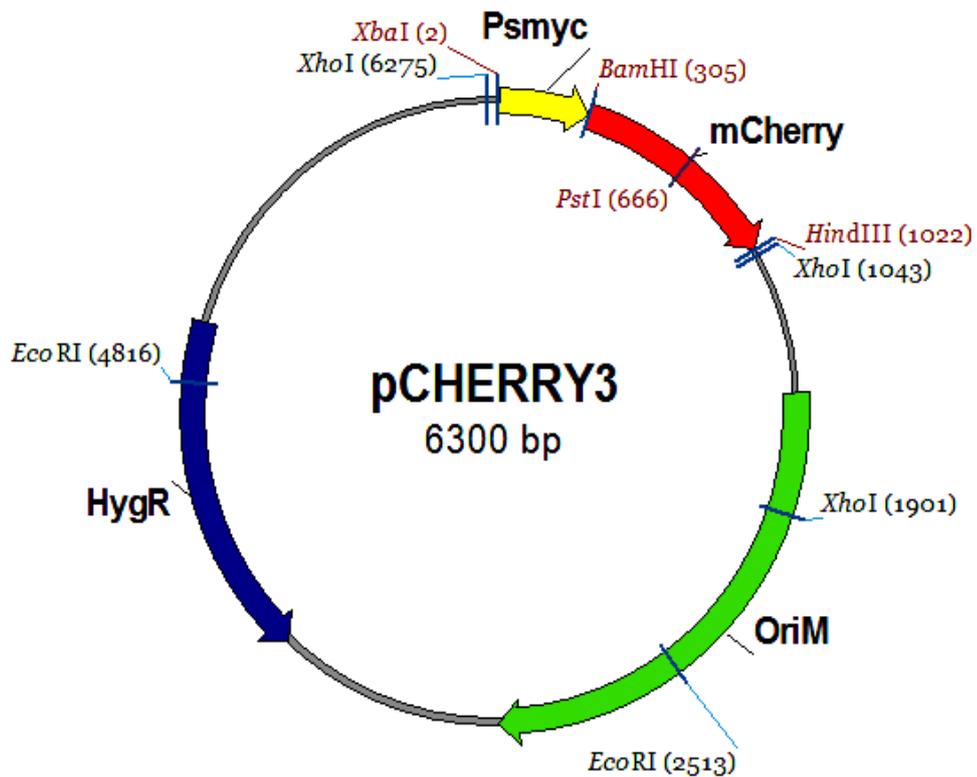


Figura 6 – Esquema demonstrativo da estrutura do plasmídeo pCHERRY3.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

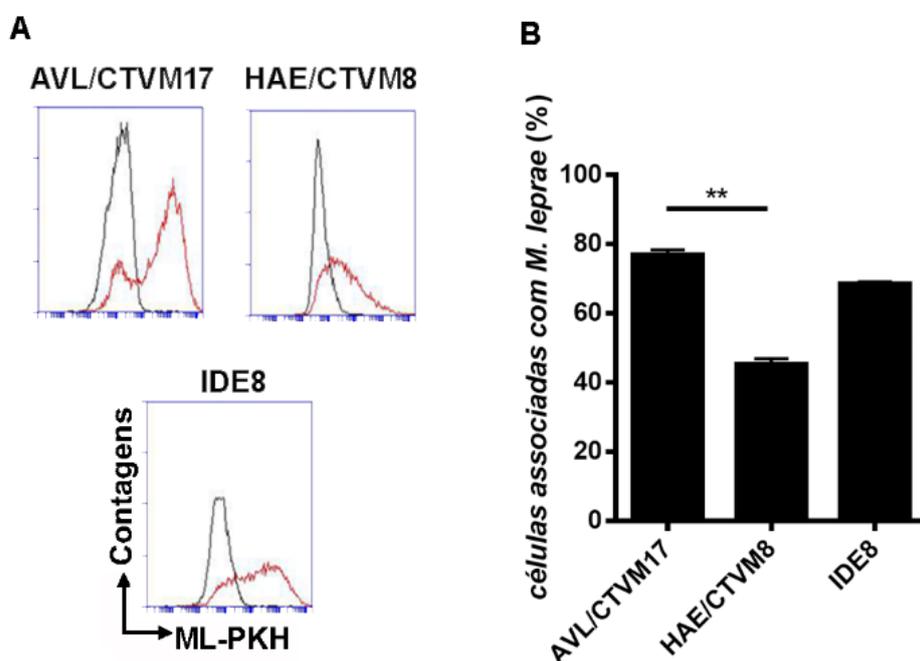
Todos os dados numéricos foram analisados usando teste não paramétrico, com comparações múltiplas de Dunn teste para comparar grupos relevantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5. Os valores foram considerados significativos quando o p foi igual ou inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE CÉLULAS DE CARRAPATO E *M. leprae*

Primeiramente foi realizado uma análise da interação do *M. leprae* com as células de linhagem de diferentes carrapatos (AVL/CTVM17, IDE8 e HAE/CTVMC8) através de citometria de fluxo (fig.1 A e B) e microscopia (fig.1 C e D) com o intuito de demonstrar se o *M. leprae* capaz de se associar às células de carrapato *in vitro* e além disso qual das três células testadas teria a melhor associação com o bacilo.

Nesse resultado é possível observar que a partir da análise por citometria de fluxo (fig. 7 A e B) e microscopia através da marcação de PKH (fig. 7 C e D) todas as três linhagens testadas demonstraram um grau de associação com o bacilo e dentre as três a AVL/CTVM17 (*Amblyomma variegatum*) e a IDE8 (*Ixodes scapularis*) foram as quem demonstraram uma maior interação com o bacilo podendo ser visto essa associação a partir do histograma e a quantificação (fig.7 A e B) e confirmado a partir da análise de microscopia por fluorescência e quantificação (fig7. C e D).



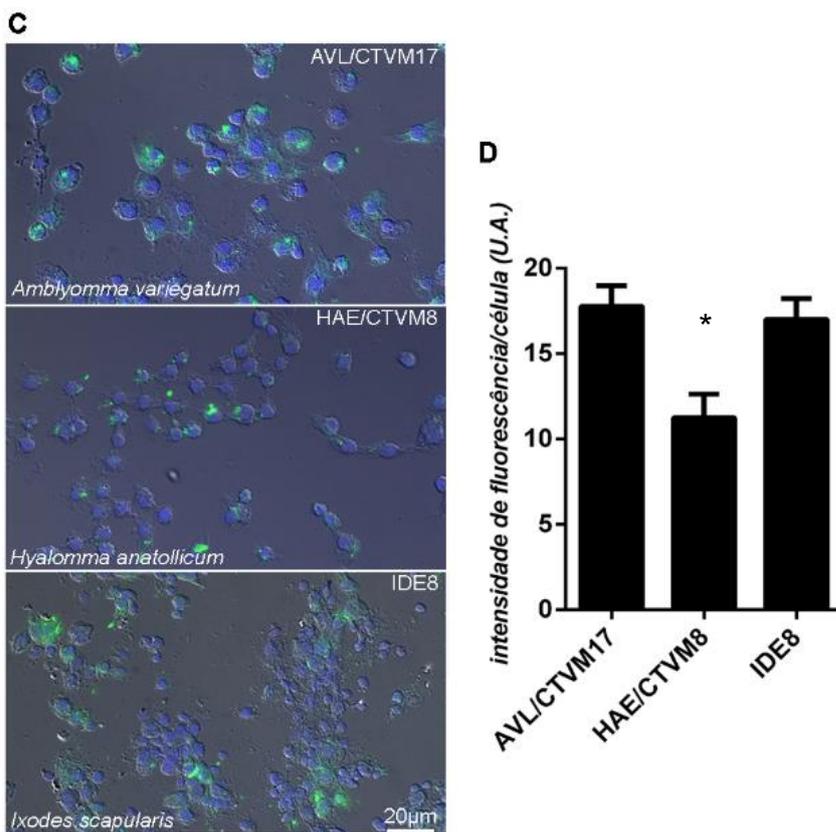
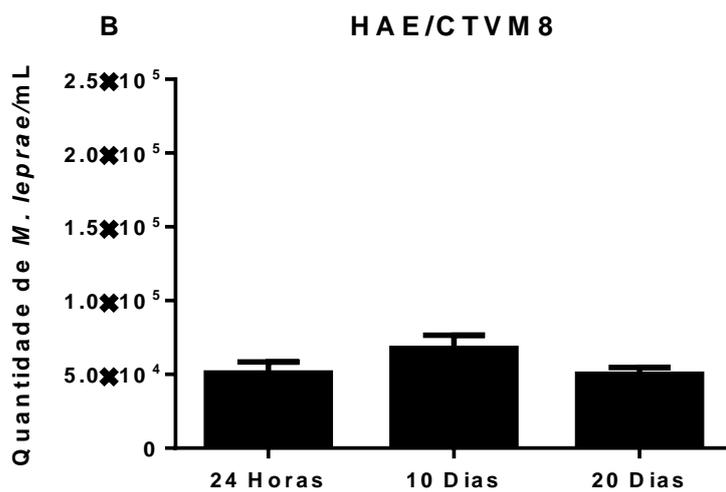
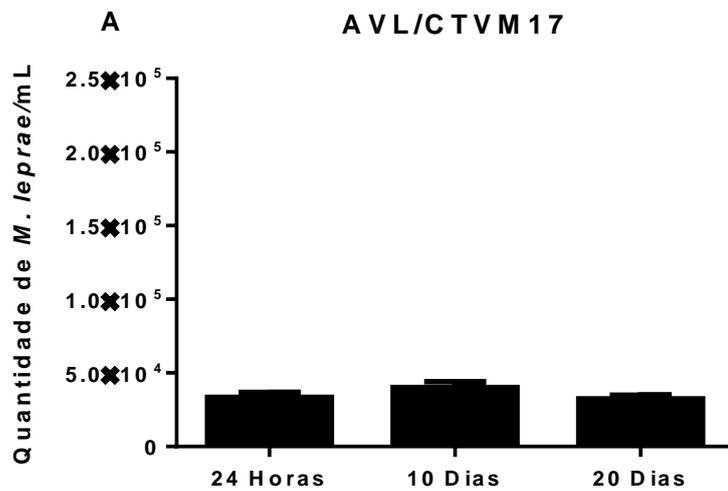


Figura 7 - O *M. leprae* pode se associar à diferentes linhagens de células de carrapatos. A) Histogramas gerados por citometria de fluxo mostrando associação entre *M. leprae* marcado com PKH26 e três linhagens celulares de carrapatos: AVL/CTVM17, HAE/CTVM8 e IDE8. As linhas cinzas representam as células do carrapato não infectadas e as linhas vermelhas representam as células associadas aos bacilos fluorescentes. B) Quantificação dos histogramas em (A) demonstrando um alto nível de associação entre o patógeno e as linhagens celulares AVL/CTVM17 e IDE8. C) Microscopia de fluorescência 24h após infecção de linhagens de carrapatos com *M. leprae* marcadas com o fluoróforo verde PKH67. D) Quantificação dos valores médios de intensidade de fluorescência/célula em (C), para os quais foram analisadas sessenta fotos de três experimentos independentes. Multiplicidade de infecção (MOI) de 50:1, A barra de escala representa 20µm; ** = $p < 0,005$ e * = $P < 0,05$ Teste de comparações múltiplas de Dunn.

5.2. TESTE DO POTENCIAL DAS CÉLULAS DE CARRAPATO PARA CULTIVO *IN VITRO* DE *M. leprae*

A seguir foi feita a análise para verificar o potencial dessas células para manter e propagar o *M. leprae*. O resultado foi gerado a partir da contagem de bacilos nos tempos de 24h, 10d e 20d após o inóculo inicial do bacilo na cultura de células mantidas em placas de 24 poços (fig.2 A-C). Verificamos que nas células AVL/CTVM17 e HAE/CTVM8 não foi possível observar uma

mudança significativa na quantidade de bacilos enquanto na linhagem IDE8 houve um aumento significativo na quantidade de *M. leprae* após 10 dias e 20 dias de cultivo.



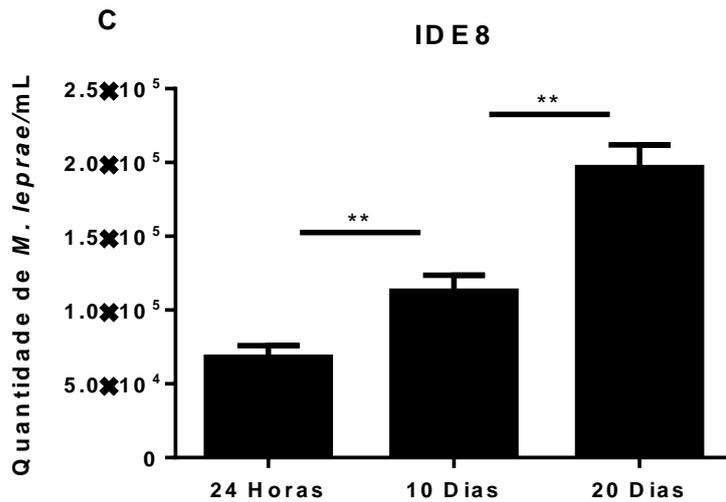


Figura 8 - O *Mycobacterium leprae* é capaz de se multiplicar em culturas de células de carrapatos. As linhagens de células de carrapatos AVL/CTVM17, HAE/CTVM8 e IDE8 foram infectadas com 10^5 *M. leprae*; a carga bacilar inicial (24h) e após 10 e 20 dias de incubação a 30°C foram determinados por lise celular e contagem de bacilos álcool-ácido resistentes totais. Cada barra representa a média de nove culturas independentes realizadas com três preparações diferentes de *M. leprae*. ** = $p < 0,0001$ Teste de comparações múltiplas de Dunn.

5.3. TESTE DO POTENCIAL DE OUTRAS LINHAGENS PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE *M. leprae*

Foram analisadas outras linhagens de células de carrapato para verificarmos se essa capacidade de propagação do bacilo verificada pela IDE8 estaria presente em outras linhagens, para isso foi repetido o mesmo experimento descrito na figura 2 com a adição de 3 linhagens novas, BMBR1, BMBR2 e ISE6. A partir deste experimento foi possível identificar que a linhagem ISE6 parecia possuir uma capacidade parecida com a observada na IDE8, entretanto mesmo com as células com aparência normal o crescimento verificado não foi sustentado após o tempo de 10 dias de cultivo.

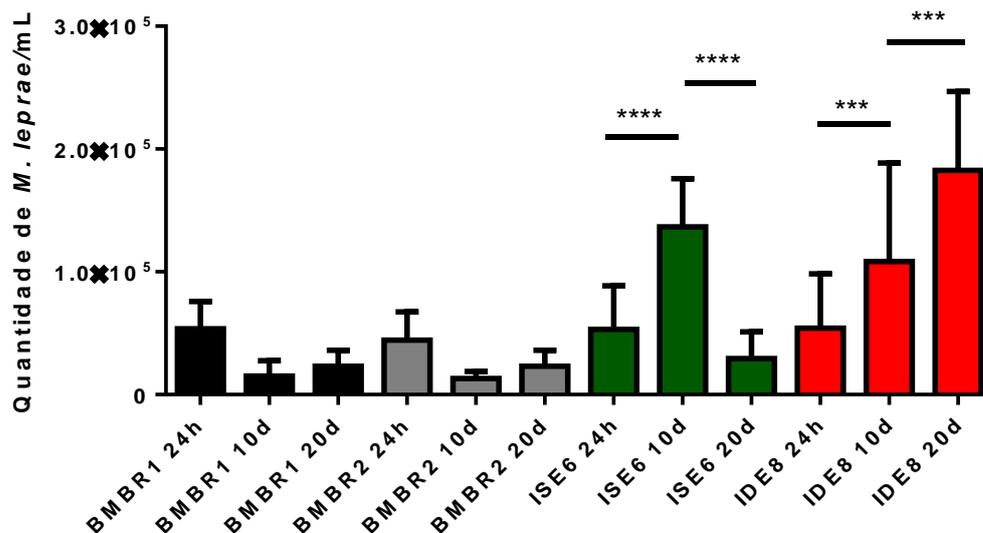


Figura 9 - Infecção por *M. leprae* em diferentes linhagens de células de carrapato. A partir de um inoculo inicial de 10^5 bacilos, a carga bacilar nas culturas após (24h), assim como a carga bacilar após 10 e 20 dias de infecção foram determinadas através da lise com Triton X100 (0,1%) mais água MilliQ das células e contagem de bacilos utilizando a coloração de Kinyoun. *** = $p < 0,0003$ e **** = $P < 0,0001$ Dunn's multiple comparisons test

5.4. *M. leprae* SE MANTÉM VIÁVEL EM CULTIVO DE IDE8 POR PELO MENOS 2 MESES

Como visto anteriormente IDE8 é a melhor candidata para o crescimento do *M. leprae in vitro*. Antes de tentar aumentar a escala do cultivo utilizado foi feita a análise da viabilidade desse *M. leprae* produzido, para isso foi feito um cultivo de IDE8 no qual as células foram aderidas na parede de um falcon e por dois meses o sobrenadante da cultura foi retirado uma vez por semana para ser analisado utilizando a marcação com IP (marcação vermelho) para a bacilos mortos e Syto9 (marcação verde) para bacilos vivos. Podemos observar no gráfico da quantificação das imagens obtidas no experimento que o *M. leprae* se manteve viável, ou seja, com pelo menos 75% de viabilidade durante o período testado de dois meses.

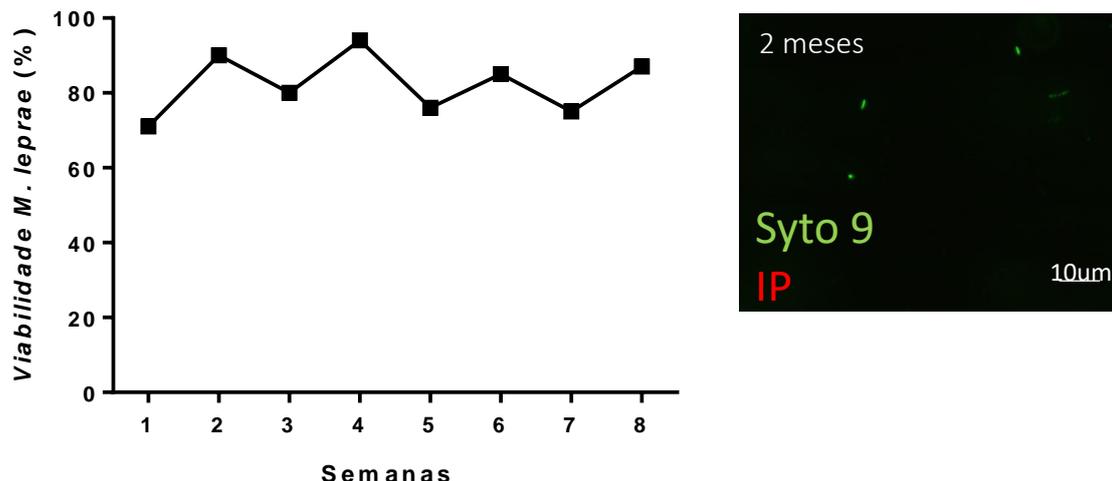


Figura 10 – O *M. leprae* permanece viável por pelo menos 2 meses em cultura de células IDE8. Após o inóculo inicial, em tubos de cultura, a viabilidade do bacilo foi analisada semanalmente com a retirada do sobrenadante da cultura e na oitava semana toda a cultura foi lisada. Imagem gerada por microscopia de fluorescência convencional, foi analisado um total de 80 fotos (10 fotos por semana) das lamínas contendo bacilo purificado e marcado com Syto 9 e IP obtido do sobrenadante da cultura. Análise feita por incorporação de Syto 9 e exclusão de IP

5.5. ANÁLISE DA VIABILIDADE EM MODELO SHEPARD DO *M. leprae* DE IDE8

Bacilos mantidos em culturas de células IDE8 foram enviados para inoculação em coxim plantar de camundongos BALB/c para verificar sua viabilidade e infectividade no modelo de Shepard (tabela 1). Os camundongos foram mantidos por seis meses após o inóculo com 10^4 *M. leprae* proveniente do cultivo em nu/nu ou de *M. leprae* propagado por 20 dias em IDE8, após esse tempo de seis os bacilos do coxim plantar foram purificados e contados por microscopia utilizando a coloração de Kinyoun. Foi possível verificar que o *M. leprae* cultivado em células da linhagem IDE8 manteve sua capacidade de infectar e se propagar em camundongos, e em dois dos cinco camundongos utilizados foi possível observar um maior aumento na quantidade de bacilo.

Inoculo	Número do camundongo				
	1	2	3	4	5
<i>M. leprae</i> cultivado em IDE8	2,5x10 ⁵	8,9x10 ⁵	6,1x10 ⁴	8,8x10 ⁴	5,5x10 ⁵
<i>M. leprae</i> cultivado em IDE8 e tratado com rifampicina	0	0	0	0	0
<i>M. leprae</i> cultivado em coxim plantar de camundongo	4x10 ⁵	1,3x10 ⁵	3,5x10 ⁵	1,8x10 ⁵	2,5x10 ⁵

Tabela 4 – Viabilidade de *M. leprae* produzido em IDE8 no modelo Shepard. Camundongos BALB/c foram inoculados com 10⁴ bacilos no coxim plantar e mantidos por 6 meses, ao final desse tempo foi feita a purificação dos bacilos encontrados no tecido do coxim plantar seguida de quantificação por contagem direta.

5.6. GENOTIPAGEM POR MVLA

Para a confirmação se a bactéria produzida é *M. leprae* foi feito uma genotipagem por análise de número variável de múltiplos locus, *multiple locus variable-number tandem repeat analysis* (MVLA) utilizando extratos de DNA de culturas de células de carrapatos infectados com *M. leprae* que foram submetidos à MLVA de 16 loci de número variável de repetição em tandem (VNTR), conforme descrito anteriormente (Kimura M 2009). O resultado confirmou que a bactéria produzida é *M. leprae* e não foi constatado a presença de contaminantes nas amostras usadas

Amostra	6-3	AT17	GGT5	GTA9	AC8B	AC8A	AT15	21-3	TTC	6-7	27-5	23-3	12-5	18-8
THAI-53*	3	10	5	9	7	11	13	3	14	6	5	2	4	8
THAI-53 depois de 20 dias em cultivo de IDE8	3	10	5	9	ND	11	ND	3	ND	6	5	2	ND	8
*Amostra original														
ND: impossível de caracterizar devido a PCR negativa														

Tabela 5. Genótipos de VNTR de amostras de *M. leprae* analisadas antes (amostras originais) e após o cultivo na linhagem de células do carrapato IDE8 (cepa Thai-53).

5.7. TESTE PARA OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE *M. leprae* EM IDE8.

Com a intenção de otimizar tanto o crescimento das células quanto do *M. leprae* foram feitos dois testes, o primeiro com o intuito de testar se as células têm melhor crescimento sob agitação de 15 RPM (fig.6 A). Foi possível observar

que essas células preferem o sistema de cultivo estático, pois a agitação causou a morte da cultura após 5 semanas. No segundo experimento foi analisada a melhor concentração do inóculo inicial de *M. leprae* (fig. 6 B) na cultura de células IDE8, onde observamos que 10^7 é a concentração ideal do inóculo para o início do cultivo.

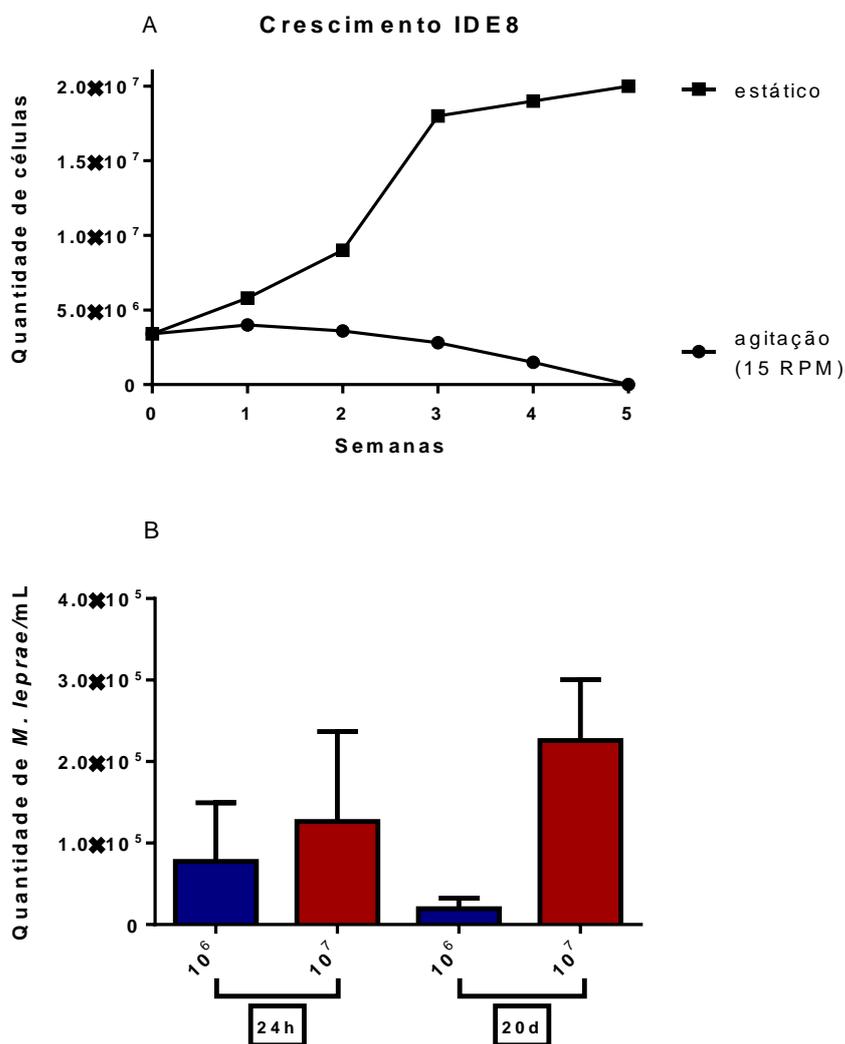


Figura 11 – Identificação do melhor processo de produção de *M. leprae* em cultura de células IDE8. A) Cultivo realizado em garrafas pequenas (25cm), onde culturas foram mantidas em cultivo estático (quadrado) ou sob agitação de 10 RPM durante até 5 semanas. B) Culturas foram mantidas em placas de 24 poço e nos tempos de 24h e 20d, quando as mesmas foram lisadas para contagem de bacilos por marcação com coloração de Kinyoun.

5.8. AUMENTO DA ESCALA DE PRODUÇÃO DE *M. leprae* IN VITRO

A partir dos testes anteriores, desenvolvemos um cultivo de *M. leprae* em tubos e garrafas, com retirada e purificação de quantidades maiores de bacilos a cada dois meses. Na figura 12, estão oito cultivos das 38 tentativas totais, quatro grupos foram testados de acordo com a origem inicial do *M. leprae* inoculado, podendo ser de camundongo nude ou *M. leprae* já mantido anteriormente em IDE8 e de acordo com a manutenção das células infectadas, podendo ser em garrafas de cultivo (25 cm) ou tubos nunc para cultivo. Após o período de dois meses o *M. leprae* das culturas foi purificado e contado, dentre esses cultivos apenas oito deram uma quantidade de bacilo maior que a inicialmente inoculada, ou seja, apenas 21% do total dos cultivos foram considerados como sucesso na propagação do *M. leprae*. Esse resultado demonstra que existem outras variáveis, ainda desconhecidas, que impactam diretamente no sucesso do cultivo.

É importante notar que os inóculos de *M. leprae* mantido em células IDE8 apresentaram crescimento melhor quando comparados aos inóculos de *M. leprae* isolados de camundongos nudes. Talvez algum tipo de adaptação do bacilo através de passagens sucessivas nessa linhagem celular seja necessário, antes da sua plena produção *in vitro*.

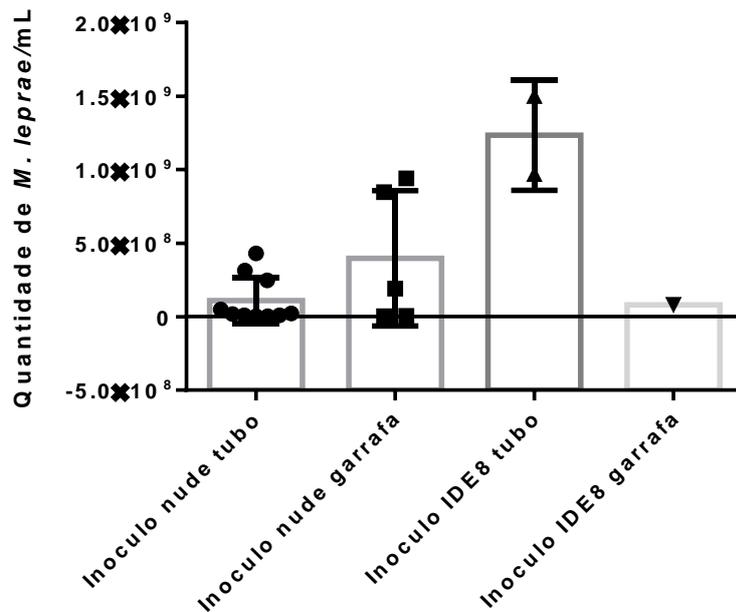


Figura 12 – Rendimento de cultivos de *M. leprae* em culturas de células da linhagem IDE8 durante 2 meses. As culturas foram mantidas a 30°C, com troca semanal de meio, ao final desse período as culturas foram lisadas e *M. leprae* foi purificado e contado. Os resultados encontrados na figura são referentes às 8 culturas onde ao final foi quantificado mais *M. leprae* que o inoculo inicial.

5.9. TESTE DE ANTIBIÓTICOS DE *M. leprae* MANTIDOS EM IDE8

Com a possibilidade de cultivo do *M. leprae in vitro*, testes como o de susceptibilidade à antibióticos se tornam mais fáceis de se executar, comparado com os feitos *in vivo* que dependem de seis meses de tratamento semanal com grupos de camundongos. Foram testados dois antibióticos comumente usados no tratamento da hanseníase: rifampicina e dapsona. O gráfico abaixo é a quantificação por coloração de Kinyoun do *M. leprae* após 30 dias em cultura nas células IDE8 com ou sem tratamento de antibióticos. O resultado obtido sugere que a dapsona não tem um efeito bactericida tão evidente na cepa Thai-53 quando comparado com o efeito da rifampicina dentro do tempo analisado de

30 dias. Sugerindo o mesmo efeito de resistência do bacilo a dapsona observado por Pettit & Rees em 1964

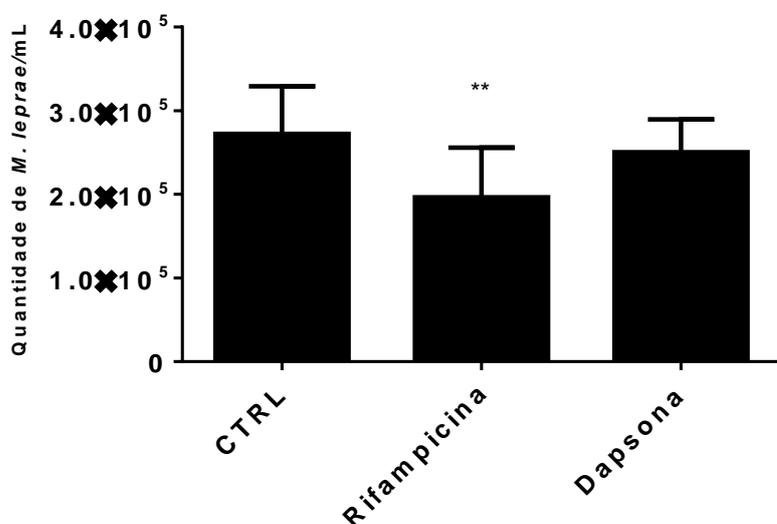


Fig. 13 – Teste de susceptibilidade à antibióticos. Os testes foram feitos em placas de 24 poços no qual foram adicionados os antibióticos rifampicina (Rifa) ou dapsona (Dap) 24h após o inoculo inicial de *M. leprae*. Após 30 dias de cultivo foi feito a lise das células e purificação do *M. leprae* para contagem de bacilos por marcação com coloração de Kinyoun. ** = $p < 0,0018$, Dunn's multiple comparisons test

5.10. EFEITO DE GÁLIO NA CULTURA DE *M. leprae*

Como prova de conceito do potencial do cultivo *in vitro* do *M. leprae*, decidimos testar o efeito micobactericida do gálio no cultivo, uma estratégia direcionada especificamente à nutrição e o metabolismo da bactéria. O gálio interrompe o metabolismo do ferro micobacteriano, uma vez que esse metal divalente pode ser absorvido por bactérias em substituição ao ferro, causando uma perturbação no funcionamento das principais enzimas dependentes de ferro nas bactérias. Estudos anteriores demonstram o potencial do gálio no tratamento de infecções letais em animais, com indicações preliminares de eficácia em humanos com infecções crônicas das vias aéreas (Olayanmi O *et al* 2000). Após

2 meses de cultivo a cepa Thai demonstrou ser sensível à presença do gálio na cultura tendo uma grande redução na quantidade de bacilo na cultura

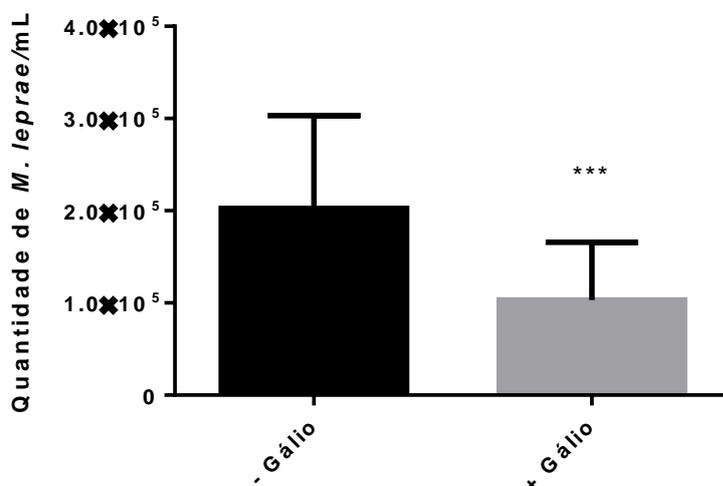


Figura 14 – Teste de efeito micobactericida do gálio sobre o *M. leprae*. Os testes foram feitos em tubos de cultura de IDE8 com ou sem a adição de gálio (50ug/mL), as culturas foram mantidas por 2 meses e ao final foi feito a lise das células e purificação do *M. leprae* para contagem de bacilos por marcação com coloração de Kinyoun. *** = $p < 0,0007$.

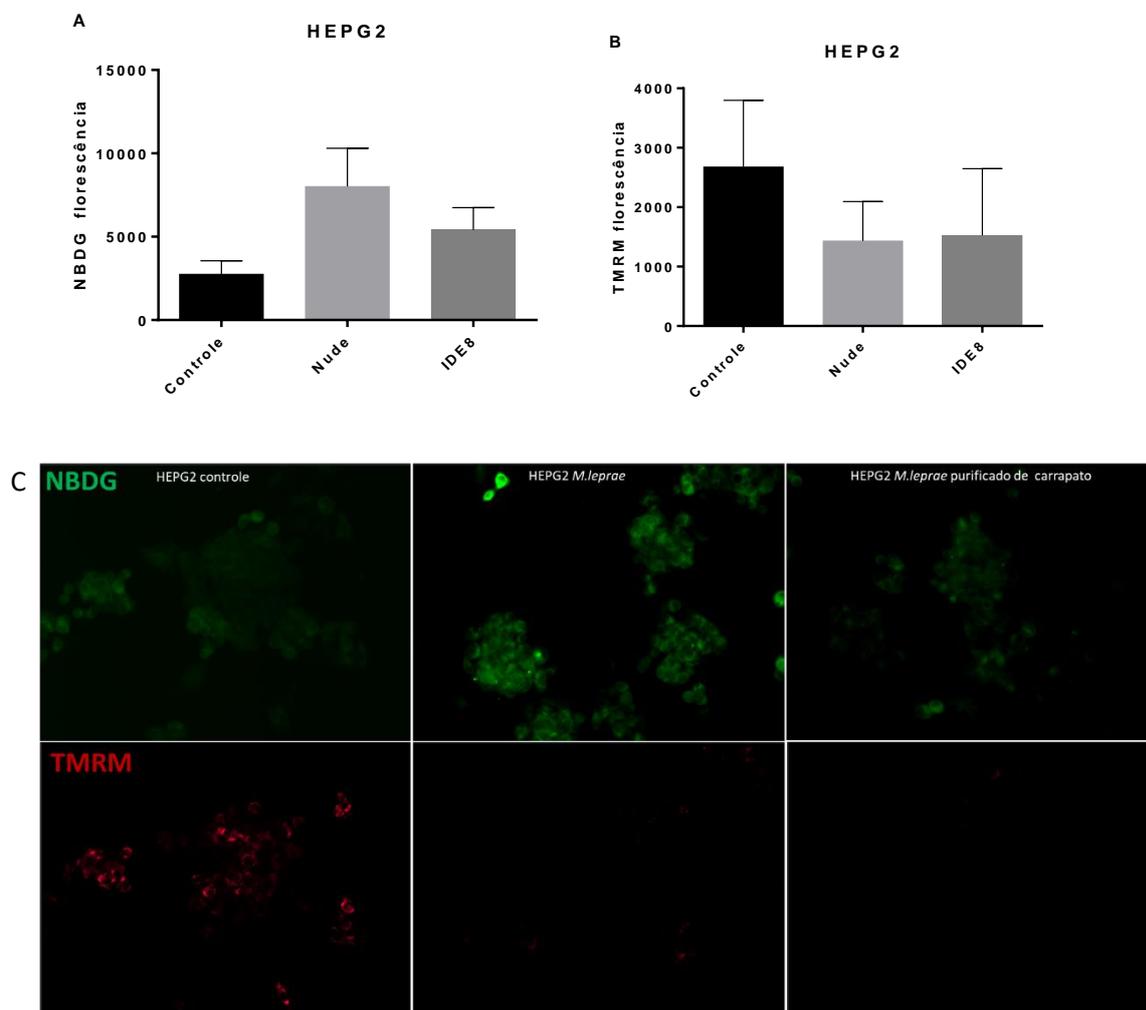
5.11. EXPERIMENTOS COMPARATIVOS ENTRE *M. leprae* DE COXIM PLANTAR DE CAMUNDONGOS NUDE E DE CULTURAS DA LINHAGEM IDE8.

Com a intenção de comparar o fenótipo do *M. leprae* produzido em camundongos por seis meses e o produzido em células IDE8 por dois meses, utilizamos modelos celulares bem estabelecidos em nosso grupo, como a infecção de células de Schwann da linhagem (ST8814) e hepatócitos (HEPG2). Foi verificado através da análise por HCS o potencial elétrico da membrana mitocondrial, utilizando a marcação por TMRM e a captação de glicose, utilizando a marcação do análogo de glicose NBDG nos três diferentes tipos celulares citados.

É possível observar que nas quantificações (fig. 15 A e B) das imagens geradas a partir de HCS das células HEPG2 (fig. 15 C) há um provável

aumento da captação de glicose após a infecção pelo *M. leprae*, independente da sua origem, *in vitro* ou *in vivo* (fig. 15 A). Além disso é possível ver que ambos os inoculos de *M. leprae* causaram um efeito similar de possível diminuição do potencial elétrico da membrana mitocondrial (fig. 15 B). Dessa forma os resultados sugerem que ambos os *M. leprae* usados causaram efeitos parecidos nesse tipo celular testado, comprovando que a composição de antígenos de superfície e metabolismo do *M. leprae* não são fundamentalmente alterados durante o seu cultivo em células de carrapato.

Nas imagens obtidas das células ST8814 (fig. 15 G) também podemos observar que ambos os *M. leprae* testados causaram efeitos similares tanto na captação de glicose (fig. 15 E) quanto no potencial elétrico mitocondrial (fig. 15 F).



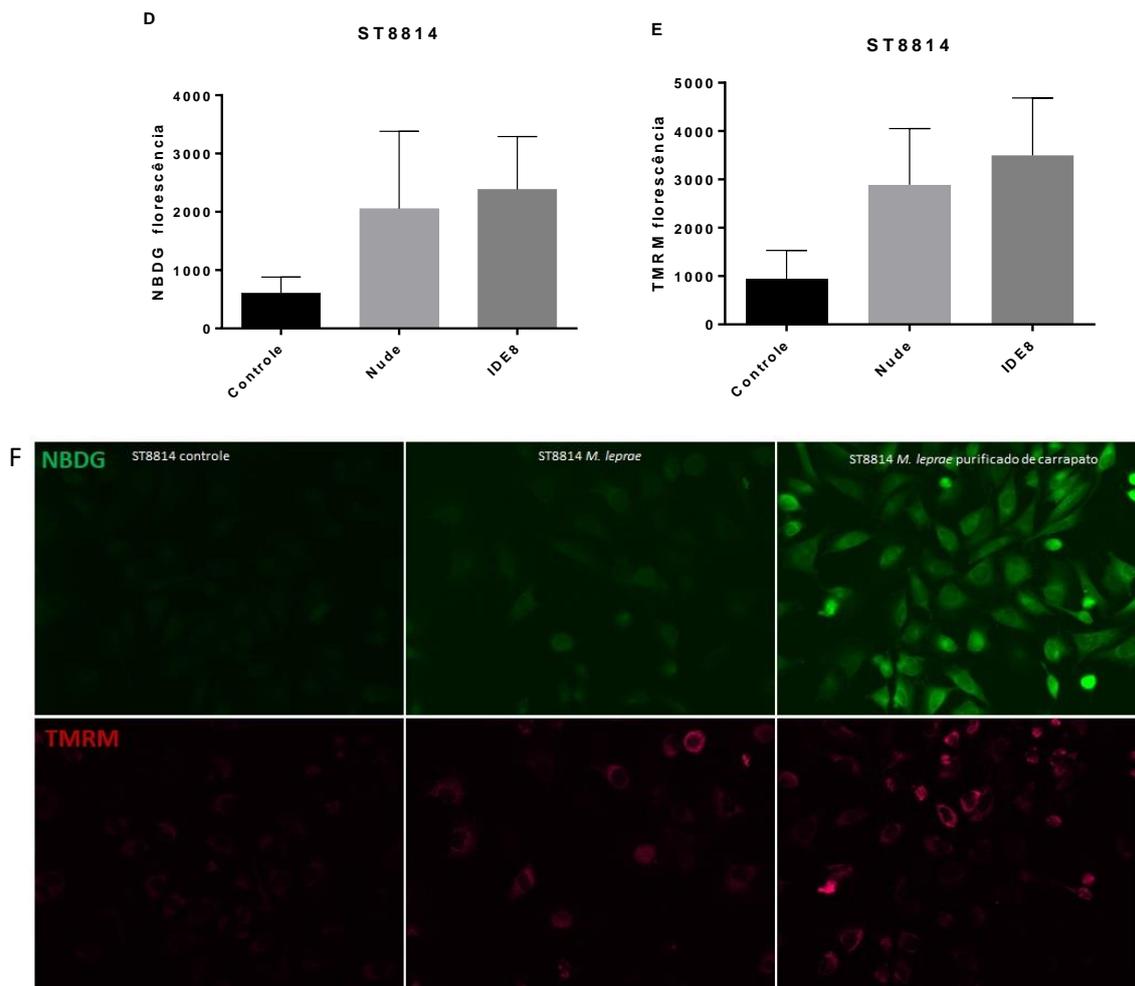


Figura 15 – Comparação entre os efeitos dos *M. leprae* produzidos *in vivo* e *in vitro*. A e B quantificação da intensidade de fluorescência de NBDG (análogo da glicose verde) e TMRM (marcador de potencial de ação mitocondrial vermelho) respectivamente. C) imagens obtidas em hepatócitos da linhagem HEPG2. D e E quantificação da intensidade de fluorescência de NBDG (verde) e TMRM (vermelho) respectivamente. F) imagens obtidas em células de Schwann da linhagem ST8814. Não foi possível realizar análise estatística pois trata-se de um único experimento.

5.12. *M. leprae* TRANSGÊNICO

Com o estabelecimento de um cultivo de *M. leprae in vitro* foi possível criar uma cepa de *M. leprae* transgênica utilizando o plasmídeo pCHERRY3. Para isso foi feito a eletroporação utilizando 10^9 bacilos e $5\mu\text{g}$ de DNA do plasmídeo, seguida da infecção em IDE8, e após uma (A e B), duas semanas (C e D) e dois meses (E e F) de cultura, foram realizadas imagens de microscopia

de fluorescência (fig.16) onde é possível observar bacilos de *M. leprae* vivos marcados em vermelho em todos os três tempos testados, além disso pode-se observar a presença de bacilos se multiplicando em todos os tempos testados (indicados pelas setas brancas) esse resultado demonstra o sucesso da transformação do *M. leprae* utilizando o plasmídeo pCherry3, demonstrado pela expressão da proteína fluorescente mCherry.

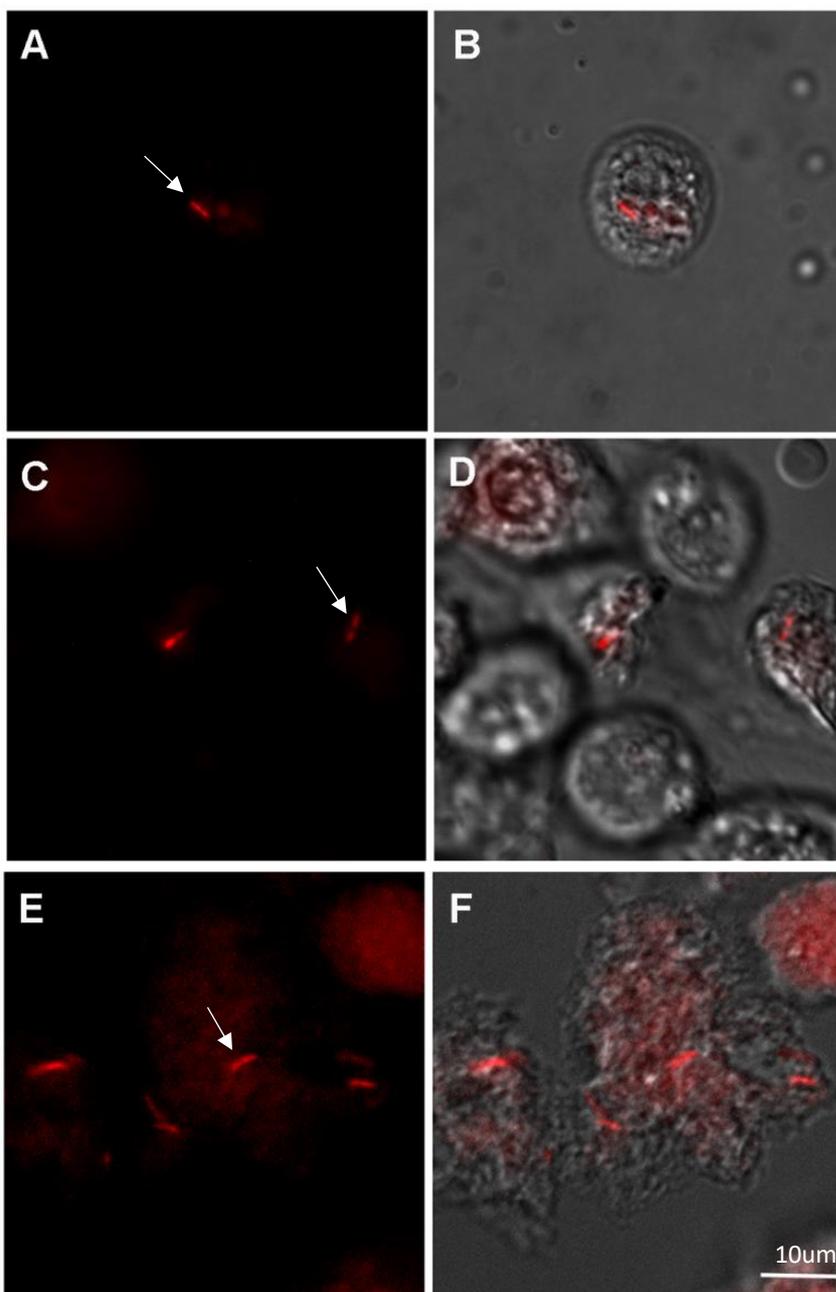


Figura 16 - *Mycobacterium leprae* transgênico gerado por transfecção com o plasmídeo pCHERRY3 em células de carrapato IDE8. A fluorescência das bactérias que expressam mCherry foi observada em 1 semana (A, B), 2 semanas (C, D) e 2 meses (E, F) após a transformação. Em todos os pontos temporais, a maioria dos *M. leprae*-mCherry fluorescentes estavam em divisão, demonstrado pelas setas. Os painéis A, C e E foram gerados por microscopia de fluorescência convencional, usando um LED de 590 nm com um filtro de fluorescência Zeiss 61; os painéis B, D e F foram gerados pela fusão com imagens de contraste de interferência diferencial. A barra de escala representa 10 µm.

5.13. GENOTIPAGEM POR MVLA DO *M. leprae* TRANSGÊNICO

Novamente para a confirmação de que a bactéria cultivada é *M. leprae* foi feito uma MVLA da cultura do *M. leprae* PA84 transformado, como descrito anteriormente na tabela 4 (Kimura M, 2009). O resultado demonstrou que a bactéria produzida é *M. leprae* e não demonstrou a presença de bactérias contaminantes.

Amostra	6-3	AT17	GGT5	GTA9	AC8B	AC8A	AT15	21-3	TTC	6-7	27-5	23-3	12-5	18-8
PA84*	3	14	4	10	7	ND	17	2	11	6	5	2	4	3
PA84 <i>M. leprae</i> -mCherry	3	14	4	10	7	ND	17	2	11	6	5	2	4	3
*Amostra original														
ND: impossível de caracterizar devido a PCR negativa														

Tabela 6. Genótipos de VNTR de amostras de *M. leprae* analisadas antes (amostras originais) e após o cultivo na linhagem de células do carrapato IDE8 e a transformação (cepa PA84).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós demonstramos o potencial das células de carrapato como método de cultivo *in vitro* para o *M. leprae*. Esse potencial foi demonstrado a partir do estudo de diversos tipos de células de linhagem de carrapato, aonde conseguimos identificar a célula IDE8 como a que apresenta o maior potencial para a manutenção do bacilo.

A IDE8 é uma célula embrionária gerada a partir do carrapato *Ixodes scapularis*, originalmente estabelecida por Mundelorrh em 1994. Assim como outras células de carrapato, ela demonstra diversas características favoráveis para a manutenção e propagação da micobactéria, como crescimento lento a 30°C e a baixa necessidade de um subcultivo frequente.

Sendo assim, nós iniciamos o estudo analisando o crescimento e associação do *M. leprae* em diversas linhagens de células de carrapatos. Inicialmente foi possível observar através da comparação de três linhagens de células de carrapatos AVL/CTVM17, HAE/CTVM8 e IDE8, que a linhagem IDE8 foi a que apresentou uma das melhores taxas de associação com o bacilo, sendo a única que conseguiu aumentar a quantidade de *M. leprae* durante o período de 20 dias, tornando-se assim um tipo celular favorável para possível estabelecimento de um cultivo *in vitro* de *M. leprae*.

A partir desses dados nos testamos o potencial de outras linhagens de células carrapato para o cultivo *in vitro* do bacilo, observando através do crescimento em placa que a célula ISE6, assim como a IDE8, demonstrou um potencial para o crescimento do *M. leprae* em até 10 dias. No entanto durante o teste a ISE6 apresentou uma grande queda na quantidade de bacilos após 10 dias em cultura (fig. 9), enquanto a IDE8 manteve a propagação do *M. leprae* em 20 dias (fig. 9). Em testes seguintes essa propagação foi mantida em IDE8, por até dois meses, porém de forma irregular.

Uma associação interessante entre essas linhagens é que ambas são oriundas de embriões do mesmo carrapato, o *Ixodes scapularis*, que é um vetor de diversas doenças e tem sido relacionado por parasitar tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* em várias regiões da América, um animal já conhecido

como reservatório da hanseníase (Truman RW 2011). Essa relação entre essa espécie de carrapato e os tatus pode ser uma explicação para a transmissão da doença entre tatus e de tatus para humanos no sul dos EUA, assim como a facilidade dessas duas células de se adaptar e suportar a manutenção do *M. leprae* intracelular (Ferreira JdS *et al* 2018).

A diferença principal dessas linhagens reside no fato de que as células IDE foram geradas a partir de embriões de ovos postos por fêmeas ingurgitadas coletadas de veados-de-cauda-branca mortos por caça, e os cultivos ISE são provenientes de ovos de carrapatos de fêmeas mantidas em laboratório (MUNDERLOH 1984), entretanto esse fato sozinho não explica a incapacidade da linhagem ISE6 em manter a viabilidade do *M. leprae*, o que sugere um outro fator presente nessas células, provavelmente relacionado ao folheto embrionário que deu origem às duas culturas.

Após os testes iniciais em placa, foi feita a tentativa de um aumento da escala de produção do *M. leprae* em células IDE8, utilizando culturas em garrafas e tubos do tipo Nunc™ Cell Culture Tubes (tab. 4). Nesse resultado apenas 21% das culturas, oito entre 38 culturas, apresentaram crescimento sustentado do inóculo inicial. Isso pode ter acontecido devido à necessidade de adaptação do *M. leprae* às células de carrapato. Essa hipótese se baseia no fato de que dentre as culturas testadas, as três que tiveram maior sucesso de cultivo possuíam inóculo oriundo de outras culturas de IDE8, previamente infectadas com *M. leprae* oriundo de coxim plantar de camundongos nude.

Uma outra estratégia para possivelmente solucionar essa questão do cultivo seria silenciar genes das células de carrapato relacionados com a resposta imune inata, como NF-Kb, dorsal, Stat3 e parquina, que podem estar afetando a sobrevivência do *M. leprae*. Uma outra possibilidade que possa estar contribuindo para o sucesso de apenas 21% dos cultivos do *M. leprae* em IDE8 é o fato das células serem sabidamente portadoras do orbivírus St Croix River (Attoui *et al* 2001), o que pode induzir a autofagia nas células e com isso eliminar o *M. leprae*. Para solucionar esse problema, pretendemos futuramente utilizar drogas na cura da cultura, ou ao menos reduzir sua carga viral, monitorando-a

utilizando o método de PCR, e testando os efeitos da utilização de inibidores de autofagia na produção do bacilo.

A partir do cultivo de *M. leprae* em IDE8 nós conseguimos gerar um teste do efeito da rifampicina e o possível uso do gálio como uma estratégia antibiótica para o controle do *M. leprae*. A cepa thai-53 demonstrou sensibilidade à, esse resultado indica que provavelmente o *M. leprae* não é tão dependente do ácido fólico, pois o principal mecanismo de ação da dapsona é a inibição por competição da conversão do ácido para-aminobenzoico (PABA) em desidropteroato, necessário para a síntese de ácido fólico. Por outro lado, ao utilizar o gálio na cultura, um metal divalente capaz de inibir o metabolismo de ferro da bactéria, perturbando o funcionamento das principais enzimas dependentes de ferro, conseguimos observar uma significativa redução na viabilidade do bacilo. Através desse dado, podemos elucubrar sobre a dependência do *M. leprae* às reservas de ferro do hospedeiro para sua sobrevivência, corroborando dados observados em células de lesões cutâneas de pacientes do polo LL (de Mattos Barbosa MG 2017).

Uma análise para verificar se o *M. leprae* produzido em células de carrapato continua viável foi feita em camundongos, onde é possível observar que ao final dos meses de infecção o *M. leprae* ainda manteve sua capacidade de infectar e se propagar no modelo *in vivo*. Além disso pudemos constatar que o *M. leprae* produzido em carrapatos gerou efeitos extremamente similares ao gerado pelo *M. leprae* isolado de camundongos em diversas células já testadas anteriormente em outros trabalhos. Também conseguimos observar nesse trabalho que o *M. leprae* produzido em células de carrapato gerou um efeito de modulação metabólica (fig. 13) extremamente parecido com o bacilo produzido em camundongos, demonstrando que mesmo após dois meses em cultivo de células IDE8 a suas características fundamentais se mantem a mesmas.

Da mesma forma conseguimos gerar a primeira cepa transgênica de *M. leprae*, capaz de expressar a proteína fluorescente mCHERRY (CARROL P, 2009), produzindo uma ferramenta única que torna possível o monitoramento da viabilidade do bacilo em tempo real. Com essa ferramenta se abre novas possibilidades para estudos futuros relacionados à hanseníase e ao *M. leprae*,

como por exemplo os testes de fármacos para o tratamento mais eficaz da hanseníase, tendo em vista a grande necessidade de avanços nessa área de pesquisa da doença.

7. CONCLUSÃO

Com os experimentos realizados nesse estudo podemos concluir que dentre as células e condições analisadas, a IDE8, linhagem embrionária derivada do carrapato *Ixodes scapularis*, é a mais adequada para o cultivo do *M. leprae*. Utilizando uma cultura estática, conseguimos através da utilização de um inoculo inicial de $\times 10^7$ bactérias, produzir bacilos por um período de dois meses com viabilidade igual ou superior ao obtido por cultivo *in vivo*. A genotipagem por MVLA confirmou que a bactéria produzida *in vitro* é o *M. leprae*, e além disso demonstrar que mesmo após o cultivo em células de carrapato, o *M. leprae* manteve suas características fenotípicas de modulação metabólica em células humanas. Como aplicação prática desta ferramenta conseguimos gerar testes de susceptibilidade à agentes micobactericidas *in vitro*, e nos tornamos o primeiro grupo de pesquisa a criar um *M. leprae* transformado capaz de expressar a proteína fluorescente mCHERRY, sendo capazes de monitorar sua viabilidade em tempo real tornando possível no futuro a procura por novas drogas para o controle da hanseníase de maneira automatizada.

Acreditamos que nossos achados irão proporcionar um grande avanço nas linhas de pesquisa relacionadas à hanseníase, através da geração de novas cepas transgênicas de *M. leprae* expressando proteínas fluorescentes fusionadas as proteínas de interesse. Pretendemos ainda otimizar a produção do bacilo, identificando variáveis responsáveis pela heterogeneidade entre cultivos, como por exemplo o monitoramento da carga viral do orbivírus St Croix River, utilização de inibidores de autofagia, antivirais e silenciamento de genes específicos da imunidade inata da célula de carrapato, para ao fim desenvolver o primeiro cultivo contínuo de *M. leprae in vitro*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Attoui H, Stirling JM, Munderloh UG, Billoir F, Brookes SM, Burroughs JN, de Micco P, Mertens PPC, de Lamballerie X. Complete sequence characterization of the genome of the St Croix River virus, a new orbivirus isolated from cells of *Ixodes scapularis*. **J Gen Virol**. 2001 Apr;82(Pt 4):795-804. doi: 10.1099/0022-1317-82-4-795. PMID: 11257184.

Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, McLuckie J, Loiseau C, Lawton C, Schoening J, Shaw DJ, Piton J, Vera-Cabrera L, Velarde-Felix JS, McDermott F, Gordon SV, Cole ST, Meredith AL. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. **Science**. 2016 Nov 11;354(6313):744-747. doi: 10.1126/science.aah3783. PMID: 27846605.

BARBIERI, Raquel Rodrigues et al. Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, n. 7, p. 944-947, nov. 2014

Bechelli LM, Souza PR, Quagliato R. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. **Rev Bras Leprol**. 1959; 27:172-82.

BELL-SAKYI, L. Continuous cell lines from the tick *Hyalomma anatolicum*. **Journal of Parasitology**, v. 77, n. 6, p. 1006-1008, 1991.

BELL-SAKYI, L. *Ehrlichia ruminantium* grows in cell lines from four ixodid tick genera. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 4, p. 285-293, 2004.

BELL-SAKYI L, ZWEYGARTH E, BLOUIN E.F., GOULD E.A., JONGEJAN F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. **Trends Parasitol**, v.23, p 450-457, 2007.

BENCHIMOL, JL, SÁ, MR., eds. and orgs. Adolpho Lutz e a entomologia médica no Brasil = Adolpho Lutz medical entomology in Brazil [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. **Adolpho Lutz Obra Completa**, v.2, livro 3, 2006.

Beyene A, Legesse W, Triest L, Kloos H. Urban impact on ecological integrity of nearby rivers in developing countries: the Borkena River in highland Ethiopia. **Environ Monit Assess**. 2009 Jun;153(1-4):461-76. doi: 10.1007/s10661-008-0371-x. Epub 2008 Jul 3. PMID: 18597179.

BLOUIN, E. F.; DE LA FUENTE, J.; GARCIA-GARCIA, J. C.; SAUER, J. R.; SALIKI, J. T.; KOCAN, K. M. Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. **Animal Health Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 57-68, 2002.

CARROLL P, SCHREUDER LJ., et al. Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. **PLoS One**. 2010 Mar 23

Chapman H Binford. Virchow's description of the lepra cell. *Int. J. Lepr.* 1953;21(3):372-3

COCITO C, DELVILLE J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. **European Journal of Epidemiology**, v.1, n.3 p.202-31, 1985.

COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILL J, JAMES KD, THOMSON NR, WHEELER PR, et al,. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature** v.409 n.6823, p.1007-1011, 2001.

de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paixão de Oliveira JA, Assis TQ, de Toledo-Pinto TG, de Lima Bezerra OC, da Costa Nery JA, Rosa PS, Bozza MT, Lara FA, Moraes MO, Schmitz V, Sarno EN, Pinheiro RO. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes Infect.* 2017 Nov;19(11):505-514. doi: 10.1016/j.micinf.2017.06.006. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28684130.

de SOUZA-ARAÚJO HC, MIRANDA RN. Poderá o carrapato transmitir a lepra? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.36 n.4 Rio de Janeiro 1941

DEPS PD, ALVES BL, GRIPP CG, ARAGAO RL, GUEDES B, FILHO JB, ANDREATTA MK, MARCARI RS, PRATES I, RODRIGUES LC. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.** v.74, n.4, p.338-42, Jul-Ago 2008.

DEPS PD, SANTOS AR, YAMASHITA-TOMIMORI J. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo: Preliminary results. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v.70, p.34-5, 2002.

FERREIRA J.S., NEUMANN A.S., UZEDO C.C.D., RANGEL C.P., PESSOLANI M.C.V., MALLETT J.R.D.S., ROSA P.S., GARLET A.P.F.T., BRITTO C.F.D.P.D.C., OLIVEIRA P.L., FONSECA A.H., MORAES M.O., LARA F.A. Analysis of persistence of *Mycobacterium leprae* in *Amblyomma cajennense* and *Rhodnius prolixus* after infection by artificial feeding. **18th International Leprosy Congress, Brussels**, p-148, 16-19 set. 2013

Ferreira JDS, Souza Oliveira DA, Santos JP, Ribeiro CCDU, Baêta BA, Teixeira RC, Neumann ADS, Rosa PS, Pessolani MCV, Moraes MO, Bechara

GH, de Oliveira PL, Sorgine MHF, Suffys PN, Fontes ANB, Bell-Sakyi L, Fonseca AH, Lara FA. Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. **PLoS Negl Trop Dis**. 2018 Dec 19;12(12):e0007001. doi: 10.1371/journal.pntd.0007001. PMID: 30566440; PMCID: PMC6326517.

Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, Krahenbuhl J. 2004. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 72:16–26.

Garcia JRL. Entre a "loucura" e a hanseníase: interfaces históricas das práticas e políticas instituídas. **Hansen. Int**. 2001;26(1):14-22

GALLO, M.E., SAMPAIO, E., NERY, J.A., ANTUNES, S.L., PESSOLANI, M.C.V., SARNO, E.N. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos, Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, **Editora Guanabara Koogan**, v.2, p.1383, 2005

Goss CH, Kaneko Y, Khuu L, Anderson GD, Ravishankar S, Aitken ML, Lechtzin N, Zhou G, Czyz DM, McLean K, Olakanmi O, Shuman HA, Teresi M, Wilhelm E, Caldwell E, Salipante SJ, Hornick DB, Siehnel RJ, Becker L, Britigan BE, Singh PK. Gallium disrupts bacterial iron metabolism and has therapeutic effects in mice and humans with lung infections. **Sci Transl Med**. 2018 Sep 26; 10(460):eaat7520. doi: 10.1126/scitranslmed.aat7520. PMID: 30257953; PMCID: PMC6637966.

HASTINGS R, OPROMOLLA D. Leprosy. In J CK, **Pathology of leprosy**, 1994; p. 266-268.

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. The **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, p.518-21, 2005

JOPLING WH, MCDUGALL AC. **Handbook of leprosy**. 2. ed. 1988.

KAPLAN G, COHN ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. **Leprosy Review**, v.57, n.2, p.199-202, 1986.

Kimura M, Sakamuri RM, Groathouse NA, Rivoire BL, Gingrich D, Krueger-Koplin S, et al. Rapid variable- number tandem-repeat genotyping for *Mycobacterium leprae* clinical specimens. **J Clin Microbiol**. 2009 Jun; 47(6):1757–66. <https://doi.org/10.1128/JCM.02019-08> PMID: 19386839

KIRCHHEIMER W, STORRS EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus*, Linn) as a model for the study of leprosy I Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **International Journal of Leprosy**, v.39, p.693-702, 1971.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; AHLSTRAND, G. G.; JOHNSON, R. C. *Borrelia burgdorferi* in Tick Cell Culture: Growth and Cellular Adherence. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 4, p. 256-261, 1988.

KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G.; SAMISH, M. Effect of medium supplements on tick cells in culture. **Journal of Parasitology**, v. 68, n. 5, p. 930-935, 1982.

Lázaro FP, Werneck RI, Mackert CC, Cobat A, Prevedello FC, Pimentel RP, Macedo GM, Eleutério MA, Vilar G, Abel L, Xavier MB, Alcaïs A, Mira MT. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. **J Infect Dis**. 2010 May 15;201(10):1598-605. doi: 10.1086/652007. PMID: 20388034.

LAHIRI R, RANDHAWA B, KRAHENBUHL J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse footpad. **Journal of medical microbiology**, v.54, n.3, p.235, 2005

LAWRIE, C. H.; UZCÁTEGUI, N. Y.; ARMESTO, M.; BELL-SAKYI, L.; GOULD, E. A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 3, p. 268-274, 2004.

MARTINEZ NA, RIBEIRO-ALVES M, SARNO EM, MORAES MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. **Neglected Tropical Diseases**. 2011; 5 (10):e1354.

Marise A. HUSSEY, Anne ZAYAITZ. Acid-fast stain protocols. **American Microbiology Society**, 2008 sep

Matsuo Y. 1976. Attempts at cultivation of *Mycobacterium leprae* in cell culture. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 44:39–44.

Melo Naves M, Gomes Patrocínio L, Patrocínio JA, Naves Mota FM, Diniz de Souza A, Negrão Fleury R, Bernardes Goulart IM. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **Am J Rhinol Allergy**. 2009 Mar-Apr;23(2):177-80. doi: 10.2500/ajra.2009.23.3301. PMID: 19401045.

MEDVEDEEVA, G. I.; BESKINA, S. R.; GROKHOVSKAYA, I. M. Culture of ixodid tick embryonic cells. **Medical Parasitology**, v. 41, n. 1, p. 39-40, 1972

MOURA, R.S., CALADO, K.L., OLIVEIRA, M.L.W., BÜHRER-SÉKULA, S., Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41(Suplemento II), p.11-8, 2008

MUNDERLOH, U. G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M.; GE, N. L.; EDWARDS, W. L.; KURTTI, T. J. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae) borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 4, p. 656-664, 1996.

MUNDERLOH, U. G.; LIU, Y.; WANG, M.; CHEN, C.; KURTTI, T. J. Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. **Journal of Parasitology**, v. 80, n. 4, p. 533-543, 1994.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Malarial parasites complete sporogony in axenic mosquitoes. **Experientia**, v. 41, n. 9, p. 1205-1207, 1985.

MUNDERLOH, U. G.; KURTTI, T. J. Formulation of medium for tick cell culture. **Experimental & Applied Acarology**, v. 7, n. 3, p. 219-229, 1989.

Olakanmi O, Britigan BE, Schlesinger LS, Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages. *Infection and immunity* 68, 5619–5627 (2000); published online EpubOct ([PubMed: 10992462]

Pattyn SR. The problem of cultivation of Mycobacterium leprae. A review with criteria for evaluating recent experimental. 1973.

PETTIT, J.H., & REES, R.J. (1964). Sulphone Resistance in Leprosy. an Experimental and Clinical Study. *Lancet* (London, England) 2, 673–674.

PUDNEY, M. Tick cell lines for the isolation and assay of arboviruses. In: YUNKER, C. E. **Arboviruses in Arthropod Cells in Vitro**, v. 1, CRC Press, 1987. p. 87-101.

PUDNEY, M.; VARMA, M. G. R.; LEAKE, C. J. Culture of embryonic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 5, p. 493-496, 1973.

REES, R.F.W. The microbiology of leprosy. In: **Hastings RC (ed) Leprosy, 1st edition**, Churchill Livingstone Inc, p.31-52, New York 1985.

ŘEHÁČEK, J; BRZOSTOWSKI, H. W. A tick tissue culture medium based on analyses of tick haemolymph. **Journal of Insect Physiology**, v. 15, n. 8, p. 1431-1436, 1969.

RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International journal of Leprosy**, v.34, 1966.

ROBBINS G, TRIPATHY VM, MISRA VN, MOHANTY RK, SHINDE VS, GRAY KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 BC). **PloS one**, v.4, n.5, e.5669, 2009

SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The continuing challenges of leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.2, p.338–381, 2006

SHEPARD CC. 1962, Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the footpad of the mouse. **International journal of Leprosy**, v.30, p.291, 1962.

SKINSNES OK, MATSUO E, CHANG PH, ANDERSSON B. In vitro cultivation of leprosy bacilli on hyaluronic acid based medium. 1. Preliminary report. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v.43, n.3, p.193-203, Jul-Set 1975.

SOUZA ARAUJO, H. C. DE. *Int. J. Leprosy*,.24: 503 (1956).

STEFANI, Mariane Martins de Araújo. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 41, supl. 2, p. 89-94, 2008

SMITH JH, FOLSE DS, LONG EG, CHRISTIE JD, CROUSE DT, TEWES ME, GATSON AM, EHRHARDT RL, FILE SK, KELLY MT. Leprosy in wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*) of the Texas Gulf Coast: epidemiology and mycobacteriology. **Journal of the Reticuloendothel Society**. v.34, n.2, p.75-88, Ago 1983.

TRAUTMAN JR. A brief history of Hansen's disease. **Bulletin of New York Academy of Medicine**, v.60, p.689-95, 1984.

TRUMAN RW, KRAHENBUHL JL. Viable *M. leprae* as a research reagent, **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v.69, n.1, p.1-12, 2001.

TRUMAN RW, SINGH P, SHARMA R, BUSSO P, ROUGEMONT J, PANIZ-MONDOLFI A, et al. Probable zoonotic leprosy in the Southern United States. **Journal of Medicine**. 2011; 364(17)1626-33

VARMA, M. G. R.; PUDNEY, M.; LEAKY, C. J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arbovirus. **Journal of Medical Entomology**, v.11, n. 6, p. 698-706, 1975.

YUNKER, C. E. Preparation and maintenance of arthropod cell cultures: Acari, with emphasis on ticks. In: YUNKER, C. E. Arboviruses in arthropod cells in vitro. **Boca Raton: CRC Press**, 1987. p. 35-51.

WEYER, F. Explantationsversuche bei Läusen in Verbindung mit der Kultur von Rickettsien. **Cblatt Bakt. Parasitenk. Infektionskr.**, v. 159, n. 1-2, p. 13-22, 1952.

WHO (1998). Expert Committee on Leprosy. **Seventh Report (Geneva)**.