

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas**

**Anna Beatriz Robottom Ferreira**

ESTUDOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO ENTRE O *Mycobacterium leprae* E A  
CÉLULA DE SCHWANN: UMA ABORDAGEM DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Ciências na área de Biologia  
Computacional e de Sistemas.

**Orientador:** Dr. Milton Ozório Moraes

**Co-Orientador:** Dr. Marcelo Ribeiro Alves

**RIO DE JANEIRO**

2011

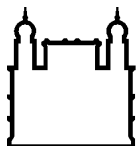
## Ficha catalográfica

Robottom Ferreira, Anna Beatriz

Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica global. / Anna Beatriz Robottom Ferreira – Rio de Janeiro: 2011.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas, 2011.

1. Hanseníase. 2. Células de Schwann. 3. Microarranjos. I.Título



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas**

**Anna Beatriz Robottom Ferreira**

ESTUDOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO ENTRE O *Mycobacterium leprae* E A  
CÉLULA DE SCHWANN: UMA ABORDAGEM DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

**ORIENTADOR: Dr. Milton Ozório Moraes**

**CO-ORIENTADOR: Dr. Marcelo Ribeiro Alves**

**Aprovada em: 2011**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Flávio Fonseca Nobre – UFRJ – Presidente**  
**Prof. Dr. Antonio Guilherme Fonseca Pacheco – Fiocruz – Titular/Revisor**  
**Prof. Dr. Sergio Luiz Gomes Antunes – Fiocruz – Titular**  
**Prof. Dr. Cynthia Chester Cardoso – UFRJ – Suplente**  
**Prof. Dr. Luciana Silva Rodrigues – Fiocruz – Suplente**

Rio de Janeiro, 04 de outubro de 2011

*Dedico esta tese a minha família  
e aos meus orientadores e amigos, Milton e Marcelo*



## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e herói, Zé Roberto, que sempre estendeu o dedo mindinho para eu segurar quando precisasse e à minha mãe, Bia, pela sua entrega integral e incondicional a nós, todos dias da sua vida. Levarei vocês comigo sempre.

Ao meu orientador e amigo, Milton, principalmente pela grande preocupação que sempre demonstrou com meu amadurecimento como cientista. Essa tese é igualmente sua por ser fruto de sua enorme vontade de desenvolver a análise de expressão gênica global no seu laboratório mesmo frente a grandes obstáculos e adversidades.

Ao meu co-orientador e amigo, Marcelo, que sempre solícito e com boa vontade me ajudou em tudo que fosse preciso, mesmo tendo que me ensinar a mesma coisa inúmeras vezes. Seus conselhos sábios foram o meu norte durante toda a realização deste trabalho.

To Dr. Diana Williams who not only gave me the opportunity to collaborate and work in her lab but whose nurturing also helped shape my 4 months in Louisiana into the experience of a lifetime.

To Dr. EJ Shannon for generously supporting our collaboration by granting space in his lab, providing reagents and setting aside time for fruitful discussions.

To Dr. Patrick Brennan and Dr. James Krahenbuhl for donating the *M. leprae* used in this study.

À Dra. Euzenir Nunes Sarno que incentivou minha vinda ao Laboratório de Hanseníase, mantendo sempre um olhar carinhoso, mesmo que de longe, na minha trajetória profissional.

O presente trabalho foi extremamente colaborativo e contou com a ajuda de muitos colegas. Agradeço a todos que trabalharam diretamente nesse trabalho: Flávio Lara (linhagens celulares e imunocitoquímica), Alejandra Martinez (microarranjos), Marcelo Ribeiro Alves (análises de dados), Tana Pittman e Felipe Sandoval (células de Scwhann primárias e tratamento com talidomida), Tiana Britto (extração de RNA, RT e diagnóstico molecular), Carolinne Marques, Ohanna Cavalcanti, Cintia Oliveira (genotipagens), Valcemir França (extração de DNA), Dra. Marcia Jardim (diagnóstico clínico), Dr. Sérgio Antunes (dados de baciloscopia).

Ao Dr. Antonio Pacheco pela revisão criteriosa da tese e juntamente aos demais membros da banca: Dr. Flávio Nobre, Dr. Sérgio Antunes, Dra. Cynthia Chester e Dra. Luciana Rodrigues, pelas contribuições valiosas ao trabalho.

A todos os membros atuais ou passados do grupo de pesquisa do Milton: Alejandra, Flávia, Guilherme, Cynthia, Viviane, Diogo, Patricia, Luana, Carolinne, Paula,

Claudia, Lucia, Marcelo, Sandro, Alexandre, Tiana, Thiago, Alice, Suelen, Matilde, Valcemir, Caroline, Carlos Diego, Cintia e Ohanna. Ter vocês ao lado tanto nos momentos de risada quanto de compenetração e mesmo durante os tropeços faz com que nosso ambiente de trabalho seja fora de série. Tenho vocês como minha família fora de casa.

Não tenho palavras que transmitem a importância que meus mais queridos amigos Anna Lucia, Flávia, Manu, Cynthia, Ramon, Wendy, Richard, Alejandra, Leila, Carmen e Anderson tiveram na minha vida. Primeiramente, nossa enorme afinidade é inexplicável, mas além disso vocês não me deixaram abalar quando o meu mundo parecia ter chegado ao fim e me estenderam a mão mesmo após eu ter recusado-a. Nunca faltaram-lhes palavras carinhosas e enaltecidas.

A todos do pavilhão da hanseníase, em especial, Danuza, Sidra, Júlio, Léo, Adriano e Robertha pelos sorrisos e momentos de descontração dentro e fora do laboratório, ao Sr. Salles, pelas palavras carinhosas e olhar protetor no final dos dias mais longos de trabalho e à Cristiane e Augusto pelo auxílio administrativo.

To everyone at the National Hansen's Disease Program in Louisiana especially Felipe, Tana, Kyle, Dr. David Scollard and Dr. Thomas Gillis.

Aos Drs. Alberto Davila e Floriano Paes Silva Jr., coordenadores da Pós Graduação em Biologia Computacional e de Sistemas (PG-BCS), que desde sua criação trabalham em íntimo contato com os professores e alunos para que o programa passe pelos obstáculos iniciais e se desenvolva ao máximo do seu potencial. Também à Alessandra Portugal pela solicitude e palavras de carinho na reta final da tese.

A todos os colegas da primeira turma da PG-BCS que acreditam no potencial do novo programa e ajudam diariamente a moldá-la. Agradeço especialmente aos colegas que sofreram junto comigo durante a primeira disciplina de modelos de dados na Coppe: Felipe, Monete, Diogo, Daniel, Adriana, Marcelo e Franklin.

À minha família, a minha maior riqueza: meus irmãos: Fernando, Beto e Anna; minhas cunhadas e cunhado: Junia, Aninha e Neil; meus tios: José Ricardo e Clarinha, Cristina e Elpidio, Claudia e Renato, Gilda; e meus primos: Dani, Monica, Crica, Aninha Dudu, Guiga, Kiko, Michy, Suzy, Manana, Georgia, Luiz, Sintia, Carlos, Ilenia e Paulo. Um agradecimento especialmente emotivo à minha irmã, melhor amiga e confidente, Anna.

Aos meus pequenos Patrick, Laurie, Bebeto, André, Rafael e Ricardinho, de quem tenho sempre muitas saudades e que me encham de orgulho e *joie de vivre*.

Às agências de fomento CAPES, CNPq, FAPERJ e FIOCRUZ pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

*"All our Science, measured against reality, is primitive and childlike –  
and yet it is the most precious thing we have" ~Albert Einstein*

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	graus Celcius
<sup>14</sup> C	Carbono 14
a.C	antes de Cristo
ABI	do inglês: <i>Applied Biosystems</i>
Ag-85B	antígeno 85B do <i>M. leprae</i>
ANOVA	análise de variância
aRNA	Ácido ribonucleico amplificado
ATP	adenosina trifosfato
B2M	Beta 2 Microglobulina
BB	<i>borderline borderline</i>
BL	<i>borderline</i> lepromatoso
BT	<i>borderline</i> tuberculóide
CI	intervalo de confiança
CO <sub>2</sub>	Deoxido de carbono
CPM	Contagem por minuto
Cq	ponto característico
cRNA	Ácido ribonucleico complementar
Ct	do inglês: <i>Cycle threshold</i>
DAPI	4', 6'-diamidino-2-fenilindole
DATASUS	Departamento de Informatica do SUS
dATP	Desoxi-adenosina trifosfatado
dCTP	Desoxi-citosina trifosfatado
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxi-guanina trifosfatado
DIG	Digoxigenina
DMEM	do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNAc	Ácido Desoxirribonucléico complementar
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxi-timina trifosfatado
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilibrio de Hardy e Weinberg

ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ENH	Eritema nodoso hansênico
<i>et al</i>	e outros
FC	do inglês: <i>fold change</i>
FDR	do inglês: <i>False Discovery Rate</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	força-G
g	grama
GAPDH	Desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato
h	horas
HADHA	Hidroxiacil-CoA desidrogenase/3cetoacil-CoA tiolase/enoil-CoA hidratase
HLA	antígeno leucocitário humano
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
I	Indeterminada
IFIT	proteínas induzidas por interferon com repetição tetratricopeptídeo
IFN	interferon
IgM	imunoglobulina M
IL-	interleucina
INCA	Instituto Nacional do Cancer
IVT	do inglês: <i>in-vitro transcription</i>
KCL	cloreto de potássio
L	Lepra
L-	Lepra com baciloscopia negativa
L+	Lepra com baciloscopia positiva
LAM	Lipoarabinomanana
LD	Desequilíbrio de ligação
LL	lepromatoso lepromatoso
M	Molar
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
M.O.I	Multiplicidade de infecção
MB	Multibacilar
MBD1	do inglês: <i>Metyl CpG binding protein 1</i>
MBP	do inglês: <i>myelin basic protein</i>

mg	miligrama
MHC	do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	mililitro
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanesulfônico
Mt_ATP6	Subunidade 6 da ATPsintase mitocondrial
Mt_COX2	Subunidade 2 do citocromo C oxidase mitocondrial
Mt_CYTb	Citocromo B mitocondrial
Mt_ND1	NADH desidrogenase 1 mitocondrial
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-kB	fator nuclear-kappa B
ng	nanograma
NHDP	do inglês: <i>National Hansen's Disease Program</i>
NK	do inglês: <i>Natural Killer</i>
NL	Não lepra
nM	nano Molar
nm	nanômetros
NOD	do inglês: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
nu/nu	camundongos <i>nude</i>
OAS	do inglês: <i>oligoadenylate synthetase</i>
OASL	do inglês: <i>oligoadenylate synthetase-like</i>
oligoDT	Oligonucleotídeo iniciador de timidinas
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	do inglês: Odds Ratio
p. ex.	Por exemplo
p/v	peso por volume
P0	Proteína zero
PAMP	do inglês: <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PB	Paucibacilar
Pb	Pares de base
PBMC	do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Tampão Salina Fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-1	glicolípido fenólico I
pH	Potencial Hidrogeniônico

PHEX	Regulador de fosfato com homologia a endopeptidases no cromossomo X
PMA	acetato de forbol-miristila
PNL	forma neural pura da hanseníase
PQT	poliquimioterapia
PRR	do inglês: <i>Pattern Recognition Receptor</i>
RAD	dose absorvida de radiação
REC	Recidiva
RLEP	sequências repetitivas do genoma do <i>M. leprae</i>
RLEP	do inglês: <i>M. Leprae pecific repetitive elemento</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RPL13a	Proteína Ribossomal 60S L13a
RPM	Rotações por Minuto
RPMI	do inglês: <i>Royal Park Memorial Institute</i>
RR	Reação reversa
rRNA	Ácido Ribonucleíco ribossomal
RT	transcrição reversa, do inglês: <i>Reverse Transcription</i>
S	Sadio
SCG2	Secretogranina 2
SDS	Sódio dodecil sulfato
SETDB1	Histona-lisina metiltransferase
SFB	Séro fetal bovino
SNP	polimorfismo de base única, do inglês: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SNR	do inglês: <i>Signal to Noise Ratio</i>
SSC	tampão citrato salina-sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
TB	Tuberculose
TE	tampão Tris EDTA
TGF $\beta$ 1	Fator de Crescimento Tumoral Beta
Th	Linfócitos T auxiliares, do inglês: <i>T helper</i>
THP1	Tamm-Horsfall Protein 1
TLR	do inglês: <i>Toll-like receptors</i>
TNF	fator de necrose tumoral

TPR	Tetratricopeptídeo
Treg	células T reguladoras
TT	tuberculóide tuberculóide
URE-B1	E3 ubiquitina ligase
UTP	uracila trifosfatado
V	do inglês: Volts
v/v	volume por volume
VDR	do inglês: <i>Vitamin D receptor</i>
ZNF79	proteína de dedo de zinco 79
µg	micrograma
µL	microlitros
µM	micro Molar



## Lista de Figura

<b>Figura 1.1.</b> Taxas de prevalência de hanseníase no mundo.	4
<b>Figura 1.2.</b> Número de novos casos de hanseníase de 2002 a 2008.	4
<b>Figura 1.3.</b> Formas clínicas da hanseníase.	12
<b>Figura 4.1.</b> Organograma das etapas do estudo com ênfase na metodologia empregada em cada etapa e os locais de realização.	30
<b>Figura 4.2.</b> Desenho experimental de microarranjos de DNA para investigar o efeito de 24 horas de infecção por <i>M. leprae</i> em células de Schwann.	45
<b>Figura 5.1.</b> Número e porcentagem de genes que restaram após o filtro pelo SNR > 3 para cada lâmina.	58
<b>Figura 5.2.</b> : <i>Box-plots</i> da intensidade de sinal log transformado de cada lâmina feita no estudo antes e após a normalização pelo método A-quantile.	59
<b>Figura 5.3.</b> Porcentagem de genes restantes após o filtro para cada lâmina do experimento.	64
<b>Figura 5.4.</b> <i>Box-plots</i> de intensidade de fluorescência das laminas utilizadas no desenho experimental II.	64
<b>Figura 5.5:</b> Gráfico MA da lâmina de número 4 após diferentes tratamentos nos dados.	65
<b>Figura 5.6:</b> Valores de expressão normalizados dos genes escolhidos para validação por RT-PCR em tempo real a partir da lista de genes diferencialmente expressos no desenho experimental I de microarranjos.	72
<b>Figura 5.7:</b> Valores de expressão normalizados dos genes escolhidos para validação por RT-PCR em tempo real a partir da lista de genes diferencialmente expressos no desenho experimental II de microarranjos.	73
<b>Figura 5.8.</b> <i>M. leprae</i> morto modula a translocação do OASL em células de Schwann e macrófagos	75
<b>Figura 5.9.</b> Valores de expressão normalizados para o gene OASL em biopsias de nervo.	78
<b>Figura 6.1.</b> Estrutura do gene OASL e de seu variante de splicing.	96
<b>Figura 6.2.</b> Processos disparados nas células de Schwann durante as etapas iniciais da interação com o <i>M. leprae</i> .	98
<b>Figura 9.1.</b> Avaliação por Bioanalyzer da qualidade dos RNAs extraídos de células de Schwann primárias humanas	113
<b>Figura 9.2.</b> Avaliação por eletroforese em gel de agarose da qualidade do RNA extraído de biópsias de nervo e de pele.	113
<b>Figura 9.3.</b> Ensaio de captação de 2-NBDG por células ST88-14.	114

## Lista de Tabelas

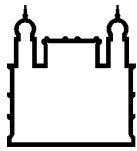
<b>Tabela 1.1.</b> Estrutura dos genomas de <i>Mycobacterium spp.</i>	7
<b>Tabela 4.1.</b> Características gerais da população recrutada para o estudo caso-controle.	36
<b>Tabela 4.2.</b> Oligonucleotídeos usados nos ensaios de RT-PCR em tempo real	51
<b>Tabela 5.1.</b> Genes identificados como sendo diferencialmente expressos em 24 ou 48 horas de infecção por <i>M. leprae</i> em células de Schwann primárias humanas.	60
<b>Tabela 5.2.</b> Integrantes da classe de proteínas induzidas por interferon do tipo I	62
<b>Tabela 5.3.</b> Grau de incorporação dos fluoróforos para cada amostra utilizada nos experimentos de microarranjo.	63
<b>Tabela 5.4.</b> Genes diferencialmente expressos entre células de Schwann controle e após 24 horas de infecção por <i>M. leprae</i> .	68
<b>Tabela 5.5.</b> : Genes candidatos a normalizador ordenados pela sua estabilidade de expressão medida pelos métodos geNorm (A) e Norm Finder (B).	69
<b>Tabela 5.6.</b> Estudo caso-controle dos SNPs e haplótipos do OASL numa população do Rio de Janeiro.	77

# Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xiv
Sumário	xv
Resumo	xviii
Abstract	xix
1 INTRODUÇÃO	001
1.1 Hanseníase	002
1.1.1 Histórico	002
1.1.2 Epidemiologia	002
1.1.3 O agente etiológico	005
1.1.4 Transmissão	008
1.1.5 Diagnóstico	009
1.1.6 Classificação e tratamento	011
1.1.7 Episódios reacionais	013
1.1.8 Resposta imunológica	014
1.1.8.1 Resposta inata	014
1.1.8.2 Resposta adaptativa	017
1.1.9 A neuropatia na hanseníase	018
1.1.9.1 A célula de Schwann	018
1.1.9.2 A interação do <i>M. leprae</i> com a célula de Schwann	020
1.2 Microarranjos de DNA	021
1.2.1 Descrição da técnica	021
2 JUSTIFICATIVA	024
3 OBJETIVOS	026
3.1 Etapa I	027
3.2 Etapa II	027
4 MATERIAL E MÉTODOS	028
4.1 Etapas da metodologia empregada	029
4.2 Amostras	031
4.2.1 Amostras bacterianas	031
4.2.2 Culturas de células	032
4.2.2.1 Células de Schwann primárias humanas	032
4.2.2.2 Células de Schwann ST88-14	033
4.2.2.3 Células THP1	034
4.2.3 Amostras clínicas	035
4.2.3.1 Biopsias de nervo	035
4.2.3.2 Sangue total	035
4.2.3.3 Comitê de ética	036

4.3	Purificação de ácidos nucleicos	036
4.3.1	Extração de RNA de células de Schwann primárias	036
4.3.2	Extração de RNA e de DNA de biópsias de nervo e de pele	037
4.3.3	Extração de DNA de sangue total	038
4.3.4	Quantificação de ácidos nucleicos	039
4.3.5	Verificação da qualidade do RNA	040
4.4	Microarranjos de DNA	040
4.4.1	Desenho experimental I	040
4.4.1.1	Protocolos utilizados pela Applied Biosystems	041
4.4.1.2	Análises de dados	042
4.4.1.2.1	Análise realizada pela Applied Biosystems	042
4.4.1.2.2	Critérios de exclusão	042
4.4.1.2.3	Re-análise de dados	043
4.4.2	Desenho experimental II	044
4.4.2.1	Amplificação de RNA	045
4.4.2.2	Marcação da segunda fita de cDNA	045
4.4.2.3	Preparação, hibridização e lavagem das lâminas	046
4.4.2.4	Aquisição das imagens dos microarranjos	047
4.4.2.5	Análise das imagens	047
4.4.2.6	Análise de dados	048
4.5	RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica	049
4.5.1	Transcrição Reversa	049
4.5.2	PCR em tempo real	050
4.5.3	Análise de dados	052
4.6	Diagnóstico molecular do M. leprae em amostras humanas por PCR em tempo real	054
4.7	Imunocitoquímica	055
4.8	Genotipagem de polimorfismos de base única por PCR em tempo real	056
5	RESULTADOS	057
	Etapa I: Análise Global da Expressão Gênica	058
5.1	Microarranjos de DNA	058
5.1.1	Desenho experimental I	058
5.1.1.1	Análise de dados preliminar	058
5.1.1.2	Re-análise dos dados	061
5.1.2	Desenho experimental II	063
5.1.2.1	Controle de qualidade das hibridizações	063
5.1.2.2	Genes diferencialmente expressos	066
5.2	Validação por RT-PCR em tempo real	069
5.2.1	Seleção de normalizadores para as reações de PCR	069
5.2.2	Validação da expressão gênica in vitro por RT-PCR em tempo real	069

Etapa II: Investigação do OASL e a Hanseníase	074
5.3 Investigação do OASL na hanseníase	074
5.3.1 Imunocitoquímica	074
5.3.2 Estudo de associação de polimorfismos no gene OASL e a hanseníase	076
5.3.3 Análise da expressão gênica do OASL <i>ex vivo</i>	078
6 DISCUSSÃO	079
6.1 Ferramentas para análise da expressão gênica	080
6.2 Considerações técnicas dos experimentos de microarranjos	081
6.2.1 Controle de qualidade das hibridações	081
6.2.2 Considerações sobre os desenhos experimentais utilizados	083
6.3 Resultados dos Microarranjos	085
6.4 Investigação do papel do OASL na hanseníase	092
7 CONCLUSÃO	099
8 PERSPECTIVAS FUTURAS	101
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
10 ANEXOS	123
I: Parecer do Comité de Etica em Pesquisa	124
II: Avaliação da qualidade das preparações de RNA	125
III: Resultados de ensaios de captação de glicose pelas linhagens de células de Schwann	127
IV: Artigo publicado	128
V: Artigo no prelo	135



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

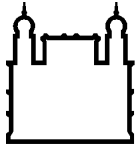
Fundação Oswaldo Cruz

## RESUMO

### ESTUDOS MOLECULARES DA INTERAÇÃO ENTRE O *Mycobacterium leprae* E A CÉLULA DE SCHWANN: UMA ABORDAGEM DE EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

**Anna Beatriz Robottom Ferreira**

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, onde tanto fatores do hospedeiro quanto ambientais têm papel no desfecho da doença. A hanseníase é uma das causas predominantes de incapacidade no nervo por infecção e os pacientes exibem altas taxas de morbidade, o que tem grande impacto na saúde pública. Apesar disso, os mecanismos de imunopatogênese induzidos pelo *M. leprae* são pouco conhecidos, especialmente nos tempos iniciais da infecção neural. Nesse estudo foi realizada uma análise global da expressão gênica por microarranjos numa tentativa de esclarecer a interação entre o *M. leprae* e seu hospedeiro humano. Células de Schwann primárias humanas infectadas pelo *M. leprae* apresentaram como diferencialmente expressos a classe de genes induzidos por interferon do tipo I. Desses genes, o *OASL* foi o gene que apresentou a maior alteração de expressão. Esse aumento de expressão foi confirmado por RT-PCR em tempo real em células de Schwann primárias infectadas pelo *M. leprae*. Foi demonstrado que a proteína *OASL* migra para o núcleo frente à infecção pelo *M. leprae* morto em linhagens de células de Schwann e de macrófagos THP1, onde ela provavelmente atua através da repressão epigenética da transcrição. O estudo de polimorfismos nesse gene envolvendo 521 casos e 498 controles indicou que o alelo A do SNP rs3213545 está associado à resistência a hanseníase. Por fim, carreadores do alelo A do SNP rs3213545 apresentaram menor expressão de RNAm de *OASL* em biópsias de nervo de indivíduos com neuropatia periférica não hanseniana, mas não em pacientes com hanseníase, sugerindo que de fato o *OASL* parece funcionar como um supressor da ativação da resposta imune protetora para a hanseníase. Assim, a produção diminuída de *OASL* em estágios iniciais da infecção poderia conferir resistência à hanseníase. Conjuntamente, esses dados sugerem que o aumento da expressão do gene *OASL* favorece, nas etapas iniciais da infecção pelo *M. leprae*, a sobrevivência intracelular do bacilo no seu hospedeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## ABSTRACT

### MOLECULAR STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN *Mycobacterium leprae* AND THE SCHWANN CELL: A PERSPECTIVE BASED ON GLOBAL GENE EXPRESSION ANALYSIS

**Anna Beatriz Robottom Ferreira**

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, in which both host and environmental factors play a role in disease outcome. Leprosy is the most important cause of infectious nerve incapacity and patients exhibit high rates of morbidity, which impacts public health. Nevertheless, the mechanisms of *M. leprae*-induced immunopathogenesis are not completely understood, especially in the nerve during the early stages of infection. A global gene expression analysis using microarrays was carried out in an attempt to better understand the host-*M. leprae* interaction. The class of genes induced by type I IFN was identified as differentially expressed. Of these genes, *OASL* presented the highest change in expression, which was confirmed by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in *M. leprae* infected primary human Schwann cells. We also showed that *OASL* protein migrates to the nucleus upon infection with dead *M. leprae* in both a Schwann cell lineage and THP1 macrophages, where it probably functions as an epigenetic repressor of transcription. A case-control study conducted using single nucleotide polymorphisms (SNPs) in this gene involving 521 cases and 498 controls indicated that the A allele of the rs3213545 SNP is associated with leprosy resistance. Furthermore, carriers of this allele expressed less *OASL* mRNA in nerve biopsies of patients presenting non-leprous peripheral neuropathy but the same was not observed in patients diagnosed with leprosy, suggesting that *OASL* seems to function by suppressing the activation of the protective immune response. Thus, an increased production of *OASL* in the initial stages of the infection by *M. leprae* may favor intracellular survival of the bacilli within its host.

## **1. INTRODUÇÃO**



## 1.1 Hanseníase

### 1.1.1 Histórico

A hanseníase é uma doença crônica neurológica e dermatológica que resulta da infecção pelo patógeno intracelular obrigatório, o *Mycobacterium leprae*. É comum que a hanseníase seja citada como uma das doenças mais antigas a acometer o homem. Apesar do assunto ainda ser controverso, historiadores sugerem que relatos de doenças referem-se à hanseníase nos *Vedas*, escrituras sagradas do hinduísmo e um dos textos preservados mais antigos, datados por volta de 1400 a.C.. Textos chineses de 500 a.C, no entanto, são mais aceitos e descrevem uma doença caracterizada por perda de sensibilidade, perda de sobrancelhas, nódulos, ulcerações nos pés e manchas brancas e avermelhadas (Trautman, 1984; Robbins *et al.*, 2009). Trabalhos recentes baseados em genômica comparativa de diferentes cepas de *M. leprae* reforçam a teoria de que a doença teria surgido no leste da África, espalhado-se primeiramente pela Ásia e Europa, e posteriormente para as Américas (Monot *et al.*, 2005; Monot *et al.*, 2009).

A denominação *lepra* foi introduzida em 300 a.C. através da tradução para o grego da palavra hebraica *tsaraáth* (que significa desonra, vergonha e desgraça). Por ser uma doença temida pelas incapacidades e deformidades severas que gera, os pacientes por ela acometidos foram forçados ao isolamento, principalmente na Europa na Idade Média, onde eram obrigados a carregar sinos para anunciar a sua presença (Trautman, 1984). No Brasil, a substituição do termo *lepra* por “hanseníase” - em homenagem a Gerhard Henrik Armauer Hansen, médico e botânico norueguês que identificou e descreveu a bactéria *M. leprae* como o agente causador da doença - foi realizada justamente para minimizar o forte estigma social que até hoje se faz presente.

### 1.1.2 Epidemiologia

A hanseníase é considerada um preocupante problema de saúde pública até os dias de hoje, tendo sido reportados 249.007 novos casos no mundo em 2008 (Organização Mundial de Saúde – OMS, 2009). A doença

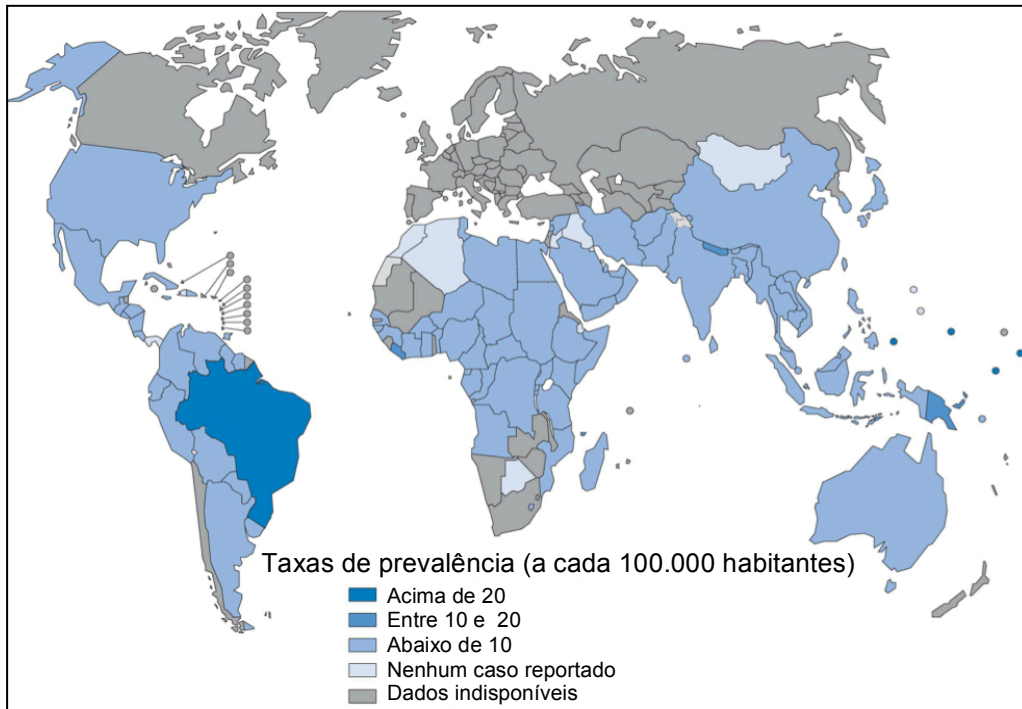
está fortemente associada aos baixos níveis de desenvolvimento socioeconômico, e 5 países (Brasil, Índia, Indonésia, República Democrática do Congo e Bangladesh) concentram 81% dos novos casos registrados em 2008 (OMS, 2009).

Com a implementação da poliquimioterapia (PQT) em 1981, a prevalência mundial da hanseníase vem sendo reduzida, passando de 520/100.000 habitantes em 1981 (Murthy *et al.*, 2004) para 18/100.000 em 2008 (OMS, 2009). Acredita-se, que a redução na prevalência deve-se muito mais à diminuição no tempo de tratamento e pela remoção dos registros dos pacientes curados do que pela redução da transmissão do *M. leprae*. O diagnóstico tardio e o longo período de incubação da doença são fatores que contribuem para a transmissão ativa da hanseníase, dificultando a redução significativa no número de novos casos. Segundo a OMS, o Brasil foi o país que apresentou a maior prevalência da doença em 2008, com 21 casos por 100.000 habitantes (Figura 1.1).

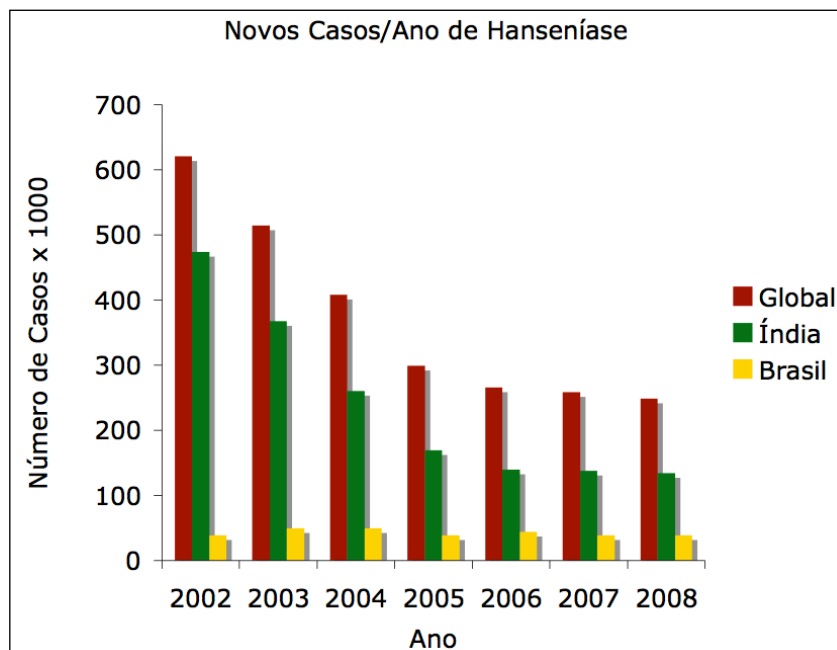
A importante redução no número de novos casos registrados na Índia, país com o maior número de novos casos no mundo (134.184 novos casos em 2008), também contribuiu para a redução na prevalência mundial. A mesma redução não foi observada no Brasil, onde foram registrados 38.365 novos casos em 2002 e 38.914 novos casos em 2008 (Figura 1.2). Esse perfil demonstra a necessidade de intensificar os esforços para que o Brasil reduza a incidência e, conseqüentemente, o número de novos casos de hanseníase.

A distribuição da doença no Brasil acompanha a desigualdade socioeconômica regional, onde as regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste são consideradas hiperendêmicas por deterem a maior concentração de casos. Em 2009, o Nordeste foi responsável por 40,8% do número de novos casos no país, seguido da região Norte, com 21,1%. Nesse mesmo ano, a região Sudeste continha 17% do número de novos casos da doença, enquanto o Sul contribuía com apenas 4,1% (DATASUS, <http://www.datasus.gov.br>, 2010). Fatores históricos, como a política de controle do isolamento compulsório, e sociais contribuem para explicar o acúmulo de pessoas infectadas com a hanseníase em determinadas regiões. Os dados do país em relação à doença demonstram a necessidade de reforçar a vigilância epidemiológica nas áreas

mais endêmicas, dando continuidade à implementação de atividades que impactem na transmissão da hanseníase.



**Figura 1.1: Taxas de prevalência de hanseníase no mundo.** Os dados são reportados pela OMS e correspondem ao início de 2009. As taxas referem-se a cada 100.000 habitantes da população. Adaptado da OMS, 2009.



**Figura 1.2: Número de novos casos de hanseníase de 2002 a 2008.** Na Índia, houve uma redução no número de novos casos em torno de 70%, enquanto que no Brasil esses números permaneceram no mesmo patamar. Adaptado da OMS, 2009.

### 1.1.3 O agente etiológico

O *M. leprae* foi identificado por Gerhard Hansen em 1874, na Noruega, como o primeiro agente causador de uma doença infecciosa (Hansen, 1874). O bacilo de Hansen apresenta tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos, o que explica as lesões anestésicas características da doença (Kaplan e Cohn, 1986). Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório, e, até o presente, ainda não foi possível cultivá-lo *in vitro*, o que têm dificultado o estudo de sua biologia e dos mecanismos de patogênese causado por este microrganismo.

O gênero *Mycobacterium* inclui mais de 70 espécies e pertence à ordem dos *Actinomycetales* e à família *Mycobacteriaceae*. Além do *M. leprae*, outros patógenos oportunistas para o homem deste gênero podem ser citados, como o *Mycobacterium tuberculosis* – causador da tuberculose humana – o *Mycobacterium avium* e o *Mycobacterium intracellulare*.

Semelhante a todos os organismos de gênero, o *M. leprae* é uma bactéria gram-positiva em forma de bastonete. É considerado um bacilo álcool-ácido resistente devido ao fato de corar-se em vermelho pela fucsina e manter esta coloração mesmo após a lavagem com álcool e ácido (Método de Ziehl-Neelsen). Como outras micobactérias, sua parede celular apresenta lipídeos na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos saturados de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM). Além disso, apresenta glicolipídeos na porção mais externa da parede celular, com destaque para o mais abundante, o glicolipídeo fenólico I (PGL-I), presente exclusivamente no *M. leprae*. Desde sua descoberta em 1981, o PGL-I vem despertando interesse quanto à sua utilização como diagnóstico precoce da infecção (Hunter e Brennan, 1981). Outras moléculas do envelope celular, como as adesinas, também mediam a interação do bacilo com as células do hospedeiro e, conseqüentemente, são essenciais para a patogênese do *M. leprae* (Alves *et al.*, 2004).

O *M. leprae* apresenta como características a alta infectividade e a baixa patogenicidade. Trata-se de uma bactéria de crescimento lento, com um período de divisão que varia entre 11 e 13 dias. A faixa ideal de temperatura para esta multiplicação é de 27 a 30° C, o que explica não só o fato do bacilo concentrar-se em áreas superficiais e nas extremidades do corpo humano

(mãos, pés, orelhas, etc.), mas também a sua capacidade de sobreviver em tatus e na pata de camundongos suscetíveis (Britton e Lockwood, 2004).

A estratégia utilizada para contornar a impossibilidade de cultivar o *M. leprae in vitro* é a infecção em animais. O primeiro a desenvolver um método bem sucedido foi o Charles Shepard, em 1960. Foi demonstrado que a inoculação de  $10^3$  a  $10^4$  bacilos (provenientes de biópsias humanas) em coxim plantar de camundongos Balb/c promovia uma multiplicação do *M. leprae* durante 9 a 12 meses (Shepard, 1960), mas, após o limite de multiplicação ter sido alcançado, as bactérias começavam a perder sua viabilidade (Shepard, 1962).

Mais recentemente, a infecção experimental de camundongos atímicos (*nude*) tem fornecido maior quantidade de bacilos viáveis. Estes animais são extremamente susceptíveis à infecção pelo *M. leprae* por apresentar um alto grau de imunodeficiência. Cerca de  $2 \times 10^7$  bacilos inoculados no coxim plantar de camundongos *nude* permitem a obtenção de aproximadamente  $10^{10}$  bacilos num período de 6 meses (Truman e Krahenbuhl, 2001).

Além dos modelos em camundongos, verificou-se, em 1971, que o tatu de nove bandas (*Dasypus novencinctus*) permite o crescimento do bacilo durante 18 meses, sendo considerado um hospedeiro naturalmente suscetível. Esses animais apresentam uma forma disseminada da doença, com comprometimento da pele, medula óssea, linfonodos, fígado, baço, pulmões e olhos (Kirchheimer e Storrs, 1971; Kirchheimer *et al.*, 1972; Storrs, 1974). O *M. leprae* pode ser obtido com relativo grau de pureza desses animais e este tipo de cultivo tem sido a base de avanços recentes no entendimento da fisiologia desse microrganismo.

Acredita-se que o alto grau de dependência por parte do *M. leprae* ao hospedeiro deve-se às suas características genéticas. O genoma completo do *M. leprae*, publicado em 2001, revelou que apenas metade do seu genoma contém genes que codificam proteínas, enquanto o restante consiste em pseudogenes (genes inativados ao longo da evolução) e regiões não codificantes (Cole *et al.*, 2001a). O número de pseudogenes e sua proporção no genoma do *M. leprae* é consideravelmente maior do que em outras micobactérias (Tabela 1.1) (Akama *et al.*, 2010a). O *Mycobacterium ulcerans*, por exemplo, apresenta o segundo lugar em número de pseudogenes (771),

mas a proporção de pseudogenes do seu genoma é menor que a metade daquela do *M. leprae* (Stinear *et al.*, 2007). Tem sido demonstrado que os pseudogenes do *M. leprae* são causados pela inserção de códons de parada, perda de fatores sigma, mutação em sítios ligadores de ribossomos ou a inserção de sequências repetitivas que compõem até 2% do seu genoma (Madan Babu, 2003; Cole *et al.*, 2001b; Williams *et al.*, 2009). A proporção de regiões não codificantes no genoma do *M. leprae* (24%) também é maior do que a do *M. tuberculosis* (9%) e especula-se que o *M. leprae* tenha perdido mais de 1.500 genes do seu genoma (Eiglmeier *et al.*, 2001). Apesar do elevado grau de degeneração de seu genoma, algumas vias de funções especializadas, como catabolismo e sistemas de transporte, têm permitido sua adaptação e sobrevivência no meio intracelular (Vissa e Brennan, 2001).

**Tabela 1.1: Estrutura dos genomas de *Mycobacterium spp.***  
Adaptado de Akama *et al.*, 2010a.

Espécie	Pseudogenes	Genes	Percentual do genoma	Tamanho do genoma (milhões de pb*)
<i>M. tuberculosis</i>	6	3.959	90.8	4.4
<i>M. Bovis</i>	27	3.953	90.6	4.3
<i>M. marinum</i>	65	5.424	90.0	6.6
<i>M. smegmatis</i>	168	6.897	92.4	7.0
<i>M. ulcerans</i>	771	4.160	72.3	5.6
<i>M. leprae</i>	1.116	1.605	49.5	3.3

\* pb = Pares de bases nucleotídicas.

Um estudo recente buscou avaliar o perfil de expressão gênica do *M. leprae* através de um microarranjo de DNA utilizando 363.116 sondas que abrangem todo o DNA do bacilo (arranjos do tipo *tiling*). Akama e colaboradores (2010a) observaram que a maioria das regiões altamente expressas em RNA correspondia a pseudogenes (37%) e regiões não-codificantes (32%), ao passo que apenas 30% das regiões expressas contemplavam genes com anotação conhecida. Esse e outros trabalhos – que mostraram que pseudogenes são altamente expressos em *M. leprae* – sugerem um possível papel funcional para essas regiões do genoma (Nakamura *et al.*, 2009; Akama *et al.*, 2009; Akama *et al.*, 2010b). Entretanto, a

análise detalhada da estrutura genômica dos pseudogenes revela que, embora sejam transcritos por estarem *in frame* com outros genes, há uma série de mecanismos reguladores pós-transcricionais que silenciam a sua tradução (Williams *et al.*, 2009) o que poderia explicar a presença abundante de sequências, a princípio, não funcionais do *M. leprae*. No entanto, outros autores sugerem que, quando expressos, os pseudogenes e as regiões não-codificantes seriam RNAs reguladores, apesar de não terem similaridade nucleotídica com as sequências padrão dessa classe de RNA em outros organismos (Akama *et al.*, 2009). Perante a eliminação de diversas vias celulares fundamentais – através da degeneração do genoma do *M. leprae*, o que implica em respostas limitadas ao estresse do ambiente – o acúmulo de pseudogenes pode ter promovido uma evolução adaptativa ao nicho extremamente especializado dos macrófagos e das células de Schwann dos nervos periféricos (Monot *et al.*, 2009).

#### 1.1.4 Transmissão

Acredita-se que a transmissão do *M. leprae* ocorra diretamente de pessoa a pessoa, provavelmente pela propagação de aerossóis de secreções nasais e da sua captação pela mucosa nasal ou respiratória (Klatser *et al.*, 1993). Embora haja a necessidade de confirmação, estudos baseados em amostras de lavados de pele e de secreção nasal sugerem que, além das vias aéreas, a pele também poderia ser uma potencial via de transmissão do *M. leprae* (Job *et al.*, 2008). Embora controverso, alguns trabalhos sugerem que reservatórios do ambiente (como água e esgoto) poderiam participar da dinâmica de transmissão da doença, uma vez que o DNA do *M. leprae* foi encontrado em amostras de água na Indonésia (Matsuoka *et al.*, 1999) e de solo na Índia (Lavania *et al.*, 2008).

De qualquer forma, o contato estreito e prolongado com os pacientes, especialmente aqueles que apresentam alta carga bacilar, constitui um importante fator determinante para a transmissão do bacilo. Assim, indivíduos residentes na mesma casa dos pacientes (contatos domiciliares) são considerados de alto risco para o desenvolvimento da doença. Um estudo realizado em uma população endêmica na Indonésia demonstrou que o risco

estimado para a hanseníase foi cerca de nove vezes maior em famílias de pacientes e quatro vezes maior em pessoas com relações diretas com pacientes em comparação às famílias que não tinham qualquer contato com os doentes (Van Beers *et al.*, 1999).

De fato, estudos em familiares, gêmeos e de segregação indicam que a genética contribui de maneira relevante para o desenvolvimento da hanseníase (Moraes *et al.*, 2006). Contudo, sabe-se hoje que esta doença apresenta um caráter multifatorial, ainda que a infecção pelo *M. leprae* seja a causa primária da doença. Em determinadas condições, o risco relacionado ao hospedeiro e ao ambiente desempenham um papel importante no desfecho da doença (Cardoso *et al.*, 2011). Fatores como o tempo de exposição, a carga bacilar do caso-índice (Douglas *et al.*, 2004) e as condições socioeconômicas das populações expostas (Düppre *et al.*, 2008) já foram apontados como importantes na determinação de quais indivíduos poderão desenvolver a doença.

O ser humano tem sido caracterizado como o único reservatório natural significativo do *M. leprae* e o único capaz de desenvolver a hanseníase, embora no tatu o bacilo consiga se multiplicar e até provocar infecção nos nervos periféricos (Scollard *et al.*, 2006). Tatus infectados por *M. leprae* têm sido encontrados na natureza no México e nos estados americanos do Alabama, da Louisiana, do Mississippi e do Texas. Através de uma abordagem por sequenciamento do genoma completo, um trabalho recente determinou que uma proporção considerável de pacientes com hanseníase habitantes do sul dos Estados Unidos compartilhava com os tatus uma cepa de *M. leprae* não encontrada em outra parte do mundo (Truman *et al.*, 2011). Esses dados sugerem que o tatu possa servir como um reservatório natural do *M. leprae* e como fonte de infecção para humanos.

#### 1.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é realizado, essencialmente, através de exames clínicos, tendo como base a sintomatologia dermatológica e neurológica. Os sinais cardinais da hanseníase são lesões cutâneas, nervos espessados e sensibilidade alterada em 70% dos casos (Gallo *et al.*, 2005).



Em alguns casos, a confirmação do diagnóstico requer o uso de exames laboratoriais complementares. Neste caso, a baciloscopia e a histopatologia são os testes mais utilizados. Além de observar-se microscopicamente a presença do *M. leprae* em amostras obtidas diretamente da pele ou de lesões, avalia-se também a integridade dos nervos cutâneos. Dessa forma, para ser caracterizado como um caso de hanseníase, o indivíduo deve possuir ao menos uma das seguintes características: (i) uma ou mais lesões de pele com alteração da sensibilidade; (ii) acometimento dos nervos com espessamento neural; e, (iii) baciloscopia positiva. Embora a identificação precoce de pacientes com hanseníase seja de grande importância para evitar a transmissão, ela é dificultada pelo longo período de incubação da doença.

Alguns antígenos exclusivos do *M. leprae*, como o PGL-I presente no envelope da bactéria, são encontrados nos tecidos infectados e desencadeiam resposta imune humoral precocemente, induzindo a produção de anticorpos IgM específicos em pacientes com hanseníase. Assim, a detecção de anticorpos anti-PGL-1 através da técnica de ELISA (do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) vem sendo utilizada como uma análise sorológica para detecção do *M. leprae*. Os níveis de produção do IgM anti PGL-1 indicam exposição ao *M. leprae* e mostram correlação positiva com a baciloscopia. Dessa forma, esse ensaio pode contribuir para avaliar o nível de exposição dos contatos, auxiliar na classificação dos pacientes e, ainda, no monitoramento da eficácia do tratamento (Moura *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de ensaios moleculares, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), foi considerado um dos maiores avanços no diagnóstico laboratorial da hanseníase. A identificação molecular do *M. leprae* consiste na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Para tal, diferentes sequências de genes alvos para ensaios de PCR em tempo real, tais como o elemento repetitivo *RLEP*, *Ag 85B* e o *16S* RNA ribossomal, têm sido utilizados e comparados (Martinez *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2011 artigo no prelo). A alta especificidade e sensibilidade conferem à técnica de PCR a possibilidade de utilização em quase todos os tipos de amostras clínicas, incluindo linfa, sangue, secreção nasal e biópsias de tecido. Além disso, esses ensaios têm sido muito úteis em casos de difícil diagnóstico, como por exemplo, da forma neural pura (PNL) da doença, que se

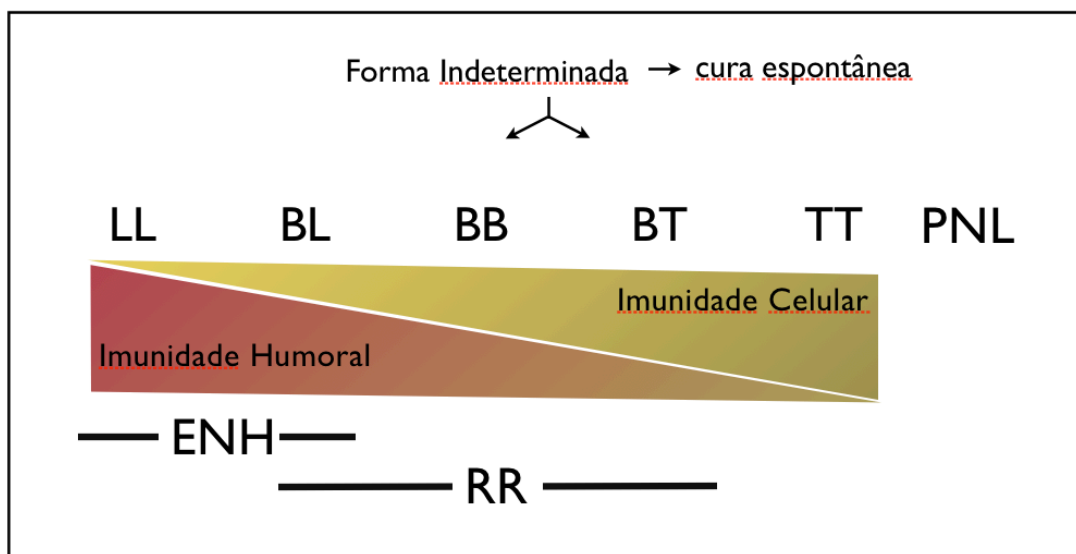
manifesta sem a presença de lesões de pele. Nesse caso, a PCR a partir de biópsias de nervo periférico vem sendo utilizada como método de suporte ao diagnóstico convencional (Jardim *et al.*, 2005). Mais recentemente, a técnica também vem sendo empregada para determinar a viabilidade do bacilo em amostras biológicas (Martinez *et al.*, 2009).

#### 1.1.6 Classificação e tratamento

A principal classificação para as formas clínicas da hanseníase foi proposta na década de 60, com base em aspectos clínicos, imunológicos (medidos pelo teste cutâneo de lepromina), baciloscópicos e histológicos. De acordo com esta classificação, o espectro da hanseníase apresenta dois pólos opostos e 3 formas intermediárias (Figura 1.3). Desse modo, em um pólo – denominado de hanseníase tuberculóide (TT) – encontram-se os casos que apresentam lesões localizadas e bem demarcadas, raramente positivos para exames bacteriológicos, mas que exibem forte resposta imune celular e reação positiva à lepromina. No pólo oposto – a hanseníase lepromatosa (LL) – caracteriza-se por uma forma disseminada onde os pacientes apresentam múltiplas lesões mal delimitadas contendo numerosos bacilos (devido à ineficiente resposta celular contra a bactéria) e reação negativa à lepromina. Existem ainda formas clínicas intermediárias denominadas *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline* lepromatosa (BL) (Ridley e Jopling, 1966). A grande maioria dos indivíduos expostos ao *M. leprae* não desenvolve a doença. Baseado nisso, a forma indeterminada da doença (I) foi proposta como sendo um estágio inicial e transitório, que pode evoluir para a cura espontânea ou para uma das cinco formas clinicamente estáveis (Jopling e McDougall, 1988).

Para facilitar os esquemas terapêuticos, a OMS estabeleceu uma classificação operacional dos pacientes em dois grupos – baseada apenas no número de lesões – classificando como paucibacilares (PB) aqueles com 1 a 5 lesões e, como multibacilares (MB) os pacientes com mais de 5 lesões. Dentro desse esquema, os pacientes paucibacilares compreendem as formas TT, BT e I, devido ao limitado número de bacilos encontrados nas lesões, ao passo

que pacientes multibacilares apresentam as formas BB, BL e LL, todas com elevada carga bacilar (OMS, 1987).



**Figura 1.3: Formas clínicas da hanseníase.** O esquema demonstra o perfil espectral da doença e está baseado na classificação de Ridley e Jopling: I (Indeterminada), TT (tubérculoide), BT (*borderline* tubérculoide), BB (*borderline* *borderline*), BL (*borderline* lepromatosa), LL (lepromatosa), PNL (forma neural pura). Estão incluídos aspectos da resposta imune do paciente e os episódios reacionais RR (reação reversa) e ENH (eritema nodoso hansênico).

Independente das classificações com embasamento imunológico ou baciloscópico, existe ainda uma denominação específica para os casos que apresentam uma neuropatia periférica isolada caracterizada por disfunção motora, sensorial ou por ambas. Este tipo de manifestação clínica é denominado forma neural pura (PNL) e o diagnóstico exige a realização de biópsias de nervo periférico devido à ausência de lesões cutâneas (Jardim *et al.*, 2003; Jardim *et al.*, 2005).

O tratamento da hanseníase se dá através da poliquimioterapia (PQT), a qual prevê a administração combinada de dapsona, rifampicina e clofazimina em doses e esquemas diferenciados, de acordo com a carga bacilar do paciente. A duração do tratamento é de 6 meses para os pacientes PB e de 12 meses para os pacientes MB. Essa combinação elimina os bacilos, impedindo o paciente de transmitir a doença logo no início do tratamento, garantindo a cura da doença caso o esquema terapêutico seja administrado de forma correta.

### 1.1.7 Episódios reacionais

Os chamados “episódios reacionais”, que constituem exacerbações no quadro clínico de forma aguda e súbita, ocorrem em aproximadamente metade dos pacientes ao longo da evolução da doença, podendo ocorrer antes, durante ou após o tratamento poliquimioterápico (Nery *et al.*, 1998). Estes quadros reacionais – classificados como reação do tipo I ou reversa (RR), e reação do tipo II, cuja manifestação clínica mais frequente é o eritema nodoso hansênico (ENH) – podem resultar no surgimento de novas lesões, reativação de lesões antigas e agravamento do quadro neurológico do paciente. O dano neural é consequência comum dos episódios reacionais, que contribuem para a instalação de incapacidades e deformidades físicas, muitas vezes irreversíveis. Não raro, as manifestações clínicas apresentadas durante os quadros reacionais levam o paciente a procurar ajuda médica e, só então, a doença é diagnosticada.

A RR é mais comum em pacientes com as formas *borderline* (Nery *et al.*, 1998) e estima-se que cerca de um terço destes pacientes pode apresentar este tipo de episódio reacional. O desenvolvimento desse quadro ocorre principalmente nos primeiros seis meses de PQT. A RR ocorre devido a um aumento na imunidade celular ao *M. leprae*, o que gera uma resposta inflamatória de hipersensibilidade do tipo tardia que, apesar de eficiente na eliminação do bacilo, é extremamente danosa ao tecido afetado. Como resultado, indivíduos que desenvolvem RR apresentam lesões inflamatórias na pele e quadro de neurite aguda (Scollard *et al.*, 2006). O tratamento da RR é realizado através da introdução de corticóides que têm como principal objetivo reduzir a reação inflamatória.

A ENH ocorre com maior frequência entre pacientes multibacilares, principalmente nas formas BL e LL. Devido a sua gravidade, o ENH constitui-se como uma das principais prioridades na prevenção de incapacidades em pacientes com hanseníase. O curso natural do ENH pode durar poucas semanas, como pode persistir durante anos nas formas crônicas e recorrentes (Pocaterra *et al.*, 2006). Os pacientes podem apresentar quadros clínicos que variam de discretos a graves, nos quais desenvolvem sintomatologia sistêmica com febre alta, mialgia, dores articulares e aparecimento de lesões de pele

vesículo-bolhosas que podem ulcerar e evoluir para necrose (Guerra *et al.*, 2004).

A talidomida é a droga de escolha no tratamento do ENH. Em 1965, Sheskin relatou a ação da talidomida no tratamento do ENH, que apresentou grande efeito imunomodulatório. O mecanismo de ação da talidomida, bem como seu efeito imunomodulador no ENH, é ainda desconhecido, mas a ação inibitória sobre o TNF *in vivo* e *in vitro* é um fenômeno muito observado (Sampaio *et al.*, 2002; Sampaio *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 1993). Apesar dos corticóides e da talidomida melhorarem os sintomas, não existe evidência de que os tratamentos anti-inflamatórios, especialmente com a talidomida, interrompam os processos imunológicos geradores dos episódios reacionais.

Apesar dos constantes relatos na literatura associando às reações uma resposta humoral via anticorpos, existem fortes evidências de uma contribuição da imunidade celular, já que estudos de expressão gênica demonstram a expressão de RNAm das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF em pacientes com os dois tipos de manifestação (Yamamura *et al.*, 1991; Moraes *et al.*, 1999). Em pelo menos um estudo, a produção de TNF foi detectada em todos os pacientes testados (Moraes *et al.*, 1999), sugerindo que esta citocina seja responsável pelos sintomas observados nos pacientes em reação.

#### 1.1.8 Resposta imunológica

A diversidade de manifestações clínicas da hanseníase, em contraposição à baixa variabilidade do bacilo, sugere que as variações observadas devem-se principalmente à resposta imunológica do hospedeiro. De fato, muitos estudos epidemiológicos e microbiológicos têm mostrado o envolvimento de diversas vias celulares e genes do hospedeiro que contribuem para o desenvolvimento das doenças micobacterianas, onde a mera presença do bacilo é insuficiente para explicar o desfecho da doença.

##### 1.1.8.1 Resposta Inata

A resposta imune inata constitui o primeiro nível de interação do *M. leprae* com o hospedeiro. Após a fagocitose, o controle da infecção depende

da capacidade do hospedeiro de ativar os processos que levam à morte do *M. leprae*, como a apoptose e a autofagia. Caso contrário, como nos indivíduos portadores de certos polimorfismos associados à inibição da atividade de genes chaves que participam dos processos microbicidas, a infecção se estabelece.

As células fagocitárias, principalmente células dendríticas e macrófagos, participam da interação inicial com o *M. leprae*. Após sua ativação, as células dendríticas tornam-se capazes de fagocitar, além de processar e apresentar o antígeno aos linfócitos T e B distantes do sítio da infecção. Além disso, a célula dendrítica ativada participa na modulação do curso da resposta imune adaptativa, produzindo moléculas co-estimulatórias e citocinas como IL-12, TNF, IL-10 e IL-6 (Demangel *et al.*, 2000).

Após a infecção pelo *M. leprae*, tem sido demonstrado que os macrófagos apresentam fenótipos distintos relacionados à resposta imunológica do hospedeiro. Macrófagos encontrados nas lesões de pacientes do pólo tuberculóide são diferenciados e raramente contêm bactérias. Já no pólo lepromatoso, os macrófagos apresentam numerosos bacilos e aspecto espumoso, devido ao acúmulo citosólico de lipídeos derivados tanto do hospedeiro quanto do patógeno (Cruz *et al.*, 2008). Esses dois tipos de macrófagos diferem quanto ao seu papel principal, podendo ser microbicida ou de fagocitose, respectivamente. Tem sido demonstrado ainda que a produção diferenciada de citocinas é responsável pelo desenvolvimento de cada fenótipo. A IL-15 induz preferencialmente uma via microbicida dependente de vitamina D onde as células tornam-se menos fagocíticas, como aquelas encontradas no pólo tuberculóide. Já a produção de IL-10 resulta em maior fagocitose de micobactérias e de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, como observado no pólo lepromatoso (Montoya *et al.*, 2009). Acredita-se, portanto, que macrófagos de indivíduos suscetíveis preferencialmente fagocitam *M. leprae*, que por sua vez escapam dos mecanismos microbicidas de controle do hospedeiro levando ao sucesso da infecção.

O reconhecimento do *M. leprae* pelas células do hospedeiro é possibilitado pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs do inglês *Pattern Recognition Receptor*). Esses receptores reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated*

*Molecular Pattern*) que variam de acordo com a sua natureza e sua localização na célula.

Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) estão presentes em monócitos, macrófagos e células dendríticas. No caso da hanseníase, demonstrou-se que os receptores TLR1 e TLR2 reconhecem lipopeptídeos da parede bacteriana do *M. leprae* (Walker e Lockwood, 2006). Observou-se também, que estes receptores foram mais expressos em amostras de lesões provenientes de pacientes TT quando comparado a lesões de pacientes LL, sugerindo que a ativação dos TLRs no sítio da doença contribui para conter a infecção (Krutzik *et al.*, 2003). Após reconhecerem lipopeptídeos micobacterianos, os TLRs ativam processos de controle da infecção como a ativação de fatores de transcrição [e.g. NF- $\kappa$ B e o receptor da vitamina D (VDR)], que por sua vez levam à indução da expressão de proteínas microbidas como a catelecidina (Liu *et al.*, 2006).

Os PRRs intracelulares do tipo NOD (do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain*), mais especificamente o NOD1 e NOD2, são capazes de ligarem-se a fragmentos de peptidoglicanos do citosol, ou até mesmo a algumas bactérias intracelulares íntegras (Bourhis *et al.*, 2007). Apesar de replicar-se preferencialmente em vesículas, acredita-se que o *M. leprae* seja reconhecido pelos NOD, possivelmente através de componentes do bacilo que são secretados para o citoplasma (Berrington *et al.*, 2010a).

Tanto os receptores TLR1/2 quanto o NOD2 são conhecidos por ativar o processo de autofagia, que tem como objetivo levar à degradação do patógeno através da formação de um autofagossomo e fusão deste com o lisossomo. Polimorfismos nos genes TLR1 e NOD2 têm sido associados à susceptibilidade à hanseníase em diferentes populações (Misch *et al.*, 2008; Berrington *et al.*, 2010a; Berrington *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2009) e acredita-se que portadores destas variantes tornam-se suscetíveis por uma falha na ativação dos processos microbidas, como a autofagia, ativados por esses receptores (Cardoso *et al.*, 2011).

Diante do contato com o patógeno, as células da resposta imune inata passam a sintetizar várias citocinas, dentre elas IL-12 e IL-23, que atuam estimulando os linfócitos e as células NK (do inglês *Natural Killer*) a produzir suas próprias citocinas, que por sua vez vão mediar a resposta imune. Dentre

elas merece destaque o IFN- $\gamma$ , que ativa mecanismos microbicidas e aumenta a expressão de moléculas do MHC (van de Vosse *et al.*, 2004). O TNF, citocina pró-inflamatória, também é produzido em resposta ao estímulo dos macrófagos e, junto com a IL-12 e o IFN- $\gamma$ , constitui o principal mecanismo efetor da imunidade celular, que culmina no isolamento e morte das micobactérias invasoras. Dessa forma, o eixo IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$  é uma das principais vias de ativação celular a combater o patógeno intracelular (Goulart *et al.*, 2002).

#### 1.1.8.2 Resposta Adaptativa

A apresentação clínica da hanseníase está fortemente associada ao padrão imunológico desenvolvido por cada indivíduo frente ao *M. leprae*. De um lado, os pacientes tuberculóides mostram uma resposta imune celular parcialmente eficiente que é responsável pelo controle da disseminação da infecção. Do outro lado, pacientes lepromatosos são incapazes de produzir IFN- $\gamma$  e, conseqüentemente, apresentam resposta imune celular baixa ou ausente, o que possibilita lenta replicação e a disseminação do bacilo.

Em 1991, Yamamura e colaboradores mostraram que o tipo de resposta desencadeada pelos linfócitos T helper (Th), através da produção de citocinas específicas, pode explicar os diferentes perfis de resposta imune entre pacientes tuberculóides e lepromatosos, onde o perfil Th1 caracteriza-se pela ativação de uma resposta mediada por células fagocitárias e mecanismos citotóxicos, e o perfil Th2 caracteriza-se pelo estímulo da produção de anticorpos pelos linfócitos B. Neste estudo, através de análise de expressão gênica de citocinas provindas de RNAm extraído de lesões de pacientes, verificaram que a expressão de IL-2, IL-23 e IFN- $\gamma$  estava aumentada nas lesões tuberculóides. Por outro lado, a expressão dos genes para IL-4, IL-5 e IL-10 foi mais evidente na pele dos pacientes com a forma lepromatosa. Resultado semelhante foi observado para a expressão gênica e secreção de citocinas em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), onde pacientes lepromatosos exibiram um padrão Th2 enquanto pacientes tuberculóides exibiram um padrão Th1 (Misra *et al.*, 1995).



Em síntese, sugere-se que os pacientes do pólo tuberculóide tenham um padrão de resposta imune protetora mediada por células T, com produção de citocinas que contribuem para a maturação e ativação dos macrófagos, levando ao controle da multiplicação dos bacilos e sua posterior eliminação. Já os pacientes do pólo lepromatoso parecem possuir um perfil de citocinas que induz a redução da resposta inflamatória, com inibição macrofágica e perfil característico da resposta humoral, que seriam insuficientes para conter o *M. leprae*. No entanto, muitos pacientes podem exibir um perfil de resposta mista, o que mostra que o predomínio de uma resposta não implica a anulação da outra. Nesse contexto, vale ressaltar que novos subgrupos de células T auxiliares já foram descritos, tais como as células T reguladoras (Treg) e as células T produtoras de IL-17 (Th17), indicando que a resposta celular não é dicotômica como se pensava.

#### 1.1.9 A neuropatia na hanseníase

A lesão neural na hanseníase está associada à capacidade do *M. leprae* de invadir as células de Schwann nos nervos periféricos. O comprometimento neural é observado em todas as formas clínicas, sobretudo durante os episódios reacionais. Vale ressaltar ainda que a neuropatia resulta não apenas da infecção, mas também das respostas imunológicas e do processo inflamatório desencadeados contra o *M. leprae* (Scollard, 2008). Sem dúvida, essa resposta consiste em um fator determinante para o aparecimento de deformidades que podem levar às incapacidades permanentes dos pacientes. Cerca de 1/3 dos pacientes com hanseníase sofre algum grau de incapacidade ao longo da vida (OMS, 2009). Estes dados ressaltam a importância de se estudar e melhor compreender os mecanismos que desencadeiam a lesão neural na hanseníase, bem como o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas visando um auxílio ao tratamento.

##### 1.1.9.1 A célula de Schwann

As células de Schwann foram identificadas por Theodor Schwann em 1839 e fazem parte das células gliais do sistema nervoso periférico, onde

desempenham um importante papel na homeostasia tecidual. Compartilham com os oligodendrócitos do sistema nervoso central a capacidade de produção da bainha de mielina, a membrana que envolve as porções alongadas do neurônio, facilitando a transmissão do impulso nervoso (Jessen e Mirsky, 2005).

A célula de Schwann origina-se na crista neural e passa pelos estágios de precursora e imatura até chegar à célula de Schwann diferenciada. Esta última pode apresentar os fenótipos mielinizante ou não-mielinizante nos nervos maduros. Diferente das células não-mielinizante, as células de Schwann mielinizantes produzem altos níveis de proteínas relacionadas à mielina, como a proteína zero (P0) e a proteína básica da mielina (MBP) (Jessen e Mirsky, 2005). A presença dos axônios e da lâmina basal que circunda a fibra nervosa é essencial para a formação da bainha de mielina pela célula de Schwann (Bunge, 1993). As células de Schwann também produzem componentes da matriz extracelular como laminina-2, colágeno IV, heparan sulfato, entre outros que compõem a lâmina basal (Chernousov e Carey, 2000).

Modelos *in vitro* de cultura de células de Schwann têm oferecido importantes contribuições no entendimento da sua interação com o nervo periférico e, eventualmente, com agentes patogênicos. No entanto, a dificuldade na obtenção de células de Schwann primárias de nervos periféricos de mamíferos muitas vezes impõe a utilização de linhagens celulares. A linhagem de células de Schwann ST88-14, isolada de um tumor maligno de um paciente com neurofibromatose tipo 1 por Yan e colaboradores (1995), tem sido utilizada como modelo de infecção por *M. leprae* (Im *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2008). As células desta linhagem assemelham-se às células de Schwann primárias pela presença dos marcadores S-100, P0 e MBP (Morrissey *et al.*, 1991; Rutkowski *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1994). O *M. leprae* é capaz de invadir a célula de Schwann ST88-14 (Marques *et al.*, 2001b) através de mecanismo que assemelha-se ao descrito em culturas primárias (Marques *et al.*, 2001a), validando a sua utilização como modelo de estudo da interação da célula de Schwann em momentos iniciais da infecção.

### 1.1.9.2 A interação do *M. leprae* com a célula de Schwann

O processo de infecção das células nervosas tem início a partir da fixação do *M. leprae* à lâmina basal, que envolve o axônio e a célula de Schwann, utilizando como ligante o domínio globular da cadeia  $\alpha 2$  da laminina-2 (Rambukkana *et al.*, 2002). Essa ligação parece ocorrer através de duas adesinas principais presentes na superfície do *M. leprae*: o PGL-1 (Ng *et al.*, 2000) e a proteína HLP (do inglês *histone like protein*) (Shimoji *et al.*, 1999). O complexo *M. leprae*-laminina2 utiliza como receptor o  $\alpha$ -dístroglicana presente na superfície da célula de Schwann (Rambukkana, 2001).

Dados da literatura continuam controversos no que diz respeito ao efeito do *M. leprae* sobre a morte e fisiologia das células de Schwann. Alguns estudos sugerem uma relação harmoniosa entre o *M. leprae* e esta célula. Análises histopatológicas obtidas a partir de biópsias de nervo de pacientes lepromatosos, mostram a célula de Schwann altamente infectada e com aparente ausência de morte celular (Shetty *et al.*, 1997). Mukherjee e Anita (1985) também observaram significativa multiplicação do *M. leprae* sem evidências de morte celular em culturas de gânglios de raiz dorsal de camundongos neonatos. Rambukkana e colaboradores (2002) demonstraram que o *M. leprae* promove desmielinização sem causar a morte das células de Schwann. O mesmo grupo mostrou que as células de Schwann proliferam em decorrência da ativação da via de sinalização Erk1,2 e consequente liberação de ciclina D1 (Tapinos e Rambukkana, 2005). Esses dados sugerem que a célula de Schwann entraria no processo de desdiferenciação, garantindo um aumento do número de células amielínicas, que constituem as células preferenciais do bacilo. Em contrapartida, resultados observados a partir de co-cultura de células de Schwann com neurônios de ratos não demonstram perda de mielina ou destruição axonal em virtude da exposição ao bacilo (Hagge *et al.*, 2002). Enquanto o *M. leprae* intacto parece favorecer a sobrevivência das células de Schwann, antígenos de *M. leprae* parecem ativar uma via de sinalização apoptótica induzida por TLR2 (Oliveira *et al.*, 2003). A apoptose pode ser um mecanismo de instalação de dano tecidual, como também pode ser um componente importante da resposta do hospedeiro na eliminação do patógeno.

## 1.2 Microarranjos de DNA

O microarranjo de DNA é uma ferramenta utilizada para medir a expressão de milhares de genes num conjunto de células. Como todas as células de um organismo apresentam o mesmo genoma, as diferenças fenotípicas entre as células são determinadas pela diferença nos níveis de expressão desses genes. Antes do desenvolvimento da técnica do microarranjo de DNA, as ferramentas disponíveis permitiam apenas analisar a expressão de pequenas quantidades de genes simultaneamente, porém através do uso de microarranjos, a expressão gênica pode ser analisada de forma global. Onde antes era possível realizar um par de *Northern Blots*, ou um par de *Southern Blots*, agora, em um único dia, realizam-se, com os arranjos de DNA, dezenas de milhares de hibridizações. Disto, resultou uma revolução na biologia molecular, e por consequência, na Medicina. Ao invés de estudarem poucos genes e mRNAs por vez, cientistas estão agora estudando muitos genes e mRNAs simultaneamente. Os arranjos de DNA são rotineiramente usados no estudo de todos os mRNAs conhecidos de um organismo (Lashkari *et al.*, 1997). Abriu-se então, a possibilidade de uma visão sistemática, completamente nova, da reação de células a um certo estímulo (Tusher *et al.*, 2001), assim como, do estudo das doenças humanas a partir da observação do efeito dessas na expressão global dos genes celulares.

### 1.2.1 Descrição da técnica

Um arranjo de DNA é usualmente um substrato (geralmente lâminas de vidro) sobre o qual são depositadas diversas moléculas de DNA de fita simples de sequências diferentes. Geralmente, é dado o nome de sonda ao material que é depositado na superfície do substrato. Como a quantidade de sondas distintas pode ser muito grande, são utilizados aparelhos robóticos na confecção das lâminas. A impressão das lâminas pode ser feita utilizando três diferentes técnicas: (i) fotolitografia, que utiliza luz para covalentemente fixar as fitas nascentes de DNA na lâmina; (ii) microimpressão mecânica, que utiliza pinos e a ação capilar para a deposição do DNA na lâmina; ou, (iii) *inkjet*, que utiliza tecnologia semelhante às impressoras de jato de tinta comerciais. A

lâmina contendo um conjunto de sondas é denominada de microarranjo de DNA.

A sonda utilizada no microarranjo pode ser de diferentes tipos, de acordo com o propósito do mesmo. Existem várias tecnologias de microarranjos de DNA comerciais, incluindo uso de sondas de cDNAs, oligonucleotídeos pré-sintetizados, ou ainda, oligonucleotídeos sintetizados *in situ*. Essas sondas são complementares a regiões do genoma que codificam proteínas e, portanto, os microarranjos são principalmente focados para a avaliação do transcriptoma codificador de proteínas (Woo *et al.*, 2004).

O microarranjo é colocado em contato com uma solução contendo a população de RNAm que desejamos estudar, a qual é denominada normalmente de alvo, e essa preparação é deixada sobre controle rigoroso de temperatura para que possa ocorrer o pareamento das regiões complementares da sonda àquelas do alvo, no fenômeno chamado de hibridação. Após ocorrer a hibridação, as moléculas do alvo que não estão pareadas ou que apresentem pareamento fraco são retiradas através de lavagens sucessivas, que não afetam os alvos corretamente pareados com a sonda. Finalmente, a hibridação é passível de ser quantificada, pois as moléculas da população alvo foram marcadas com a adição de agentes fluorescentes, os quais podem ser captados por leitores de fluorescência.

O delineamento do experimento é uma das questões mais importantes no uso de microarranjos. A forma como as hibridações são planejadas tem grande impacto sobre a capacidade de se inferir informações biológicas a partir dos experimentos. A escolha (i) dos alvos, (ii) da forma de realizar a hibridação e (iii) do número de replicatas biológicas ou técnicas a serem realizadas são algumas etapas do desenho dos experimentos de microarranjo. Os fatores que comumente restringem as opções descritas acima são financeiras, relativas ao gasto com material, e logísticas, como a quantidade de mRNA da amostra disponível (Simon *et al.*, 2002).

A forma mais comum de experimento baseia-se na hibridação competitiva, onde dois alvos marcados com fluoróforos distintos são hibridados contra um mesmo microarranjo. Sabe-se que diferentes cDNAs hibridam com suas sondas nos arranjos em taxas diferentes. Além disso, não se sabe ao certo a quantidade de DNA que é imobilizado numa lâmina de microarranjo.

Portanto, uma medida de intensidade de fluorescência obtida de um único fluoróforo confere pouca informação sobre a quantidade daquele gene. Essas realizações certamente motivaram o desenvolvimento de experimentos com hibridações competitivas entre dois fluoróforos, uma vez que é possível obter informações sobre a abundância de um gene numa amostra em relação à mesma em outra amostra. Esse tipo de experimento permite realizar comparações entre amostras de indivíduos diferentes, ou de grupos experimentais diferentes, com um único microarranjo (*Kerr and Churchill, 2001*).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Estudos de expressão gênica global apresentam-se como ferramentas valiosas na compreensão da interação patógeno-hospedeiro. Diversos estudos têm sido realizados para monitorar as alterações na expressão gênica de células hospedeiras após o contato com patógenos *in vitro*. Os dados desses estudos têm mostrado que as células dos hospedeiros sofrem uma grande reprogramação do transcriptoma durante a infecção, sugerindo que esse seja um componente central na defesa do hospedeiro (Jenner & Young, 2005). Outra vantagem das abordagens globais é o fato destes eliminarem a necessidade de hipóteses *a priori*, sendo estas substituídas por hipóteses *ad hoc* ou *a posteriori*. Dessa forma, essas ferramentas criam a oportunidade única de rever os conceitos da resposta aos agentes infecciosos, pois genes que antes não eram cogitados na regulação da resposta do hospedeiro podem aparecer como mediadores centrais no controle da infecção.

A literatura carece de dados sobre o efeito do *M. leprae* sobre a expressão de genes do hospedeiro e os processos metabólicos das células de Schwann. Na tentativa de contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos que participam do dano neural na hanseníase, o presente estudo traz uma grande inovação à investigação da resposta da célula de Schwann primária humana ao *M. leprae* por basear-se numa abordagem de expressão gênica em larga escala.

A utilização de (i) *M. leprae* viável produzido pelo modelo de cultivo na pata do camundongo nude; e, (ii) um modelo de infecção de célula de Schwann primária humana também constitui uma vantagem do estudo<sup>1</sup>. Esse modelo foi estabelecido e validado anteriormente (Hagge *et al.*, 2002), onde verificou-se que essas células internalizam o bacilo, que por sua vez têm sua viabilidade mantida por prazos longos. Sendo assim, esse modelo é de grande valia em estudos da interação do *M. leprae* com a célula de Schwann durante a fase inicial da infecção. A compreensão dos mecanismos envolvidos na colonização bem sucedida dessas células pelo *M. leprae* pode auxiliar no desenvolvimento de ferramentas para o controle da hanseníase.

---

<sup>1</sup> A colaboração com a Dra. Diana Williams do National Hansen's Disease Program (NHDP) em Baton Rouge, Louisiana, nos ofereceu a oportunidade de utilizar um modelo de infecção de células de Schwann primárias humanas por *M. leprae* vivo, produzido rotineiramente em seu laboratório. As etapas iniciais do estudo foram realizadas no NHDP, como observado na figura 3.1.



### **3. OBJETIVOS**

O presente estudo contou com um objetivo inicial que foi cumprido na primeira etapa do estudo através de uma abordagem de expressão gênica global por microarranjos. Uma característica desse tipo de estudo é o desenvolvimento de hipóteses *a posteriori* a realização do mesmo. Dessa forma, após a conclusão da primeira etapa, novos objetivos foram desenvolvidos com base nas hipóteses geradas anteriormente. Segue uma relação dos objetivos das duas etapas do estudo:

### 3.1 Etapa 1: Análise global da expressão gênica

Objetivo Principal: Estudar a interação do *M. leprae* com as células de Schwann humanas primárias por uma abordagem de expressão gênica global.

Objetivos Específicos:

- Realizar experimentos de microarranjo de DNA para identificar genes diferencialmente expressos em modelo *in vitro* de infecção de células de Schwann humanas primárias pelo *M. leprae*;
- Validar os genes encontrados pelos microarranjos nas mesmas amostras por RT-PCR em tempo real.

### 3.2 Etapa 2: Investigação do OASL e a hanseníase.

Objetivo Principal: Investigar o papel do OASL (gene encontrado como sendo diferencialmente expressos pela análise por microarranjos) na hanseníase.

Objetivos Específicos:

- Observar o efeito do *M. leprae* na localização intracelular do OASL em linhagens de células humanas de Schwann (ST88-14) e macrófagos (THP1);
- Analisar polimorfismos de base única no gene do OASL e sua associação com a hanseníase;
- Análise da expressão do OASL *ex vivo* em biópsias de nervo humanas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### 4.1 Etapas da metodologia empregada

Na figura 4.1, observa-se um resumo das metodologias empregadas no presente estudo com ênfase para os locais de realização de cada etapa. Primeiramente, foram realizados experimentos de cultivo de células de Schwann primárias e infecção por *M. leprae* vivo no NHDP, Louisiana. Foram realizados dois grupos de experimentos. O primeiro observou o efeito de dois tempos de infecção por *M. leprae* (24 e 48 horas). RNA foi extraído das células e enviado à empresa *Applied Biosystems* que se encarregou da realização de experimentos de microarranjos e análise de dados dos mesmos. Em seguida, os dados foram submetidos a uma nova análise no Brasil. O segundo grupo de experimentos observou apenas o tempo de infecção de 24 horas. O RNA extraído foi transportado para o Brasil onde foi utilizado em experimentos de microarranjos com lâminas fabricadas pela *Stanford Genomics Facility*. Genes encontrados como sendo diferencialmente expressos foram selecionados para validação por RT-PCR em tempo real. A partir dessa análise, o gene *OASL* foi encontrado como sendo diferencialmente expresso em células de Schwann infectados por *M. leprae*. Iniciou-se, portanto, a segunda etapa do estudo para investigar o papel do *OASL* na hanseníase. Foram realizados experimentos de infecção por *M. leprae* morto das linhagens de células de Schwann ST88-14 e de macrófagos THP1. A partir desses experimentos foram realizados ensaios de imunocitoquímica para detecção da localização intracelular do *OASL*. Além disso, foi realizado estudo do tipo caso-controle para analisar a associação de polimorfismos no gene do *OASL* à hanseníase. Por fim, a expressão do *OASL* foi verificada em biópsias de nervo de pacientes diagnosticados no Ambulatório Souza Araújo com neuropatia periférica não hansênica ou hanseníase. Esses pacientes também foram genotipados para um polimorfismo no gene do *OASL* identificado como associado à hanseníase pelo estudo caso-controle para observar se esse tinha efeito sobre a expressão do mesmo.

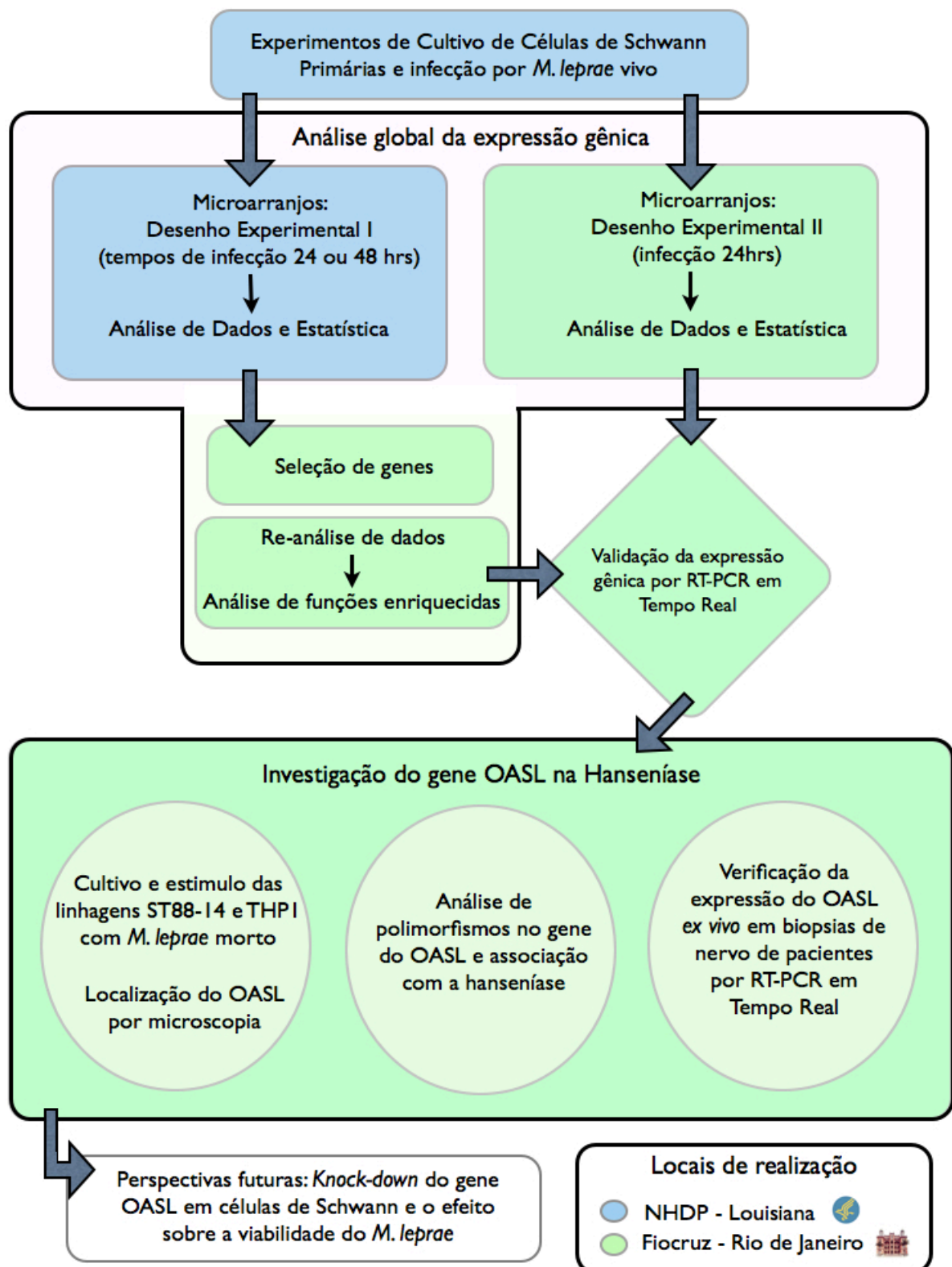


Figura 4.1: Organograma das etapas do presente estudo, com ênfase na metodologia empregada em cada etapa, destacando os locais de realização.

## 4.2 Amostras

### 4.2.1 Amostras bacterianas

*M. leprae* de duas fontes foram utilizados neste trabalho: proveniente de modelo de infecção sistêmica de tatus - doado pelo Dr. Patrick J. Brennan (Departamento de Microbiologia da Colorado State University, Fort Collins, CO, EUA) – e provenientes de modelo de infecção de coxim plantar de camundongos *nu/nu* – doado pelo Dr. James Krahenbuhl (National Hansen's Disease Program, School of Veterinary Medicine, Baton Rouge, LA, EUA).

Os *M. leprae* obtidos a partir de tatus (*Dasypus novencinctus*) foram purificados de tecidos de fígado e baço de animais infectados utilizando o método de Draper (Hunter *et al.*, 1981). Esta metodologia consiste na irradiação dos tecidos contendo os bacilos com  $2,5 \times 10^6$  RAD (Dose Absorvida de Radiação), homogeneização em tampão PBS 10 mM, pH 7,2 (Life Technologies/Gibco, Carlsbad, CA, EUA) por 3 minutos em gelo, centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 minutos, ressuspensão do sedimento em tampão contendo DNase, filtragem da mistura e centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 minutos. O sedimento foi centrifugado mais duas vezes em gradiente de Percol a  $27.000 \times g$  por 15 minutos. Finalmente, o *M. leprae* foi ressuspensão em salina tamponada com fosfato e mantido a  $-70^\circ\text{C}$  até o uso.

Os *M. leprae* Thai-53 viáveis, mantidos em passagens contínuas seriadas no coxim plantar de camundongos atímicos *nude (nu/nu)*, foram colhidos das patas dos camundongos aproximadamente 9 meses após a inoculação, quando estes continham numerosos bacilos ( $10^9$ - $10^{10}$ /g de tecido). A suspensão de bacilos frescos foi tratada com hidróxido de sódio 0,1 M. Os bacilos foram ressuspensos em meio de cultura Middlebrook 7H12 (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) contendo albumina, 50 mg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 50 mg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) e então incubados por três horas em estufa a  $33^\circ\text{C}$ . As bactérias foram centrifugadas a  $10.000 \times g$  por 5 minutos e ressuspensas em meio de cultura D-10 contendo DMEM (Life Technologies/Gibco), 10% SFB (p/v) (HyClone Laboratories, South Logan, UT, EUA) e 50 mg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich). A contagem dos bacilos foi realizada por coloração álcool ácido-resistente (BBL7 TB Ziehl-Neelsen Kit; Becton,

Dickinson and Company, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) (Truman & Krahenbuhl, 2001). Bacilos viáveis foram utilizados por não mais do que 24 horas após a coleta.

A viabilidade das preparações de *M. leprae* foi medida por dois métodos. Primeiramente, realizou-se o ensaio de radiorespirometria pela técnica de Buddemeyer, que mede a capacidade do *M. leprae* de oxidar ácido palmítico marcado com carbono 14 em  $^{14}\text{CO}_2$  (Franzblau, 1988). Brevemente, *M. leprae* foi ressuspenso em 1,0 mL de meio Bactec 7H12B (BD) recoberto com papel de filtro impregnado com NaOH, 2,5-diphenyloxazole (Sigma-Aldrich) e concentrado I (Kodak, Chicago, IL, EUA). A radioatividade expressa em contagem por minuto (CPM) foi registrada diariamente e o CPM acumulado no dia 7 foi utilizado como indicador da viabilidade.

A viabilidade das preparações de *M. leprae* também foi medida por coloração fluorescente através do LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Life Technologies/Molecular Probes) como descrito em Lahiri e colaboradores (2005). Para tal, as bactérias foram coradas com 6  $\mu\text{M}$  de Syto9 e 30  $\mu\text{M}$  de iodeto de propídio. Após a coloração, as bactérias foram lavadas e resuspenso em 10% (v/v) de glicerol em solução salina. As bactérias mortas e vivas foram quantificadas por contagem dos bacilos verdes e vermelhos, respectivamente, sob microscopia de fluorescência utilizando o conjunto de filtros adequados.

#### 4.2.2 Culturas de Células

##### 4.2.2.1 Células de Schwann Primárias Humanas

Células de Schwann primárias humanas isoladas de nervos espinhais foram obtidas do ScienCell Research Laboratories (Carlsbad, CA, EUA) e mantidas em nitrogênio líquido até o uso. Para início do cultivo, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria a 37° C. As células foram então colocadas para crescer em meio de cultivo recomendado pelo fabricante (*Human Schwann Cell Medium*, ScienCell) em garrafas de cultura (Nunc Flask, 75 cm<sup>2</sup>) em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C.

As células são aderentes e sua manutenção foi feita por repiques onde o sobrenadante da cultura era retirado, a monocamada de células lavada com PBS 1X, e as células ressuspensas em 10 mL de solução Tripsina (0,025%, p/v) /EDTA (0,5 mM) (SceinCell), seguida de neutralização com 10 mL de solução neutralizadora de tripsina contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (SceinCell). As células em suspensão foram coletadas e transferidas para tubos *Falcon* de 50 mL, centrifugados a 1000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. O crescimento das células nas condições de cultivo foi determinado, a cada repique, através de contagens em câmara de Neubauer. Após a quinta passagem, as culturas foram desprezadas e uma nova alíquota estoque era descongelada e o cultivo reiniciado.

Para a realização dos estímulos, foram utilizadas garrafas de cultura (Nunc Flask) de 75 cm<sup>2</sup>. Cada garrafa recebeu 2,5 x 10<sup>6</sup> células que foram incubadas a 37° C por 48 horas, até que formassem uma monocamada confluenta. Após a incubação de 48 horas, as células foram colocadas para aclimatar por 2 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 33° C. Após o período de aclimação, as células, cujas contagens foram estimadas em 1 x 10<sup>7</sup>, foram infectadas com 1 x 10<sup>9</sup> bacilos de *M. leprae* vivos, o que corresponde a uma multiplicidade de infecção (M.O.I.) de 100:1. As células controle receberam apenas meio de cultura. Após 24 ou 48 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 33° C, os sobrenadantes das culturas foram removidos e armazenados a -80° C, quando deu-se início à extração de RNA.

#### 4.2.2.2 Células de Schwann ST88-14

A linhagem de células de Schwann ST88-14 foi isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I e doada pelo Professor Jonathan Fletcher (Universidade de Harvard, Boston, EUA). Esta linhagem é mantida em meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-Glutamax a 37° C em estufa de 5% de CO<sub>2</sub>. Por serem células aderentes, seu repique foi feito adicionando-se 0,125% (v/v) de tripsina em EDTA 5,3 mM por no máximo um minuto. Em seguida, adicionou-se meio RPMI suplementado com 10% (v/v) SFB e a suspensão centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. As



células foram ressuspensas, em meio RPMI completo suplementado com 10% (v/v) de SFB, e contadas em câmara de Neubauer. O meio RPMI, antibióticos, tripsina e EDTA foram obtidos da Life Technologies/Gibco.

Os estímulos foram realizados em placas de cultura de 24 poços com lamínulas (Greiner Bio-one, Monroe, NC, EUA) contendo  $5 \times 10^4$  células em 1 mL de meio RPMI completo (Life Technologies/Gibco) suplementado com 10% (v/v) de SFB, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As células receberam *M. leprae* irradiado com a M.O.I. de 20:1 no momento em que a cultura apresentou uma confluência de aproximadamente 50%. Após 48 horas de infecção, as células foram preparadas para os ensaios de imunofluorescência.

#### 4.2.2.3 Células THP1

THP1 é uma linhagem monocítica humana que foi obtida através da purificação de monócitos do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Foi adquirida do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA) e mantida congelada em nitrogênio líquido. Para o início do cultivo, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria a 37° C. Esta linhagem foi mantida em meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2mM de L-Glutamax. As células ficaram incubadas em garrafas de cultura (NUNC Flask, 25 cm<sup>2</sup>) em estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. As culturas foram mantidas através de repiques semanais. O crescimento da linhagem nas condições de cultivo, a cada repique, foi determinado através de contagens das células em câmara de Neubauer.

Para que a linhagem de monócitos pudesse ser diferenciada em macrófagos, foi utilizado o acetato de forbol-miristila (PMA; Sigma) na concentração final de 80 nM seguida de incubação na estufa de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C. Após 24 horas de incubação, o PMA era retirado da cultura com a ajuda de banhos sucessivos de PBS 10 mM (pH 7.4), e novo meio RPMI completo suplementado com 10% (v/v) de SFB era adicionado. Após 24 horas de repouso, as células eram então infectadas pelo *M. leprae* morto com

a M.O.I. de 20:1. Após 48 horas de infecção, as células foram preparadas para os ensaios de imunofluorescência.

#### 4.2.3 Amostras Clínicas

##### 4.2.3.1 Biopsias de nervo

A coleta de rotina de biopsias de nervo é realizada no Ambulatório Souza Araújo (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ) em pacientes de difícil diagnóstico, como é o caso da forma neural pura (PNL), cuja patologia é restrita ao nervo e o paciente não apresenta lesões de pele (Jardim *et al.*, 2003). Os nervos foram processados a fim de extrair o DNA para detecção de genes do bacilo por PCR em tempo real, como forma de auxiliar no diagnóstico desses pacientes. Para aproveitar ao máximo o potencial de geração de informação dessas biópsias, foi otimizado um protocolo de extração de RNA e DNA para possibilitar estudos de expressão gênica a partir de nervos colhidos para o diagnóstico molecular. Foi coletado sangue total dos mesmos pacientes para os quais foram obtidas biopsias de nervo a partir do qual também foi extraído DNA para genotipagem de polimorfismos no gene do *OASL* (protocolos a seguir). Para o presente estudo, foram coletadas 85 biópsias de nervos de pacientes atendidos no Ambulatório Souza Araújo.

##### 4.2.3.3 Sangue total

Para genotipagem, em estudo do tipo caso-controle em uma população do Rio de Janeiro, estudamos 1030 indivíduos, onde 503 casos foram diagnosticados no Ambulatório Souza Araújo (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ), segundo os critérios estabelecidos por Ridley & Jopling (1966), e como recomendado pela OMS, agrupando-os em multibacilares (MB) ou paucibacilares (PB). Quinhentos e vinte e sete (527) controles, residentes da mesma área geográfica dos pacientes, foram recrutados a partir de um banco de doadores de medula óssea do Instituto Nacional do Cancer (INCA, RJ). Casos e controles foram etnicamente classificados como caucasóides, mestiços ou negros, de acordo com características morfológicas dos

indivíduos e dos seus familiares. Esta classificação foi realizada através de uma inspeção cuidadosa de atributos dessas pessoas, tais como características morfológicas da face, tipo de cabelo e cor de pele. As características gerais das populações utilizadas no estudo caso-controle estão listadas na tabela 4.1. A coleta de sangue total dos 503 casos diagnosticados e dos 527 controles foi realizada no Ambulatório Souza Araújo (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ) e no INCA, respectivamente.

**Tabela 4.1: Características gerais da população recrutada para o estudo caso-controle\*.**

		<b>Casos</b>	<b>Controles</b>
<b>Idade (média ± SD)</b>		38.66 ± 16.92	33.49 ± 9.62
<b>Sexo</b>	<b>Feminino</b>	239 (36)	314 (45)
	<b>Masculino</b>	431 (64)	386 (55)
<b>Etnia</b>	<b>Caucasóide</b>	305 (55)	393 (57)
	<b>Mestiços</b>	191 (34)	195 (28)
	<b>Negros</b>	64 (11)	105 (15)
<b>Classificação OMS</b>	<b>Paucibacilar</b>	244 (36)	-
	<b>Multibacilar</b>	426 (64)	-

\*Resultados expressos como N (frequência%). O número total de indivíduos em cada parâmetro pode ser diferente do número total genotipado devido a perdas durante o processo.

#### 4.2.3.4 Comitê de ética

Todos os ensaios que se valeram da utilização de amostras humanas (sangue e tecido) foram realizados posteriormente a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido por escrito, de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (protocolo CEP/Fiocruz 151/01; anexo I).

### 4.3 Purificação de Ácidos Nucleicos

#### 4.3.1 Extração de RNA de células de Schwann primárias

O RNA foi extraído das culturas de células de Schwann primárias humanas pelo kit RNAgentes® Total RNA Isolation System (Promega,

Madison, Wisconsin, EUA). Para tal, os sobrenadantes das culturas foram removidos e armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  e às células aderentes, foram acrescentados 5 mL de solução de desnaturação. Após o rompimento das células, estas foram aliqüotadas em criotubos de 2 mL (700  $\mu\text{L}$  por tubo) e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o realização do ensaio. A cada tubo foi acrescentado 70  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio a 2 M e 700  $\mu\text{L}$  fenol:cloroformio:alcohol isoamílico. O conteúdo dos tubos foi misturado por inversão e mantido no gelo por 15 minutos. A mistura foi centrifugada a  $10.000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , e a fase aquosa superior (contendo o RNA) foi transferida para novos tubos eppendorf (Axygen, Union City, CA, EUA) de 1,5 mL. O RNA foi precipitado, acrescentando-se 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol seguido de incubação a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e os sedimentos lavados com 1 mL de etanol 75% (v/v) por centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado, os sedimentos foram secos à temperatura ambiente por 10 minutos e então ressuspensos em 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNases. Todos os reagentes foram fornecidos pelo kit da Promega.

#### 4.3.2 Extração de RNA e de DNA de biópsias de nervo

A extração de RNA de biópsias de nervo foi realizada utilizando o reagente Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies/Invitrogen). As biópsias, pesando entre 50 e 100 mg, foram maceradas utilizando pistilo e almofariz de inox mantidos congelados em gelo seco. O macerado foi colocado em tubos eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de Trizol<sup>®</sup>. Em seguida, adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (Sigma-Aldrich) 24:1 a cada tubo seguido de homogeneização por inversão. Os homogeneizados foram incubados em gelo por 15 minutos seguidos de centrifugação a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa superior contendo o RNA foi transferida para novos tubos eppendorf de 1,5 mL, acrescida de 500  $\mu\text{L}$  isopropanol (Sigma-Aldrich), misturada por inversão e incubada a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante a noite. As fases intermediária e inferior orgânica foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior

extração de DNA, a ser utilizado no diagnóstico molecular do *M. leprae*. Após a incubação, os tubos contendo RNA foram centrifugados a 14.000 x g por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos lavados com 1 mL de etanol (Sigma-Aldrich) 75% (v/v) por centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C. Após a remoção do sobrenadante, os sedimentos foram secos à temperatura ambiente por 10 minutos e ressuspensos em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (v/v) (DEPC, Life Technologies/Invitrogen).

Após a extração do RNA, o DNA presente na interfase e na fase orgânica (inferior) foi isolado seguindo os procedimentos descritos a seguir. Aos tubos contendo as fases de interesse, foi adicionado 100 µL de tampão TE (5 mM Tris; 0,1 mM EDTA) e 150 µL de clorofórmio:alcoól isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada no instrumento FastPrep® 120 (MP Biomedicals, Solon, OH, EUA) na velocidade de 6,5 metros/segundo (m/s) por 45 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados em gelo por 5 minutos seguido de centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo eppendorf de 1,5 mL, foi acrescida de 2 vezes o volume de isopropanol e 2 µL de GlycoBlue® (Life Technologies/Invitrogen) e foi homogeneizada por inversão. A mistura foi incubada por no mínimo 4 horas a -20° C seguido de centrifugação a 12.000 x g por 30 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) por centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. O DNA foi ressuspenso em 20-30 µL de água tratada com DEPC.

#### 4.3.3 Extração de DNA de sangue total

A partir de amostras de sangue total, foi realizada a extração de DNA utilizando o método *salting out* (Miller *et al.*, 1988), com algumas modificações. Primeiramente, foram adicionados 10 mL de tampão TE (Tris/Cl 10 mM; EDTA 1 mM) a um tubo *Falcon* de 15 mL contendo 2 mL de

amostra de sangue total. O sangue total colhido foi misturado por inversão e centrifugado a 2.500 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e ao sedimento foi adicionado tampão TE até completar o volume de 10 mL. Posteriormente, o material foi homogeneizado no vórtex até que o sedimento estivesse completamente dissolvido. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 2500 rpm durante 20 minutos. Esse último passo foi repetido, e após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Após esse descarte foi adicionado ao sedimento 600 µL de tampão de lise (Tris/Cl 10 mM, NaCl 400 mM e EDTA 2 mM), 80 µL de uma solução de SDS a 10% e 9 µL de proteinase K (solução a 25 mg/mL). O material foi homogeneizado no vórtex por 2 segundos e incubado a 37° C durante a noite. Em seguida, foram acrescentados 200 µL de uma solução de acetato de sódio saturado (6,83 M) e o material foi então centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo, ao qual foi acrescentado etanol absoluto (2 vezes o volume recuperado). A solução foi misturada por inversão até que o DNA precipitasse. O sedimento de DNA foi coletado e transferido para outro tubo, adicionando-se 200 µL de etanol 70% (v/v) seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo cuidadosamente mantido invertido por 30 minutos para que o etanol evaporasse completamente. Finalmente, foram adicionados 200 µL de tampão TE (Tris/Cl 5 mM; EDTA 0,1 mM) ao sedimento de DNA, e o material foi incubado a 56° C até que o sedimento estivesse dissolvido.

#### 4.3.4 Quantificação de Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucléicos extraídos pelos diversos métodos foram quantificadas por espectrofotometria usando o espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para isso, um microlitro da amostra foi lido contra um “branco” contendo água DEPC ou Milli-Q. A absorbância (A) no comprimento de onda de 260 nm corresponde a 40 µg/mL de RNA e 50 µg/mL de DNA. Para avaliar a pureza das amostras, utilizou-se a razão da absorbância em dois comprimentos de onda, onde  $A_{260/280}$  indica o grau de contaminação por proteínas e  $A_{260/230}$  indica a contaminação por compostos

orgânicos. Amostras com razões de  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230} < 1,8$  foram consideradas inadequadas e foram repurificadas até atingirem razão de  $A_{260/280}$  e  $A_{260/230} \geq 1,8$  ou desconsideradas para o estudo.

#### 4.3.5 Verificação da Qualidade do RNA

A qualidade do RNA extraído das células de Schwann primárias foi avaliada por Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, EUA), enquanto que a qualidade do RNA extraído das demais amostras foi avaliada por gel de agarose (Life Technologies/Invitrogen) a 1,2% (p/v) em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich). Este gel foi desenvolvido no laboratório como forma de eliminar a necessidade de utilização dos reagentes tóxicos formaldeído e brometo de etídeo. As amostras foram previamente desnaturadas misturando-se 200 ng de RNA com 1  $\mu$ L de SYBR Green II 100X (Life Technologies/Applied Biosystems), 35% (v/v) formamida, MOPS 1X e 0,125% (p/v) corante azul de bromofenol. As amostras foram incubadas em banho seco a 65° C por 10 minutos e em seguida aplicadas no gel. O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100 V por 40 minutos. Após a corrida eletroforética o gel foi analisado por um sistema de fotodocumentação (I-Pix Touch, Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). Os resultados da análise de qualidade das amostras de RNA utilizadas nos microarranjos e no RT-PCR em tempo real encontram-se no Anexo II.

### 4.4 Microarranjos de DNA

#### 4.4.1 Desenho Experimental I

Para rastrear o efeito do *M. leprae* na expressão global de células de Schwann primárias e avaliar as diferenças entre dois tempos de infecção (24h e 48h) foram comparadas através da técnica de microarranjo de DNA quatro condições experimentais: células de Schwann controle 24h (C-24), infectadas 24h (I-24), controle 48h (C-48), e infectadas 48h (I-48). Após a verificação da qualidade do RNA por Bioanalyzer, os mesmos foram enviados à Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA), que se encarregou dos

experimentos de amplificação do RNA, marcação, hibridação dos microarranjos em lâminas de um canal *Human Genome Survey Microarray* versão 2.0 (Applied Biosystems) e de uma primeira análise de dados. As lâminas de microarranjo continham 30.865 sondas de oligonucleotídeos de 60 bases para avaliar a expressão de 29.098 genes com funções conhecidas. Cada amostra foi hibridizada independentemente a uma lâmina de microarranjo, e dois experimentos foram realizados para cada amostra, o que resultou num total de 8 lâminas.

#### 4.4.1.1 Protocolos utilizados pela Applied Biosystems

As amostras de RNA foram transcritas em cDNA, amplificadas e marcadas com digoxigenina (DIG) utilizando o *NanoAmp<sup>TM</sup> RT-IVT Labeling Kit* (Life Technologies/Applied Biosystems). Primeiramente, 2 µg de RNA total foi transcrito reversamente em uma reação de 20 µL finais contendo primer T7-Oligo (dT), tampão de síntese de primeira fita (*First Strand Buffer*), dNTP, enzima transcriptase reversa e inibidor de RNase. Essa reação foi incubada em termociclador por duas horas a 42° C seguido de 5 minutos a 70° C. A segunda fita de cDNA foi sintetizada numa reação contendo todo o cDNA gerado pela primeira reação, tampão de síntese da segunda fita (*Second Strand Buffer*), dNTP, DNA polimerase e RNase H. Esta reação, de volume final de 100 µL, foi incubada em termociclador por 2 horas a 16° C seguida de 70° C por 5 minutos. Em seguida, o aRNA de fita dupla foi marcado com DIG durante a transcrição *in vitro* (IVT) numa reação contendo tampão de transcrição (*IVT Buffer*), DIG-UTP, dNTP para marcação e enzima (*IVT Enzyme*). Essa reação foi incubada a 37° C por 16 horas. O cRNA foi purificado utilizando as colunas fornecidas pelo kit.

As amostras amplificadas e marcadas foram hibridadas com as lâminas de microarranjo e reveladas utilizando o *Chemiluminescence Detection Kit* (Life Technologies/Applied Biosystems). Para isso, as lâminas foram pré-hibridadas por 1 hora a 55° C com uma solução de 1 mL contendo tampão de hibridação (*Hybridization Buffer*), desnaturante da hibridação (*Hybridization Denaturant*) e reagente de bloqueio (*Blocking Reagent*). Dez



microgramas do cRNA marcado com DIG foi fragmentado por aquecimento a 60° C por 30 minutos em tampão de fragmentação e em seguida misturado com as lâminas de microarranjo em solução contendo o tampão de hibridação e o desnaturante da hibridação a 55° C por 16 horas.

Ao final da hibridação, as lâminas foram submetidas a uma série de lavagens com tampões fornecidos pelo kit. Além de remover a hibridação não específica, as lavagens tinham como objetivo revelar o sinal quimio-luminescente. Para isso, as lavagens incluíram as etapas de ligação de anticorpo Anti-DIG ligada a fosfatase alcalina (Anti-DIG-AP) e a incubação com o substrato, que quando submetida à ação da enzima gerava sinal quimio-luminescente. Ao final das lavagens, as lâminas foram lidas no leitor de lâminas quimio-luminescentes (1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer, Applied Biosystems).

#### 4.4.1.2 Análises de dados

##### 4.4.1.2.1 Análises realizadas pela Applied Biosystems

A empresa *Applied Biosystems* (ABI) realizou a análise das imagens utilizando *software* proprietário com o objetivo de obter dados quantitativos a partir das imagens. A empresa também realizou uma primeira análise dos dados gerados pelos microarranjos através do pacote de ferramentas ABarray ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)), desenvolvido para o ambiente R (R Development Core Team, 2010). Os dados foram filtrados pelos valores de sinal/ruído (SNR), e os pontos na lâmina com  $SNR > 3$  foram incluídos nas análises subseqüentes. As intensidades de sinal foram normalizadas entre as lâminas através do método A-quantil (Irizarry, 2003). Os dados filtrados e normalizados foram utilizados na inferência estatística de comparação das médias pelo teste t de Student entre as condições C-24 e I-24; C-48 e I-48; I-24 e I-48 para cada gene.

##### 4.4.1.2.2 Critérios de exclusão

Aplicamos critérios de exclusão estridentes para selecionar um

conjunto restrito de genes para a validação posterior. Para tal, optamos por utilizar como ponto de corte ( $|\log \text{fold change}| \geq 4$  e p-valor  $\leq 0,001$ ) para a seleção de genes diferencialmente expressos.

#### 4.4.1.2.3 Reanálise dos dados

Optamos a seguir por reanalisar os dados, desta vez fazendo um ajuste por um modelo linear que possibilita inferir sobre os fatores principais (infecção e tempo) e a interação entre eles, característica de um desenho fatorial 2 x 2. Esse desenho pode ser representado pelo modelo de *two-way* ANOVA:

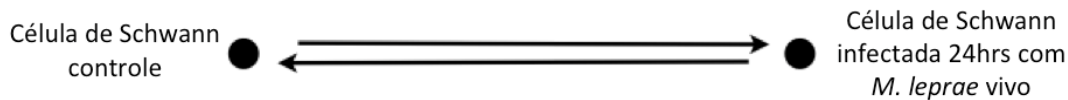
$$Y_{ijk} = \mu_i + I_{ij} + T_{ik} + (I:T)_{ijk} + \varepsilon_{ijk},$$

onde,  $Y_{ijk}$  é a expressão log-transformada do gene  $i$ ,  $i = \{1, \dots, n\}$ , dada a presença ou ausência de infecção  $I_j$ ,  $j = \{1, 2\}$ , o tempo de infecção  $T_k$ ,  $k = \{1, 2\}$ , e a interação entre os fatores  $I$  e  $T$ ,  $(I:T)$ . A média global é representada por  $\mu$ , enquanto  $\varepsilon$  corresponde ao componente aleatório do modelo. Em seguida, dois testes de hipótese foram utilizados na comparação de médias dos contrastes de interesse: (i) frequentista moderado (Tusher *et al.*, 2001); e, (ii) Bayesiano (Smyth, 2004). Ambos permitem a moderação do erro padrão amostral e, conseqüentemente, possibilitam a maior descoberta de genes diferencialmente expressos. Em todas as reanálises os mesmos critérios de seleção de genes diferencialmente expressos (GDEs) foram considerados: (i) p-valor ajustado  $\leq 0,05$ , para controle do erro family-wise do tipo I ou false discovery rate (Benjamini e Hochberg, 1995); (ii) valor absoluto de *log fold change*  $\geq 1$  (fold change  $\leq 0,5$  ou fold change  $\geq 2$ ); e, (iii) odds Probability  $\geq 0,95$ . Esse último foi estimado a partir do valor da estatística Bayesiana B, que possibilitou a incorporação de informação *a priori* sobre a variabilidade esperada para cada gene, o que, em muitos casos, diminui o erro esperado entre grupos e, conseqüentemente, aumenta a possibilidade de descoberta de genes diferencialmente expressos. Ao final, as listas de genes diferencialmente expressos relativos ao efeito da infecção por *M. leprae*, do tempo de infecção, e da interação entre os fatores tempo e infecção foram submetidas ao Panther (<http://www.pantherdb.org/>) para anotação física e

funcional e comparadas ao banco de dados de genes humanos do NCBI, por meio de testes hipergeométricos, para identificar processos biológicos sobre-representados na lista de genes diferencialmente expressos (<http://www.pantherdb.org/tools/compareToRefListForm.jsp>).

#### 4.4.2 Desenho experimental II

Optamos por realizar um novo estudo por microarranjos contando com replicação biológica e técnica. Para esse desenho de estudo, foram cultivadas células de Schwann primárias em apenas duas condições experimentais: célula de Schwann controle e infectado por *M. leprae* vivo por 24 horas. Os RNAs foram extraídos no NHDP, Louisiana, onde tiveram sua qualidade verificada por Bioanalyzer, e em seguida foram transportados para o Laboratório de Hanseníase, Fiocruz, RJ, onde foram realizadas todas as etapas experimentais dos microarranjos. As lâminas utilizadas nesse estudo foram adquiridas da *Stanford Genomics Facility* e continham 44.544 sondas de oligonucleotídeos de 70 bases. Desses, 30.718 sondas reconheciam transcritos de genes, 8.441 reconheciam exons de alguns genes com *splicing* alternativo conhecidos, 196 reconheciam RNA não codificante e 372 sondas reconheciam transcritos de genes que sofrem rearranjo somático. Além dessas sondas, a lâmina também contava com um conjunto grande de controles de hibridação incluindo controles negativos (398), positivos (864) e controles que reconhecem sequências não-humanas de amostras controle acrescentadas ao RNA antes da marcação (1.384). Também foi adquirido da Stanford o *pool* de RNAs controle *spike-in* contendo 51 RNAs não-humanos que são reconhecidos pelas sondas controle. O desenho experimental das hibridizações foi do tipo competitivo onde duas amostras foram hibridadas por lâmina, sendo cada amostra marcada com fluoróforos distintos (Alexa 555, de cor verde; ou Alexa 647, de cor vermelha). Duas lâminas foram hibridadas para cada conjunto de amostras, e em cada uma dessas hibridações foi efetuada a troca dos fluoróforos entre as amostras (do inglês, *dye swap*). O estudo contou com uma triplicata biológica, portanto, um total de 6 lâminas foram hibridadas no experimento completo (Figura 4.1).



**Figura 4.2: Desenho experimental de microarranjos do DNA para investigar o efeito de 24 horas de infecção por *M. leprae* em células de Schwann.** Desenho com replicação em *dye swap*. Nessa representação, círculos correspondem à amostras de RNA e setas correspondem a hibridações entre as duas amostras. Por convenção, representamos a amostra corada em verde na ponta e a amostra corada em vermelho na cauda da seta.

#### 4.4.2.1 Amplificação do RNA

O RNA obtido das células de Schwann foi amplificado utilizando o kit Message Amp<sup>TM</sup> II aRNA (Life Technologies, Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, 2 µg de RNA total foram submetidos a uma transcrição reversa para a síntese de uma primeira fita de cDNA numa reação de 20 µL contendo T7 oligo (dT), 1 X *First Strand Buffer*, 4 µL dNTP, 1 µL de inibidor de RNases, 1 µL de enzima ArrayScript. A reação foi incubada por 2 horas a 42° C. Foi realizada a síntese da segunda fita de cDNA através de uma reação de 100 µL contendo todo o conteúdo da primeira reação, 63 µL de água livre de nucleases, 1 X *Second Strand Buffer*, 4 µL dNTP, 2 µL de DNA polimerase e 1 µL de RNase H. Essa reação foi incubada por 2 horas a 16° C. O cDNA de dupla fita foi purificado através das colunas fornecidas pelo kit e em seguida submetida a uma transcrição *in vitro* para síntese de aRNA numa reação contendo tampão da transcrição, dNTP e enzima que foi incubado por 14 horas a 37° C. O aRNA foi purificado através de colunas fornecidas pelo kit e quantificado no espectrofotômetro *NanoDrop*.

#### 4.4.2.2 Marcação fluorescente da segunda fita de cDNA

As amostras de aRNA foram submetidas a marcação direta para a incorporação de nucleotídeos acoplados aos fluoróforos Alexa 555 ou 647 através de uma adaptação do Bioprime DNA labeling kit (Life Technologies, Invitrogen). Para isso, 2 µg de aRNA foram primeiro submetidos a uma reação de transcrição reversa no volume de 20 µL contendo 2 µL de random primer, 2 µL dNTP, 1 µL RNA controle (*spike-in*), 1 X *First Strand Buffer*, 1 µL

DTT, 1 µL inibidor de RNase e 2 µL enzima Superscript III. Essa reação foi incubada a 50° C por 2 horas em termociclador. Ao final, o RNA foi digerido acrescentando-se ao tubo 1 X Tampão RNase One, 2 µL de enzima RNase One e 68 µL de água livre de nucleases. Esta reação foi incubada por 10 minutos a 37° C. O cDNA remanescente foi purificado por centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos em colunas Microcon 30 (Millipore). Em seguida o cDNA foi marcado numa reação de 50 µL contendo 20 µL da solução de *random primer* (fornecido pelo kit), 1 µL do fragmento Klenow da DNA polimerase, 120 µM de dATP, dTTP e dGTP, 60 µM de dCTP não marcado e 40 µM de dCTP-Alexa 555 ou 647. Após uma incubação a 37° C por 3 horas, o cDNA marcado foi purificado por 4 centrifugações a 13.000 x g em colunas Microcon 30 com 400 µL de água livre de nucleases cada. Ao final da purificação, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro para cálculo do grau de incorporação dos fluoróforos (DoL, do inglês, *Degree of Labelling*). O DoL é expresso em porcentagem e representa o número de bases marcadas incorporadas a cada 100 bases. Valores de DoL entre 1,0 e 3% sugerem boa incorporação e foram utilizados como controle de qualidade das marcações.

#### 4.4.2.3 Preparação, hibridação e lavagem das lâminas de microarranjo

Antes da hibridação, as lâminas de microarranjo foram lavadas para remoção de sujeira e bloqueadas para evitar sinal inespecífico seguindo as recomendações do fabricante. Para isso, as lâminas foram submetidas ao seguinte protocolo de lavagem: 5 minutos em Triton X-100 0,1% (v/v); 2 vezes por 2 minutos cada em 1 mM HCl; 10 minutos em 100 mM KCl; 1 minuto em água Milli-Q; 15 minutos a 50° C em 50 mM etanolamina, 0,1% SDS e 0,1 M Tris, pH 9.0; 1 minuto em água Milli-Q.

As amostras marcadas e purificadas foram hibridadas com as lâminas de microarranjo em solução contendo 5 X SSC e 0,1% SDS. A hibridação ocorreu por 18 horas em câmaras mantidas em banho-maria a 60° C sob agitação.

Após as hibridações, as lâminas foram lavadas em *beaker* sob agitação contendo 500 mL das seguintes soluções: 2 X SSC, 0,2% SDS por 10 minutos; 0,5 X SSC, 0,02% SDS por 10 minutos; 0,1 X SSC por 5 minutos; 0,1 X SSC por 5 minutos. As lâminas foram secas por centrifugação em suporte apropriado por 50 minutos a 500 x *g*.

#### 4.4.2.4 Aquisição das imagens dos microarranjos

As lâminas foram analisadas em um leitor óptico (Vers Array Chip Reader™, BioRad), que quantifica a emissão de fótons após a excitação dos fluoróforos por um laser, em leituras independentes ao comprimento de onda de 532 nm (para quantificação do Alexa 555, denominado canal “verde”) ou de 635 nm (para quantificação do Alexa 647, denominado canal “vermelho”). Neste trabalho, cada lâmina foi analisada com 9 µm de resolução dos pixels e intensidade do laser de 100%, mas variando a voltagem do tubo fotomultiplicador de forma a balancear a razão da emissão entre os canais. As imagens foram exportadas em formato tiff.

#### 4.4.2.5 Análise das imagens

A análise das imagens foi realizada através do programa GenePix Pro v.6.0 (Axon). A análise inclui três etapas: (i) gradeamento: alinhamento de uma grade sobre os pontos de impressão das sondas para marcar as coordenadas de cada ponto; (ii) segmentação: uma máscara circular é posicionada sobre o ponto, e os pixels que localizam-se sob a máscara são classificados como sinal, enquanto que os pixels fora da máscara são classificados como ruído; e, (iii) quantificação: onde são calculadas estatísticas correspondentes às áreas de sinal e ruído segmentadas (ex. média, mediana, desvio-padrão, distância interquartilica). O método de segmentação utilizado por este programa é o de círculos adaptativos, que permitem variações no diâmetro de cada ponto (Yang *et al.*, 2001).

#### 4.4.2.6 Análise de dados

Todas as análises foram feitas com o pacote Limma (Smyth, 2004) desenvolvido para a linguagem de programação R (R Development Core Team, 2010), utilizando as medianas do sinal e do ruído em cada canal como dados “brutos” de entrada, uma vez que médias são mais influenciadas por valores extremos.

A correção pelo ruído é utilizada para remover os possíveis efeitos de hibridação não-específica da heterogeneidade espacial no microarranjo. No entanto, a correção de ruído padrão, estimada pela subtração sinal – ruído para cada ponto em cada canal, introduz uma grande variabilidade nos pontos de baixa intensidade e gera problemas como valores negativos de intensidade. O método de correção pelo ruído utilizado empregou o modelo de misturas normo-exponencial (Bolstad, 2004), que é mais adequado por evitar valores negativos.

Os pontos foram filtrados (mantidos) por três critérios: razão sinal ruído (SNR, do inglês, *signal to noise ratio*)  $> 3$ , *flag* do software Genepix  $\leq -49$ , *Hthreshold*  $< 0,2$ . O software Genepix identifica pontos não detectados durante o gradeamento com *flag* no valor de -50. O *Hthreshold* é um critério que elimina pontos com grande diferença entre a média e a mediana da intensidade dos pixels (normalizados pela média de intensidade do canal), que podem representar pontos com artefatos.

Em seguida, foram feitos gráficos MA (MA *plots*) para visualização do perfil das intensidades dos pontos de cada lâmina. Esses gráficos foram propostos por Dudoit e colaboradores (2002) e tem se tornando o método padrão para visualização de dados de microarranjos por hibridação competitiva pelo fato dos mesmos revelarem mais características e artefatos dos dados que os RG plots utilizados anteriormente. O gráfico MA é feito plotando no eixo x o valor da intensidade média de todos os pixels em escala  $\log_2$  [índice A;  $A = \frac{1}{2} (\log_2 R + \log_2 G)$ ; onde R e G são os valores de intensidade do ponto nos canais vermelho e verde, respectivamente (do inglês *Red* e *Green*)] e no eixo y a razão da expressão entre os canais que é estimada pela diferença na quantidade de pixels em escala  $\log_2$  [índice M;  $M = \log_2 R - \log_2 G = \log_2(R/G)$ ]. Após análise visual dos gráficos MA, optamos

pela normalização *lowess* global (Yang *et al.*, 2002) e pelo escalonamento pelos quantis da distribuição dos valores médios de intensidade A, método conhecido por *A-quantile* (Irizarry *et al.*, 2003).

Aos dados normalizados e escalonados, assim como para o experimento anterior de microarranjo, optamos pelo ajuste de um modelo linear com um fator principal (infecção) e apenas dois níveis, infectado ou não-infectado. Esse modelo de *one-way* ANOVA pode ser representado por:

$$Y_{ij} = \mu_i + I_{ij} + \varepsilon_{ij},$$

onde,  $Y_{ij}$  é a expressão log-transformada do gene  $i$ ,  $i = \{1, \dots, n\}$ , dada a presença ou ausência de infecção  $I_j$ ,  $j = \{1, 2\}$ . A média global é representada por  $\mu$ , enquanto  $\varepsilon$  corresponde ao componente aleatório do modelo. Em seguida, dois testes de hipótese foram utilizados na comparação de médias do contraste de interesse: (i) frequentista moderado e; (ii) Bayesiano. Os mesmos critérios de seleção de genes diferencialmente expressos (GDEs) foram considerados, ou seja: (i) p-valor ajustado  $\leq 0,05$ , para controle do erro family-wise do tipo I ou false discovery rate (Benjamini e Hochberg, 1995); (ii) valor absoluto de *log fold change*  $\geq 1$  (fold change  $\leq 0,5$  ou fold change  $\geq 2$ ); e (iii) odds Probability  $\geq 0,95$ . Foi realizada uma anotação funcional dos genes através do software *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>).

#### 4.5 RT-PCR em Tempo Real para análise da expressão gênica

##### 4.5.1 Transcrição Reversa (RT)

A transcrição do RNA em cDNA foi realizada em um volume final de reação de 20  $\mu$ L mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III<sup>®</sup> (Life Technologies/Invitrogen). Inicialmente, uma concentração de 1  $\mu$ g de RNA em solução aquosa foi incubada a 65° C por 5 min juntamente com 0,5  $\mu$ g de Oligo (dT) para a linearização da molécula de RNA. Em seguida, foi adicionado a essa mistura o tampão da enzima em concentração final 1X, dNTP 0,125 mM, DTT a 10 mM, 40 U de inibidor de RNase Out<sup>®</sup> e 200 U da enzima Superscript III<sup>®</sup>. Esta mistura foi incubada a 50° C por 1 hora para



realização da transcrição e, em seguida, a 70° C durante 5 minutos para a inativação da enzima. Todas as etapas de incubação foram realizadas em banho-seco modelo DB- Heat & Cool (Loccus Biotechnology). Por fim, as amostras foram resfriadas e armazenadas a -20° C. Por causa da limitação na quantidade de RNA proveniente de biópsias de nervo, apenas 0,5 µg de RNA total foi utilizado na reação de transcrição reversa e a incubação da reação ocorreu por 2 horas.

#### 4.5.2 PCR em Tempo Real

A amplificação por RT-PCR em tempo real foi realizada após a transcrição reversa do RNA total. Neste estudo, foi utilizado o sistema SYBR green I (Applied Biosystems), cuja fluorescência é diretamente proporcional à formação do produto amplificado pela ligação do fluoróforo, que se encaixa na curvatura maior do DNA de dupla fita.

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas em volume final de 20 µL contendo Sybr Green PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo e 4 µL de cDNA previamente diluído 1:10 (1:5 no caso biópsias de nervo). Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse além dos genes constitutivos RPL13, 18S, B2M, GAPDH e HPRT1. Todas as reações foram realizadas no sistema de PCR em tempo real Step One Plus® (Applied Biosystems) e as incubações seguiram a seguinte sequência: 95° C por 10 minutos seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto. Ao final da reação de amplificação, as amostras foram submetidas a uma nova incubação para geração da curva de dissociação.

Todos os oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR em tempo real (Tabela 4.2) foram desenhados a partir de sequências de referência de cada gene utilizando o *software Primer3 v.0.4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) onde foram controlados os fatores: (i) tamanho do iniciador, (ii) tamanho do produto, (iii) temperatura de anelamento dos *iniciadores*, (iv) conteúdo GC do iniciador, (v) chance de pareamento entre o par de *iniciadores* e dentro do mesmo iniciador e (vi) força de anelamento na extremidade 3' do *iniciador*.

Após serem desenhadas, as sequências foram validadas pela ferramenta *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) usando o banco de genes humanos do NCBI.

**Tabela 4.2. Oligonucleotídeos usados nos ensaios de RT-PCR em tempo real**

Gene	Fita	Sequência (5' - 3')	Pb do produto
Genes Constitutivos	RPL13	Senso GACAAGAAAAAGCGGATGGT	111
		Antisenso GTACTTCCAGCCAACCTCGT	
	HPRT1	Senso GTGGAAGATATAATTGACTGGC	120
		Antisenso AACACTTCGTGGGGTCCTTT	
	B2M	Senso AGATAGTTAAGTGGGATCGAGACA	103
		Antisenso ATAAAAAGCAAGCAAGCAGAA	
	GAPDH	Senso CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA	124
		Antisenso AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	
18S	Senso AGGATGAGGTGGAACGTGTG	147	
	Antisenso CTTCACGGAGCTTGTTGTCC		
Genes de Interesse	OASL V. 1	Senso AATTTCTGCCATCCTTCAG	115
		Antisenso TGGCTTTCACATACTGCTGGTA	
	OASL V. 2	Senso AATTTCTGCCATCCTTCAG	110
		Antisenso TGATGGGCCTGCTGGTAC	
	SCG2	Senso GGAGAACGGGGAGGAATATG	135
		Antisenso AGATGAGGAAAATTAAGGGATAAGA	
	SETD1B	Senso AGCTCAAGTTCCGGAAGAAA	136
		Antisenso GCGATCACCTGACGGATATT	
	URE-B1	Senso CCATCTTCACTGAGCAGGAGTTA	125
		Antisenso GAACCACTGGATCTGAATAGAGTTG	
	ZNF79	Senso TCCAGGAGCCTTGCCTACT	150
		Antisenso CTCTGGTGGTGATCCAGATATAA	
	C6orf136	Senso CTTGCTCTTTTTGCGGTTCT	112
		Antisenso TAGACGATGGCGACAAATGA	
	HADHA	Senso GAGACATCGGAGCCGTCTTT	107
		Antisenso TTTCTTGAGCCGGTCCACTA	
	mt_ND1	Senso TCCGCTACGACCAACTCATA	108
		Antisenso GGGGAATGCTGGAGATTGTA	
	mt_COX2	Senso GGCCTGACTGGCATTGTATT	135
		Antisenso TCAGTGAATGAAGCCTCCTATG	
	mt_CYTb	Senso AGACGCCCTCGGCTTACTT	123
		Antisenso ATGTGGGGAGGGGTGTTTA	
	mt_ATP6	Senso GCCACCTACTCATGCACCTAAT	126
		Antisenso TTAAGGCGACAGCGATTCTA	

pb: tamanho do produto em pares de base nucleotídicas.

#### 4.5.3 Análise dos dados de RT-PCR em tempo real

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das triplicatas da reação de RT-PCR em tempo real de cada amostra, utilizou-se o ajuste de função logística, ou curva sigmóide de quatro parâmetros, para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções `qpcR` (Ritz & Spiess, 2008) para a linguagem R (R Development Core Team, 2009) versão 2.9.22. O ciclo de quantificação, ou  $C_p$  (*crossing point* ou ponto característico), foi determinado pelo ciclo correspondente ao ponto de máxima da segunda derivada dessa curva. A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene foi obtida pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene.

Diversas variáveis precisam ser controladas na análise de expressão gênica, como a quantidade de material inicial e diferenças na eficiência enzimática. A normalização por controles internos continua sendo a ferramenta mais utilizada para controlar essas variáveis. Os controles internos – muitas vezes chamados de *housekeeping genes* – não devem apresentar variação de expressão entre as condições experimentais. Entretanto, muitos estudos utilizam controles internos sem validação da estabilidade da sua expressão. A literatura também mostra que a expressão de genes constitutivos pode variar consideravelmente (Warrington *et al.*, 2000; Thellin *et al.*, 1999). Com a maior sensibilidade e reprodutibilidade de métodos de RT-PCR em tempo real, o uso de controles internos adequados torna-se cada vez mais necessário. Genes empregados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas foram selecionados pelos métodos `geNorm` (Vandesompele *et al.*, 2002) e `NormFinder` (Andersen *et al.*, 2004). O algoritmo do `geNorm` parte do pressuposto de que os genes com expressão mais estável em relação aos outros genes analisados são os mais adequados para normalização interna. O índice de estabilidade do `geNorm` é obtido através da variação par-a-par média do gene com relação a todos os outros, e a estabilidade dos genes analisados é ordenada através da exclusão sequencial do gene menos estável, até que o par mais estável seja

identificado, quando nenhum dos dois genes restantes pode ser excluído (Vandesompele *et al.*, 2002). Já o algoritmo NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) parte do pressuposto de que a expressão média entre todos genes testados possua uma pequena variação entre grupos (próxima de zero). Deste modo, a variação entre os grupos experimentais de cada gene de referência é estimada, e o índice de estabilidade estimado leva em consideração não somente a variação entre os grupos analisados (diferentes tratamentos, por exemplo), mas também qualquer variação sistemática dentro de cada grupo (entre réplicas biológicas, por exemplo). Como resultado, os genes de referência com menor variação intergrupos e intragrupo apresentam os menores valores de estabilidade e são classificados como os mais estáveis entre os genes testados.

Para a comparação de médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos não infectado e infectado para genes de interesse (Tabela 4.2) em células de Schwann primárias foi utilizado *one-way* ANOVA não paramétrica via permutação irrestrita (n=1000), seguido da comparação de médias par-a-par por teste t não paramétrico via permutação (n=1000) com correção de Bonferoni (Basso *et al.*, 2009).

Para a comparação de médias dos valores de expressão normalizados do gene OASL entre os grupos homocigotos GG e portadores do alelo A para o SNP rs3213545 no nervo de indivíduos diagnosticados com neuropatia não hanseniana ou hanseníase foram empregados testes t de Welch.

As comparações de médias foram realizadas no ambiente R (R Development Core Team, 2009) e representadas em gráficos contendo os níveis de expressão normalizados de cada grupo pela média  $\pm$  erro padrão da média. Níveis de significância bi-caudais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como “altamente significantes”, “significantes” e “sugestivos”, respectivamente.

#### 4.6 Diagnóstico molecular do *M. leprae* em amostras humanas por PCR em tempo real

A coleta de rotina de biópsias de nervo é realizada no Ambulatório Souza Araújo (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, RJ), quando o paciente apresenta um caso de difícil diagnóstico, como é o caso da forma neural pura (PNL), cuja patologia é restrita ao nervo e o paciente não apresenta lesões de pele (Jardim *et al.*, 2003). A partir dessas biópsias, o DNA é extraído para detecção de genes do bacilo por PCR em tempo real, como forma de auxiliar de diagnóstico. O PCR para o diagnóstico molecular consiste na amplificação de genes de *M. leprae*. Os genes alvo para os quais existem sistemas de detecção desenhados e testados no laboratório incluem, dentre outros, o 16S RNAr (Rudeeaneskin *et al.*, 2008; Martinez *et al.*, 2009), o elemento repetitivo RLEP (Truman *et al.*, 2008) e o Ag 85B (Martinez *et al.*, 2006). Para o presente estudo, o 16S RNAr foi utilizado como alvo principal, enquanto que os outros genes eram utilizados apenas em casos que apresentavam resultados inconclusivos para a presença do 16S RNAr. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados pelo *software* Primer Express 2.0 (Applied Biosystems).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com 200 ng de DNA das biópsias em volume final de 20  $\mu$ L contendo TaqMan PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 0,1  $\mu$ M da sonda e 0,5  $\mu$ M de cada oligonucleotídeo. As reações foram incubadas a 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto no sistema de PCR em tempo real Step One Plus (Applied Biosystems). Os dados de acúmulo de fluorescência foram analisados usando o *software* ABI Prism (Applied Biosystems). Os valores de  $\Delta R_n$  foram extraídos e utilizados para determinar o Ct (ciclo referente ao limiar de fluorescência para quantificação) de quantificação usando o ambiente R (R Development Core Team, 2009). A quantificação baseou-se em curvas padrão de *M. leprae* versus Ct pré-estabelecidas em nosso laboratório, assim como valores ótimos de número de genomas preditos para diagnóstico de Hanseníase estabelecidos em Martinez e colaboradores (2011, artigo no prelo).

#### 4.7 Imunocitoquímica

As linhagens de células de Schwann ST88-14 e de THP1 foram utilizadas para os ensaios de imunofluorescência, sendo para tanto cultivadas em placas de 24 poços, aderidas em lamínulas de vidro. Ao final dos experimentos de infecção, os meios de cultura foram removidos, as células foram lavadas 2X com PBS 10 mM pH 7,4, fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 4% em PBS (Sigma-Aldrich) à temperatura ambiente e, ao final, lavadas 2X com PBS 10 mM. As células fixadas foram incubadas com 5% de soro SFB em PBS e 0,01% (v/v) Triton X-100 (solução de bloqueio/permeabilização) por 20 minutos em câmara úmida. O anticorpo primário contra OASL humano (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) foi diluído a 5 µg/ml em solução de bloqueio/permeabilização e incubado em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3X com PBS 10 mM, pH 7,4, por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário (Alexa 633, Life Technologies/Invitrogen) diluído em solução de bloqueio/permeabilização na concentração recomendada pelo fabricante por 2 horas. Ao final, os núcleos foram corados com DAPI (4',6'-diamidino-2-fenillindole, Sigma-Aldrich) e as lamínulas foram lavadas 3X com PBS por 5 minutos, e montadas em lâmina contendo 3µl de solução SlowFade<sup>®</sup> (Life Technologies / Molecular Probes) e seladas com Entelan (Merck Chemycals International). Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se microscópio invertido de fluorescência Zeiss AxioObserver com sistema de iluminação Colibri com objetiva Plan-neofluar 65X com 1.4 de abertura numérica (Zeiss). O sinal vermelho do anticorpo secundário marcado com Alexa 633 foi fotografado utilizando-se o led 625nm e o filtro Zeiss 50. O sinal azul do DAPI foi registrado utilizando-se led 365nm e filtro Zeiss 60. As imagens foram registradas em câmera monocromática HMR (Zeiss) e as quantificações da fluorescência realizada por *software* Axiovision (Zeiss).

#### 4.8 Genotipagem de polimorfismos de base única por PCR em tempo real

Os SNPs rs2258227, rs4403877 e rs3213545 no gene do OASL foram genotipados através da técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real. Nesta técnica, são utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada alelo, e a inferência dos genótipos é baseada na intensidade de fluorescência. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando o ensaio TaqMan (Applied Biosystems). Resumidamente, as amplificações foram realizadas num volume final de 10  $\mu$ L contendo TaqMan Universal Master Mix em concentração final de 1X. Os ensaios foram desenhados utilizando o serviço Assay-by-Design<sup>SM</sup> oferecido pela Applied Biosystems.

As frequências genóticas dos polimorfismos do OASL em casos e controles foram testadas com o auxílio do teste  $X^2$  (qui-quadrado), para avaliar os desvios do Equilíbrio de Hardy e Weinberg (EHW). As análises das frequências alélicas e genóticas foram realizadas em casos e controles e comparadas entre esses grupos utilizando o modelo de regressão logística, com ou sem o ajuste para as co-variáveis sexo e etnia. Esta metodologia foi utilizada tanto para as análises de cada polimorfismo em isolado quanto para os haplótipos. As análises foram realizadas em referência à contagem alélica dos carreadores do alelo (incluindo heterozigotos e homozigotos) e contagem genotípica. As frequências haplotípicas foram estimadas através de máxima verossimilhança através do algoritmo de Maximização da Esperança (EM) e também foram comparadas entre casos e controles. Além disso, foi realizada a análise de desequilíbrio de ligação entre os marcadores utilizando os parâmetros estatísticos  $D'$  e  $r^2$ . A estimativa do risco foi realizada utilizando a OR, com 95% de intervalo de confiança (CI) para cada estudo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio da linguagem R (R Development Core Team, 2009) utilizando os pacotes de funções *genetics* e *haplo.stats*.

## **5. RESULTADOS**

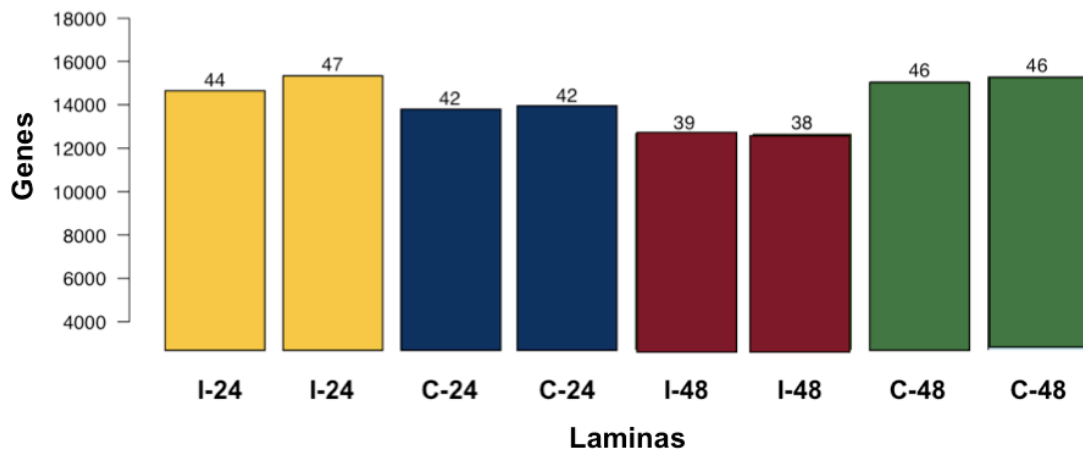


## 5.1 Microarranjos de DNA

### 5.1.1 Desenho experimental I

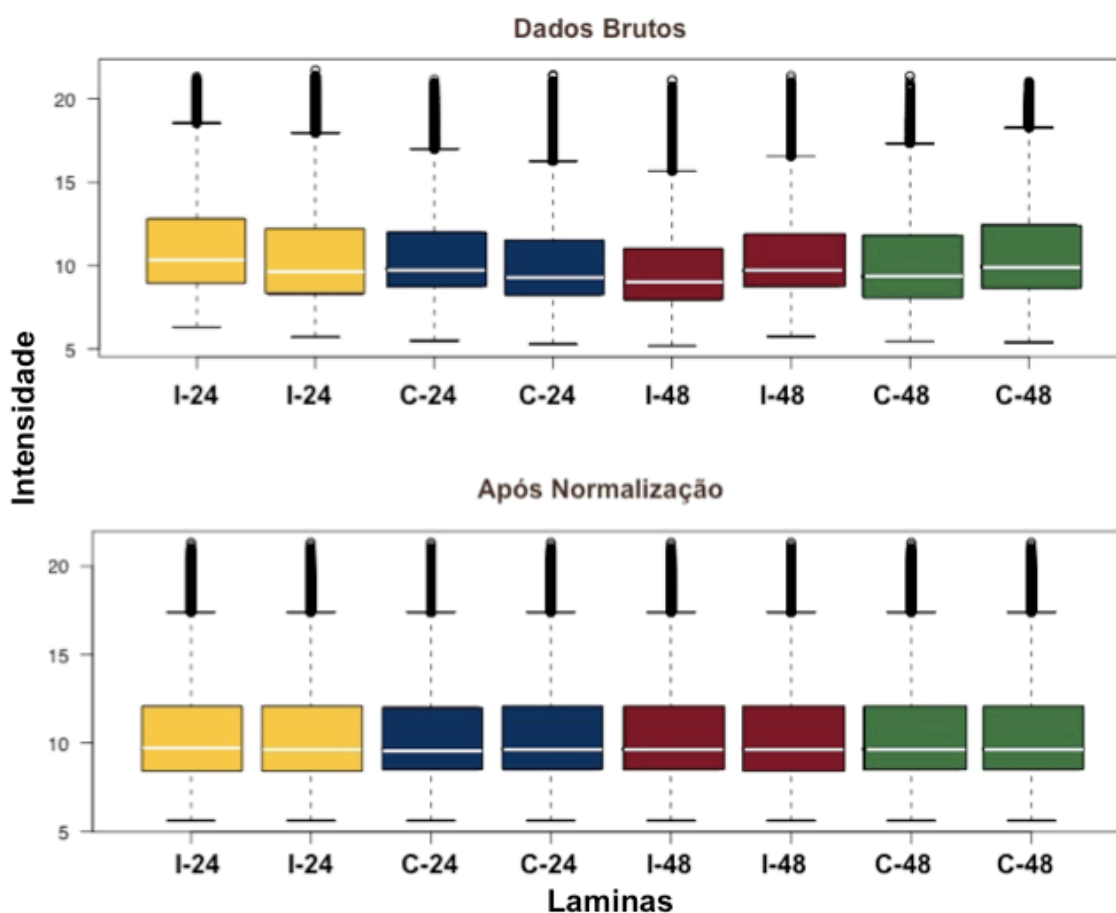
#### 5.1.1.1 Análise de Dados Preliminares (Applied Biosystems)

A partir da análise dos dados de microarranjo realizada pela empresa *Applied Biosystems* (ABI) e em consequência da filtragem dos genes pelos valores de razão sinal/ruído (SNR) > 3, o número de genes que foram utilizados na inferência estatística foi de aproximadamente 14.000 (Figura 5.1).



**Figura 5.1: Número e porcentagem de genes que restaram após o filtro pelo SNR > 3 para cada lâmina.** Números acima das barras correspondem a porcentagem de genes restantes. Cada lâmina foi hibridada com uma amostra proveniente de células de Schwann primárias infectadas (I) ou não (C) por *M. leprae* vivo por 24 ou 48 horas.

Após a normalização pelo método A-quantil (Irizarry *et al.*, 2003), todas as lâminas passaram a apresentar a mesma distribuição de valores de intensidade log-transformados, permitindo assim a comparação entre elas. Observa-se na figura 5.2 o efeito da normalização sobre as intensidades de sinal das lâminas usadas no estudo.



**Figuras 5.2: Box-plots da intensidade de sinal log-transformado de cada lâmina feita no estudo antes e após a normalização pelo método A-quantile.** Cada lâmina foi hibridada com uma amostra proveniente de células de Schwann primárias infectadas (I) ou não (C) por *M. leprae* vivo por 24 ou 48 horas.

Os dados filtrados e normalizados foram utilizados na inferência estatística. Utilizando como critério de seleção o  $|\log \text{fold change}| \geq 4$  e  $p\text{-valor} \leq 0,001$  um número restrito de genes foi encontrado como diferencialmente expressos. Dos 24 genes encontrados como sendo diferencialmente expressos por esses critérios, 20 continham informações sobre função biológica ou ontologia no Panther. A lista dos genes selecionados como sendo diferencialmente expressos em cada comparação é apresentada na tabela 5.1.

**Tabela 5.1: Genes diferencialmente expressos em 24 ou 48 horas de infecção por M. leprae em células de Schwann primárias humanas.**

Experimento	Gene	Função Molecular (Panther)	fold change (FC)	log2(FC)	p valor	FDR (BH)
<b>Super expresso (24 horas)</b>	Zinc finger protein 79 (ZNF79)	KRAB box transcription factor	22.40	4.49	0.00010	0.15
	Hystone-lysine N-methyltransferase (SETD1B)	DNA binding, Methyltransferase	4.49	2.17	0.00018	0.15
	Secretogranin II (SCG2)	Neuropeptide	8.31	3.05	0.00021	0.15
	Hemoglobin theta 1 (HBQ1)	Transfer/carrier protein	5.55	2.47	0.00029	0.15
	Glutamate decarboxylase 2 (GAD2)	Decarboxylase	4.53	2.18	0.00034	0.15
<b>Reprimido (24 horas)</b>	Fatty acid chain elongation (ELOVL3)	Acyltransferase	0.23	-2.13	0.00086	0.15
	Polypyrimidine binding ptn 1,2	Ribonucleoptn, mRNA splicing factor	0.11	-3.21	0.00003	0.15
	DNA primase large subunit	Primase Nucleotidyltransferase	0.18	-2.45	0.00042	0.15
	Microsemino ptn (MSMB)	Peptide hormone	0.08	-3.67	0.00063	0.15
	60S ribosomal ptn L36E	Ribosomal ptn	4.77	2.25	0.00007	0.14
<b>Super expresso (48 horas)</b>	2'5'oligoadenylate synthetase-like (OASL)	Immunity related ptn	24.06	4.59	0.00005	0.14
	Cytochrome C oxidase 7A1 (COX7A1)	Oxidative phsophorylation	4.96	2.31	0.00036	0.14
	E3 Ubiquitin ptn ligase (URE-B1)	Ubiquitin ptn ligase	4.94	2.30	0.00018	0.14
	Adhesion mol w/ Ig-like domain (AMIGO2)	Extracellular matrix receptor	0.28	-1.81	0.00005	0.14
	Nucleoside diphosphate linked moiety (NUDT15)	Hydrolase	0.49	-1.02	0.00008	0.14
<b>Reprimido (48 horas)</b>	SLIT-ROBO GTPase activating ptn (SRGAP1)	G-ptn modulator	0.40	-1.31	0.00005	0.14
	Citron serine/threonine kinase 21 (CIT)	Serine/threonine ptn kinase	0.37	-1.43	0.00027	0.14
	Phenylalanine-tRNA synthetase-like (FARSLB)	Aminoacyl-tRNA synthetase	0.49	-1.03	0.00038	0.14

Critério de seleção utilizado foi log fold change > 4 e p valor < 0,001

5.1.1.2 Re-análise dos Dados

Não satisfeitos com os métodos de análise utilizados pela ABI, optamos por reanalisar os dados, dessa vez fazendo um ajuste de modelo linear que possibilitou inferir sobre os fatores principais (infecção e tempo) e a interação entre eles. Utilizando como critérios de seleção  $|\log \text{fold change}| > 1$ , p-valor ajustado  $\leq 0,05$ , e *Odds Probability*  $\geq 0,95$ , o número de genes diferencialmente expressos encontrados para cada comparação foi de 719, para o fator tempo; 710, para o fator infecção; e, 563, para a interação entre os fatores principais tempo e infecção. Essas listas de genes diferencialmente expressos foram também submetidas ao Panther e comparadas ao banco de dados de genes humanos do NCBI para identificar processos biológicos enriquecidos. Dessa análise, apenas a lista de genes resultante da interação entre tempo e estímulo mostrou um processo biológico significativamente enriquecido (p-valor  $\leq 0,005$ ), ou seja, encontrado na lista de genes diferencialmente expressos numa frequência maior que a esperada, relativo à imunidade mediada por interferon do tipo I. Este processo biológico incluiu 8 proteínas induzidas por interferon, com genes codificantes entre os diferencialmente expressos selecionados (Tabela 5.2). Interessantemente, o gene *2'-5' oligoadenylate synthetase like (OASL)* participa dessa classe de genes e também havia sido selecionado como induzido em células de Schwann após 48 horas de infecção pelo *M. leprae* pelos critérios de seleção estridentes aplicados sobre os dados gerados pela Applied Biosystems. Além do OASL, a lista incluiu 4 proteínas induzidas por interferon do tipo I (IFIT1, logFC = 4,78; IFIT2, logFC = 3,64; IFIT3, logFC = 4,79; IFIT5, logFC = 2,48) contendo em suas estruturas uma repetição tetratricopeptideo (TPR).

**Tabela 5.2: Integrantes da classe de proteínas induzidas por interferon do tipo I**

<b>Celera Gene ID</b>	<b>Gene</b>	<b>Processo Biológico</b>
hCG16969	interferon-induced protein 35 (IFI35)	JAK-STAT cascade, T-cell mediated immunity, Interferon-mediated immunity
hCG27362	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like (OASL)	Nucleic acid metabolism, Interferon-mediated immunity, Other metabolism
hCG17046	interferon regulatory factor 8 (IRF8)	mRNA transcription regulation, Interferon-mediated immunity, Oncogenesis
hCG18132	interferon regulatory factor 7 (IRF7)	mRNA transcription regulation, Interferon-mediated immunity, Oncogenesis
hCG1643352	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2 (IFIT2)	Interferon-mediated immunity
hCG24570	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT3)	Interferon-mediated immunity
hCG24571	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1)	Interferon-mediated immunity
hCG24572	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5 (IFIT5)	Interferon-mediated immunity

Essa classe se mostrou enriquecida na lista de genes resultante da interação entre tempo e estímulo

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 5.1.2 Desenho experimental II

#### 5.1.2.1 Controle de qualidade experimental

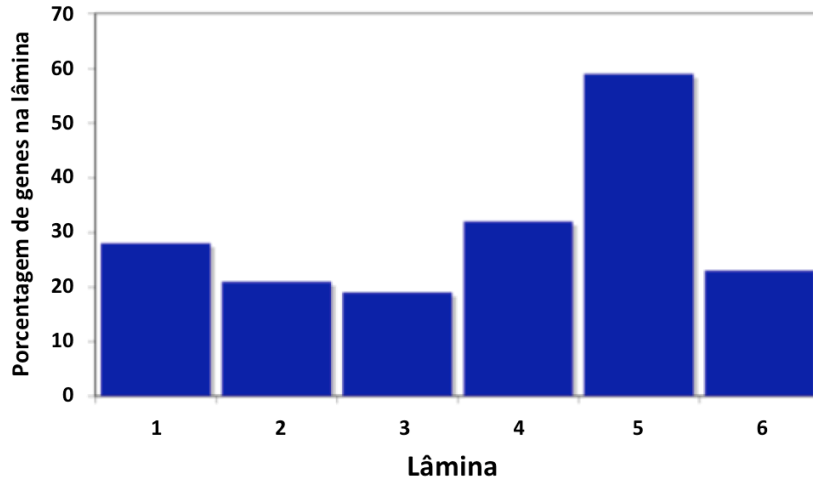
No segundo estudo por microarranjos, todas as etapas experimentais e de análise foram realizadas no laboratório. Como controle de qualidade das reações de marcação fluorescente do cDNA, calculou-se o grau de incorporação dos fluoróforos para cada amostra (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3: Grau de incorporação dos fluoróforos (DoL %) para cada amostra utilizada nos experimentos de microarranjo.**

Lâmina	Amostra	DoL %
1	Alexa 555	1.3
	Alexa 647	1.7
2	Alexa 555	1.0
	Alexa 647	1.3
3	Alexa 555	1.2
	Alexa 647	1.4
4	Alexa 555	1.4
	Alexa 647	1.6
5	Alexa 555	1.6
	Alexa 647	1.9
6	Alexa 555	1.2
	Alexa 647	1.4

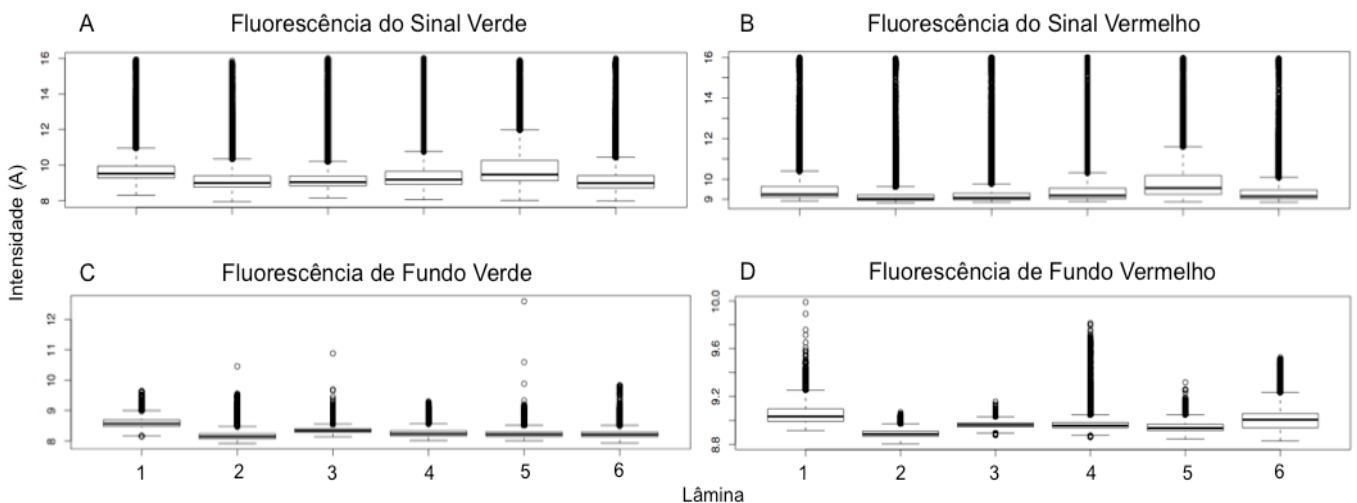
Após realizadas as hibridações, os pontos foram filtrados com base no  $SNR > 3$ , *flag* do software Genepix  $\leq -49$  e *Hthreshold*  $< 0,2$ . Por esse filtro 18% a 59% dos pontos em cada lâmina foram considerados confiáveis e foram utilizados para os ajustes de parâmetros dos modelos estatísticos (figura 5.3). Optou-se por utilizar como filtro o valor de  $SNR > 3$  uma vez que não houve grandes diferenças quando comparado ao uso do  $SNR > 2$ , menos estrigente.

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA



**Figura 5.3: Porcentagem de genes restantes após o filtro para cada lamina do experimento.**

Valores baixos de SNR geralmente decorrem de baixa intensidade de sinal (*foreground*) e/ou de altos valores de fluorescência de fundo, chamado de *background*. Na figura 5.4 (a-d), encontram-se *box-plots* dos valores de intensidade de *foreground* (a e b) e de *background* (c e d) para cada fluoróforo utilizado (verde: a e c; vermelho: b e d) após aplicado o filtro. Podemos observar que a lâmina 5 apresentou um pequeno aumento de sinal para os dois fluoróforos em relação às demais lâminas, o que se reflete no fato de ter restado um maior número de pontos para esta lâmina após o filtro por SNR que para as demais. Apesar da lâmina 1 também ter apresentado aumento na intensidade de sinal, a fluorescência de fundo elevada nessa



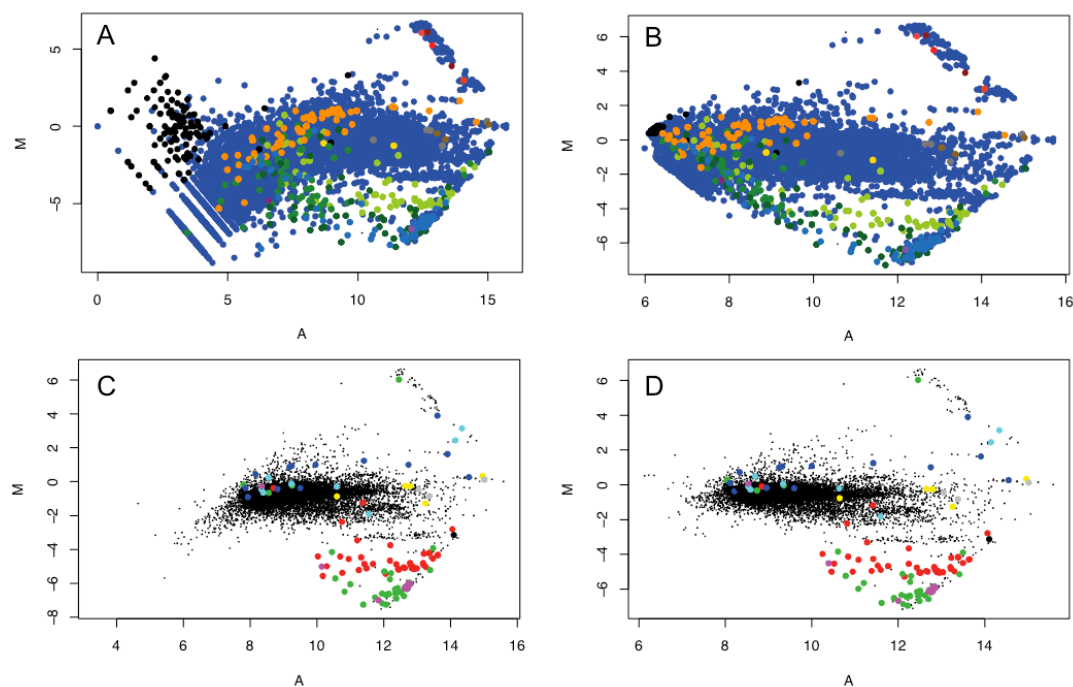
**Figura 5.4: Box-plots da intensidade de fluorescência das lâminas utilizadas no desenho experimental II. Intensidade do sinal (foreground A & B) e de fundo (background C & D) para cada fluoróforo utilizado (verde, A & C; vermelho, B & D).**

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

lâmina acarretou na exclusão de maior número de genes pelo filtro.

Em seguida, foram feitos gráficos MA para visualizar o perfil das intensidades dos pontos de cada lâmina (figura 5.5). Os gráficos apresentados são da lâmina 4 e são representativos dos demais. Os 4 gráficos apresentados correspondem a A) dados brutos, B) dados com correção de *background*, C) dados filtrados e D) dados filtrados e com correção de *background* (figura 5.5).

É possível observar que os dados refletem o padrão esperado onde a maioria dos genes não apresenta diferenças entre os canais com valores de M próximo a zero. Os dados brutos apresentam o fenômeno de *fanning*, onde pontos de baixa intensidade têm maior variabilidade. Esse fenômeno tem sido amplamente descrito (Beibarth *et al.*, 2000; Bilban *et al.*, 2002; Finkelstein *et al.*, 2002; Kooperberg *et al.*, 2002) e diferentes estratégias têm sido utilizadas para contorná-lo. Aqui, mostramos que a filtragem de pontos de baixa intensidade e a correção do *background* elimina esse efeito nos dados. Observa-se também que os pontos negativos (pontos pretos nas figuras 5.5a e 5.5b) apresentam intensidades baixas e que os controles *spike-in* apresentam razões próximas às esperadas.



**Figura 5.5: Gráfico MA da lâmina de número 4 após diferentes tratamentos nos dados.** A) dados brutos, B) dados com correção pela fluorescência de fundo, C) dados filtrados e D) dados filtrados com correção pela fluorescência de fundo. Pontos pretos (A e B) = controles negativos; Pontos coloridos = controles *spike-in*.



## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 5.1.2.2 Genes diferencialmente expressos

Após as hibridações e estabelecimento de critérios de qualidade foram realizadas as inferências estatísticas, como descrito anteriormente, para indagar o efeito de 24 horas de infecção das células de Schwann primárias por *M. leprae*. Nenhum gene foi encontrado como diferencialmente expresso quando usamos como critério de seleção o p-valor ajustado para comparações múltiplas. Entretanto, ao selecionar genes com p-valor  $\leq 0,005$ , 67 genes foram encontrados como sendo diferencialmente expressos, embora com valores de *log fold change* muito baixos (mínimo 0,5 e máximo de 1,5) (Tabela 5.4).

Como observado no desenho experimental I, constavam na lista de genes diferencialmente expressos três proteínas induzidas por interferon do tipo I (IFITM4, LogFC = -1,03; IFITM3 LogFC = -0,83; IFITM2, LogFC = -0,78) reforçando o papel dessa classe nos tempos iniciais da interação entre a célula de Schwann e o *M. leprae*.

Identificamos a via celular da fosforilação oxidativa enriquecida, sendo que 11 dos 67 genes (17%) participavam dessa via metabólica ainda não identificada na infecção por *M. leprae*. Como participavam desta lista genes que codificam proteínas de 4 dos 5 complexos proteicos envolvidos na cascata de fosforilação oxidativa, selecionamos um gene de cada complexo para validação por RT-PCR em tempo real. É importante ressaltar que esses genes estão presentes no DNA mitocondrial e não genômico. Esses genes foram *mt\_ND1* (logFC= -1,3), *mt\_COX2* (logFC= -0,65), *mt\_CYTb* (logFC= -0,63) e *mt\_ATP6* (logFC= -0,62).

De qualquer forma, poucos genes foram identificados diferencialmente expressos pelos arranjos e estes apresentavam diferença da razão de expressão (*log-fold change*) baixa. Na tentativa de esclarecer se um dos motivos do baixo número de genes encontrados pela análise supracitada havia sido a variabilidade experimental introduzida pelos corantes ao realizar o *dye swap* no desenho experimental optamos por realizar a mesma análise com apenas 3 lâminas por vez. Para realizar essa análise separamos as lâminas em dois grupos correspondentes as hibridações referentes a cada uma das setas do desenho do estudo como dispostas na figura 4.1. Dessa

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

forma, o primeiro grupo incluiu apenas as lâminas referentes à seta superior do desenho experimental observado na figura 4.1, enquanto o segundo grupo incluiu apenas as lâminas referentes à seta inferior da mesma figura. Por essa estratégia, foi possível obter uma lista pequena de genes usando critérios mais rigorosos (e  $|\log FC| \geq 1,5$  e p-valor ajustado  $\leq 0,05$ ). Foram encontrados 11 genes pela análise com o primeiro grupo de lâminas e 7 genes com o segundo grupo de lâminas. Os logFC desses genes variava entre 1,7 e 3,4. Três genes foram encontrados como diferencialmente expressos pelas análises com os dois grupos de lâminas. Desses, apenas dois continham informações de anotação no Panther: *C6orf136* (FC=3,07) e *HADHA* (FC=3,01). A *C6orf136* está localizada no braço curto do cromossomo 6 na mesma região do TNF, LTA e de genes HLA, que haviam sido associados e ou ligados à hanseníase por estudos genéticos realizados previamente (Alcais *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2002; Vanderborght *et al.*, 2004). Já o gene *HADHA* codifica uma proteína com três funções biológicas: hidroxiacil-coenzima A desidrogenase, 3-cetoacil-coenzima A thiolase, enoyl-coenzima A hidratase.

ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

**Tabela 5.4: Genes diferencialmente expressos (p-valor ≤ 0,005) entre células de Schwann controle e após 24 horas de infecção por *M. leprae*.**

Símbolo do Gene	Descrição	log fold change
LOC391269	similar to ankyrin repeat domain 20 family, member A2	-1.466
MTND1	NADH dehydrogenase subunit 1	-1.320
CFL1	cofilin 1 (non-muscle)	-1.225
MTND2	NADH dehydrogenase subunit 2	-1.120
IFITM4P	6p22.1, interferon induced pseudogene	-1.034
LOC283412	similar to 60S ribosomal protein L29	-0.984
GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	-0.898
C6orf48	chromosome 6 open reading frame 48	-0.880
MT1JP	metallothionein 1J (pseudogene)	-0.862
PRKCSH	protein kinase C substrate 80K-H	-0.844
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	0.842
MTND5	NADH dehydrogenase subunit 5	-0.830
PLP2	proteolipid protein 2 (colonic epithelium-enriched)	-0.830
CST3	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)	-0.825
LOC144383	Interferon-induced transmembrane protein 3	-0.825
MTND4	NADH dehydrogenase subunit 4	-0.823
RPS25	ribosomal protein S25	-0.807
RPL21	ribosomal protein L21	-0.805
IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	-0.789
RPS24P15	similar to ribosomal protein S24	-0.775
UQCRQ	ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa	-0.772
mtRNA_RNR1	mitochondrially encoded 12S ribosomal RNA	-0.764
MTND4L	NADH dehydrogenase subunit 4L	-0.761
LOC389308	similar to ribosomal protein L10a	-0.742
NRM	nurim (nuclear envelope membrane protein)	-0.726
LOC389127	similar to 40S ribosomal protein S10	-0.713
DBI	diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator)	-0.707
RPL12P6	ribosomal protein L12 pseudogene 6	-0.707
LOC146053	similar to ribosomal protein S3a	-0.701
COMMD7	COMM domain containing 7	0.698
PKM2	pyruvate kinase, muscle	-0.697
RPS26P6	ribosomal protein S26 pseudogene 6	-0.691
LOC285900	similar to 60S ribosomal protein L6	-0.689
LOC441377	similar to 40S ribosomal protein S26	-0.689
PRDX2	peroxiredoxin 2	-0.686
mtRNA_ND3	mitochondrially encoded NADH dehydrogenase subunit 3	-0.685
GLTP1	glutathione S-transferase pi	-0.665
mtRNA_COX-2	cytochrome c oxidase subunit II	-0.648
HIST1H4C	6p21.3 histone 1, H4c	-0.647
LOC402287	ribosomal protein S3a pseudogene	-0.644
PPIAL3	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 3	-0.641
CHMP4A	chromatin modifying protein 4A	-0.630
SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E	0.630
NDUFB10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa	-0.628
SLC25A28	solute carrier family 25, member 28	0.627
mtRNA_CYTB	mitochondrially encoded cytochrome b	-0.627
OXA1L	oxidase (cytochrome c) assembly 1-like	0.619
LOC388460	hypothetical LOC388460	-0.618
SLC16A3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member	0.614
TP11	triosephosphate isomerase 1	-0.598
LOC441777	similar to Serine/threonine-protein kinase (PLK-1) (STPK13)	0.587
LOC440733	similar to 40S ribosomal protein S15 (RIG protein)	-0.580
HSPC148	hypothetical protein HSPC148	-0.578
C10orf70	chromosome 10 open reading frame 70	-0.574
CACNG7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7	0.573
KRTHA1	keratin, hair, acidic, 1	-0.570
LOC402175	hypothetical gene	-0.570
RPS26e	ribosomal protein S26-like	-0.564
RPS26P10	ribosomal protein S26 pseudogene 10	-0.562
RPS13	ribosomal protein S13	-0.556
RPS3A	ribosomal protein S3A	-0.552
SPOCD1	SPOC domain containing 1	0.549
PTD008	PTD008 protein	-0.549
PIN4	NIMA-interacting protein, 4 (parvulin)	-0.537
ECHS1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	-0.529
SMAP	small acidic protein	0.515
NR0B2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	0.509

Em vermelho, genes induzidos por interferon do tipo I. Em verde, genes que participam da via da fosforilação oxidativa. Anotação extraída do DAVID.

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 5.2. Validação por RT-PCR em tempo real

#### 5.2.1 Seleção de normalizadores para as reações de PCR

Cinco genes (*HPRT1*, *RPL13*, *18S*, *B2M* e *GAPDH*) amplamente utilizados como normalizadores na literatura foram selecionados com base na sua estabilidade nas amostras provenientes de células de Schwann primárias estimuladas ou não com *M. leprae*. As tabelas 5.5 (A e B) apresentam a estabilidade média de cada normalizador calculada por cada um dos métodos, respectivamente. O gene que apresentou a menor variabilidade através dos dois métodos foi o *RPL13*, e portanto foi escolhido como gene normalizador nos ensaios. A mesma metodologia de seleção de genes normalizadores foi aplicada aos dados de biópsias de nervo e o mesmo normalizador foi escolhido como o menos variável (dados não mostrados).

**Tabela 5.5. Genes candidatos a normalizador ordenados pela sua estabilidade de expressão (M) medida pelos métodos geNorm (A) e Norm Finder (B) em células de Schwann primárias controle e infectadas por *M. leprae* vivo**

A: geNorm			B: Norm Finder						
Ranking	Gene	Valor de Estabilidade (M)	Total		<u>Controle</u>		<u>Infectado</u>		
			Gene	(M)	Gene	(M)	Gene	(M)	
1	RPL13	0,709							
1	HPRT1	0,709							
2	B2M	2,289							
3	GAPDH	2,819							
4	18S	3,085							
			1	<i>RPL13</i>	1,103	<i>B2M</i>	2,182	<i>18S</i>	2,449
			2	<i>HPRT1</i>	4,248	<i>GAPDH</i>	2,505	<i>RPL13</i>	2,467
			3	<i>GAPDH</i>	5,974	<i>RPL13</i>	2,665	<i>GAPDH</i>	2,572
			4	<i>B2M</i>	6,472	<i>18S</i>	3,244	<i>B2M</i>	3,105
			5	<i>18S</i>	7,765	<i>HPRT1</i>	8,732	<i>HPRT1</i>	9,032

#### 5.2.2 Validação da expressão gênica *in vitro* por RT-PCR em tempo real

Genes identificados como diferencialmente expressos pelos dois estudos por microarranjos foram selecionados para validação com base em critérios empíricos como a observação de um grande *log fold change* e/ou da inclusão desse gene em uma via ou processo biológico enriquecidos. A partir do primeiro desenho experimental, o gene *OASL* foi selecionado por apresentar a maior indução de expressão (FC = 24.06, logFC = 4.59) dentre

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

os 20 genes selecionados. Interessantemente, este gene também estava incluído na lista de genes induzidos por interferon do tipo I, único processo biológico que se mostrou enriquecido após a re-análise dos dados. Como esse gene apresenta uma variação pós-transcricional (de *splicing* alternativo), a expressão das duas variantes de transcritos, denominada de OASL v1 e v2, foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Além das duas isoformas do gene OASL, os genes secretogranina II (SCG2), histona-lisina metiltransferase (SETD1B), E3 ubiquitina ligase (URE-B1) e proteína de dedo de zinco 79 (ZNF79) foram também selecionados para validação.

Já a partir do segundo desenho experimental, foram escolhidos 4 genes mitocondriais, cada um do qual codifica uma subunidade de um dos complexos protéicos que participam da fosforilação oxidativa. Os genes selecionados foram *mt\_ND1*, *mt\_CYTB*, *mt\_COX2* e *mt\_ATP6*. Além destes, foram selecionados também os dois genes encontrados pela análise realizada excluindo as replicatas técnicas por *dye swap*, o C6orf123 e o HADHA.

Dentre todos os genes testados, as duas isoformas do OASL foram os únicos a apresentarem alteração significativa de expressão em células de Schwann primárias humanas infectadas quando comparadas às não infectadas (Figura 5.6). Entretanto, não parece haver diferença entre as isoformas, já que ambas foram induzidas de forma semelhante.

Como dito anteriormente, os genes da via da fosforilação oxidativa foram selecionados como diferencialmente expressos no segundo desenho experimental por microarranjos pelo critério de seleção menos estrigente ( $p$ -valor não ajustado  $\leq 0,005$ ), e os valores de logFC eram baixos (entre -1,3 e -0,6). Por mais que, individualmente, os valores de logFC não pareçam ter grande significância biológica, o somatório desse efeito ao longo de toda uma via celular pode se tornar um efeito importante para uma célula frente a uma infecção por um patógeno intracelular. Ao validar a expressão desses genes por RT-PCR em tempo real, verificamos um resultado bastante semelhante àquele do microarranjo, onde a infecção sugere reprimir ligeiramente esses genes nas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* (Figura 5.7). Atualmente, estão em andamento ensaios funcionais diversos para elucidar se essa via celular tem papel no sucesso da infecção de células de Schwann

## ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

pelo *M. leprae*.

Dois genes haviam sido encontrados pelas análises dos microarranjos quando estas foram feitas sem incluir lâminas com replicação técnica por *dye swap*. Esses genes, *C6orf136* e *HADHA*, apresentavam  $\logFC=3,07$  e  $\logFC=3,01$ , respectivamente, e p-valores ajustados  $\leq 0,05$ . Ao avaliar a expressão desses genes nas mesmas amostras por RT-PCR em tempo real, observamos que estes não apresentavam alteração na sua expressão (Figura 5.7).

ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

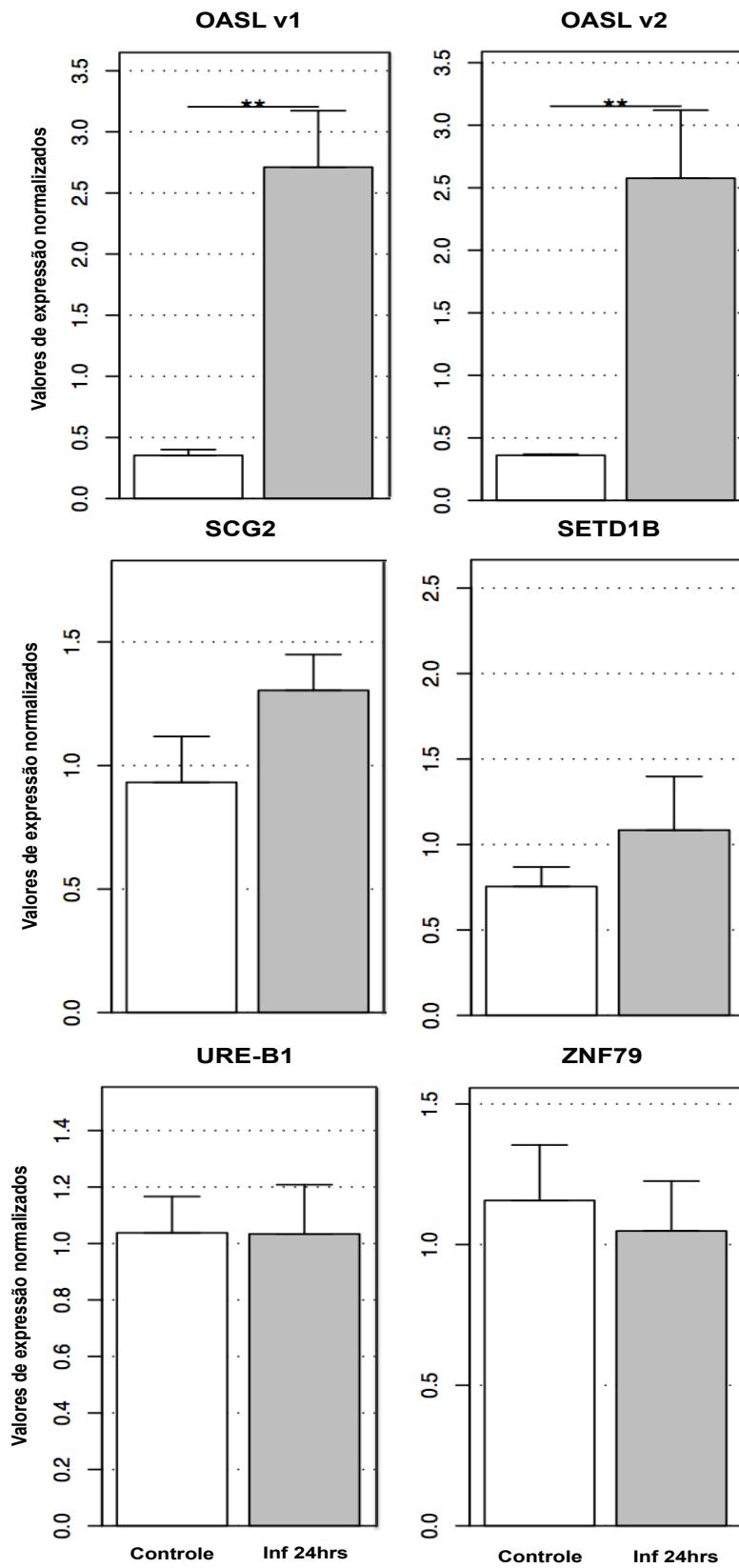


Figura 5.6: Valores de expressão normalizados dos genes escolhidos para validação por RT-PCR em tempo real a partir da lista de genes diferencialmente expressos no desenho experimental I de microarranjos.

ETAPA I: ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA

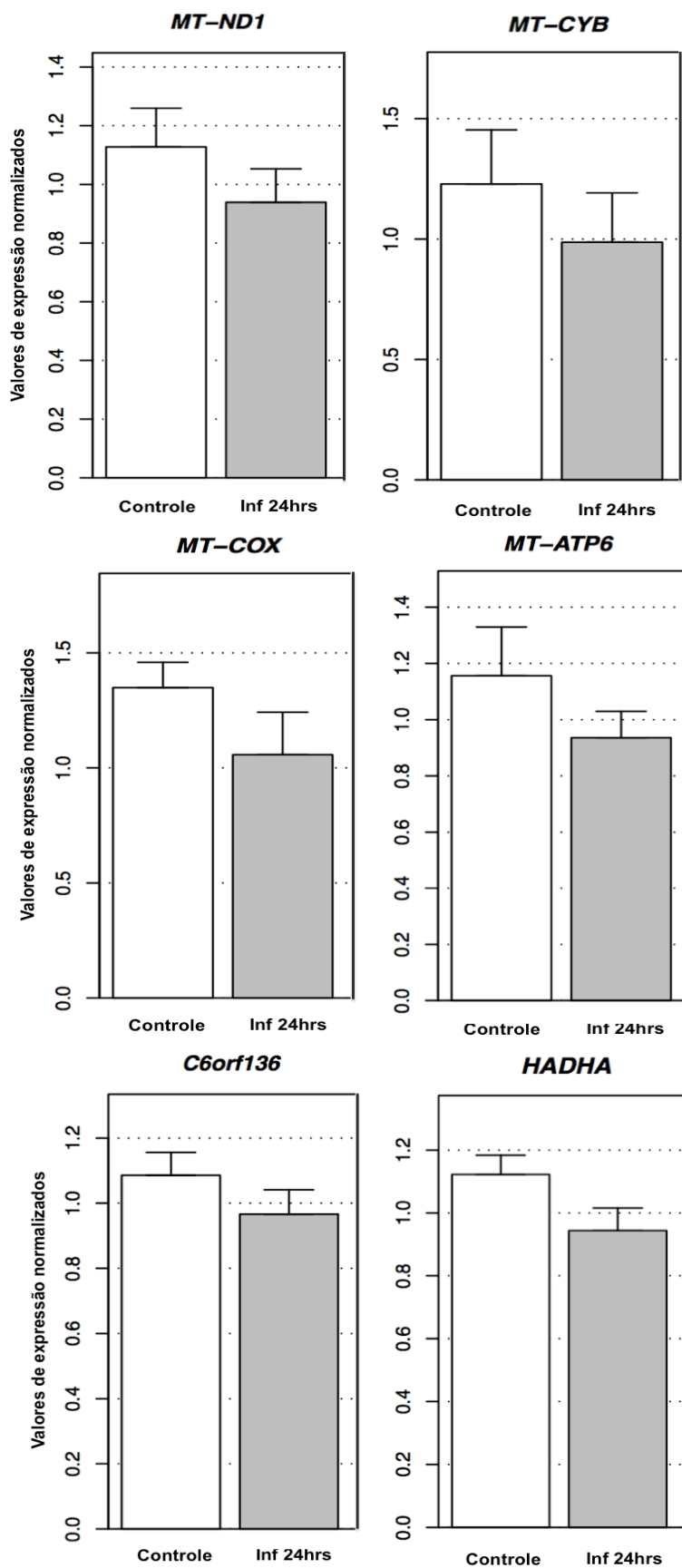


Figura 5.7: Valores de expressão normalizados dos genes escolhidos para validação por RT-PCR em tempo real a partir da lista de genes diferencialmente expressos no desenho experimental II de microarranjos

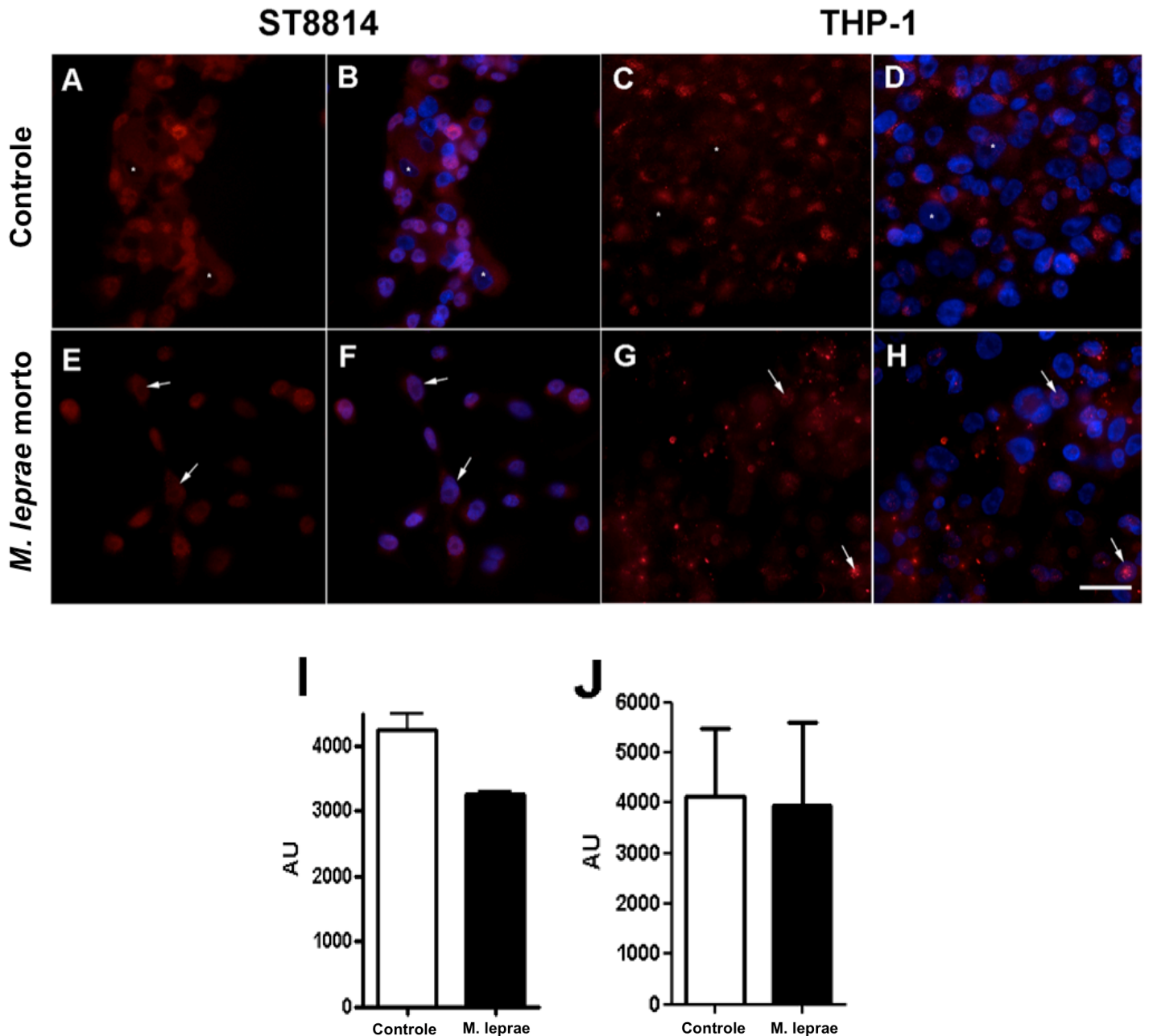


### 5.3 Investigação da OASL na hanseníase

A classe de proteínas induzidas por interferon do tipo I foi encontrada como sendo enriquecida em genes diferencialmente expressos em células de Schwann primárias infectadas pelo *M. leprae* em relação ao controle. Desses, o gene OASL apresentou a maior indução na expressão pelo microarranjo e esse resultado foi confirmado por RT-PCR em tempo real. Consequentemente, optamos por investigar o envolvimento desse gene na interação entre o *M. leprae* e o seu hospedeiro.

#### 5.3.1 Imunocitoquímica

Ensaios de imunofluorescência foram realizados para observar a localização intracelular do OASL frente ao estímulo com *M. leprae* morto em uma linhagem de células de Schwann (ST88-14) e em THP1 diferenciadas *in vitro* em macrófagos (Figura 5.11 A-H). As células de Schwann não estimuladas com *M. leprae* apresentam um sinal fluorescente difuso, correspondente a proteína OASL, localizada principalmente no citoplasma com alguns poucos núcleos marcados (Figura 5.8 A, B, E e F). Após o estímulo por *M. leprae* morto, o sinal passa a estar localizado quase em sua totalidade no núcleo, como se observa pela co-localização com o marcador de núcleo (DAPI) (Figura 5.8 C, D, G e H). Esse dado sugere que a proteína OASL migra do citoplasma para o núcleo frente ao estímulo com *M. leprae* morto. O mesmo fenômeno é observado quando as células THP1 são estimuladas, porém a translocação não ocorreu em todas as células, como foi observado para células de Schwann. A quantificação do sinal fluorescente demonstrou uma diminuição na quantidade de proteína do OASL em células de Schwann frente ao estímulo com *M. leprae* morto (Figura 5.8 I). A mesma diminuição não foi observada para células THP1 (Figura 5.8 J).



**Figura 5.8: *M. leprae* morto modula a translocação do OASL em células de Schwann e macrófagos.** Imagens de epifluorescência de células de Schwann (A, B, E, F) e THP1 diferenciada (C, D, G, H) incubada com *M. leprae* morto (MOI 20:1) por 48 horas. OASL foi marcado com Alexa633 (vermelho). Núcleos foram contracolorados com DAPI (azul) e imagens combinadas (B, F, D, H). Setas indicam grande translocação de OASL para o núcleo após exposição ao *M. leprae* morto (E, F, G, H). Células controle com ausência de sinal de OASL no núcleo estão indicadas por asteriscos. Imagens são representativas de 4 experimentos. Escala: A, B, E e F = 50  $\mu$ m; C, D, G e H = 35  $\mu$ m. Gráficos mostram a quantificação do sinal fluorescente das imagens correspondente a proteína OASL em células de schwann (I) e THP1 (J).

## ETAPA II: INVESTIGAÇÃO DO OASL NA HANSENÍASE

### 5.3.2 Estudo de associação de polimorfismos no OASL e a hanseníase

Foram realizadas genotipagens em três SNPs no gene OASL (rs3213545, rs2258227, rs4403877) para 524 pacientes e 506 controles. As frequências de cada genótipo, alelo e carreadores do alelo de menor frequência, assim como os resultados dos modelos de regressão logística encontram-se na tabela 5.6. Não foram observados desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para nenhum dos SNPs testados.

Conforme observado na tabela 5.6, as comparações entre as frequências do SNP rs3213545 em casos e controles demonstraram uma associação entre os genótipos carreadores do alelo A e um menor risco de desenvolver hanseníase (OR=0,69 e p-valor=0,005 para GA e OR=0,52, p-valor=0,024 para AA). Os genótipos permaneceram associados de forma significativa após correção para as co-variáveis sexo e etnia (GA: OR=0,66, p-valor=0,003; AA: OR=0,45, p-valor=0,007). Resultados semelhantes foram observados nas comparações utilizando frequência alélica (OR=0,67, p-valor=0,009) e frequência dos carreadores do alelo A (OR=0,63, p-valor=0,0005). Em oposição aos resultados para o SNP rs3213545, os resultados do modelo de regressão logística indicaram uma associação entre o genótipo TT do SNP rs2258227 e uma maior susceptibilidade à hanseníase (OR=2,31 e p-valor=0,009 após ajuste para covariáveis). Entretanto, esse efeito não foi observado nas comparações de frequências alélicas e de carreadores do alelo T. Não foi observada qualquer evidência de associação entre o SNP rs4403877 e a hanseníase *per se* em nenhuma das comparações testadas.

As análises de desequilíbrio de ligação não mostraram qualquer evidência de associação entre os marcadores, com valores de  $r^2$  muito inferiores a 1. Por esta razão, todos os SNPs foram incluídos nas análises haplotípicas. As frequências dos haplótipos compostos pelos SNPs rs2258227, rs4403877, rs3213545 bem como as comparações entre as distribuições dos mesmos em casos e controles encontram-se na tabela 5.6. Conforme observado, o haplótipo A/G/A foi associado à proteção contra a hanseníase tanto antes quanto após a correção para as co-variáveis sexo e etnia (não ajustado: OR=0,70, p-valor=0,007; ajustado: OR=0,66, p-valor=0,003), corroborando o efeito protetor do alelo A no SNP rs3213545.

Tabela 5.6: Estudo caso-controle dos SNPs e haplótipos do *OASL* numa população do Rio de Janeiro

SNP/Haplótipo	Genótipo/alelo	N (frequência %)		Regressão Logística	
		Casos	Controles	OR (p-value)	OR (p-value)**
<b>rs2258227</b>	AA*	318 (0.61)	311 (0.62)	Referencia	Referencia
	AT	168 (0.32)	171 (0.34)	0.96 (p = 0.767)	1.07 (p = 0.636)
	TT	35 (0.07)	16 (0.03)	2.14 (p = 0.015)	2.31 (p = 0.009)
		521	498		
	Alelo A*	804 (0.77)	793 (0.80)	Referencia	Referencia
	Alelo T	238 (0.23)	203 (0.20)	1.16 (p = 0.341)	1.25 (p = 0.16)
	Carreadores de T	203 (0.39)	187 (0.37)	1.06 (p = 0.643)	1.18 (p = 0.225)
<b>rs4403877</b>	GG*	322 (0.74)	360 (0.76)	Referencia	Referencia
	GA	104 (0.24)	107 (0.22)	1.09 (p = 0.598)	1.02 (p = 0.918)
	AA	8 (0.02)	9 (0.02)	0.99 (p = 0.990)	0.922 (p = 0.874)
		434	476		
	Alelo G*	748 (0.86)	827 (0.87)	Referencia	Referencia
	Alelo A	120 (0.14)	125 (0.13)	1.06 (p = 0.759)	1.00 (p = 0.995)
	Carreadores de A	112 (0.26)	116 (0.24)	1.08 (p = 0.618)	1.01 (p = 0.951)
<b>rs3213545</b>	GG*	327 (0.62)	266 (0.53)	Referencia	Referencia
	GA	176 (0.34)	207 (0.41)	0.69 (p = 0.005)	0.66 (p = 0.003)
	AA	21 (0.04)	33 (0.07)	0.52 (p = 0.024)	0.45 (p = 0.007)
		524	506		
	Alelo G*	830 (0.79)	739 (0.73)	Referencia	Referencia
	Alelo A	218 (0.21)	273 (0.27)	0.71 (p = 0.020)	0.672 (p = 0.009)
	Carreadores de A	197 (0.37)	240 (0.47)	0.67 (p = 0.001)	0.63 (p = 0.0005)
<b>Haplótipo (rs225/rs440/rs321)</b>	A/A/G	0.12	0.11	0.97 (p = 0.890)	0.96 (p = 0.797)
	A/G/A	0.19	0.26	0.70 (p = 0.007)	0.66 (p = 0.003)
	T/G/G	0.21	0.19	0.99 (p = 0.921)	1.09 (p = 0.55)
	A/G/G*	0.44	0.41	Referencia	Referencia

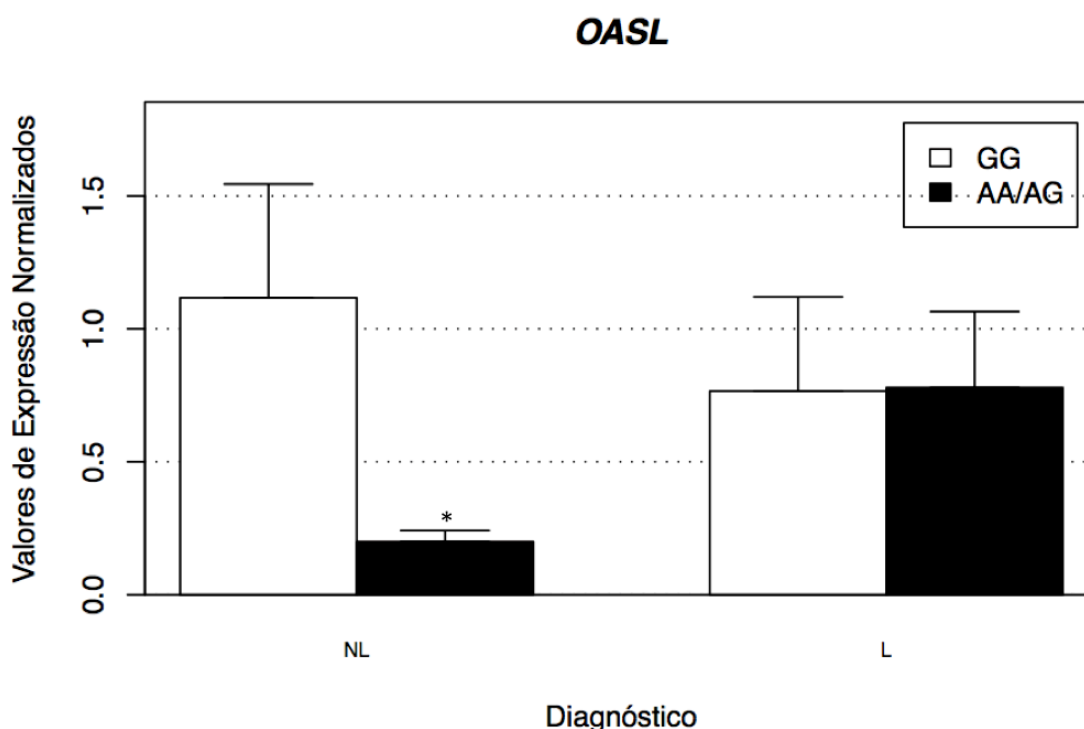
Valores de OR calculados com intervalo de confiança (IC) de 95%.

\* Utilizados como base para as comparações no modelo de regressão logística

\*\* Valores ajustados para as co-variáveis sexo e etnia

5.3.3 Análise de expressão gênica do OASL *ex vivo*

A expressão do gene *OASL* foi analisada em 85 biópsias de nervo de pacientes que apresentavam neuropatia periférica e tinham suspeita de hanseníase. Os pacientes suspeitos de hanseníase foram diagnosticados no Ambulatório Souza Araújo, Fiocruz, RJ, por métodos clínicos, laboratoriais e moleculares, e classificados como tendo hanseníase (L, n=37) ou não (NL, n=48). Para determinar se o SNP rs3213545 tem efeito sobre a expressão do *OASL* no nervo, os pacientes foram genotipados e agrupados pela presença ou ausência do alelo A, uma vez que apenas um indivíduo foi genotipado como homozigoto AA. A expressão de RNAm do *OASL* mostrou-se reduzida nos carreadores do alelo A quando comparados aos homozigotos GG em pacientes portadores de neuropatia não hanseníase (p-valor=0,026). A mesma alteração não foi observada em pacientes com hanseníase (figura 5.9).



**Figura 5.9: Valores de expressão normalizados para o gene OASL em biópsias de nervo.** Amostras de pacientes com neuropatia não hanseníase (NL) e pacientes diagnosticadas com hanseníase (L) estratificadas pelo genótipo do SNP rs3213545 como sendo homozigotos GG ou carreadores do alelo A (AA/AG).

## **6. DISCUSSÃO**

## 6.1 Ferramentas para análise da expressão gênica

Ferramentas para a análise global da expressão gênica oferecem uma visão ampla de alterações na expressão de RNAm que ocorre durante os processos biológicos, o que é essencial na compreensão dos fenômenos complexos da vida celular. Durante mais de 10 anos, a maior parte das plataformas tecnológicas para efetuar medições da expressão gênica foram baseadas na tecnologia de microarranjos de DNA. Além de servir como ferramenta na área de pesquisa básica, os microarranjos também foram utilizados em diversas aplicações clínicas, especialmente na estratificação de risco em doenças e terapia personalizada (Feng *et al.*, 2010). Uma aplicação clínica notável foi a assinatura molecular de câncer de mama composta por 70 genes, aceito pelo FDA em 2007 (Van't Veer *et al.*, 2002).

No entanto, os microarranjos sofrem com alguns aspectos técnicos. Por estes se basearem na hibridação de ácidos nucleicos, apresentam problemas de ruído e de hibridação cruzada. Além disso, os microarranjos geram medidas baseadas em abundância relativa e apenas detectam sequências predefinidas. Mais recentemente, devido a um aumento na capacidade de sequenciadores, maior número de trabalhos está fazendo uso das tecnologias inovadoras de seqüenciamento, chamadas de nova geração. A ideia comum por trás das diferentes tecnologias se baseia na detecção clonal de moléculas de DNA que se encontram fisicamente isoladas umas das outras ('t Hoen *et al.*, 2008). Trabalhos recentes têm comparado as tecnologias de sequenciamento de nova geração, que para detecção de RNA é chamada de RNA-seq, e de microarranjos e tem sido mostrado que as ferramentas geram perfis de expressão similares, mas que as técnicas de sequenciamento apresentam maior sensibilidade na detecção de transcritos com baixos níveis de expressão devido a capacidade de detectar milhões de sequências curtas (Feng *et al.*, 2010; Git *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011; 't Hoen *et al.*, 2008).

No entanto, a quantidade massiva de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração e a variedade de instrumentos existentes torna necessário o desenvolvimento de ferramentas de análise específicas a cada uma delas, o que torna as análises muito caras e laboriosas. Apesar

dessas novas tecnologias provavelmente substituírem os microarranjos no futuro, estes ainda se apresentam como ferramentas estáveis, práticas, e de mais fácil acesso aos pesquisadores que quiserem realizar uma análise global da expressão gênica nos seus trabalhos com a análise mais simples e direta. Portanto, os microarranjos continuarão tendo utilidade na busca de genes candidatos em trabalhos com grande número de amostras. Além disso, os microarranjos poderão ser utilizados em conjunto com as novas tecnologias de sequenciamento para focar em genes de interesse.

Trabalhos anteriores utilizaram a técnica de microarranjos para investigar a expressão de genes em células de Schwann frente ao dano neural causado por trauma induzido por axotomia (Araki *et al.*, 2001; Nagarajan *et al.*, 2002). Entretanto, o presente trabalho foi o primeiro a utilizar um enfoque global através da técnica de microarranjos no estudo da resposta do hospedeiro ao *M. leprae*. Mostramos que apesar das limitações da técnica e dos desenhos de estudo, foi possível gerar dados inéditos e que foram corroborados por outras ferramentas e abordagens de estudo.

## 6.2 Considerações técnicas dos experimentos de microarranjos

A tecnologia de microarranjos envolve múltiplas etapas, desde a preparação das amostras até a análise dos dados, e cada uma delas é suscetível a erros possivelmente custosos. Realizar um controle de qualidade experimental no intuito de identificar possíveis fontes de ruído é essencial para a geração de resultados reproduzíveis.

### 6.2.1 Controle de qualidade das hibridações

Uma das medidas mais efetivas da qualidade geral de um experimento de microarranjo é a porcentagem de genes selecionados após o filtro pela razão sinal/ruído (SNR). Neste trabalho, o percentual de genes selecionado após o filtro por SNR foi entre 38-47% no primeiro desenho experimental e entre 18-58% no segundo desenho experimental, sendo que, no segundo, uma das lâminas do experimento (que apresentou 58% de genes considerados adequados) destoava das demais que apresentaram entre 18-



33% de genes com SNR > 3. Coombs e colaboradores (2003) recomendam que microarranjos competitivos com boas hibridações apresentem entre 30-60% de genes que passam do filtro SNR > 2 independentemente da amostra utilizada. Em nosso estudo, não houve diferença entre o uso do filtro por SNR > 2 quando comparado ao SNR > 3, e, assim, optamos por usar o valor mais estrigente. Observa-se nos gráficos do tipo *box-plot* que os baixos valores de SNR decorrem principalmente de baixos valores de intensidade de sinal e não de altos valores de ruído. Uma pequena melhora da intensidade do sinal, como observado na lâmina 5 do desenho experimental II, foi capaz de melhorar significativamente o número de genes considerados adequados após o filtro SNR.

No segundo desenho experimental, a intensidade baixa de sinal foi uma das principais razões da dificuldade em encontrar genes diferencialmente expressos após as análises. Temos realizado ajustes nos protocolos de microarranjo na tentativa de melhorar esse item. Uma das etapas chave na determinação da intensidade de sinal é a marcação das sondas, onde uma melhor incorporação dos fluoróforos ao cDNA reflete numa melhora considerável da intensidade, sem afetar a intensidade do fundo (ruído). 't Hoen e colaboradores (2003) mostraram que, durante a marcação, um aumento na razão entre o nucleotídeo marcado e o não marcado tem efeito direto no grau de incorporação do fluoróforo (DoL, do inglês *Degree of Labeling*), o que, conseqüentemente, leva a um aumento na intensidade de sinal na lâmina. Entretanto, a marcação/incorporação do fluoróforo na sonda não é linear e após um determinado nível de incorporação, pode acontecer o fenômeno de *quenching*, onde os sinais são diminuídos ao invés de aumentados. O DoL ideal pode variar de um tipo de experimento de microarranjo para outro, devendo, portanto, ser otimizado. Nossos dados recentes, ainda não publicados, de microarranjos realizados com RNA proveniente de células THP-1 mostraram que um aumento no DoL de valores próximos a 1,5 (como obtivemos nos experimentos do segundo desenho experimental) para valores próximos a 2,5 refletem num aumento de intensidade do sinal da lâmina e, conseqüentemente, na porcentagem de genes encontrados após o filtro SNR > 3, que variou entre 40-50%. Esses

resultados estão de acordo com as porcentagens recomendadas por Coombs e colaboradores (2003).

### 6.2.2 Considerações sobre os desenhos experimentais utilizados

O desenho experimental I configurou um estudo piloto que, apesar de não contar com replicação biológica, foi realizado com o objetivo de identificar genes com as maiores alterações de expressão gênica para validação posterior. Esse tipo de experimento não tem como objetivo confirmar uma hipótese *a priori*, mas, sim, funcionar como geradora de hipóteses, que, por sua vez, ainda teriam que passar por comprovação. Por isso, e por se tratar de um método de *screening*, a falta de replicação e pequeno número amostral se justificam mediante a validação dos resultados por outras ferramentas. Nesse caso, a replicação técnica foi utilizada para aumentar a precisão das medições. Entretanto, a replicação técnica nunca substituirá a replicação biológica, que, por sua vez, é essencial para que seja possível fazer inferências sobre as diferenças na expressão de um gene entre duas condições experimentais (Kerr, 2003). Por esses motivos, optamos por utilizar um critério de seleção de genes diferencialmente expressos bastante estrigente ( $|\log \text{fold change}| \geq 4$  e  $p\text{-valor} \leq 0,001$ ), resultando numa lista pequena de genes identificados.

O segundo desenho experimental foi elaborado com o objetivo de 1) incorporar a replicação biológica através de experimentos de microarranjo por hibridação competitiva e 2) realizar todas as etapas experimentais dos microarranjos no Laboratório de Hanseníase, Fiocruz, RJ. Ao se tratar de experimentos de microarranjo por hibridação competitiva, a literatura recomenda a realização de replicação técnica na forma da troca de fluoróforo (do inglês *dye-swap*) (Glonek & Solomon, 2004; Kerr, 2003). Esse tipo de replicação técnica permite uma medição direta do viés causado pelas diferenças físicas, além de outras propriedades dos fluoróforos. É possível, por exemplo, que genes distintos possam apresentar diferenças de eficiência na incorporação de fluoróforos. Nesse caso, a diferença biológica da expressão relativa desse gene entre duas amostras pode ser mascarada pela

eficiência de incorporação do fluoróforo. É de se esperar, portanto, que, ao se realizar duas hibridações com as mesmas amostras onde os fluoróforos são trocados, genes super-expressos num canal de uma lâmina mostrem-se também super-expressos no canal oposto da lâmina onde os fluoróforos foram trocados. Entretanto, o viés dos fluoróforos nem sempre é constante e, na prática, nem sempre as razões dos experimentos realizados com troca de fluoróforos se compensam (Kerr, 2003). Tem sido defendida a tese de que esse efeito corresponderia a uma parte desprezível da variação total dos dados de microarranjo, já que fontes de viés são inúmeras e muitas vezes incalculáveis (Tseng *et al.*, 2001).

Os benefícios da utilização da replicação por troca de fluoróforos ainda são controversos na literatura. Por exemplo, Liang e colaboradores (2003) mostraram que a troca de fluoróforos melhorou a reprodutibilidade dos resultados dos microarranjos. Fang e colaboradores (2003) demonstraram que a utilização desse tipo de replicação técnica é crucial para a obtenção de dados robustos após a normalização. Já Wokrman e colaboradores (2002) discutiram que a troca de fluoróforos foi menos efetiva do que métodos de normalização baseados apenas na intensidade. Ademais, Dobbin e colaboradores (2003) concluíram que essa troca é desnecessária. No nosso trabalho, uma vez que não foi possível encontrar genes diferencialmente expressos (quando corrigido para comparações múltiplas) nos experimentos de microarranjos do segundo desenho experimental, optamos por uma análise sem lâminas com troca de fluoróforo, para verificar se esse controle estaria mascarando genes diferencialmente expressos. De fato, através desta análise, foi possível identificar genes diferencialmente expressos (C6orf123 e HADHA), mas não foi possível validar esses resultados por RT-PCR em tempo real. Devido à falta de validação, é possível que os resultados dessa análise sejam falsos positivos, sugerindo que nas nossas condições experimentais a replicação técnica pela troca de fluoróforos é realmente relevante.

### 6.3 Resultados dos Microarranjos

A hanseníase é uma doença complexa, e o sucesso da micobactéria como patógeno intracelular é fruto da sua longa co-evolução com seu hospedeiro. O diálogo entre o *M. leprae* e o seu hospedeiro vem sendo estudado ao nível molecular e celular. Algumas etapas da interação com as células de Schwann têm sido elucidadas como (i) o reconhecimento do patógeno pelas células do hospedeiro pelos PRRs TLR1/2 (Walker e Lockwood, 2006; Krutzik *et al.*, 2003) e NOD2 (Bourhis *et al.*, 2007; Barrington *et al.*, 2010a); (ii) a ligação do *M. leprae* a laminina-2 (Rambukkana *et al.*, 2002); e, (iii) a ativação da proliferação das células de Schwann através da sinalização via Erk1,2 e ciclina D1 (Tapinos e Rambukkana, 2005). Entretanto, o estabelecimento da doença é uma consequência eventual, mas não necessária da infecção e resulta de um balanço sensível entre mecanismos de proteção e patologia destrutiva. Nos tempos iniciais de infecção, patógenos modulam a expressão de genes do hospedeiro na tentativa de modificar a resposta frente a infecção favorecendo sua sobrevivência. A ativação da desdiferenciação e proliferação das células de Schwann pode configurar um mecanismo que favoreça a sobrevivência do *M. leprae* nessas células. Contudo, na maioria das vezes o hospedeiro ativa mecanismos de controle da infecção, como a autofagia e a apoptose, que culminam na eficiente eliminação do patógeno. Na hanseníase, esses processos são dinâmicos e variam entre indivíduos e o estabelecimento da doença depende da incapacidade de alguns hospedeiros de induzir estas vias que controlam a proliferação intracelular e o espalhamento da micobactéria infectante. Obviamente que desenhos complexos para análise de expressão gênica global comparativos ainda precisam ser realizados, por exemplo entre indivíduos resistentes (como o grupo de contatos domiciliares que podem ser considerados “super-controles”, pois são conhecidamente expostos por muitos anos e que nunca desenvolveram a doença) e suscetíveis à hanseníase (pacientes). Entretanto, a abordagem apresentada neste estudo é inédita e um primeiro modelo de estudo para essa doença e tem como alvo as etapas iniciais da infecção do nervo.

O presente trabalho contou com a utilização de um modelo de infecção de células de Schwann primárias humanas por *M. leprae* vivo com uma M.O.I. de 100:1 e essas células foram mantidas a 33° C. Hagge e colaboradores (2002) demonstraram que, quando mantido a 33° C, o *M. leprae* manteve sua viabilidade nessas células por períodos longos (12-20 dias após a infecção), em contraste a trabalhos anteriores que mantiveram as células a 37° C. Após 4 dias de infecção, foi observada uma alteração na morfologia das células de Schwann infectadas com *M. leprae* vivo, mas não com *M. leprae* morto, onde as células formaram agregados que indicam modificação das interações do tipo célula-célula entre células de Schwann. Entretanto, mesmo após 12 dias de infecção, as células infectadas com *M. leprae* vivo mantiveram sua capacidade de circundar neurônios e de produzir mielina. Esse trabalho foi o primeiro a demonstrar o importante efeito da temperatura no modelo de infecção de células de Schwann pelo *M. leprae* vivo, o que não causou espanto uma vez que o *M. leprae* é conhecido por infectar preferencialmente nervos periféricos encontrados em regiões mais frias do organismo. O mesmo trabalho demonstrou que não houve diferenças entre o índice de fagocitose (número de organismos internalizados por célula) quando as células foram infectadas por *M. leprae* vivo ou morto, o que sugere que a fagocitose independe de processos induzidos pela viabilidade da bactéria. As culturas demonstraram um índice de fagocitose de aproximadamente 12 micobactérias/célula 10 horas após a infecção, atingindo um pico de até 20 micobactérias/célula nas primeiras 48 horas (Hagge *et al.*, 2002). Com base nesses dados e considerando a lenta divisão desse patógeno, os tempos observados no presente trabalho (24 e 48 horas) podem ser considerados tempos iniciais para análise da infecção no momento crucial da interação parasita-hospedeiro, onde espera-se haja modulação da expressão gênica do hospedeiro frente à internalização do bacilo.

Apesar dos problemas técnicos e de desenho experimental enfrentados neste trabalho, obtivemos resultados que, não só corroboram a literatura, como também foram validados por RT-PCR em tempo real. O primeiro desses resultados foi a identificação da classe de genes induzidos

por interferon do tipo I como enriquecidos entre os genes encontrados diferencialmente expressos no desenho experimental I. Desses genes, o *OASL* teve sua expressão diferencial validada por RT-PCR em tempo real. Esse resultado está de acordo com dois trabalhos recentes de expressão gênica global que identificaram que essa classe de genes está induzida no sangue de pacientes com tuberculose ativa, quando comparado a pacientes com tuberculose latente (Berry *et al.*, 2010; Maertzdorf *et al.*, 2011). O *OASL* também estava presente nas listas de genes induzidas por interferon geradas nesses trabalhos. Um estudo recente do nosso laboratório (Ferreira *et al.*, 2011) que reanalisou estudos de microarranjos depositados em bancos públicos como o GEO confirmou a ativação desta via (IFN tipo I) como enriquecida bem como a ativação de *OASL* na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*.

Ao passo que se sabe que o IFN- $\gamma$  confere proteção contra patógenos intracelulares (Cooper, 2008), o papel do IFN do tipo I é menos conhecido para esse tipo de patógeno. Mesmo assim, os efeitos antivirais do IFN do tipo I são conhecidos há mais de 50 anos (Isaacs & Lindenmann, 1957). O IFN do tipo I é ativado rapidamente e induz um estado antiviral tanto na própria célula, quanto em células ao seu redor, através da indução de genes envolvidos no controle viral, na apoptose, na ativação da resposta imune inata e adaptativa, no ciclo celular e em outros mecanismos celulares (Perry *et al.*, 2005). Em infecções bacterianas a indução da produção de interferon do tipo I tem sido observada na infecção por duas bactérias intracelulares Gram-positivas: *Listeria monocytogenes* (Stockinger *et al.*, 2002; Auerbuch *et al.*, 2004) e *Mycobacterium tuberculosis* (Manca *et al.*, 2001). Em ambos os casos, a produção de IFN do tipo I durante a infecção em modelos murinos parece ser prejudicial ao hospedeiro, sendo essa via preferencialmente utilizada por cepas mais virulentas e relacionadas a maiores taxas de morte induzida pelo patógeno. Já em humanos, o aumento observado nos transcritos de genes induzidos por interferon no sangue de pacientes com TB ativa está relacionada à gravidade e à progressão da forma latente para a forma ativa da TB (Berry *et al.*, 2010; Maertzdorf *et al.*, 2011). Nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a indução dessa classe de genes por *M. leprae* em

células do sistema nervoso periférico.

Trabalhos têm mostrado que a produção de interferon do tipo I pode ser ativada através de PRRs como os TLR. Quatro adaptadores estão envolvidos com a sinalização através dos receptores TLR; MyD88, TIRAP, TRAM e TRIF. A função desses adaptadores é promover a sinalização entre os TLRs e proteínas kinases, culminando na ativação de reguladores de transcrição, como o NF- $\kappa$ B. Entretanto, nem todos os receptores TLR sinalizam através dos mesmos adaptadores e a escolha do adaptador parece influenciar na etapa de indução a jusante da regulação da resposta transcricional. Esses trabalhos sugerem que a utilização de TIRAP e MyD88 por alguns TLRs induzem a produção de citocinas pro-inflamatórias, enquanto que os adaptadores TRAM e TRIF elicitam preferencialmente uma resposta por interferon do tipo I (Yamamoto *et al.*, 2002, 2003a e 2003b; Horng *et al.*, 2002; Kagan *et al.*, 2008). Tem sido mostrado que os receptores TLR1/2 (Walker & Lockwood, 2006) e TLR6 (Mattos *et al.*, 2011b) estão envolvidos na sinalização durante a infecção das células de Schwann pelo *M. leprae*, entretanto, novos trabalhos se fazem necessários para verificar se a sinalização através desses receptores participa da ativação da expressão de genes induzidos por interferon do tipo I.

Além da classe de proteínas induzidas por interferon - identificada no primeiro desenho experimental - o presente trabalho também identificou que a via de fosforilação oxidativa estava sendo reprimida em células de Schwann infectadas por *M. leprae*. As mitocôndrias são organelas envolvidas no metabolismo energético aeróbico cujo objetivo final é gerar ATP através da fosforilação oxidativa. Essa via, que consiste em 5 grandes complexos proteicos, é responsável por gerar > 90% do ATP celular. Todos os complexos proteicos estão localizados na membrana interna da mitocôndria e são chamados de “Complexo I” (NADH-ubiquinona oxidoredutase), “Complexo II” (Succinato-ubiquinona oxidoredutase), “Complexo III” (ubiquinolol-citocromo c oxidoredutase), “Complexo IV” (citocromo c oxidase) e “Complexo V” (ATP sintase). O segundo desenho experimental do nosso estudo identificou que subunidades de 4 dos 5 complexos proteicos da fosforilação oxidativa estavam diferencialmente expressos. Por mais que,

individualmente, as alterações não pareçam ter grande significância biológica, o somatório desse efeito ao longo de toda uma via celular pode se tornar importante para uma célula frente a uma infecção por um patógeno intracelular. Ao verificar a expressão desses genes por RT-PCR em tempo real, observamos um resultado bastante semelhante àquele do microarranjo, onde, mesmo sem apresentar significância estatística, a infecção parece reduzir modestamente a expressão das 4 subunidades. O nosso trabalho de reanálise também identificou essa via enriquecida em outros estudos de microarranjos publicados na infecção de células humanas pelo *M. tuberculosis* (Ferreira *et al.*, 2011).

Esses resultados sugerem repressão de etapas críticas do metabolismo energético associado a essa organela em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. Apesar de sua relevância, existem poucos relatos na literatura do papel do metabolismo energético nas doenças micobacterianas. O metabolismo energético recebeu maior destaque no câncer, onde se observou que mesmo na presença de oxigênio, células tumorais produzem ATP preferencialmente através da glicólise e fermentação e, conseqüentemente, apresentam diminuição da atividade mitocondrial. Esse efeito, inicialmente observado por Otto Warburg em 1926, foi identificado como uma característica de todas as células tumorais, independente de sua origem. Acredita-se que esse desvio nas rotas de produção de ATP forneça para as células tumorais meios para ativar o crescimento e a proliferação celular, sendo que o piruvato, o produto final da glicólise, é redirecionado à biossíntese de lipídeos (Gogvadze *et al.*, 2010). Na doença de Chagas experimental, também causado por um patógeno intracelular, o *Trypanosoma cruzi*, Garg e colaboradores (2004) demonstraram, através de um “mitoarranjo” (um microarranjo específico para genes mitocondriais) a repressão de genes dos complexos da cadeia respiratória junto com uma indução de genes associados à via de oxidação de ácidos graxos.

De fato, tem sido demonstrado que o *M. leprae* tem efeito pronunciado na homeostasia de lipídeos em células de Schwann, que conseqüentemente favorece a sobrevivência do bacilo (Mattos *et al.*, 2011a). Essa conclusão foi corroborada (i) pelo acúmulo de corpúsculos lipídicos em células de Schwann



de biópsias de nervo de pacientes do pólo lepromatoso, (ii) pela indução da formação de corpúsculos lipídicos em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae in vitro*, (iii) pelo recrutamento de corpúsculos lipídicos aos fagossomos contendo *M. leprae* após a infecção, e (iv) pela redução na sobrevivência do bacilo em consequência do impedimento da biogênese dos corpúsculos lipídicos. O mecanismo de regulação da formação dos corpúsculos lipídicos em células de Schwann ainda é desconhecido, entretanto, Mattos e colaboradores (2011b) mostram que o processo é dependente da sinalização através do TLR6. É possível que a ativação da glicólise, acompanhada de uma repressão do metabolismo energético mitocondrial e consequente ativação na biossíntese de lipídeos, seja um mecanismo efetuado pelo *M. leprae* para promover o crescimento das células do hospedeiro e garantir a sua sobrevivência. Dados preliminares do nosso laboratório demonstram que a infecção pelo *M. leprae* leva a um aumento na captação de glicose na linhagem de células de Schwann, ST88-14 e que esse efeito é mais pronunciado conforme aumenta multiplicidade de infecção (dados apresentados no anexo III).

Outra importante consequência do desvio glicolítico observado nas células tumorais é a resistência adquirida à morte celular por apoptose (Gogvadze *et al.*, 2010). A apoptose é um processo conservado de morte celular programada importante na manutenção da homeostase tecidual, também evidenciado como mecanismo de defesa em células infectadas por microorganismos patogênicos. Em células tumorais, tem sido observado que a redução no metabolismo energético mitocondrial torna as mitocôndrias menos suscetíveis a permeabilização, impedindo assim a liberação do citocromo c e evitando a ativação da via das caspases. Além das células tumorais, outras bactérias intracelulares obrigatórias, como a *Chlamydia trachomatis*, são conhecidas por serem capazes de ativamente impedir que ocorra a apoptose através da secreção de produtos que inibem a liberação do citocromo c pela mitocôndria (Faherty *et al.*, 2008). O mecanismo de frenagem do metabolismo oxidativo pode ser uma estratégia para diminuição na produção de radicais livres e consequente inibição da apoptose que é necessário tanto no câncer quanto em doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares para que a proliferação celular se mantenha.

A parkina, uma enzima E3 ubiquitina ligase responsável pela ubiquitinação de proteínas para degradação das mesmas pelo proteossomo, tem sido descrita como uma proteína que previne a apoptose em doenças neurodegenerativas através da sua associação com a mitocôndria e subsequente inibição da liberação do citocromo c (Berger *et al.*, 2009). Curiosamente, polimorfismos no seu promotor foram associadas a suscetibilidade a hanseníase (Mira *et al.*, 2003; Mira *et al.*, 2004). A mitocôndria é um dos principais sensores de estresse da célula e a detecção e degradação de proteínas danificadas é um dos mecanismos iniciais usados para controlar os níveis de dano, promovendo a manutenção das células e tecidos (Luce *et al.*, 2010). Uma das formas de controlar os níveis de dano intracelular sem induzir a morte programada é através do processo de autofagia, onde componentes celulares e organelas são degradadas após o seu fusionamento com lisossomos. A parkina, e outras proteínas associadas a ela, como a LRRK2 e a PINK1, participam na regulação da autofagia de mitocôndrias despolarizadas e/ou danificadas (Vives-Bauza *et al.*, 2010). Curiosamente a LRRK2 também foi identificada em um estudo pan-genômico com associada à hanseníase em Chineses (Zhang *et al.*, 2009). Ainda outros genes de metabolismo mitocondrial no cromossomo 6q25 como SOD2, próximo a PARK2, também foram associados a hanseníase no trabalho de Mira e colaboradores (2004). Existem semelhanças importantes nos mecanismos de sinalização da autofagia de mitocôndrias e de bactérias intracelulares, reforçando a hipótese de que a parkina também possa atuar diretamente na autofagia do *M. leprae* (Deretic, 2009). Dessa forma, portadores das variações genéticas no promotor do gene da parkina, seriam incapazes de disparar o processo de autofagia que poderia envolver as mitocôndrias danificadas (mitofagia). Por isso, esses indivíduos devem apresentar um ambiente permissivo ao crescimento do *M. leprae*. Considerados em conjunto, esses dados reforçam um papel central para as mitocôndrias na infecção de células de Schwann por *M. leprae*, no entanto, novos estudos se fazem necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos.

Curiosamente, tem sido demonstrado que proteínas induzidas por interferon do tipo I são capazes de reprimir a expressão de genes

mitocondriais e, conseqüentemente, o metabolismo energético em vários tipos celulares (Lewis, 1996). O tratamento das células com IFN do tipo I acarretou numa redução em até 50% da expressão de genes mitocondriais e também da atividade dos complexos de fosforilação oxidativa entre 24 e 48 horas após o tratamento. Esse efeito foi bloqueado por cicloheximida, um inibidor da síntese protéica citoplasmática, mas não mitocondrial, sugerindo que o efeito observado do IFN do tipo I seja mediado pela indução de algum gene nuclear que seja capaz de modular a expressão de genes mitocondriais. No caso da infecção de células de Schwann pelo *M. leprae*, observamos tanto um aumento de genes induzidos por interferon do tipo I quanto uma diminuição de genes mitocondriais reforçando a participação desses eventos na interação parasita-hospedeiro.

Outro item interessante nesta associação entre IFN tipo I e inibição da fosforilação oxidativa é justamente que embora o conjunto de genes identificados seja diferente nos dois desenhos experimentais que conduzimos as vias identificadas por cada um são interligadas. Essa observação sugere fortemente que os achados são altamente sugestivos da participação desta via na suscetibilidade da infecção à hanseníase.

#### 6.4 Investigação do papel do OASL na hanseníase

Como discutido anteriormente dados recentes de estudos de expressão gênica global têm realçado a importância da classe de genes induzidos por interferon nas doenças micobacterianas (Berry *et al.*, 2010; Maertzdorf *et al.*, 2011). Nosso estudo foi o primeiro a identificar que essa classe de genes estava diferencialmente expressa em células de Schwann infectadas por *M. leprae*. Desses genes, o OASL apresentou a maior indução de expressão em microarranjo e teve sua expressão diferencial confirmada por RT-PCR em tempo real. Também tem-se identificado que o OASL é diferencialmente expresso em doenças virais (Ishibashi *et al.*, 2010) e que sua expressão é induzida em células dendríticas por LPS, mas não pelo estímulo com parede celular de BCG ou peptidoglicano (Ishii *et al.*, 2005). Com base nisso, optamos por investigar mais a fundo o papel do OASL na

hanseníase.

As 2'-5'oligoadenilato sintetases (OAS) formam uma família conservada de proteínas induzidas por interferon do tipo I, presumidamente presente em toda a classe dos mamíferos. Em humanos, a família é composta por 4 membros, todas localizadas no cromossomo 12 (Justesen *et al.*, 2000). O OAS1, OAS2 e OAS3 estão agrupados no locus no 12q24.1. Já o oligoadenilato sintetase-like (OASL) - identificado por Hartmann e colaboradores (1998) e classificado com base na sua semelhança com membros da família OAS, notavelmente o OAS1 - está localizado no 12q24.2. Essa proteína compartilha a porção N-terminal com outros OAS, porém difere na porção C-terminal, que no OASL é formado por dois domínios de ubiquitina (Eskildsen *et al.*, 2003).

Tanto o OASL quanto o OAS1, a proteína mais estudada dessa família, têm sua expressão ativada por IFN (Guille *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1998a; Rebouillat *et al.*, 1998). No entanto, a literatura tem mostrado que essas duas proteínas diferem quanto a sua função (Hartmann *et al.*, 1998) e a regulação da sua expressão gênica (Melchjorsen *et al.*, 2009). As oligoadenilato sintetases polimerizam ATP para formar 2'-5' oligoadenilato, que, por sua vez, ativa a RNase L, resultando na degradação do RNA. Entretanto, foi demonstrado que falta ao OASL essa atividade enzimática por causa de uma substituição de aminoácido de uma lisina por uma aspargina na porção N-terminal envolvida com a ligação ao ATP, além da ausência de 2 dos 3 resíduos de aspartato responsáveis pela ligação a íons de magnésio. De qualquer forma, como outras proteínas OAS, o OASL apresentou atividade antiviral contra Picorna Vírus (Marques *et al.*, 2008) e HCV (Ishibashi *et al.*, 2010), porém seu mecanismo ainda é desconhecido.

Alguns estudos têm enfatizado as diferenças nos padrões de expressão gênica entre OASL e outros membros da família OAS. Hartmann e colaboradores (1998b) mostraram que o RNAm do OASL era mais prevalente em células altamente proliferativas como PBMC, o revestimento mucoso do cólon, estômago e testículos, enquanto o OAS1 apresentou um padrão de expressão mais generalizado. Esse padrão de expressão sugere que o OASL pode desempenhar um papel nas vias celulares de crescimento e proliferação. Ye e colaboradores (2007) também demonstraram um perfil de

expressão distinto para o OASL quando comparado a outras OAS, e esse perfil foi capaz de diferenciar entre ativação da doença e infecção em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Curiosamente, Melchjorsen e colaboradores (2009) mostraram que o gene do OASL é rapidamente induzido em resposta a infecção por Vírus Sendai ou Vírus da Influenza A e que essa indução foi independente de uma resposta por IFN do tipo I. Em contrapartida, a indução do gene OAS1 foi menos notória e era dependente da ativação por IFN do tipo I. Essa diferença marcante na regulação da expressão gênica entre OASL e OAS1 condiz com a diferença funcional entre esses genes, provavelmente devido à ausência da atividade 2'-5' oligoadenilato sintetase do OASL.

No presente trabalho, demonstramos através de imunocitoquímica que o OASL migra para o núcleo frente ao estímulo por *M. leprae* morto tanto em células de Schwann quanto em macrófagos THP-1. Esse achado corrobora trabalhos prévios que mostram que o OASL tem localização tanto citoplasmática quanto nuclear, o que pode ser explicado pelo possível sinal de endereçamento para o núcleo (376-RKVKEKIRRTR-386) na sua porção C terminal, que é único no OASL e não presente em outros genes OAS (Rebouillat *et al.*, 1998). Uma vez no núcleo, tem sido mostrado que o OASL se liga com alta afinidade ao MBD1 (do inglês, *Methyl CpG binding protein 1*), e subsequentemente ativa modificações epigenéticas que levam a uma repressão generalizada da transcrição (Andersen *et al.*, 2004). Já o MBD1 é conhecido por recrutar a histona H3 lisina 9 (H3K9) metilase, denominada SETDB1. A metilação de H3K9 foi encontrada em praticamente todos os sítios de ligação do MBD1, incluindo promotores silenciados, sugerindo que o complexo MBD1/SETDB1 silencia a transcrição através de metilação repressiva de H3K9 (Sarraf & Stancheva, 2004). Em paralelo, Schultz e colaboradores (2002) mostraram que o SETDB1 é recrutado por fatores de transcrição contendo domínios KRAB que ligam-se ao DNA, formando um poderoso complexo co-repressor que leva à condensação da cromatina e ao silenciamento da expressão gênica. Curiosamente, tanto o SETDB1 quanto um fator de transcrição com domínio KRAB (ZNF79) foram identificados no presente estudo pelo primeiro desenho experimental por microarranjos como diferencialmente expressos em células de Schwann primárias infectadas por

*M. leprae*. No entanto, a indução da expressão de SETDB1 e ZNF79 não foi evidenciada por RT-PCR em tempo real.

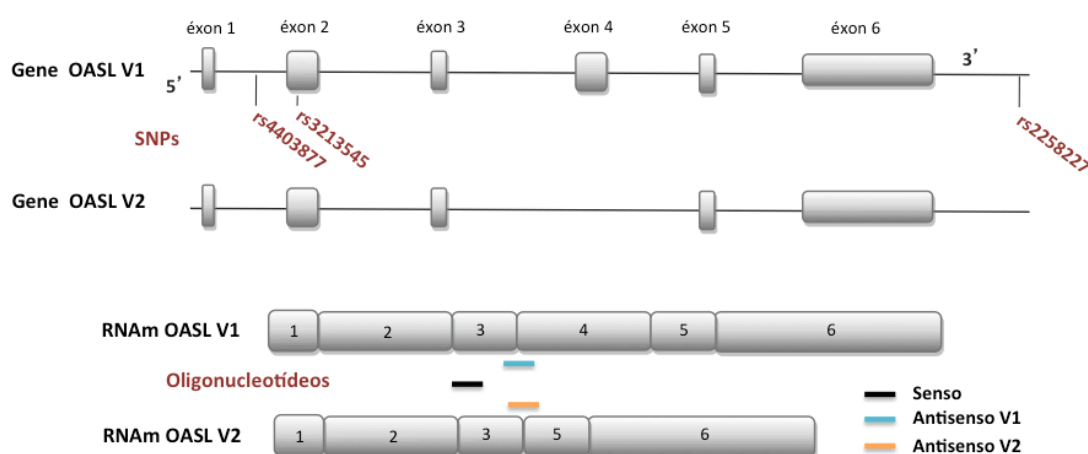
Esses trabalhos, considerados em conjunto, sugerem que o OASL pode ser um componente chave de uma resposta inicial comum que é ativado durante a interação entre patógenos intracelulares, como o *M. leprae* e o *M. tuberculosis*, e seus nichos preferenciais. Essa resposta provavelmente se inicia com a ativação da produção de IFN do tipo I por antígenos do patógeno, através da sinalização por PPR, como Toll e NOD2. Por sua vez, o IFN tipo I ativa a expressão de genes como o OASL, e, conseqüentemente, sua migração para o núcleo - onde ele atua, em conjunto com outros fatores, no controle epigenético da expressão gênica.

Variantes genéticas que afetam a expressão ou atividade do OASL podem determinar a susceptibilidade/resistência a doenças virais e não virais como também na resposta ao tratamento com IFN. Polimorfismos de base única (SNPs) no gene do OASL têm sido associados à resposta a infecções virais. Su e colaboradores (2008) identificaram 3 SNPs (rs3213545, rs1169279 e rs2859398) no gene do OASL que foram associados a uma resposta viral exacerbada em duas coortes independentes de pacientes recebendo tratamento por IFN para infecção crônica por HCV. Um desses SNPs (rs3213545) também estava presente em maior frequência em pacientes com febre do Nilo ocidental (*West Nile Virus*) quando comparado a controles (Yakub *et al.*, 2005).

Esse SNP está localizado no exon 2 do gene do OASL e, embora não configure uma troca sinônima que não acarreta em alteração de aminoácido, está presente numa região que se crê ser indutora de splicing (ESE, do inglês *exon splice enhancer*). Foi observado que o alelo variante apresentava reduzida probabilidade de ligação aos fatores de *splicing* SF2/ASF (Yakub *et al.*, 2005). Dessa forma, parece que pacientes suscetíveis a essas doenças virais expressam transcritos íntegros de OASL, e não suas variantes de *splicing*. No presente estudo, os genótipos GA e AA para este SNP se mostraram associados à resistência a hanseníase. Presumindo que o papel do OASL na interação patógeno-hospedeiro no modelo da hanseníase seja o de silenciador gênico, sugere-se que indivíduos carreadores de A (GA ou AA) produzem menores níveis de RNAm do OASL e, conseqüentemente,

apresentam uma resposta inata fortalecida. De fato, observamos que carreadores do alelo A produzem menores níveis de RNAm do OASL no nervo, entretanto, a presença do *M. leprae* induz a expressão desse gene a níveis semelhantes aos homocigotos GG. Uma investigação mais aprofundada sobre o papel dos variantes de *splicing* do OASL é necessária para esclarecer os mecanismos por trás da susceptibilidade a essas doenças virais e micobacterianas.

Enquanto a presença do alelo A do SNP rs3213545 confere resistência à hanseníase, observamos que o SNP rs2258227 confere susceptibilidade à hanseníase enquanto que não observamos associação entre o SNP rs4403877 e a doença. É importante ressaltar que o presente trabalho é o primeiro a investigar a associação dos SNPs rs2258227 e rs4403877 a qualquer doença através de estudo do tipo caso-controle. Observamos que a combinação haplotípica formada pela presença do alelo A no rs3213545, do alelo G no SNP rs4403877 e do alelo A no SNP rs2258227 se mostrou associada a proteção à hanseníase. Na figura 6.1, observa-se a estrutura do gene do OASL indicando os polimorfismos estudados, as variantes de *splicing* descritas até o momento e os oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR em tempo real

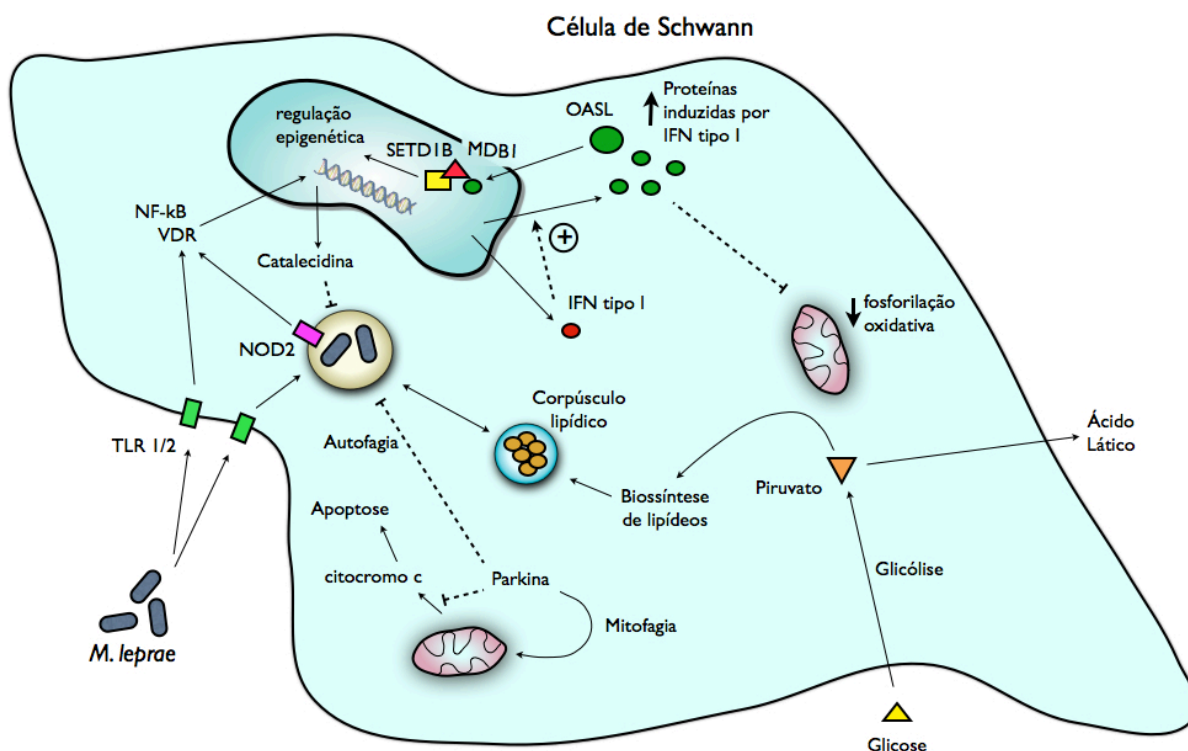


**Figura 6.1: Estrutura do gene OASL e de seu variante de *splicing*.** Polimorfismos estudados e oligonucleotídeos utilizados no RT-PCR em tempo real. Os oligonucleotídeos foram desenhado para distinguir entre as duas isoformas de *splicing*, onde o mesmo oligonucleotídeo senso foi usado para detectar ambas as isoformas enquanto que oligonucleotídeos antisenso distintos detectando a junção exon-exon (V1 = exon 3-exon4; V2 = exon3-exon5) cuja sequência é única para cada isoforma.

## 6.5 Fechamento

O *M. leprae* é capaz de residir e replicar-se dentro de células de Schwann por longos períodos antes que células do sistema imune entrem em cena iniciando uma resposta inflamatória que eventualmente leva às perdas sensoriais e motoras observadas nos quadros de dano neural da hanseníase. Os eventos iniciais da interação desse patógeno com essas células são críticos para a propagação do *M. leprae* e estabelecimento de um nicho bacteriano no sistema nervoso periférico (Rambukkana, 2010). Estudos recentes que utilizaram *M. leprae* cultivado in vivo (Truman e Krahenbuhl, 2001) têm contribuído com o entendimento de processos pontuais dessa interação (Rambukkana *et al.*, 1997, 1998, 2002; Ng *et al.*, 2000; Rambukkana, 2004; Tapinos e Rambukkana, 2005; Tapinos *et al.*, 2006). Contudo, o presente trabalho é o primeiro a apresentar um enfoque global para observar a resposta das células de Schwann ao seu invasor. Na figura 6.2, observa-se algumas hipóteses dos processos que podem ser disparados nas células de Schwann na sua interação inicial com o *M. leprae*, que foram desenvolvidas com base na integração de dados do presente estudo com aqueles encontrados na literatura. A compreensão das respostas das células de Schwann ao *M. leprae* pode auxiliar na identificação de moléculas marcadoras que sejam indicativas de dano neural. Essas moléculas são possíveis candidatos a alvos que podem ser utilizados no diagnóstico ou como ponto de intervenção terapêutica na hanseníase.





**Figura 6.2: Processos disparados nas células de Schwann durante as etapas iniciais da interação com o *M. leprae*.** Quando o *M. leprae* entra em contato com a célula hospedeira ele é reconhecido preferencialmente pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como TLR e NOD. Esses receptores são capazes de ativar uma cascata de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B e VDR, que por sua vez regulam a transcrição de genes inflamatórios (como as citocinas TNF e IL12) e microbicidas (como a catalecidina). Uma ativação bem sucedida dessas vias deveria levar a degradação do patógeno através da autofagia, porém, é possível que indivíduos suscetíveis não sejam capazes de disparar esse processo de forma eficiente, levando à persistência do bacilo nas vesículas intracelulares. A sinalização através desses receptores também é capaz de induzir a produção de interferon do tipo I, que por sua vez ativa a expressão de uma variedade de proteínas como as IFIT e o OASL. Observamos no presente trabalho que o OASL é induzido nas células de Schwann e migra para o núcleo frente à infecção por *M. leprae*, onde ele provavelmente interage com metiltransferases e acaba promovendo uma repressão da expressão gênica através de regulação epigenética. Proteínas induzidas por interferon do tipo I também são capazes de levar a uma repressão da expressão gênica mitocondrial. É possível que ocorra um desvio do metabolismo energético celular da mitocôndria para a fermentação frente à infecção pelo *M. leprae* que acaba favorecendo a persistência do bacilo, possivelmente através do aumento da biossíntese de lipídeos que são essenciais para manutenção e divisão do bacilo. As alterações mitocondriais observadas no microarranjo também estão de acordo com a literatura no que diz respeito aos processos de apoptose e autofagia que muitas vezes são disparados pela mitocôndria que desempenha função central como sensor de estresse dentro da célula. A parkina, uma proteína cujos polimorfismos foram associados à susceptibilidade a hanseníase, migra para a mitocôndria onde ela atua na manutenção dessa organela impedindo a liberação do citocromo c e a apoptose e induzindo os processos de autofagia tanto das mitocôndrias danificadas quanto do patógeno invasor.

## **7. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados encontrados nesse estudo, podemos concluir que:

- A resposta celular induzida por IFN do tipo I e a fosforilação oxidativa são processos celulares que parecem estar envolvidos nos tempos iniciais da interação entre o *M. leprae* e a célula de Schwann;
- O 2'-5' oligoadenilato sintetase-like (OASL), um gene conhecido por ser induzido por IFN do tipo I e por possuir atividade antiviral, é induzido nas células de Schwann frente à infecção pelo *M. leprae*;
- A proteína do OASL migra do citoplasma para o núcleo em linhagens de célula de Schwann e de macrófagos THP1 frente ao estímulo por *M. leprae* morto;
- Segundo estudo caso-controle com polimorfismos no gene do OASL, genótipos carreadores do alelo A (GA e AA) para o SNP rs3213545 estão associados à proteção a hanseníase enquanto o genótipo TT do SNP rs2258227 está associado a uma maior susceptibilidade à hanseníase. Não foi evidenciado associação do SNP rs4403877 com a hanseníase. A combinação haplotípica A/G/A referente à combinação rs2258227/rs4403877/rs3213545 mostrou-se associada à proteção à hanseníase;
- Os carreadores do alelo A para o SNP rs3213545 no gene do OASL expressam menores níveis de RNAm do OASL no nervo quando comparado aos homozigotos GG, no entanto, o *M. leprae* parece induzir a expressão dessa proteína nos indivíduos portadores desse polimorfismo a níveis similares aos não portadores.

## **8. PERSPECTIVAS FUTURAS**

No presente trabalho, novas hipóteses foram elaboradas a partir das análises de expressão gênica global, e algumas dessas hipóteses estão sendo consolidadas e poderão servir de base para a realização de diversos estudos para melhor compreender os processos iniciais da interação entre o *M. leprae* e a célula de Schwann. Possíveis linhas de estudo, algumas das quais já se encontram em andamento no laboratório, são:

1) No que concerne a participação do OASL na hanseníase:

- Avaliação do efeito do *knockdown* do OASL através de RNA de interferência sobre a viabilidade do *M. leprae*;
- Continuação da avaliação da expressão de RNAm do OASL em biópsias de nervo e de pele;
- Verificação do efeito do polimorfismo rs3213545 sobre a expressão de diferentes isoformas do gene do OASL.

2) No que concerne o papel do metabolismo mitocondrial:

- Avaliação do grau da disfunção mitocondrial e do desvio do metabolismo energético nas células de Schwann infectadas por *M. leprae*, incluindo a medição das atividades dos complexos da fosforilação oxidativa, observação de danos morfológicos nas membranas das mitocôndrias, investigação da produção de ácido láctico, dentre outros;
- Comparação do proteoma mitocondrial das células de Schwann na presença e ausência do *M. leprae*.

3) Novos estudos de larga e/ou média escala na investigação do efeito do *M. leprae* sobre as células de Schwann:

- Novos estudos globais por sequenciamento de nova geração e de média escala pelo RT-PCR em tempo real usando o equipamento Fluidigm, recém instalado no laboratório;
- Realização de uma cinética temporal para investigar as alterações na expressão gênica ao longo dos tempos iniciais e médios da infecção de células de Schwann por *M. leprae*;
- Avaliação do efeito do tratamento com Talidomida sobre a expressão gênica global de células de Schwann infectadas por *M. leprae*.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Akama, Suzuki, Tanigawa, Nakamura, Kawashima, Wu, Sue, Yoshihara, Ishido & Ishii, 2010a, Whole-Genome Expression Analysis of *Mycobacterium leprae* and its Clinical Application, *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 63, pp. 387-92.

Akama, T., Tanigawa, K., Kawashima, A., Wu, H., Ishii, N. & Suzuki, K., 2010b, Analysis of *Mycobacterium leprae* gene expression using DNA microarray, *Microbial pathogenesis*, 49(4), pp. 181-5.

Akama, T., Suzuki, K., Tanigawa, K., Kawashima, A., Wu, H., Nakata, N., Osana, Y., Sakakibara, Y. & Ishii, N., 2009, Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions, *Journal of bacteriology*, 191(10), pp. 3321-7.

Alcaïs, A., Abel, L. & Casanova, J.L., 2009, Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm, *The Journal of clinical investigation*, 119(9), pp. 2506-14.

Alves, L., Mendonça Lima, L., Silva Maeda, E., Carvalho, L., Holy, J., Sarno, E.N., Pessolani, M.C.V. & Barker, L.P., 2004, *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways, *FEMS microbiology letters*, 238(2), pp. 429-37.

Andersen, C.L., Jensen, J.L. & Ørntoft, T.F., 2004a, Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets, *Cancer research*, 64(15), p. 5245.

Andersen, J.B., Strandbygård, D.J., Hartmann, R. & Justesen, J., 2004b, Interaction between the 2 – '5 oligoadenylate synthetase-like protein p59 OASL and the transcriptional repressor methyl CpG-binding protein 1, *European Journal of Biochemistry*, 271(3), pp. 628-36.

Araki, T., Nagarajan, R. & Milbrandt, J., 2001, Identification of genes induced in peripheral nerve after injury, *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), p. 34131.

Auerbuch, V., Brockstedt, D.G., Meyer-Morse, N., O'Riordan, M. & Portnoy, D.A., 2004, Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*, *The Journal of experimental medicine*, 200(4), p. 527.

Beibbarth, T., Fellenberg, K., Brors, B., Arribas-Prat, R., Boer, J.M., Hauser, N.C., Scheideler, M., Hoheisel, J.D., Schütz, G. & Poustka, A., 2000,

Processing and quality control of DNA array hybridization data, *Bioinformatics*, 16(11), p. 1014.

Benjamini & Hochberg, 1995, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 57(1), pp. 289-300.

Berger, A.K., Cortese, G.P., Amodeo, K.D., Weihofen, A., Letai, A. & LaVoie, M.J., 2009, Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release, *Human molecular genetics*, 18(22), p. 4317.

Berrington, W.R., Iyer, R., Wells, R.D., Smith, K.D., Skerrett, S.J. & Hawn, T.R., 2010a, NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*, *European journal of immunology*, 40(12), pp. 3519-27.

Berrington, W.R., Macdonald, M., Khadge, S., Sapkota, B.R., Janer, M., Hagge, D.A., Kaplan, G. & Hawn, T.R., 2010b, Common polymorphisms in the NOD2 gene region are associated with leprosy and its reactive states, *Journal of Infectious Diseases*, 201(9), p. 1422.

Berry, M.P., Graham, C.M., McNab, F.W., Xu, Z., Bloch, S.A., Oni, T., Wilkinson, K.A., Banchereau, R., Skinner, J., Wilkinson, R.J., Quinn, C., Blankenship, D., Dhawan, R., Cush, J.J., Mejias, A., Ramilo, O., Kon, O.M., Pascual, V., Banchereau, J., Chaussabel, D. & O'Garra, A., 2010, An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis, *Nature*, 466(7309), pp. 973-7.

Bilban, M., Buehler, L.K., Head, S., Desoye, G. & Quaranta, V., 2002, Defining signal thresholds in DNA microarrays: exemplary application for invasive cancer, *BMC genomics*, 3(1), p. 19.

Bolstad, B.M., Collin, F., Simpson, K.M., Irizarry, R.A. & Speed, T.P., 2004, Experimental design and low-level analysis of microarray data, *International review of neurobiology*, 60, pp. 25-58.

Bourhis, L., Benko, S. & Girardin, S., 2007, Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders, *Biochemical Society transactions*, 35, pp. 1479-84.

Britton, W.J. & Lockwood, D.N.J., 2004, Epidemiology of leprosy, *The Lancet*, 363, pp. 1209-19.

Bunge, R.P., 1993, Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment,



myelination, trophism and regeneration, *Current opinion in neurobiology*, 3(5), pp. 805-9.

Cardoso, C.C., Pereira, A.C., de Sales Marques, C. & Moraes, M.O., 2011, Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome, *Future Microbiology*, 6(5), pp. 533-49.

Chernousov, M.A. & Carey, D.J., 2000, Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors, *Histology and histopathology*, 15(2), p. 593.

Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C. & Harris, D., 2001, Massive gene decay in the leprosy bacillus, *Nature*, 409(6823), pp. 1007-11.

Cole, S.T., Supply, P. & Honoré, N., 2001, Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity, *Leprosy review*, 72(4), pp. 449-61.

Coombes, K.R., Wang, J. & Abruzzo, L.V., 2004, Monitoring the quality of microarray experiments, *Methods of Microarray Data Analysis III*, pp. 25-40.

Cooper, A.M. & Khader, S.A., 2008, The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis, *Immunological reviews*, 226(1), pp. 191-204.

Cruz, D., Watson, A.D., Miller, C.S., Montoya, D., Ochoa, M.T., Sieling, P.A., Gutierrez, M.A., Navab, M., Reddy, S.T. & Witztum, J.L., 2008, Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy, *The Journal of clinical investigation*, 118(8), p. 2917.

Demangel, C. & Britton, W.J., 2000, Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts, *Immunology and cell biology*, 78(4), pp. 318-24.

Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M. & Singh, S., 2009, Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy, *Current topics in microbiology and immunology*, 335, pp. 169-88.

Dobbin, K., Shih, J.H. & Simon, R., 2003, Statistical design of reverse dye microarrays, *Bioinformatics*, 19(7), p. 803.

Douglas, J.T., Cellona, R.V., Fajardo Jr, T.T., Abalos, R.M., Balagon, M.V.F. & Klatser, P.R., 2004, Prospective study of serological conversion as a risk

factor for development of leprosy among household contacts, *Clinical and Vaccine Immunology*, 11(5), p. 897.

Dudoit, S., Yang, Y.H., Callow, M.J. & Speed, T.P., 2002, Statistical methods for identifying genes with differential expression in replicated cDNA microarray experiments, *Stat. Sin.*, 12(1), pp. 111-39.

Duppre, N.C., 2008, Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(7), pp. 631-8.

Eiglmeier, K., Parkhill, J., Honore, N., Garnier, T., Tekaia, F., Telenti, A., Klatser, P., James, K.D., Thomson, N.R. & Wheeler, P.R., 2001, The decaying genome of *Mycobacterium leprae*, *Leprosy review*, 72(4), pp. 387-98.

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

Faherty, C.S. & Maurelli, A.T., 2008, Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection, *Trends in microbiology*, 16(4), pp. 173-80.

Fang, Y., Brass, A., Hoyle, D.C., Hayes, A., Bashein, A., Oliver, S.G., Waddington, D. & Rattray, M., 2003, A model-based analysis of microarray experimental error and normalisation, *Nucleic acids research*, 31(16), p. e96.

Feng, L., Liu, H., Liu, Y., Lu, Z., Guo, G., Guo, S., Zheng, H., Gao, Y., Cheng, S. & Wang, J., 2010, Power of deep sequencing and agilent microarray for gene expression profiling study, *Molecular biotechnology*, 45(2), pp. 101-10.

Ferreira, Carlos Diego, 2011, Integração de dados de expressão gênica global em tuberculose, Dissertação de Mestrado defendido na Pós Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz.

Finkelstei, D., Ewing, R., Gollub, J., Sterky, F., Cherry, J. & Somerville, S., 2002, Microarray data quality analysis: lessons from the AFGC project. Arabidopsis Functional Genomics Consortium, *Plant Mol. Biol.*, 48, pp. 119-31.

Franzblau, S.G., 1988, Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium, *Journal of clinical microbiology*, 26(1), p. 18.

Gallo, M.E., Sampaio, E., Nery, J.A., Antunes, S.L., Pessolani, M.C.V., Sarno, E.N., 2005, Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos,

Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Editora Guanabara Koogan, Vol. II, p. 1383.

Garg, N., Gerstner, A., Bhatia, V., DeFord, J. & Papaconstantinou, J., 2004, Gene expression analysis in mitochondria from chagasic mice: alterations in specific metabolic pathways, *The Biochemical Journal*, 381(Pt 3), pp. 743-52.

Git, A., Dvinge, H., Salmon-Divon, M., Osborne, M., Kutter, C., Hadfield, J., Bertone, P. & Caldas, C., 2010, Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression, *Rna*, 16(5), p. 991.

Glonek, G.F. & Solomon, P.J., 2004, Factorial and time course designs for cDNA microarray experiments, *Biostatistics*, 5(1), pp. 89-111.

Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S., 2010, The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells, *Molecular aspects of medicine*, 31(1), pp. 60-74.

Goulart, I.M.B., Penna, G.O. & Cunha, G., 2002, Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35(4), pp. 365-75.

Guerra, J.G., Penna, G.O., Castro, L.C.M., Martelli, C.M.T., Stefani, M.M.A. & Costa, M.B., 2004, Erythema nodosum leprosum case series report: clinical profile, immunological basis and treatment implemented in health services, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(5), pp. 384-90.

Hagge, D.A., Oby Robinson, S., Scollard, D., McCormick, G. & Williams, D.L., 2002, A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions, *The Journal of infectious diseases*, 186(9), pp. 1283-96.

Hansen, G.A., 1874, Investigations concerning the etiology of leprosy, *Norsk Mag. Laegervidenskaben*, 4, p. 1-88.

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

Hunter, S.W. & Brennan, P.J., 1981, A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity,

*Journal of bacteriology*, 147(3), p. 728.

Im, J.S., Tapinos, N., Chae, G.T., Illarionov, P.A., Besra, G.S., DeVries, G.H., Modlin, R.L., Sieling, P.A., Rambukkana, A. & Porcelli, S.A., 2006, Expression of CD1d molecules by human schwann cells and potential interactions with immunoregulatory invariant NK T cells, *The Journal of Immunology*, 177(8), p. 5226.

Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. & Speed, T.P., 2003, Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data, *Biostatistics (Oxford, England)*, 4(2), p. 249.

Isaacs, A. & Lindenmann, J., 1957, Virus interference. I. The interferon, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 147(927), p. 258.

Ishibashi, M., Wakita, T. & Esumi, M., 2010, 2'-5'-Oligoadenylate synthetase-like gene highly induced by hepatitis C virus infection in human liver is inhibitory to viral replication in vitro, *Biochemical and biophysical research communications*, 392(3), pp. 397-402.

Ishii, K., Kurita-Taniguchi, M., Aoki, M., Kimura, T., Kashiwazaki, Y., Matsumoto, M. & Seya, T., 2005, Gene-inducing program of human dendritic cells in response to BCG cell-wall skeleton (CWS), which reflects adjuvancy required for tumor immunotherapy, *Immunology letters*, 98(2), pp. 280-90.

Jardim, M.R., Antunes, S.L., Santos, A.R., Nascimento, O.J., Nery, J.A., Sales, A.M., Illarramendi, X., Duppre, N., Chimelli, L., Sampaio, E.P. & Sarno, E.P., 2003, Criteria for diagnosis of pure neural leprosy, *Journal of neurology*, 250(7), pp. 806-9.

Jardim, M.R., Antunes, S.L.G., Simons, B., Wildenbeest, J.G., Nery, J.A.C., Illarramendi, X., Moraes, M.O., Martinez, A.N., Oskam, L. & Faber, W.R., 2005, Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy, *Leprosy review*, 76(3), pp. 232-40.

Jardim, M.R., Illarramendi, X., Nascimento, O.J., Nery, J.A., Sales, A.M., Sampaio, E.P. & Sarno, E.N., 2007, Pure neural leprosy: steroids prevent neuropathy progression, *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 65(4A), pp. 969-73.

Jenner, R.G. & Young, R.A., 2005, Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling, *Nature reviews. Microbiology*, 3(4), pp. 281-94.

Jessen, K.R. & Mirsky, R., 2005, The origin and development of glial cells in peripheral nerves, *Nature reviews. Neuroscience*, 6(9), pp. 671-82.

Job, C.K., Jayakumar, J., Kearney, M. & Gillis, T.P., 2008, 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*, 78(3), p. 518.

Jopling, W.H. & McDougall, A.C., 1988, Handbook of leprosy, *Handbook of leprosy. 4th edition..*

Justesen, J., Hartmann, R. & Kjeldgaard, N.O., 2000, Gene structure and function of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase family, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(11), pp. 1593-612.

Kagan, J.C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S. & Medzhitov, R., 2008, TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta, *Nature immunology*, 9(4), pp. 361-8.

Kaplan, G. & Cohn, Z.A., 1986, The immunobiology of leprosy, *International review of experimental pathology*, 28, p. 45.

Kerr, M.K., 2003, Design considerations for efficient and effective microarray studies, *Biometrics*, 59(4), pp. 822-8.

Kerr, M.K. & Churchill, G.A., 2001, Experimental design for gene expression microarrays, *Biostatistics (Oxford, England)*, 2(2), p. 183.

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

Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E. & Binford, C.H., 1972, Attempts to establish the Armadillo (*Dasypus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the Armadillo, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 40(3), p. 229.

Klatser, P.R., Van Beers, S., Madjid, B., Day, R. & De Wit, M.Y., 1993, Detection of Mycobacterium leprae nasal carriers in populations for which leprosy is endemic, *Journal of clinical microbiology*, 31(11), p. 2947.

Kooperberg, C., Sipione, S., LeBlanc, M., Strand, A.D., Cattaneo, E. & Olson, J.M., 2002, Evaluating test statistics to select interesting genes in microarray experiments, *Human molecular genetics*, 11(19), p. 2223.

Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Sieling, P.A., Uematsu, S., Ng, Y.W., Legaspi, A., Liu, P.T., Cole, S.T., Godowski, P.J. & Maeda, Y., 2003, Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy, *Nature medicine*, 9(5), pp. 525-32.

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

Lashkari, D.A., McCusker, J.H. & Davis, R.W., 1997, Whole genome analysis: Experimental access to all genome sequenced segments through larger-scale efficient oligonucleotide synthesis and PCR, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), p. 8945.

Lavania, M., Katoch, K., Katoch, V.M., Gupta, A.K., Chauhan, D.S., Sharma, R., Gandhi, R., Chauhan, V., Bansal, G. & Sachan, P., 2008, Detection of viable Mycobacterium leprae in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy, *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), pp. 627-31.

Lewis, J.A., Huq, A. & Najarro, P., 1996, Inhibition of mitochondrial function by interferon, *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), p. 13184.

Liang, M., Briggs, A.G., Rute, E., Greene, A.S. & Cowley, A.W., 2003, Quantitative assessment of the importance of dye switching and biological replication in cDNA microarray studies, *Physiological Genomics*, 14(3), p. 199.

Liu, P.T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B.H., Krutzik, S.R., Ochoa, M.T., Schaubert, J., Wu, K. & Meinken, C., 2006, Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response, *Science*, 311(5768), p. 1770.

Luce, K., Weil, A.C. & Osiewacz, H.D., 2010, Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease, *Protein metabolism and homeostasis in aging. Austin: Landes Bioscience*, pp. 1-18.

Madan Babu, M., 2003, Did the loss of sigma factors initiate pseudogene accumulation in M. leprae? *Trends in microbiology*, 11(2), pp. 59-61.

Maertzdorf, J., Repsilber, D., Parida, S.K., Stanley, K., Roberts, T., Black, G.,

Walzl, G. & Kaufmann, S.H., 2011, Human gene expression profiles of susceptibility and resistance in tuberculosis, *Genes and immunity*, 12(1), pp. 15-22.

Manca, C., Tsenova, L., Bergtold, A., Freeman, S., Tovey, M., Musser, J.M., Barry, C.E., Freedman, V.H. & Kaplan, G., 2001, Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- $\alpha/\beta$ , *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), p. 5752.

Marques, J., Anwar, J., Eskildsen-Larsen, S., Rebouillat, D., Paludan, S.R., Sen, G., Williams, B.R. & Hartmann, R., 2008, The p59 oligoadenylate synthetase-like protein possesses antiviral activity that requires the C-terminal ubiquitin-like domain, *The Journal of general virology*, 89(Pt 11), pp. 2767-72.

Marques, M.A.M., Mahapatra, S., Sarno, E.N., Santos, S., Spencer, J.S., Brennan, P.J. & Pessolani, M.C.V., 2001a, Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34(4), pp. 463-70.

Marques, M.A.M., Sarno, E.N., Brennan, P.J. & Pessolani, M.C.V., 2001b, Binding of  $\alpha$ 2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells, *Journal of medical microbiology*, 50(1), p. 23.

Martinez, A.N., Britto, C.F.P.C., Nery, J.A.C., Sampaio, E.P., Jardim, M.R., Sarno, E.N. & Moraes, M.O., 2006, Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy, *Journal of clinical microbiology*, 44(9), p. 3154.

Martinez, A.N., Lahiri, R., Pittman, T.L., Scollard, D., Truman, R., Moraes, M.O. & Williams, D.L., 2009, Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR, *Journal of clinical microbiology*, 47(7), p. 2124.

Martinez, Ribeiro-Alves, Sarno E, & Moraes, M.O., (no prelo) Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens, *Plos Neglected Tropical Diseases*.

Matsuoka, M., Izumi, S., Budiawan, T., Nakata, N. & Saeki, K., 1999, *Mycobacterium leprae* DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection, *Indian journal of leprosy*, 71(1), pp. 61-7.

Mattos, K.A., Lara, F.A., Oliveira, V.G., Rodrigues, L.S., D'Avila, H., Melo, R.C., Manso, P.P., Sarno, E.N., Bozza, P.T. & Pessolani, M.C., 2011a,

Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes, *Cellular microbiology*, 13(2), pp. 259-73.

Mattos, K.A., Oliveira, V.G.C., D' Avila, H., Rodrigues, L.S., Pinheiro, R.O., Sarno, E.N., Pessolani, M.C.V. & Bozza, P.T., 2011b, TLR6-Driven Lipid Droplets in *Mycobacterium leprae*-Infected Schwann Cells: Immunoinflammatory Platforms Associated with Bacterial Persistence, *The Journal of Immunology*, 187(5), pp. 2548-58.

Melchjorsen, J., Kristiansen, H., Christiansen, R., Rintahaka, J., Matikainen, S., Paludan, S.R. & Hartmann, R., 2009, Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections, *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29(4), pp. 199-207.

Miller, S.A., 1988, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic acids research*, 16, p. 1215.

Mira, M.T., Alcais, A., Van Thuc, N., Moraes, M.O., Di Flumeri, C., Thai, V.H., Phuong, M.C., Huong, N.T., Ba, N.N. & Khoa, P.X., 2004, Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG, *Nature*, 427(6975), pp. 636-40.

Mira, M.T., Alcais, A., Di Pietrantonio, T., Thuc, N.V., Phuong, M.C., Abel, L. & Schurr, E., 2003, Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes, *Genes and immunity*, 4(1), pp. 67-73.

Misch, E. & Hawn, T., 2008, Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease, *Clinical Science*, 114, pp. 347-60.

Misra, N., Murtaza, A., Walker, B., Narayan, N.P., Misra, R.S., Ramesh, V., Singh, S., Colston, M.J. & Nath, I., 1995, Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*, *Immunology*, 86(1), p. 97.

Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppée, J.Y., Lacroix, C., Sow, S., Spencer, J.S., Truman, R.W., Williams, D.L., Gelber, R., Virmond, M., Flageul, B., Cho, S.N., Ji, B., Paniz-Mondolfi, A., Convit, J., Young, S., Fine, P.E., Rasolofso, V., Brennan, P.J. & Cole, S.T., 2005, On the origin of leprosy, *Science (New York, N.Y.)*, 308(5724), pp. 1040-2.



Monot, M., Honoré, N., Garnier, T., Zidane, N., Sherafi, D., Paniz-Mondolfi, A., Matsuoka, M., Taylor, G.M., Donoghue, H.D., Bouwman, A., Mays, S., Watson, C., Lockwood, D., Khamesipour, A., Khamispour, A., Dowlati, Y., Jianping, S., Rea, T.H., Vera-Cabrera, L., Stefani, M.M., Banu, S., Macdonald, M., Sapkota, B.R., Spencer, J.S., Thomas, J., Harshman, K., Singh, P., Busso, P., Gattiker, A., Rougemont, J., Brennan, P.J. & Cole, S.T., 2009, Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*, *Nature genetics*, 41(12), pp. 1282-9.

Montoya, D., Cruz, D., Teles, R., Lee, D.J., Ochoa, M.T., Krutzik, S.R., Chun, R., Schenk, M., Zhang, X. & Ferguson, B.G., 2009, Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy, *Cell host & microbe*, 6(4), pp. 343-53.

Moraes, M.O., Cardoso, C.C., Vanderborght, P.R. & Pacheco, A.G., 2006, Genetics of host response in leprosy, *Leprosy review*, 77(3), p. 189.

Moraes, M.O., Sarno, E.N., Almeida, A.S., Saraiva, B.C.C., Nery, J.A.C., Martins, R.C.L. & Sampaio, E.P., 1999, Cytokine mRNA Expression in Leprosy: A Possible Role of Interferon- and Interleukin-12 in Reactions (RR and ENL), *Scandinavian journal of immunology*, 50, pp. 541-9.

Moreira, A.L., Sampaio, E, Zmuidzinas, A., Frindt, P., Smith, K.A., Kaplan, G., 1993, Thalidomide Exerts Its Inhibitory Action on Tumor Necrosis Factor alpha by Enhancing mRNA Degradation, *Journal of Experimental Medicine*, 177, p. 1675-1680.

Morrissey, T.K., Kleitman, N. & Bunge, R.P., 1991, Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve, *The Journal of neuroscience*, 11(8), p. 2433.

Moura, R.S., Calado, K.L., Oliveira, M.L.W. & Bühner-Sékula, S., 2008, Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(Suplemento II), pp. 11-8.

Mukherjee, R. & Antia, N.H., 1985, Migration and proliferation of Schwann cells in adult human leprosy nerve cultures, *Leprosy review*, 56(4), pp. 321-30.

Murthy, P.K., 2004, Current epidemiology of leprosy, *Journal of the Indian Medical Association*, 102(12), p. 672.

Nagarajan, R., Le, N., Mahoney, H., Araki, T. & Milbrandt, J., 2002, Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), p. 8998.

Nakamura, K., Akama, T., Bang, P.D., Sekimura, S., Tanigawa, K., Wu, H., Kawashima, A., Hayashi, M., Suzuki, K. & Ishii, N., 2009, Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*, *Microbial pathogenesis*, 47(3), pp. 183-7.

Nery, J.A.C., Vieira, L.M.M., Matos, H.J., Gallo, M.E.N. & Sarno, E.N., 1998, Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40(6).

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

Oliveira, R.B., Ochoa, M.T., Sieling, P.A., Rea, T.H., Rambukkana, A., Sarno, E.N. & Modlin, R.L., 2003, Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy, *Infection and immunity*, 71(3), p. 1427.

Organização Mundial da Saúde, (OMS), 2009, Global leprosy situation 2009, *Wkly Epidemiol Rec*, 84, pp. 333-40.

Perry, A.K., Gang, C., Zheng, D., Hong, T. & Cheng, G., 2005, The host type I interferon response to viral and bacterial infections, *Cell research*, 15(6), pp. 407-22.

Pocaterra, L., Jain, S., Reddy, R., Muzaffarullah, S., Torres, O., Suneetha, S. & Lockwood, D.N., 2006, Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 74(5), pp. 868-79.

Rambukkana, A., 2010, Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria, *Progress in neurobiology*, 91(2), pp. 102-7.

Rambukkana, A., 2004, *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration, *Current opinion in immunology*, 16(4), pp. 511-8.

Rambukkana, A., Zanazzi, G., Tapinos, N. & Salzer, J.L., 2002, Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells, *Science (New York, N.Y.)*, 296(5569), pp. 927-31.

Rambukkana, A., 2001, Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*, *Current opinion in microbiology*, 4(1), pp. 21-7.

Rambukkana, A., Yamada, H., Zanazzi, G., Mathus, T., Salzer, J.L., Yurchenco, P.D., Campbell, K.P. & Fischetti, V.A., 1998, Role of  $\alpha$ -dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*, *Science*, 282(5396), p. 2076.

Rambukkana, A., Salzer, J.L., Yurchenco, P.D. & Tuomanen, E.I., 1997, Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-[ $\alpha$ ] 2 chain, *Cell*, 88(6), pp. 811-21.

Rebouillat, D., Marie, I. & Hovanessian, A.G., 1998, Molecular cloning and characterization of two related and interferon-induced 56-kDa and 30-kDa proteins highly similar to 2'-5' oligoadenylate synthetase, *European Journal of Biochemistry*, 257(2), pp. 319-30.

Ridley, D.S. & Jopling, W.H., 1966, Classification of leprosy according to immunity: a five-group system, *Int J Lepr*, 34.

Ritz, C. & Spiess, A.N., 2008, qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis, *Bioinformatics*, 24(13), p. 1549.

Robbins, G., Tripathy, V.M., Misra, V.N., Mohanty, R.K., Shinde, V.S., Gray, K.M. & Schug, M.D., 2009, Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.), *PloS one*, 4(5), p. e5669.

Rudeeaneksin, J., Srisungngam, S., Sawanpanyalert, P., Sittiwakin, T., Likanonsakul, S., Pasadorn, S., Palittapongarnpim, P., Brennan, P.J. & Phetsuksiri, B., 2008, LightCycler™ real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54(2), pp. 263-70.

Rutkowski, J.L., Tennekoon, G.I. & McGillicuddy, J.E., 1992, Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves, *Annals of neurology*, 31(6), pp. 580-6.

Ryan, J.J., Klein, K.A., Neuberger, T.J., Leftwich, J.A., Westin, E.H., Kauma, S., Fletcher, J.A., DeVries, G.H. & Huff, T.F., 1994, Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis, *Journal of neuroscience research*, 37(3), pp. 415-32.

Sampaio, E.P., Hernandez, M.O., Carvalho, D.S. & Sarno, E.N., 2002, Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit *M. leprae*-induced TNF [alpha] production in vitro, *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 56(1), pp. 13-9.

Sampaio, E.P., Kaplan, G., Miranda, A., Nery, J.A.C., Miguel, C.P., Viana, S.M. & Sarno, E.N., 1993, The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum, *Journal of Infectious Diseases*, 168(2), p. 408.

Santos, A.R., Suffys, P.N., Vanderborght, P.R., Moraes, M.O., Vieira, L.M.M., Cabello, P.H., Bakker, A.M., Matos, H.J., Huizinga, T.W.J. & Ottenhoff, T.H.M., 2002, Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interleukin-10 Promoter Gene Polymorphisms in Leprosy, *Journal of Infectious Diseases*, 186(11), p. 1687.

Sarraf, S.A. & Stancheva, I., 2004, Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly, *Molecular cell*, 15(4), pp. 595-605.

Schlesinger, L.S. & Horwitz, M.A., 1991, Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes, *The Journal of experimental medicine*, 174(5), p. 1031.

Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G. & Rauscher, F.J., 2002, SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins, *Genes & development*, 16(8), p. 919.

Scollard, D.M., Adams, L.B., Gillis, T.P., Krahenbuhl, J.L., Truman, R.W. & Williams, D.L., 2006, The continuing challenges of leprosy, *Clinical microbiology reviews*, 19(2), pp. 338-81.

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

Shepard, C., 1960, The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice, *Journal of Experimental Medicine*, 112(3), pp. 445-54.

Shetty, V.P., Suchitra, K., Uplekar, M.W. & Antia, N.H., 1997, Higher incidence of viable *Mycobacterium leprae* within the nerve as compared to skin among multibacillary leprosy patients released from multidrug therapy, *Leprosy review*, 68(2), p. 131.

Shimoji, Y., Ng, V., Matsumura, K., Fischetti, V.A. & Rambukkana, A., 1999, A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), p. 9857.

Silva, T.P., Silva, A.C., Baruque, M., Oliveira, R.B., Machado, M.P. & Sarno, E.N., 2008, Morphological and functional characterizations of Schwann cells stimulated with *Mycobacterium leprae*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(4), pp. 363-9.

Simon, R., Radmacher, M.D. & Dobbin, K., 2002, Design of studies using DNA microarrays, *Genetic Epidemiology*, 23(1), pp. 21-36.

Smyth, G.K., 2004, Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3(1), p. 3.

Stinear, T.P., Seemann, T., Pidot, S., Frigui, W., Reysset, G., Garnier, T., Meurice, G., Simon, D., Bouchier, C. & Ma, L., 2007, Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer, *Genome research*, 17(2), p. 192.

Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L., Steinborn, R., Kolbe, T., Unger, H., Chakraborty, T., Levy, D.E. & Müller, M., 2002, Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*, *The Journal of Immunology*, 169(11), p. 6522.

Storrs, E.E., Walsh, G.P., Burchfield, H.P. & Binford, C.H., 1974, Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research, *Science*, 183(4127), p. 851.

Su, Z., Li, Z., Chen, T., Li, Q., Fang, H., Ding, D., Ge, W., Ning, B., Hong, H. & Perkins, R., 2011, Comparing Next-Generation Sequencing and Microarray Technologies in a Toxicological Study of the Effects of Aristolochic Acid on Rat Kidneys, *Chemical Research in Toxicology*.

Su, X., Yee, L.J., Im, K., Rhodes, S.L., Tang, Y., Tong, X., Howell, C., Ramcharran, D., Rosen, H.R., Taylor, M.W., Liang, T.J., Yang, H. & Virahep-C Study Group, 2008, Association of single nucleotide polymorphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C, *Journal of hepatology*, 49(2), pp. 184-91.

Tapinos, N., Ohnishi, M. & Rambukkana, A., 2006, ErbB2 receptor tyrosine

kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli, *Nature medicine*, 12(8), pp. 961-6.

Tapinos, N. & Rambukkana, A., 2005, Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), p. 9188.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E., 1999, Housekeeping genes as internal standards: use and limits, *Journal of biotechnology*, 75(2-3), pp. 291-5.

t' Hoen, P.A.C., Ariyurek, Y., Thygesen, H.H., Vreugdenhil, E., Vossen, R.H.A.M., De Menezes, R.X., Boer, J.M., Van Ommen, G.J.B. & Den Dunnen, J.T., 2008, Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms, *Nucleic acids research*, 36(21), p. e141.

t' Hoen, P.A.C., de Kort, F., van Ommen, G.J.B. & den Dunnen, J.T., 2003, Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications, *Nucleic acids research*, 31(5), p. e20.

Trautman, J.R., 1984, A brief history of Hansen's disease, *Bull, NY Acad. Med*, 60, pp. 689-95.

Truman, R.W. & Krahenbuhl, J.L., 2001, Viable *M. leprae* as a research reagent, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, 69(1), pp. 1-12.

Truman, R.W., Andrews, P.K., Robbins, N.Y., Adams, L.B., Krahenbuhl, J.L. & Gillis, T.P., 2008, Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(11), p. e328.

Truman, R.W., Singh, P., Sharma, R., Busso, P., Rougemont, J., Paniz-Mondolfi, A., Kapopoulou, A., Brisse, S., Scollard, D.M. & Gillis, T.P., 2011, Probable zoonotic leprosy in the southern United States, *New England Journal of Medicine*, 364(17), pp. 1626-33.

Tseng, G.C., Oh, M.K., Rohlin, L., Liao, J.C. & Wong, W.H., 2001, Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects, *Nucleic acids research*, 29(12), p. 2549.

Tusher, V.G., Tibshirani, R. & Chu, G., 2001, Significance analysis of

microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(9), p. 5116.

Van Beers, S.M., Hatta, M. & Klatser, P.R., 1999, Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 67(2), p. 119.

Vanderborght, P.R., Matos, H.J., Salles, A.M., Vasconcellos, S.E., Silva-Filho, V.F., Huizinga, T.W.J., Ottenhoff, T.H.M., Sampaio, E.P., Sarno, E.N. & Santos, A.R., 2004, Single nucleotide polymorphisms (SNPs) at-238 and-308 positions in the TNF $\alpha$  promoter: Clinical and bacteriological evaluation in leprosy, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*, 72(2), pp. 143-8.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome biology*, 3(7), p. research0034.

van de Vosse, E., Hoeve, M.A. & Ottenhoff, T.H.M., 2004, Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae, *The Lancet infectious diseases*, 4(12), pp. 739-49.

van't Veer, Hongyue, van de Vijver, He, Hart, Mao, Peterse, van der Kooy, Matthew, Witteveen, Schreiber, Kerkhoven, Roberts, Linsley, Bernards & Friend, 2002, Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature*, 415, pp. 530-6.

Vissa, V.D. & Brennan, P.J., 2001, The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set, *Genome biology*, 2(8).

Vives-Bauza, C., de Vries, R.L.A., Tocilescu, M. & Przedborski, S., 2010, PINK1/Parkin direct mitochondria to autophagy, *Autophagy*, 6(2), pp. 315-6.

Walker, S.L. & Lockwood, D.N.J., 2006, The clinical and immunological features of leprosy, *British medical bulletin*, 77(1), p. 103.

Warrington, J.A., Nair, A., Mahadevappa, M. & Tsyganskaya, M., 2000, Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes, *Physiological genomics*, 2(3), p. 143.

Williams, D.L., Pittman, T.L., Deshotel, M., Oby-Robinson, S., Smith, I. &

Husson, R., 2007, Molecular basis of the defective heat stress response in *Mycobacterium leprae*, *Journal of bacteriology*, 189(24), pp. 8818-27.

Williams, D.L., Slayden, R.A., Amin, A., Martinez, A.N., Pittman, T.L., Mira, A., Mitra, A., Nagaraja, V., Morrison, N.E., Moraes, M. & Gillis, T.P., 2009, Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*, *BMC genomics*, 10, p. 397.

Woo, Y., Affourtit, J., Daigle, S., Viale, A., Johnson, K., Naggert, J. & Churchill, G., 2004, A comparison of cDNA, oligonucleotide, and Affymetrix GeneChip gene expression microarray platforms, *Journal of biomolecular techniques: JBT*, 15(4), p. 276.

Workman, C., Jensen, L.J., Jarmer, H., Berka, R., Gautier, L., Nielser, H.B., Saxild, H.H., Nielsen, C., Brunak, S. & Knudsen, S., 2002, A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments, *Genome biology*, 3(9), pp. 1-16.

Yakub, I., Lillibridge, K.M., Moran, A., Gonzalez, O.Y., Belmont, J., Gibbs, R.A. & Tweardy, D.J., 2005, Single nucleotide polymorphisms in genes for 2'-5'-oligoadenylate synthetase and RNase L in patients hospitalized with West Nile virus infection, *The Journal of infectious diseases*, 192(10), pp. 1741-8.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M. & Takeda, K., 2003a, Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway, *Science*, 301(5633), p. 640.

Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S., 2003b, TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway, *Nature immunology*, 4(11), pp. 1144-50.

Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K. & Akira, S., 2002, Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the Toll-like receptor signaling, *The Journal of Immunology*, 169(12), p. 6668.

Yamamura, M., Uyemura, K., Deans, R.J., Weinberg, K., Rea, T.H., Bloom, B.R. & Modlin, R.L., 1991, Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions, *Science*, 254(5029), p. 277.

Yan, N., Ricca, C., Fletcher, J., Glover, T., Seizinger, B.R. & Manne, V., 1995, Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type I (NF1) malignant phenotype, *Cancer research*, 55(16), p. 3569.



Yang, Y.H., Buckley, M.J. & Speed, T.P., 2001, Analysis of cDNA microarray images, *Briefings in bioinformatics*, 2(4), p. 341.

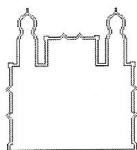
Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J. & Speed, T.P., 2002, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation, *Nucleic acids research*, 30(4), p. e15.

Ye, S., Guo, Q., Tang, J.P., Yang, C.D., Shen, N. & Chen, S.L., 2007, Could 2'5'-oligoadenylate synthetase isoforms be biomarkers to differentiate between disease flare and infection in lupus patients? A pilot study, *Clinical rheumatology*, 26(2), pp. 186-90.

Zhang, F.R., Huang, W., Chen, S.M., Sun, L.D., Liu, H., Li, Y., Cui, Y., Yan, X.X., Yang, H.T. & Chu, T.S., 2009, Genomewide association study of leprosy, *New England Journal of Medicine*, 361(27), pp. 2609-18.

## **9. ANEXOS**

## ANEXO I: Parecer do Comit  de  tica em Pesquisa



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMIT  DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 18 de julho de 2005.

### PARECER

**Título do Projeto:** "Novas Abordagens no estudo molecular e genético para compreender a Lesão de Nervo na Hanseníase"

**Protocolo CEP:** 151/01

**Pesquisador Responsável:** Euzenir Nunes Sarno

**Institui o:** IOC

**Delibera o:** APROVADO

Foi submetido   aprecia o do CEP/FIOCRUZ, adendo do projeto supra mencionado.

Por se tratar da continuidade de um projeto com significativa contribui o científica e por não apresentar fatos novos que indiquem desacordos com a Resolu o 196/96, foram aprovados o relatório e a emenda.

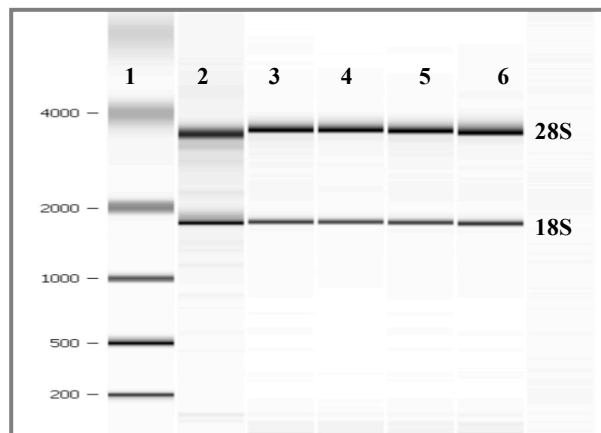
Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modifica o ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida   aprecia o do CEP/FIOCRUZ.

José Luiz Telles de Almeida  
Coordenador do Comit  de  tica em Pesquisa em Seres Humanos  
Fundação Oswaldo Cruz

## **ANEXO II: Avaliação da Qualidade das Preparações de RNA**

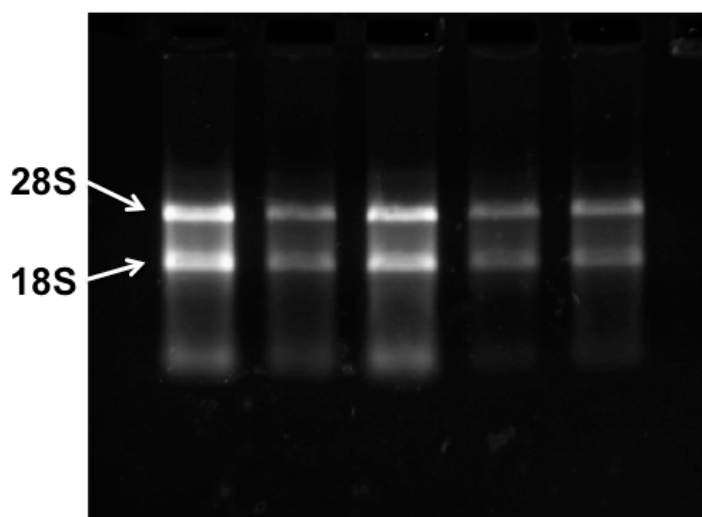
A primeira etapa no controle de qualidade experimental em microarranjos é a verificação da pureza e da integridade do RNA obtido a partir das amostras do estudo. Após a extração, o RNA é extremamente instável e sensível a degradação pela ação de nucleases. Além disso, a qualidade do RNA tem influência direta na validade e replicabilidade de dados de microarranjos e de RT-PCR quantitativo. Por esses motivos, o controle da qualidade do RNA é apontado como etapa crítica aos ensaios de microarranjos e RT-PCR em tempo real. Como controle de qualidade, compreende-se a análise da pureza e da integridade do RNA. A pureza do RNA é obtida durante a quantificação em espectrofotômetro onde são comparadas as absorbâncias nos comprimentos de onda 260 nm (ácidos nucleicos), 280 nm (proteínas), 230 nm (compostos orgânicos). Ressaltamos que todos os RNAs utilizados neste estudo apresentaram razões maiores ou iguais àquelas usualmente recomendadas ( $A_{260/280} \geq 2,0$ ;  $A_{260/230} \geq 1,8$ ).

A integridade do RNA é medida através de corrida eletroforética onde as diferentes subunidades do RNA ribossomal (28S e 18S) são separadas e visualizadas. O RNA extraído de células de Schwann tiveram sua integridade verificada pelo Bioanalyzer. O equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent) consiste em uma avançada tecnologia para avaliação da integridade de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas) através de uma cromatografia em micro-colunas. Partindo de uma quantidade muito pequena de amostra (variando de pico a nanogramas) o aparelho retorna dados digitais de alta precisão de forma automatizada. A confiabilidade e reprodutibilidade, aliada à necessidade de pouca quantidade de amostra, superam enormemente as técnicas convencionais de eletroforese usadas para a mesma finalidade. Através da colaboração com o National Hansen's Disease Program (NHDP), tivemos a oportunidade de utilizar este aparelho, ainda inexistente na Fiocruz, no controle de qualidade dos RNAs utilizados nos estudos por microarranjos. Todas as amostras apresentaram grau máximo de qualidade (RNA Integrity Number = 10), além de exibirem razão entre os RNAs ribossomais 28S/18S  $\geq 1,7$ . A imagem digital da qualidade das amostras gerada pelo Bioanalyzer a partir dos cromatogramas pode ser vista na figura 9.1.



**Figura 9.1: Avaliação pelo Bioanalyzer da qualidade dos RNAs extraído de células de Schwann primárias humanas.** 1) marcador de peso molecular, 2) controle positivo, 3) C-24, 4) I-24, 5) C-48, 6) I-48.

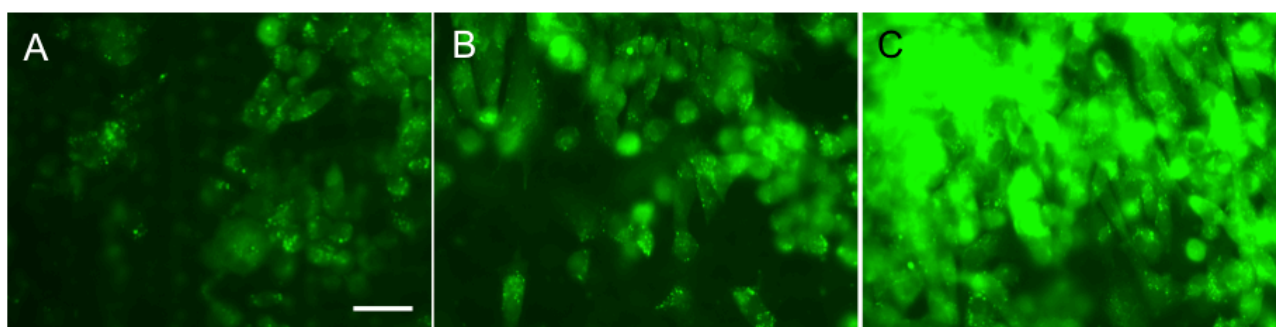
Os demais RNAs extraídos de biópsias de nervo, tiveram sua qualidade verificada por eletroforese em gel de agarose. Foram transcritos em cDNA apenas aqueles cujos fragmentos esperados estivessem nítidos (28S e 18S) e que apresentassem ausência de rastro de degradação (Figura 9.2, a, b).



**Figura 9.2: Avaliação por eletroforese em gel de agarose da qualidade do RNA extraído de biópsias de nervo.** Imagens representativas. Setas indicam os fragmentos esperados do RNA ribossomal (28S e 18S).

### ANEXO III: Resultados de ensaios de captação de glicose pelas linhagens de células de Schwann ST88-14

Resultados preliminares sugerem que *M. leprae* morto induz a captação de glicose na linhagem de células de Schwann ST88-14 e que esse efeito é dose dependente, ou seja, quanto maior a multiplicidade de infecção, maior a captação de glicose por essas células (Figura 9.3). Os ensaios foram realizados através da detecção da fluorescência emitida pelo análogo fluorescente da glicose, o 2-NBDG (2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose).



**Figura 9.3: Ensaio de captação de 2-NBDG por células ST88-14** controle (A) e infectadas por *M. leprae* morto por um M.O.I de 1:10 (B) e de 1:50 (C). Imagens representativas. Experimento realizados em triplicata e fotos tiradas de 10 campos por lamínula. Barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ .



Contents lists available at ScienceDirect

## Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

## *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: Influence of successive *in vitro* cultivation on the expression of promastigote proteinases

Karina Mastropasqua Rebello<sup>a</sup>, Constança Britto<sup>a</sup>, Bernardo Acácio Santini Pereira<sup>a</sup>, Daniela de Pita-Pereira<sup>a</sup>, Milton Ozório Moraes<sup>b</sup>, Anna Beatriz Robottom Ferreira<sup>b</sup>, Léa Cysne-Finkelstein<sup>c</sup>, Thomas Dan Otto<sup>d</sup>, Luzia Monteiro de Castro Côrtes<sup>a</sup>, Gabriel Gomes da-Silva<sup>a</sup>, Carlos Roberto Alves<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 August 2009

Received in revised form 1 June 2010

Accepted 2 June 2010

Available online 8 June 2010

## Keywords:

*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*  
Cysteine proteinases  
Cathepsin L-like, *trans*-epoxysuccinyl *L*-  
leucylamido-(4-guanidino)butane  
pGlu-Phe-Leu-p Nitroanilide  
Real-time PCR

## ABSTRACT

Cysteine proteinases are an important virulence factor in *Leishmania* parasites. In this study we analyzed the cysteine proteinase expression of infective *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes, examining the expression induced by successive *in vitro* passages in culture. We observed that this parasite presents a decrease in its virulence over BALB/c macrophages, after successive passages in culture, but still they present proteinase activity, being capable of hydrolyzing the substrate pGlu-Phe-Leu-p Nitroanilide at pH 7.0. This proteinase activity also decreases in the course of the successive passages. Additionally, the decrease in the amount of CPB proteins following successive passages of promastigotes was verified by immunoblotting assays, using an anti-CPB antiserum. Real-time PCR assays were performed to assess the relative *cpb* expression when compared to a housekeeping gene in promastigote cDNA preparations from the first, fourth and seventh passages. Interestingly, the data indicate a relative increase in *cpb* gene transcripts as the promastigotes were maintained under *in vitro* culture: 2.2 times higher for fourth and 2.7 times higher for seventh passages when compared to the first passage. Thus, the information gathered here shows that the expression of cysteine proteinases is modified during *in vitro* cultivation of *L. (V.) braziliensis* promastigotes.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Leishmania* spp. are protozoa that live as extracellular promastigotes within the insect vector and as intracellular amastigotes in mammalian host cells (Bates and Rogers, 2004). Some species of these parasites are responsible for a broad spectrum of clinical manifestations in humans, ranging from self-healing skin lesions to fatal visceralizing leishmaniasis, depending on the species and host factors (Desjeux, 2004). In Brazil, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is considered the most frequent causative agent of American cutaneous leishmaniasis (ACL) and mucocutaneous leishmaniasis. In recent decades the incidence of new cases of periurban and urban ACL continues increasing in Brazil without control (Olivier et al., 2005). Leishmaniasis is transmitted during the blood meal of phlebotomine sandflies and affects human and domestic animals, like dogs (Coutinho et al., 1985), turning them into an impor-

tant source of infection (Lainson and Shaw, 1998). The current treatment involves antimonials, which uses multiple injections, is expensive and can be toxic (Berman et al., 1997; Deps et al., 2000).

The success of *Leishmania* spp. life cycle is dependent on the genes that are differentially expressed between mammals and invertebrate hosts and encode proteins such as proteinases are implicated in host–pathogen interactions and parasite survival – virulence factors. A recent study comparing gene sequences from *L. (L.) infantum* and *L. (V.) braziliensis* with the published *L. (L.) major* genome reveals a broad spectrum of conservation and identifies about two hundred genes with a differential expression between the three species (Peacock et al., 2007). This finding was also substantially reinforced for the *Leishmania* spp. main surface protease (GP63), an enzyme that facilitates the parasite evasion from complement-mediated killing, phagocytosis by macrophages and intracellular survival in macrophage phagolysosomes (Yao et al., 2004). Although serine proteases have been identified in promastigotes from *L. (V.) braziliensis* (Guedes et al., 2007), their function in the parasite physiology and in host–parasite interaction are still unclear. The same being true for the aspartyl-proteinases of *Leishmania* spp. (Alves et al., 2005; Yao et al., 2007).

\* Corresponding author. Address: Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, CP 926, Manguinhos, Rio de Janeiro 21045-900, RJ, Brazil. Fax: +55 21 2590 3495.

E-mail addresses: [calves@ioc.fiocruz.br](mailto:calves@ioc.fiocruz.br), [calves@pq.cnpq.br](mailto:calves@pq.cnpq.br) (C.R. Alves).

In general, cysteine proteinases (CPs) from *Leishmania* spp. have been reported as virulent factors (Sajid and McKerrow, 2002); however, in *L. (V.) braziliensis* their functional activity is yet to be adequately characterized. As in other species, *L. (V.) braziliensis* genome revealed two principal types of CP sequences: cathepsin B-like and cathepsin L-like. In other characterized *Leishmania* species, CPs are organized in three distinct loci: CPA, CPB and CPC. CPA and CPC are presented as single copy genes although CPB is represented as a multigene tandem array (Mottram et al., 1998, 2004). In the amastigotes, CPs are associated with several pathogenic factors in leishmaniasis (Hide et al., 2007), and also act directly in processes which are essential for the success of the infection (Mahmoudzadeh-Niknam and McKerrow, 2004), such as autophagy and differentiation (Williams et al., 2006). Furthermore, in *L. (V.) braziliensis* some homologs of CPB enzymes are implicated with the membrane surface of promastigotes and may be important in the catalysis of protein substrates in the sand fly gut environment (Rebello et al., 2009).

In the present study we analyzed cysteine proteinases expression of infective *L. (V.) braziliensis* promastigotes, examining the expression induced by successive *in vitro* passages in culture. Additionally, we hypothesized that long period under *in vitro* culture can modulate CP gene expression in promastigotes – being associated with parasite adaptation. This research is focused on correlation between virulence and changes in the parasite proteinase profile.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and culture reagents

3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiothreitol (DTT), substrate pGlu-Phe-Leu-p Nitroanilide (pEFLpNan;  $\Delta E = 10.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\lambda = 405 \text{ nm}$ ), inhibitor of cysteine proteinases (CP) [*L-trans*-epoxysuccinyl-*L-leucyl*amido-(4-guanidino)butane (E-64)], inhibitor of serine proteinase (SP) [phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)], inhibitor of metalloproteinase (MP) [1,10-Phenanthroline (*O*-Phe)], inhibitor of aspartic proteinases [pepstain A (Pep A)], bovine serum albumin (BSA), dithiothreitol (DTT), horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (rHRP-IgG), anti-mouse IgG (mHRP-IgG), anti- $\alpha$ -tubulin antibody produced in mouse, molecular mass markers, RPMI 1640 medium, *N*-(2-hydroxyethyl) piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid) [HEPES], *L*-glutamine, penicillin, streptomycin, pyruvate, AB + Human Serum (HS), May-Grünwald-Giemsa solution (MGG) and Trizol reagent were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Cultilab S/A (Brazil); Brain Heart Infusion (BHI) was purchased from Oxoid (West Heidelberg, Vic., Australia); SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR was purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA); and, SYBR Green PCR master mix was purchased from Applied Biosystems (Foster City, California). The reagents for chemiluminescence detection were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, USA).

### 2.2. Parasite culture and protein extraction

Promastigote forms of *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/1998/619) were obtained from stationary-phase (approximately  $5 \times 10^7$  cells/mL) cultivated in BHI medium supplemented with 10% (v/v) FCS at 28 °C. The parasites were washed three times (3000g, 15 min, 5 °C) in phosphate buffer saline, pH 7.2, (PBS) and lysed in 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 1% (w/v) CHAPS (120 min at 4 °C). The soluble proteins (crude extract) were recovered by

centrifugation (10,000g, 20 min, 4 °C) and stored at –70 °C. Protein concentration was determined as previously described by Lowry et al. (1951), using a BSA standard curve.

Metacyclic promastigotes were obtained by incubation (45 min at 34 °C) of stationary-phase promastigotes ( $10^7$  parasites/mL) from in a humid bath, with 2% (v/v) of human serum. Afterwards, the cells were maintained on ice for counting of parasites resistant to HS (metacyclic forms) in a Neubauer chamber.

### 2.3. Murine macrophage culture

Murine peritoneal macrophages obtained from 6 to 8 week old BALB/c mice were collected in cold serum-free RPMI 1640 medium, supplemented with 1 mmol/L *L*-glutamine, 1 mol/L HEPES, 100 U penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 1 mmol/L pyruvate and seeded on tissue plate wells containing a round coverslip ( $5 \times 10^5$  cells/well) and then incubated for 2 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Non adherent cells were removed by washing with RPMI 1640 and 5% (v/v) of heat-inactivated FCS. The cells were maintained under the same culture conditions for 24 h before infection assays.

### 2.4. Experimental infection of mouse macrophage

These assays were performed to evaluate the infectivity of promastigotes forms maintained in culture. Briefly,  $2 \times 10^8$  promastigotes obtained from successive *in vitro* passages (first, fourth and seventh passages) were washed in the culture medium, resuspended in medium with 1% (v/v) of heat-inactivated FCS added and incubated overnight with peritoneal adherent cells (10 parasites/cell,  $5 \times 10^6$ /well) in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C. After this period, free parasites were removed by washing the monolayers with the culture medium. Infected macrophages were maintained in RPMI 1640 with 10% (v/v) heat-inactivated FCS for 24 h. Coverslips were fixed in methanol and stained with MGG. The development of infection was assayed by quantifying the number of infected macrophages and the number of parasites per macrophage. The infection data were expressed as amastigotes per macrophage. Each experiment was performed in triplicate.

### 2.5. Determination of proteinase activity

Enzymatic activity assays were performed as described by Alves et al. (2005). Briefly, 5 µg of crude extract was resuspended in an activation buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.0), containing 1 mM DTT and 1% (w/v) CHAPS and incubated (30 min at 25 °C) with 0.1 mM pEFLpNan, in a final volume of 400 µL. Inhibition assays were performed with previous incubation (5 min at 25 °C) of crude extract with different inhibitors: 10 mM of *O*-Phe, 10 µM of Pep A, 10 µM of E-64 and 1.0 mM of PMSF. The absorbance fluctuation at 405 nm was monitored in a spectrophotometer (Ultrospec 1100 pro – GE Healthcare Life Sciences) for 30 min (when the substrate reaction became linear) and the velocity of the reaction (enzymatic activity) was defined by the formula  $v = (s - s_0)/(t - t_0)$ , where  $v$  = velocity,  $(s - s_0)$  = final substrate concentration subtracted from the initial substrate concentration and  $(t - t_0)$  = final time subtracted from the initial time. The assays were controlled by verifying the auto-release of the chromogenic conjugates during the same time interval. The enzymatic activity was expressed in  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg of protein}^{-1}$  and represented the mean value  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

### 2.6. Immunoblotting

Crude extracts (30 µg) were separated by SDS-PAGE using the Laemmli system (Laemmli, 1970) and the fractionated proteins were



electro-transferred from the gel onto 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane, according to Towbin et al. (1979). The membrane was blocked overnight at 4 °C in blocking buffer containing 5% (w/v) skimmed milk in PBS and 0.5% (v/v) Tween 20 (2 h at 25 °C). The nitrocellulose membrane was washed three times with PBS containing 0.5% (v/v) Tween 20 (PBST) following incubation (1 h at 25 °C) with primary antibody anti-CPB (Alves et al., 2005) in PBST (1:500). As a control, we used anti- $\alpha$ -tubulin antibody (1:2000) in PBST. After that, the membrane was washed six times with PBST and then incubated (1 h at 25 °C) with rHRP-IgG (1:2000) and mHRP-IgG (1:30,000 dilution). Following the additional six washing steps with PBST, bound antibodies were detected by chemiluminescence after exposing the membrane to X-ray film.

### 2.7. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was prepared by guanidine isothiocyanate extraction followed by precipitation with lithium chloride (Chomczynski and Sacchi, 1987). Briefly, stationary-phase promastigotes ( $10^7$  parasites/mL) were lysed with 1 mL Trizol and 200  $\mu\text{L}$  chloroform. After homogenization, the tubes were incubated (5 min at 25 °C) and centrifuged (12,000g, 15 min, 25 °C). The supernatants (RNA) were mixed with isopropanol (500  $\mu\text{L}$ ) and left to sediment at a low temperature (12 h at –70 °C). Later, the RNA was recovered by centrifugation (14,000g, 20 min, 4 °C) and the new precipitate was washed in 70% ethanol (500  $\mu\text{L}$ ) and centrifuged (7500g, 8 min, 4 °C). RNA was resuspended in 240  $\mu\text{L}$  of RNase free water and preparations were heated (10 min at 60 °C) and precipitated with 2.5 M LiCl<sub>2</sub> (30 min at 20 °C). The samples were subsequently centrifuged (13,000g, 4 °C, 20 min) and the precipitate was washed with 70% ethanol by centrifugation (13,000g for 15 min). Finally, all samples were recovered in 10  $\mu\text{L}$  of DNase free water (1 U/ $\mu\text{L}$ ) and the concentrations were measured by spectrophotometry at 260 nm. The RNA integrity was evaluated by denaturing-agarose gel electrophoresis 1.2% (w/v) stained with ethidium bromide. The cDNA was synthesized using the SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (1  $\mu\text{g}$  of total RNA per sample) according to the manufacturer instructions (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) For each sample, an RT reaction without reverse transcriptase enzyme was carried out and subsequently tested in the PCRs for all primers combinations to check for DNA contamination in the extracted RNA samples.

### 2.8. Design of specific primers

Primer design was accomplished using the PerlPrimer program (<http://perlprimer.sourceforge.net/>) and it was based on the genomic sequences of *L. (V.) braziliensis* (available at [ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/L\\_braziliensis/](ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/L_braziliensis/)). Primers directed to the *cpb* genes LbrM8 – V2.0810, LbrM8 – V2.0820 and LbrM08 – V2.0830 were used in the real-time reverse transcriptase-PCR assays to amplify a 101 bp fragment from the intragenic regions. Primers for the  $\alpha$ -tubulin gene (LbrM13 – V2.0200) amplifying a 130 bp fragment, were employed as an endogenous control (constitutive expression) for the comparative analysis of CP gene expression. The primer sequences used in this study were:  $\alpha$ -tubulin sense – 5' TAT CTG CAT TCA CAT CGG 3' and antisense – 5' CGT CAT CCT CAA CAC CA 3'; *cpb* sense – 5' AAC TTC CAG CGT AAC CT 3' and antisense – 5' AAC TCT TCC TCC GAC AG 3'.

### 2.9. Conventional reverse transcriptase (RT)-PCR

Primers for the  $\alpha$ -tubulin and *cpb* genes were first tested for their specificity and performance in conventional RT-PCR. Conventional PCR assays were performed under the following reaction conditions: 1 mM Tris–HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>,

2.5 mM of each dNTP, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer and 1 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), together with 5  $\mu\text{L}$  of cDNA and adjusted to a final volume of 25  $\mu\text{L}$ . The amplification consisted of the following cycling profile: one step at 94 °C for 5 min, followed by 36 cycles (95 °C, 45 s; 60 °C, 45 s; 72 °C, 90 s), and a final elongation step (72 °C, 7 min) using a PTC-100 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The specificity of the amplified products was evaluated by 1.2% (w/v) agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

### 2.10. Sequencing of the *cpb* gene PCR product

The 101 bp fragment obtained by *cpb* gene amplification was eluted from a 2% (w/v) agarose gel and purified using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), according to the manufacturer's instructions. Sequences generated were compared with sequences available in GenBank using BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)).

### 2.11. Real-time RT-PCR

The real-time RT-PCR assays were performed in the ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reactions were carried out in the same volume used in conventional RT-PCR, containing 12.5  $\mu\text{L}$  2 $\times$  SYBR Green PCR master mix, 5  $\mu\text{L}$  cDNA (1:5) samples and 0.5  $\mu\text{mol}$  of each primer. The amplification and real-time detection consisted of the following cycling profile: one step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Non-template controls containing all reagents and without genetic material were included in all PCR assays to verify for occasional contamination or nonspecific reaction. In every assay the cDNA samples were tested in triplicates. The specificities of the amplified products were monitored by analyzing the corresponding dissociation curve generated for each amplicon. PCRs were repeated at least three times independently to ensure the reproducibility of the results.

The relative quantification of amplicons was defined by the difference between the threshold cycle ( $C_t$ ) values for the *cpb* gene transcripts and  $\alpha$ -tubulin transcripts, as follows:  $\Delta C_T = C_t(\textit{cpb}) - C_t(\alpha\text{-tubulin})$ . The  $C_t$  value was defined as the number of PCR cycles required for the fluorescence signal to exceed the detection threshold value (background noise). The results were expressed in  $2^{-\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

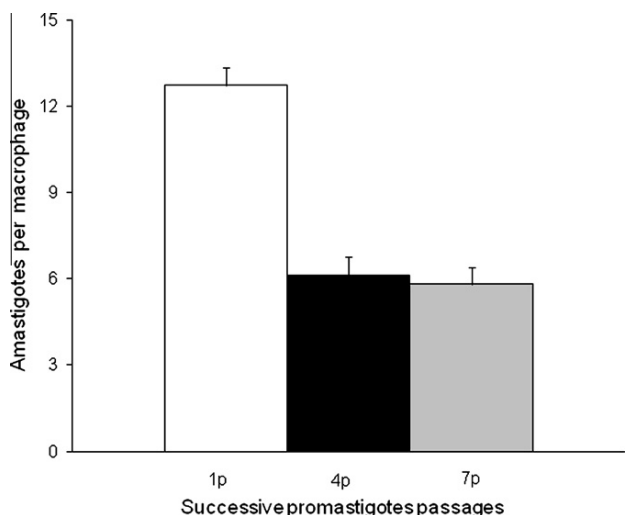
### 2.12. Statistical analysis

Statistical analysis were performed with the Graph Pad Prism<sup>®</sup> 4.0 (San Diego, USA) software. The data were analyzed for statistical significance using an unpaired Student's *t*-test, and considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. In vitro infectivity of *L. (V.) braziliensis* promastigotes

The infectivity of *L. (V.) braziliensis* promastigotes after successive passages was assessed by *in vitro* infection of BALB/c peritoneal macrophages. In the course of this work we verify that nearly 50% of the promastigotes were represented as metacyclic forms independent of *in vitro* passage number. These parasites were able to infect macrophages at different levels (Fig. 1). Parasites in the first culture passage showed a higher infection rate ( $12.7 \pm 1.17$ ) than those of the subsequent passages: fourth ( $6.14 \pm 0.58$ ) and seventh ( $5.82 \pm 0.55$ ), thus revealing a decrease

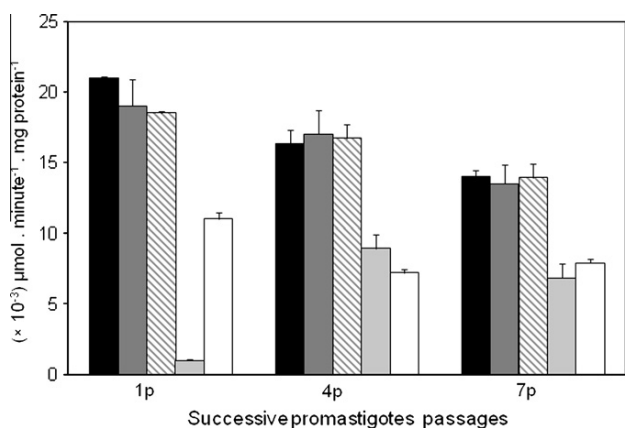


**Fig. 1.** *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection within mouse macrophages. In these assays verified the infectivity of metacyclic promastigotes obtained from first (1p), fourth (4p) and seventh (7p) passages from BHI medium supplemented with 10% (v/v) FCS at 28 °C. The infection assays were performed with  $5 \times 10^6$  macrophages/well and 10 metacyclic promastigotes/macrophage, for 24 h. The rate of infection was assessed by the percentage of amastigote per macrophage. Data are expressed as the average and standard deviation ( $\pm$ ) of three independent experiments.

in *L. (V.) braziliensis* promastigotes virulence after successive passages in culture.

### 3.2. Quantification of proteinase activities in protein extracts from *L. (V.) braziliensis* promastigotes after successive *in vitro* passages

These assays were performed using crude proteins extracts from *L. (V.) braziliensis* stationary-phase promastigotes after one, four or seven *in vitro* passages (Fig. 2). The results showed that all analyzed samples presented proteinase activity, as they were able to hydrolyze the substrate pEFLpNan – a synthetic peptide substrate for

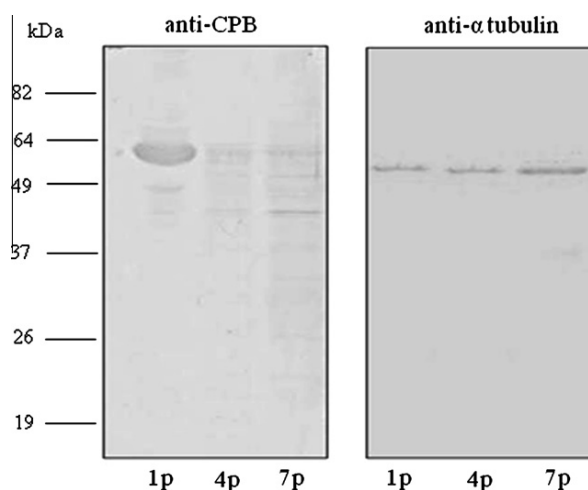


**Fig. 2.** Enzymatic activity assays for proteinases activities of protein extracts from *Leishmania (V.) braziliensis* promastigotes from stationary-phase. The assays were carried out with 5 μg of proteins using pEFLpNan (0.1 mM) as substrate, in activation buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0 containing 1 mM DTT and 1% (v/v) CHAPS). The assays were performed with promastigotes from the first (1p), fourth (4p) and seventh (7p) passages. The activities were assessed without (■) or with inhibitors: 10 μM O-Phe (▨), 10 μM of Pep A (■), 10 μM of E-64 (■) and 1.0 μM of PMSF (□). The data are expressed in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$  and are represented by the average and standard deviation ( $\pm$ ) of three independent experiments ( $p < 0.05$ ).

cysteine proteinases (CP) and serine proteinases (SP). We observed decrease in the enzymatic activity for each additional passage, with 24% less activity [ $16 \pm (0.9) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ;  $p = 0.001$ ] in the fourth passage, and 34% less activity [ $14 \pm (0.6) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ;  $p = 0.001$ ] in the seventh passage in comparison to the first one [ $21 \pm (1.0) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ]. The specificity of the peptidase assays was assessed by measuring the hydrolysis of substrate in the presence and absence of selective inhibitors. We verified that these proteinase activities were more strongly inhibited by E-64 [first passage: 96% of inhibition;  $20.1 \pm (0.1) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$ ; fourth passage: 54%;  $11.3 \pm (0.1) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$  and seventh passage: 52%;  $10.9 \pm (0.3) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$ ] than PMSF [first passage: 52% of inhibition;  $10.9 \pm (0.5) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$ , fourth passage: 34.3%;  $7.1 \pm (0.6) \text{nmol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$  and seventh passage: 38%;  $8.0 \pm (0.9) \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg of protein}^{-1}$ ]. These results indicated that both proteinase activities decreased with successive stationary-phase promastigotes *in vitro* passages. Furthermore, the analyses of the dynamic ratio of CP/SP activity suggested cysteine proteinase activity was higher than serine proteinase activity in all consecutive culturing points tested: first passage (1.8 $\times$ ), fourth passage (1.6 $\times$ ) and seventh passage (1.4 $\times$ ). Also, the hydrolysis of the substrate pEFLpNan was not affected by aspartic proteinase and metalloproteinase inhibitors (Fig. 2).

### 3.3. Detection of CPB in protein extracts from *L. (V.) braziliensis* promastigotes

Immunoblotting assays were performed to verify the presence of CPB in crude protein extracts of *L. (V.) braziliensis* promastigotes obtained from successive *in vitro* passages (Fig. 3). A protein band approximately 63 kDa was strongly reactive to the anti-CPB antiserum in the first passage, but this reactivity decreased in each subsequent *in vitro* passage tested. Also, additional protein bands (near 60 and 45 kDa) were detected by the antiserum only at the fourth and seventh passages (Fig. 3). Control samples incubated with anti- $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody showed that the expression levels of the constitutive protein band (55 kDa) did not vary at each subsequent *in vitro* passage tested (Fig. 3).



**Fig. 3.** Reactivity of anti-CPB and anti- $\alpha$ -tubulin antisera with *Leishmania (V.) braziliensis* promastigote crude protein extracts. The immunoblotting assay was performed with protein samples (30 μg) obtained from parasites in the first (1p), fourth (4p) or seventh (7p) *in vitro* passages. The bands containing the CPB and  $\alpha$ -tubulin proteins were revealed using a chemiluminescence kit. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). These results are representative of two independent experiments.

### 3.4. Relative expression of promastigote *cpb* gene during *in vitro* cultivation

The expression of the *L. (V.) braziliensis* promastigotes *cpb* gene family from the first, fourth and seventh *in vitro* passages was evaluated. As expected, the primers were specific for conserved region of the *L. (V.) braziliensis* multicopy CPB gene, amplifying a 101 bp fragment in all tested cDNA samples by the PCR (Fig. 4A). High identity rates with *L. (V.) braziliensis* cathepsin L-like protein (98%), *L. (L.) mexicana cpb* (86%) and *L. (L.) pifanoi cpb* (86%) were identified through BLAST analysis following sequencing of the *cpb* gene products (data not shown).

Real-time RT-PCR assays for assessing the relative expression of *cpb* in the cDNA samples obtained from each *in vitro* passage (1st, 4th and 7th) indicated a sequential increase in *cpb* transcripts in the samples from the first ( $C_t = 22.0 \pm 0.2$ ), fourth ( $C_t = 21.0 \pm 0.8$ ) and seventh ( $C_t = 20.0 \pm 0.10$ ) passages (Fig. 4B), using the  $\alpha$ -tubulin gene as the normalization factor ( $C_t = 16.0 \pm 0.3$ ). It was possible to verify a significant increase in *cpb* gene expression: 2.2 times higher ( $p = 0.009$ ) in the fourth passage and 2.7 times higher ( $p = 0.003$ ) in the seventh passage, when compared to the number of transcripts detected in the first passage sample. Dissociation curves were carried out to test for the specificity of each amplified product, which showed a single melting-temperature peak ( $T_m = 83^\circ\text{C}$  for *cpb* and  $T_m = 86^\circ\text{C}$  for  $\alpha$ -tubulin).

## 4. Discussion

The function of CPs in *Leishmania (V.) braziliensis* is not yet completely understood, especially with regard to roles in the adaptation to different environments within vertebrate and invertebrate hosts. It is believed that the main function of these enzymes is the catalytic cleavage of peptide bonds to provide nutritional necessities and, also, to process other proteins in both morphological stages of this parasite (Alves et al., 2001). Thus, studies directed to identify the biological role of these enzymes in promastigotes and amastigotes are necessary understand the

mechanism used by parasite for its adaptation to specific environments. In the present study, we propose that CPs from *L. (V.) braziliensis* may have their expression modulated, as well as their enzymatic activity, during successive *in vitro* passages of infective promastigotes, thus causing a decrease in virulence towards mice macrophages. Also, we verified that the percentage of metacyclic form promastigotes (50% in all *in vitro* passages) has no correlation to the changes in observed proteinase profile.

This finding was confirmed as the promastigotes crude extracts obtained from the fourth and seventh *in vitro* passages showed a reduction in their hydrolytic activity toward the substrate pEFLp-Nan when compared to promastigotes from the first *in vitro* passage. Although pEFLpNan is also a substrate for chymotrypsin-like serine proteinases (SP) activity (due to the Leu residue at P1), the analysis of the dynamic ratio of CP/SP suggested that the majority of the catalytic activity might be due to CPs.

Our data indicate that promastigotes of *L. (V.) braziliensis* submitted to such repetitive *in vitro* passages have different levels of CP expression, as evidenced by a decrease in the inhibitory activity of E-64 over the enzymatic activity of crude protein extract from the fourth and seventh passages (~50% of inhibition) when compared to the first passage (96% of inhibition).

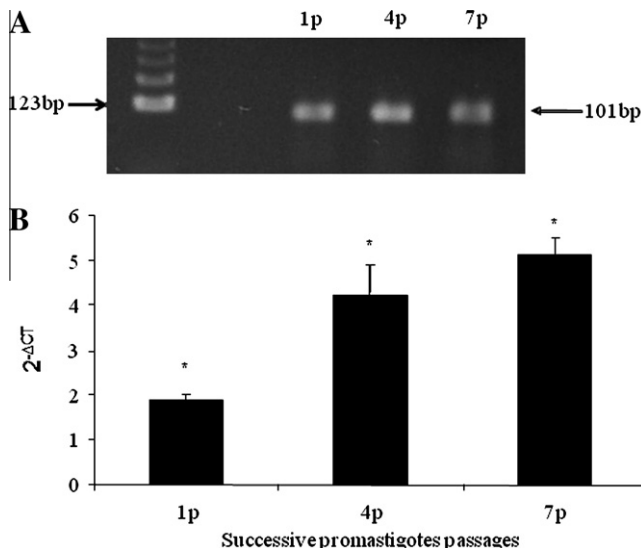
Proteins bands of approximately 63 and 43 kDa were detected by anti-CPB antiserum during prolonged *in vitro* culture. Recently, our group showed that 63 and 45 kDa bands are recognized by anti-CPB antiserum, and that they are localized on the cellular surface and in the flagellar pocket of *L. braziliensis* promastigotes (Rebello et al., 2009). These observations suggest that CPs play an important role in the interaction between parasites and host cells.

Generally, the CPs families are organized according to the amino acid composition of the catalytic center (<http://merops.sanger.ac.uk/> – Rawlings et al., 2008), meaning that microheterogeneities determine catalytic preferences for specific peptide bonds and, in the same manner, inhibitory specificity. In this context, it is notorious that E-64 is a specific irreversible inhibitor for several CPs, such as cathepsin K, cathepsin B, cathepsin H, actinidin, calpain, among others (Rawlings et al., 2008). However, other CPs are slowly inactivated by E-64 or are insensitive to its action, such as bromelin (Harrach et al., 1998) and falcipain-1 (Goh et al., 2005). Thus, it is possible that different CPs expressed by *L. (V.) braziliensis* promastigotes may differ in their sensitivity to E-64.

In the course of this work, we had the opportunity to study the relative quantity of promastigote *cpb* gene transcripts. Our results indicate an increase in *cpb* transcripts when promastigotes were successively maintained under *in vitro* cultivation. Although this result seems contradictory to those obtained with the enzymatic and immunoblotting assays, it is important to note the existence of at least three possible *cpb* gene copies in *L. (V.) braziliensis*, the ones herein used for primer design ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), which may be alternately expressed during the *in vitro* cultivation timeline and, thus, justify the distinct CP properties observed along the cultivation time in our study. Furthermore, the additional bands (near 60 kDa and 45 kDa) recognized by the anti-CPB antiserum, as observed in the immunoblotting assays, may represent distinct CPB isoforms in which their expression may be regulated through successive *in vitro* passages.

The primers used were designed to detect a common region in the multicopy *cpb* gene array and, therefore, it is not possible to infer which genes had their expression altered among the distinct copies of the gene. Moreover, we can speculate that some *cpb* genes are expressed under special circumstances, as necessary. This sort of regulated expression is a well-known fact for other *Leishmania* spp. genes (Brooks et al., 2001; Folgueira and Requena, 2007; Omara-Opyene and Gedamu, 1997; Somanna et al., 2002).

The *cpb* genes from *Leishmania* spp. present significant differences (Mottram et al., 1997). A database analysis of *L. (L.) major*



**Fig. 4.** RT-PCR of *cpb* genes from *Leishmania (V.) braziliensis*. (A) Conventional RT-PCR results revealed a single 101 bp *cpb* gene fragment in all tested cDNA samples. (B) Real-time RT-PCR assays were normalized using  $\alpha$ -tubulin gene expression and the data are expressed as  $2^{-\Delta CT}$ , where  $\Delta CT = cpb$  gene  $C_t - \alpha$ -tubulin gene  $C_t$ . Both assays were performed with stationary-phase promastigotes cDNA samples obtained from parasites in the first (1p), fourth (4p) or seventh (7p) *in vitro* passages. The results are expressed as the average and standard deviation ( $\pm$ ) of five independent experiments ( $p < 0.05$ ) (\*) indicates statistically significant.



genome ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) showed 56 genes that encode for cysteine proteinases, with only eight copies for the *cpb* gene. Probably, many of these enzymes possess important roles in the parasite–host interaction; and, nowadays their activities can be predicted based on homologies with known enzymes in other organisms.

In *L. (L.) mexicana*, the multiple *cpb* genes encode for isoenzymes which are distinctly regulated. From the 19 copies of *cpb* genes in *L. (L.) mexicana*, the *cpb1* and *cpb2* are significantly different from the other ones. Both genes are mainly expressed in metacyclic promastigotes forms and encodes for enzymes that possess a truncated carboxy-terminal region. The 17 remaining copies are mainly expressed in the amastigotes forms. Therefore, the expression of these enzymes occurs exclusively in the forms of the parasite that are able to interact with the mammal host (Mottram et al., 1997). In *L. (V.) braziliensis*, 34 distinct genes which encodes cysteine proteinases were identified, only three of them represent copies of the *cpb* gene ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), and their functions were not yet completely clear.

Thus, it is possible that the differences encountered between enzymatic activity and the relative quantity of gene transcripts may be due to a post-transcriptional regulation, as most of gene regulation in trypanosomatid parasitic protozoa occurs at this stage (Brooks et al., 2001; Haile and Papadopolou, 2007). Additionally, we can not exclude the possibility that most of the CP activity is due to other non-*cpb* genes or cryptic *cp* genes (Hide and Banuls, 2008).

An alternative explanation of the data presented may be that the decrease in protease activity causes no direct loss of virulence and that it may simply reflect other changes to the biology of the parasite when cultured *in vitro* for long periods of time. Additionally experiments are needed to learn if proteases variations are cause or consequence of virulence reduction. *In vitro* adaptation of *Leishmania* parasites is related to some selective changes, such as modification of surface antigens, transcripts and, even, chromosomal changes have been reported (Navarro et al., 1992; Segovia et al., 1992). We propose that through the combined use of enzymatic activity and gene expression approaches the expression of CPs is modulated during successive *in vitro* passages of *L. (V.) braziliensis* promastigotes, suggesting that these enzymes might be involved with adaptive and selective changes during the life cycle of this parasite. Additionally, the decrease in pEFLpNan substrate hydrolysis may indicate a decrease of promastigote virulence in mammalian infection, since thiol-containing proteinases can inhibit the biosynthesis of proinflammatory prostaglandins (Taussig, 1980) and reduce clotting efficiency by affecting fibrinogen (Livio et al., 1978).

## Acknowledgments

This study was supported by: CNPq, FAPERJ, CAPES, PAPES/ CNPq and FIOCRUZ. We thank the PDTIS/Genomic-DNA Sequencing and real-time PCR technological platforms (FioCruz). Carlos R. Alves, Milton O. Moraes and Constança Britto are CNPq research fellows.

## References

- Alves, C.R., Figueiredo, L.J.O., Saraiva, F.A.L.O., De Simone, S.G., 2001. Molecular modeling study on a *Leishmania* cysteine proteinase. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* 539, 289–295.
- Alves, C.R., Corte-Real, S., Bourguignon, S.C., Chaves, C.S., Saraiva, E.M., 2005. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 109, 38–48.
- Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4, 601–609.
- Berman, E., Wiernik, P., Vogler, R., Velez-Garcia, E., Bartolucci, A., Whaley, F.S., 1997. Long-term follow-up of three randomized trials comparing idarubicin and

- daunorubicin as induction therapies for patients with untreated acute myeloid leukemia. *Cancer* 80, 2181–2185.
- Brooks, D.R., Denise, H., Westrop, G.D., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2001. The Stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *J. Biol. Chem.* 276, 47061–47069.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Coutinho, S.G., Nunes, M.P., Marzochi, M.C., Tramontano, N., 1985. A survey for American cutaneous and visceral leishmaniasis among 1342 dogs from areas in Rio de Janeiro (Brazil) where the human diseases occur. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 17–22.
- Deps, P.D., Viana, M.C., Falqueto, A., Dietze, R., 2000. Comparative assessment of the efficacy and toxicity of *N*-methyl-L-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 535–543.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 692.
- Folgueira, C., Requena, J.M., 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 359–377.
- Goh, S.L., Goh, L.L., Sim, T.S., 2005. Cysteine protease falcipain 1 in *Plasmodium falciparum* is biochemically distinct from its isozymes. *Parasitol. Res.* 97, 295–301.
- Guedes, H.L., Rezende, J.M., Fonseca, M.A., Salles, C.M., Rossi-Bergmann, B., De-Simone, S.G., 2007. Identification of serine proteases from *Leishmania braziliensis*. *Z. Naturforsch. C* 62, 373–381.
- Haile, S., Papadopolou, B., 2007. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 569–577.
- Harrach, T., Eckert, K., Maurer, H.R., Machleidt, I., Machleidt, W., Nuck, R., 1998. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *J. Protein Chem.* 17, 351–361.
- Hide, M., Banuls, A.L., 2008. Polymorphisms of *cpb* multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 105–106.
- Hide, M., Bras-Goncalves, R., Banuls, A.L., 2007. Specific *cpb* copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. *Parasitology* 134, 379–389.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 1998. New world leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species. In: *Parasitology*. Arnold, London.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>−(Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 25, 402–408.
- Livio, M., Bertoni, M.P., De Gaetano, G., Donati, M.B., 1978. Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in Prostaglandin and in the rat. *Drugs Exp. Clin. Res.* 49, 53.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mahmoudzadeh-Niknam, H., McKerrow, J.H., 2004. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp. Parasitol.* 106, 158–163.
- Mottram, J.C., Frame, M.J., Brooks, D.R., Tetley, L., Hutchison, J.E., Souza, A.E., Coombs, G.H., 1997. The multiple *cpb* cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J. Biol. Chem.* 272, 14285–14293.
- Mottram, J.C., Brooks, D.R., Coombs, G.H., 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host–parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 455–460.
- Mottram, J.C., Coombs, G.H., Alexander, J., 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 375–381.
- Navarro, M., Maingon, R., Hamers, R., Segovia, M., 1992. Dynamics and size polymorphisms of minichromosomes in *Leishmania major* LV-561 cloned lines. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55, 65–74.
- Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 293–305.
- Omara-Opyene, A.L., Gedamu, L., 1997. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani* chagasi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 90, 247–267.
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitz, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* 39, 839–847.
- Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., Barrett, A.J., 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36, D320–325.
- Rebello, K.M., Cortes, L.M., Pereira, B.A., Pascarelli, B.M., Corte-Real, S., Finkelstein, L.C., Pinho, R.T., d'Avila-Levy, C.M., Alves, C.R., 2009. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitol. Res.* 106, 95–104.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1–21.

- Segovia, M., Artero, J.M., Mellado, E., Chance, M.L., 1992. Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 347–354.
- Somanna, A., Mundodi, V., Gedamu, L., 2002. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J. Biol. Chem.* 277, 25305–25312.
- Taussig, S.J., 1980. The mechanism of the physiological action of bromelain. *Med. Hypotheses* 6, 99–104.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- Williams, R.A., Tetley, L., Mottram, J.C., Coombs, G.H., 2006. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol. Microbiol.* 61, 655–674.
- Yao, C., Luo, J., Storlie, P., Donelson, J.E., Wilson, M.E., 2004. Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.* 135, 171–183.
- Yao, C., Donelson, J.E., Wilson, M.E., 2007. Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. and their differential release from promastigotes. *Eukaryot. Cell* 6, 1905–1912.

## ANEXO IV: Artigo no prelo

### Journal of Bone and Joint Surgery

#### ADIPOSE DERIVED STEM CELLS TREATMENT OF SKELETAL MUSCLE INJURY

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	JBJS-D-11-00351R2
<b>Full Title:</b>	ADIPOSE DERIVED STEM CELLS TREATMENT OF SKELETAL MUSCLE INJURY
<b>Article Type:</b>	Research
<b>Keywords:</b>	adipose tissue, stem cell therapy, skeletal muscle injury, muscle fibrosis and cell transplantation
<b>Corresponding Author:</b>	João Pedro Saar Werneck-de-Castro, PhD Federal University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Federal University of Rio de Janeiro
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Ramon Peçanha, Ms
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>All Authors:</b>	Ramon Peçanha, Ms Luiza Bagno, Ms Marcelo Baldanza Anna Beatriz Robottom Ferreira, Dr Milton Ozório Moraes, PhD Gisele Zapata Sudo, PhD Tais H. Kasai-Brunswick, Ms Antônio Carlos Campos-de-Carvalho, MD PhD Regina C.S. Goldenderg, PhD João Pedro Saar Werneck-de-Castro, PhD
<b>All Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> The aim of the present study was to investigate whether adipose-derived stem cells (ASC) could contribute to skeletal muscle healing.</p> <p><b>Methods:</b> The ASC of male rats were cultured and injected on the soleus muscles of female rats. Two and four weeks after injections, muscles were tested for tetanic force (50 Hz). Histological analysis was performed to evaluate muscle collagen deposition and number of centronucleated muscle fibers. In order to track donor cells, chimerism was detected by real time PCR targeting the male SRY gene.</p> <p><b>Results:</b> Two weeks after cell injection, tetanus strength and the number of centronucleated regenerating myofibers were higher in the treated group compared to the control group (79.2±5.0% vs 58.3±8.1%, p&lt;0.05 and 145±36 vs 273±18 per 103 myofibers, p&lt;0.05 respectively;) as well as the number of centronucleated regenerating myofibers. However, there were no significant differences at four weeks. Treatment did not decrease collagen deposition. Male gene was not detected in female host tissue at 2 and 4 weeks after engraftment by PCR analysis.</p> <p><b>Conclusion:</b> Adipose-derived stem cell therapy increased muscle repair and force two weeks, but not four weeks after injection, suggesting that ASC administration may accelerate muscle repair, but the rapid disappearance of injected cells suggests a paracrine mechanism</p>

**ADIPOSE DERIVED STEM CELLS TREATMENT OF SKELETAL MUSCLE  
INJURY**

RAMON PEÇANHA<sup>1,2</sup>, LUIZA BAGNO<sup>1</sup>, MARCELO BALDANZA<sup>2</sup>, ANNA BEATRIZ ROBOTOM FERREIRA<sup>3</sup>, MILTON OZÓRIO MORAES<sup>3</sup>, GISELE ZAPATA-SUDO<sup>4</sup>, TAÍS H. KASAI-BRUNSWICK<sup>1</sup>, ANTÔNIO CARLOS CAMPOS-DE-CARVALHO<sup>1</sup>, REGINA C.S. GOLDENBERG<sup>1</sup>, JOÃO PEDRO SAAR WERNECK-DE-CASTRO<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-902, Brazil.;

<sup>2</sup>Laboratório de Biologia do Exercício, UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-599, Brazil.;

<sup>3</sup>Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil.; <sup>4</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, 21941-902, Brazil.

Correspondence address: João Pedro Saar Werneck-de-Castro

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Educação Física e Desportos - C.C.S.

Laboratório de Biologia do Exercício

Departamento de Biociência e Atividade Física

Av. Carlos Chagas Filho, 540 Ilha do Fundão

21941-599 - Rio de Janeiro – RJ Brazil

e-mail: [joaopedrowerneck@yahoo.com.br](mailto:joaopedrowerneck@yahoo.com.br) and

[jpedro@biof.ufrj.br](mailto:jpedro@biof.ufrj.br)

tel: (+5521) 2562 6826

fax: (+5521) 2562 6850

Running head: ASC and skeletal muscle injury

1 **Abstract**

2 **Background:** The aim of the present study was to investigate whether adipose-derived stem  
3 cells (ASC) could contribute to skeletal muscle healing.

4 **Methods:** The ASC of male rats were cultured and injected on **the soleus muscles of female**  
5 **rats**. Two and four weeks after injections, muscles were tested for tetanic force (50 Hz).  
6 Histological analysis was performed to evaluate muscle collagen deposition and number of  
7 centronucleated muscle fibers. In order to track donor cells, chimerism was detected by real time  
8 PCR targeting the male SRY gene.

9 **Results:** Two weeks after cell injection, **tetanus strength and the number of centronucleated**  
10 **regenerating myofibers were** higher in the treated group compared to the control group  
11 (79.2±5.0% vs 58.3±8.1%, p<0.05 and **145±36 vs 273±18 per 10<sup>3</sup> myofibers, p<0.05**  
12 respectively;) as well as the number of centronucleated regenerating myofibers. However, **there**  
13 **were no significant differences at four weeks**. Treatment did not decrease collagen deposition.  
14 **Male gene was not detected in female host tissue at 2 and 4 weeks after engraftment by**  
15 **PCR analysis.**

16 **Conclusion:** Adipose-derived stem cell therapy increased muscle repair and force two  
17 weeks, but not four weeks after injection, suggesting that ASC administration may  
18 accelerate muscle repair, but the rapid disappearance of injected cells suggests a paracrine  
19 mechanism

20



1 **Introduction:**

2 A complete functional recovery of skeletal muscle after severe injury remains a great  
3 challenge in orthopedics and traumatology. The capacity of skeletal muscle tissue to regenerate  
4 resides in a reserve population of mononucleated precursors termed satellite cells. Satellite cells  
5 are located beneath the basal lamina that surrounds each myofiber and act as myogenic  
6 precursors for repair with stem cell-like characteristics after muscle injury<sup>1 2</sup>. Although these  
7 cells have regenerative potential, complete skeletal muscle recovery is hindered by the  
8 development of scar tissue<sup>3 4</sup>.

9 Cell therapy techniques with stem cells isolated from adult tissues are becoming a very  
10 attractive strategy for the treatment of muscle disorders. Satellite cells represent one choice  
11 because of their intrinsic myogenic potential<sup>5</sup>. Nevertheless, they are poorly expandable in vitro,  
12 rapidly undergo senescence and showed poor survival rate of transplanted cells in vivo<sup>6 7</sup>.  
13 Several researchers report that bone marrow-mesenchymal stem cells (BM-MSCs) have the  
14 potential to differentiate and fuse with myoblasts in vitro<sup>8</sup>, contribute to muscle healing and  
15 treatment of muscle disorders<sup>9-12</sup>.

16 Like bone marrow, adipose tissue is derived from the embryonic mesoderm and contains  
17 a heterogenous stromal cell population such as endothelial cells, smooth muscle cells, pericytes,  
18 **and** mesenchymal stem cells<sup>13 14</sup>. The plastic adherent cell population isolated by collagenase  
19 treatment is called adipose-derived stem cells (ASC) and shares many of the characteristics of  
20 BM-MSCs such as cell surface protein expression and the ability to undergo differentiation along  
21 classical mesenchymal lineages: osteogenic, chondrogenic, and adipogenic<sup>15-17</sup>, even after  
22 cryopreservation<sup>18</sup>. Furthermore, Cui et al<sup>19</sup> showed that ASC are less immunogenic and  
23 immunosuppressive. Additionally, ASC have several advantages over bone marrow in clinical

1 trials, such as easy accessibility, abundance and higher stem cell proliferation rates than BM-  
2 MSCs<sup>15 16 20</sup>. Recently, ASC were shown to secrete multiple angiogenic and anti-apoptotic  
3 cytokines supporting tissue regeneration and minimizing tissue damage<sup>21-23</sup> which provides new  
4 mechanisms for tissue engineering applications. These cytokines were also classically described  
5 to be crucial for satellite cell proliferation and fusion in vitro and in vivo<sup>24 25</sup>. The aim of the  
6 study was to investigate whether adipose tissue-derived mesenchymal cells could contribute to  
7 skeletal muscle healing after muscle laceration.

8

## 9 **Materials and methods:**

### 10 **Animals**

11 All procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of  
12 Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No.85-  
13 23, revised 1996) as attested by the competent institutional board. Syngenic female Wistar rats  
14 (12-15 w age; 180–210 g) were obtained from the Laboratório de Cardiologia Celular e  
15 Molecular (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-Rio de Janeiro/Brazil) and Vital Brazil  
16 Institute (Niterói, Rio de Janeiro, Brazil). Animals were housed at controlled temperature (23°C)  
17 with daily exposure to a 12-h light–dark cycle (lights on at 8:00 am) and both water and standard  
18 rat chow ad libitum.

19

### 20 **Cell culture**

21 ASC were isolated according to their density and differential adhesion to culture dishes,  
22 as described by Zuk et al<sup>13</sup>. Inguinal subcutaneous white adipose tissue from male syngenic  
23 Wistar rats (12-15 **weeks** age; 200—250 g) **was** washed with sterile phosphate-buffered saline

1 (PBS) to remove contaminating debris and red blood cells. Washed tissue was minced and cells  
2 were isolated by enzymatic digestion (type II Collagenase, Worthington) in PBS for 45 min at  
3 37°C with gentle agitation. Enzyme activity was neutralized with **Dulbecco's** modified eagle's  
4 medium (DMEM) supplemented with 20% of fetal bovine serum (FBS), and cells were  
5 centrifuged **and the** supernatant containing mature adipocytes was discarded. Pellets were  
6 filtered with 80µm filters, resuspended in DMEM – high glucose, containing 20% FBS, 2mM L-  
7 glutamine, 100 U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, and then plated at a density of  $2 \times 10^4$   
8 /cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>2</sup> cell culture flasks. Following 24 hours of incubation, non-adherent cells were  
9 washed out and the cultures were maintained at 37°C in normoxic conditions (95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>).  
10 Medium was changed twice a week, and cells were replated when 80% confluence was reached.  
11 Cells from the third passage were used in this study. **Four male syngenic rats were used as cell**  
12 **donor to the whole experiment.**

13

14 Flow cytometric characterization of ASC

15 The cells were removed from culture flasks with trypsin/EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich,  
16 USA). Enzyme activity was neutralized with **Dulbecco's** modified eagle's medium (DMEM)  
17 with 20% of fetal bovine serum (FBS), and the cells were then centrifuged for 10 minutes at 200  
18 g at room temperature. The pellets were washed twice with ice-cold PBS. A total of  $5 \times 10^5$  cells  
19 in 100 µl PBS **with 0.5% BSA** were stained in the dark with the appropriate antibodies for 20  
20 minutes at 4°C. Monoclonal antibodies used in the study were: CD29-phycoerythrin (PE)  
21 **0.015µg/µl**, CD45-PercP-Cy5 (both from BD Biosciences, San Jose, California, USA)  
22 **0.006µg/µl**, anti-CD34-PE (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA)  
23 **0.006µg/µl**, CD90-fluorescein isothiocyanate (FITC) **0.003µg/µl**, CD11b-FITC **0.003µg/µl** (both

1 from Caltag Laboratories, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Isotype controls for FITC, PE and  
2 PercP-Cy5 were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Caltag Laboratories and BD  
3 bioscience respectively. The cells were washed with 2 ml PBS and resuspended in 200  $\mu$ l PBS  
4 for acquisition images. Samples were acquired using a flow cytometer (BD Biosciences) and  
5 analyzed using software BD FACSDiva, version 6.1.1 (BD Biosciences).

6

### 7 Muscle injury model and injection of ASC

8 The animals were anesthetized with a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5  
9 mg/kg) by intraperitoneal injection. The soleus muscle was exposed and lacerated with a surgical  
10 blade (No. 11) at the largest diameter, compromising 50% of their width and 100% of their  
11 thickness<sup>26</sup>. After the procedure, the superficial muscle and the skin were sutured.

12 One week after laceration of female rats soleus, a suspension of 30 $\mu$ l of 10<sup>6</sup> ASC with  
13 Matrigel<sup>TM</sup> (BD Biosciences) was injected into the damaged area of the muscle belly (**n=23**). For  
14 the control group, the muscle was lacerated in the same manner but 30 $\mu$ l of PBS/ Matrigel<sup>TM</sup> was  
15 injected (**n=14**). **This time point of injection was chosen to avoid the first week of intense**  
16 **inflammatory response attempting to improve cell survival**<sup>27</sup>

17

### 18 Contractile properties

19 Two (**vehicle = 6 and ASC = 6**) or four (**vehicle = 8 and ASC = 8**) weeks after  
20 treatment, the animals were sacrificed for functional evaluation **as described previously**<sup>28 29</sup>.  
21 Soleus muscles were removed, mounted in a double-jacketed tissue organ bath containing 15 ml  
22 of Ringer-Krebs solution at 37°C (116,8mM NaCl; 25mM NaHCO<sub>3</sub>; 5,9mM KCl; 1,2mM  
23 MgSO<sub>4</sub>; 1,25mM CaCl<sub>2</sub>; 5mM Glucose), and constantly agitated by bubbling with a mixture of

1 95% oxygen and 5% carbon dioxide. Isometric contractions were measured with strain gauge  
2 transducers Grass FT03 (Grass instruments-Rhode Island, New England) coupled with a  
3 Cyberamp strain gauge amplifier (Molecular Devices-Sunnyvale, California, USA), decoded by  
4 a Digidata 1440A low-noise data acquisition system (Molecular Devices-Sunnyvale, California,  
5 USA) and recorded on a computer using a data acquisition program (Axoscope 11.0 for  
6 Windows). During 20 minutes of equilibration with 0.2-Hz stimulation, electrical field stimuli  
7 were applied by Grass S88 stimulator (Grass instruments-Rhode Island, New England) through  
8 two silver wire electrodes positioned on the top and bottom of the organ bath and separated by 2  
9 cm. The muscles were stimulated with 2ms square wave pulses under maximum voltage (50 V).  
10 First, 1-Hz stimulation was applied, and the muscle twitches were recorded for 20 seconds,  
11 followed by the application of one 50-Hz tetanic stimulation until muscle fatigue was reached.  
12 Muscle strength was reported in percent of contralateral noninjured muscle.

13

14 Muscle regeneration and fibrosis.

15 After functional assessment, **soleus muscles** were fixed in 4% paraformaldehyde in  
16 phosphate buffer and the mid-belly portion of each muscle was mounted in paraffin embedding  
17 medium with the fibers oriented **perpendicularly to the plane of sectioning in order to permit**  
18 **a cross sectional view**. Muscle samples were sectioned (5  $\mu$ m) and stained with **Hematoxylin &**  
19 **Eosin (H&E)** and Sirius red according to standard protocols<sup>30</sup>.

20 Muscle regeneration was assessed by counting the number of centronucleated  
21 regenerating myofibers **two (vehicle = 5 and ASC = 3) or four (vehicle = 4 and ASC = 5)**  
22 **weeks after treatment**. At least ten fields from **a single** cross section area were analyzed for  
23 each muscle **in order to analyze all the muscle cross sectional area**. The average number of

1 regenerating myofibers per  $10^3$  total fibers was compared between groups. Nuclei with no  
2 discernible surrounding cytoplasm were **excluded**.

3 For collagen analysis, muscle sections stained with Sirius were used. Ten random fields  
4 were selected for each sample. Morphometry was performed using an imaging system  
5 constituted by a digital Q-color 5 camera (® Olympus, Japan) coupled to an epifluorescence  
6 Axiovert 100 microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Ten randomly picked fields of  
7 Sirius red sections were captured from each animal, using a magnification 4X objective lens.  
8 Quantification was estimated by the percentage of stained area in comparison to the total area of  
9 fields examined, using Image-Pro Plus 5.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) image  
10 analysis software<sup>31</sup>. A blinded observer performed all analyses.

11

12 Chimerism detection by Real Time polymerase chain reaction

13 In order to **track ASC male donor cells in the host tissue** through SRY gene **detection**,  
14 we **treated lacerated female muscle as described above. Soleus muscles were harvested 3**  
15 **(n = 3), 24 (n = 3) and 72 (n = 3) hours; and 14 (n = 3) and 28 (n = 3) days after treatment. Only**  
16 **muscles from 14 and 28 days were submitted to functional assessment as shown above.**

17 DNA was extracted from **entire** soleus muscle **homogenates** using the proteinase K  
18 protocol adapted from Stefani et al<sup>32</sup>. DNA was diluted in TE (5mM Tris-HCL, pH 7,4; 0,1mM  
19 EDTA), quantified on a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000) and then stored at -20°C.

20 PCR specific-primers for the rat sex determining region Y gene (SRY) 5'-CGT GAA  
21 GTT GCC TCA ACA AA-3' (forward) and 5'-TCT GGT TCT TGG AGG ACT GG-3' (reverse)  
22 were used to identify injected mesenchymal cells. A control primer was designed that detected  
23 both the male and female constitutively expressed glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

1 (GAPDH) gene to normalize input DNA amounts 5'-ACA TGC CGC CTG GAG AAA-3'  
2 (forward) and 5'-AAG GGC AAA ACC AAA GAT GA-3' (reverse). **An entire soleous female**  
3 **muscle was mixed to 10<sup>6</sup> male ASC to reproduce host tissue injected with ASC.** Five  
4 nanograms of DNA extracted from this mixture **were** used as a positive control for SRY  
5 detection. **Results of engrafted female muscles are shown as a percentage of the positive**  
6 **control.**

7 DNA was amplified on an ABI 7000 sequence detection system using SYBR Green PCR  
8 Master Mix according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems) in a final volume of  
9 20- $\mu$ l. Thermal cycling parameters included 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 15  
10 seconds at 95°C and 75 seconds at 55°C.

11

## 12 Statistical analysis

13 All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Two-way analysis of variance (ANOVA) was  
14 used to compare the effects of treatment and time on muscle force, fiber regeneration and muscle  
15 collagen deposition followed by Bonferroni post-test. One-way analysis of variance was  
16 performance to analyze the presence of donor cells in the treated muscle. Statistical significance  
17 was set to  $p < 0.05$ .

18

## 19 Results

20 ASC express cell surface antigens that reflect BM-MSCs

21 The adipose tissue derived mesenchymal cells were analyzed by flow cytometry to obtain  
22 a cell surface marker profile. According to the International Society for Cellular Therapy (ISCT),  
23 criteria for defining MSC are adherence to plastic, specific surface antigen expression and

1 multipotent differentiation potential<sup>30</sup>. More than 95% ASC expressed high levels of CD90,  
2 CD29 and were negative for CD34, CD45, CD11b (Figure 1), which is consistent with the well-  
3 characterized profile of BM-MSCs. Besides, **ASC differentiate** into adipogenic and osteogenic  
4 lineages (data not shown)

5

6 Influence of ASC on muscle contractile properties

7 All damaged muscles exhibited impaired function when compared to the contralateral leg  
8 ( $P < 0.001$ ). Tetanus strength was higher in cell treated group compared to vehicle treated group  
9 ( $79.2 \pm 5.0\%$  vs  $58.3 \pm 8.1\%$ , respectively;  $p < 0.05$ ) two weeks after cell injection, although no  
10 significant difference was observed in tetanus strength between them 4 weeks after injection  
11 **(Figure 2)**.

12

13 **Muscle repair accelerated**, whereas fibrosis did not decrease in ASC treated muscle.

14 We observed a higher number of centronucleated regenerating myofibers in the ASC  
15 treated group ( $273 \pm 18$  per  $10^3$  myofibers) when compared to the **vehicle treated** ( $175 \pm 36$  per  
16  $10^3$  myofibers) 2 weeks after treatment ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). However, no difference was detected  
17 at 4 weeks in the **ASC** treated group ( $282 \pm 58$  per 10 myofibers) compared with **vehicle**  
18 **treated** ( $282 \pm 130$  per 10 myofibers).

19 Sirius red staining (collagen staining) revealed a large area covered by collagen in all  
20 injured muscles compared with normal uninjured muscles either in 2 weeks (Normal –  $7.5 \pm$   
21  $1.2\%$ ; Vehicle –  $27.4 \pm 7.1\%$  and ASC -  $30.3 \pm 1.77\%$ ) or 4 weeks (Normal –  $8.0 \pm 0.9\%$ ;  
22 Vehicle –  $25.4 \pm 3.6\%$  and ASC -  $23.1 \pm 3.0\%$ ) after cell injection (Figure 4A). Figures 4B-D  
23 show representative Sirius red staining images of the three groups.



1

2 SRY positive cell signal gradually decreased over time as shown by real-time PCR.

3       GAPDH was amplified in all samples (data not show) and negative controls presented no  
4 amplification. Primer sets were then tested for sensitivity by performing PCR using a mixture of  
5 DNA containing decreasing amounts (1ng – 0.001ng) of male DNA and 5 ng of female DNA.  
6 The SRY primer set generated PCR products of expected sizes from as low as 5 pg of male DNA  
7 or about a one cell genome of murine DNA (Fig 5A).

8       We performed real-time PCR with genomic DNA in order to detect the presence of the  
9 SRY gene from the Y chromosome of male rat cells that were grafted in female rat tissues.  
10 The SRY gene was only detected in the treated groups at early time points after injection (Figure  
11 5B). The SRY gene signal was  $80.7 \pm 25\%$  of the positive control three hours after engraftment  
12 (Fig 5B). Detection of the SRY gene decreased **at** 24 hours ( $4.4 \pm 0.3\%$ ) and 72 hours ( $2.2 \pm$   
13  $0.2\%$ ) after engraftment. Furthermore, no signs of SRY-positive cells were found by real-time  
14 PCR two and four weeks after therapy and vehicle treated muscles

15

## 16 **Discussion**

17       The present study revealed that ASC therapy accelerates skeletal muscle repair by  
18 increasing both tetanic force and the number of regenerating myofibers two weeks after  
19 engraftment, but not at four weeks. We observed a large amount of scar tissue in lacerated  
20 muscles two and four weeks post injury and treatment did not decrease collagen deposition. We  
21 did not find the grafted cells in the host tissue analyzed by real time PCR **at 2 or 4 weeks after**  
22 **treatment**. It is reasonable to speculate that a mechanism other than differentiation and fusion of  
23 transplanted cells **might be involved in transient acceleration of skeletal muscle repair**.

1           The participation of bone marrow mesenchymal cells (BM-MSCs) in regeneration of  
2 several disease models, including skeletal muscle regeneration, has been studied intensively<sup>10 30</sup>  
3 <sup>33 34</sup>. Nevertheless, the investigation of the potential of ASC in skeletal muscle healing is scarce,  
4 even though myogenic differentiation from ASC has been described in vitro by many  
5 researchers<sup>13 16 17 35</sup>. Indeed, culture of cells from adipose tissue in the presence of  
6 dexamethasone and hydrocortisone results in a time-dependent pattern of expression of muscle-  
7 related genes that is consistent with normal myogenesis<sup>15 36 37</sup>. In clinics, there are some benefits  
8 of using ASC, as follows: easily harvested abundance, autologous source of mesenchymal stem  
9 cells, less immunogenic and immunosuppressive, reduced morbidity and high rate of  
10 proliferation which facilitates ex vivo expansion (**CME**). Adipose tissue derived cells have been  
11 used to treat other disorders like liver failure<sup>38</sup>, cartilage regeneration<sup>39</sup>, spinal cord injury<sup>40</sup> and  
12 cardiovascular disease<sup>41</sup>.

13           Although the differentiation potential into myocytes has been demonstrated in  
14 vitro, little is known about ASC transplantation after skeletal muscle injury. Bacou et al<sup>42</sup> were  
15 the first to test the potential of cells from adipose tissue in muscle healing. They used the non-  
16 physiological cardiotoxin model to induce muscle damage in rabbits and transplanted cells  
17 cultured from the stromal vascular fraction (SVF), three days after injury. Bacou and co-workers  
18 cultured SVF for 3 (SVF-1) or 7 (SVF-2) days. SVF-1 **only** increased slightly maximum tetanic  
19 force and fibers centronucleated. Two weeks after treatment transplanted cells incorporated to  
20 regenerating muscle fibers with a low efficiency and some expressed skeletal muscle markers  
21 such as merosin, myogenin and multiple isoforms of myosin heavy chain, suggesting myogenic  
22 differentiation. Conversely, in the present study we isolated SVF and cultured the adherent cells  
23 until the third passage. Our cells exhibited undifferentiated mesenchymal cell phenotype since

1 they were positive to CD90, CD29 and were negative or low positive for CD34, CD45, CD11b  
2 (Figures 1C-H) and were able to form adipocyte and osteogenic lineages. In contrast to the  
3 Bacou's work, long term culture of SVF improved muscle force and the number of muscle fibers  
4 in process of regeneration in the present study, and participated in muscle healing following  
5 ischemia shown by others<sup>35 43</sup>. It is difficult to compare our data to theirs since they did not  
6 perform any phenotype analysis and the source of ASC was different: perirenal adipose tissue.

7 In another study, Di Rocco and colleagues<sup>35</sup> showed that both freshly harvested  
8 uncultured SVF and ASC were able to differentiate into myofibers when co-cultured with  
9 myoblasts. ASC, cultured until passage 8 to 12, accounted **for** 1% of newly formed myoblast  
10 while only 0.2% of SVF differentiated into myoblasts when co-cultured with muscle cells.  
11 However, soluble factors from myoblasts only induced differentiation in SVF cells, suggesting  
12 the presence of distinct populations capable of muscle formation. In addition, they injected SVF  
13 cells in mice submitted to hind-limb ischemia and dystrophic mice. A wide region of muscle  
14 fibers was covered by donor cells (20%) in ischemic muscle and 10% of the dystrophic muscles.  
15 Unfortunately, they neither performed any muscle contractile analysis nor tested ASC in vivo.  
16 **The present study made use of ASC injected into a classical laceration model, one week**  
17 **post-injury**. In contrast to previous results described above, we were not able to find donor cells  
18 in the host tissue by PCR analysis pointing out to a possible paracrine effect of ASC (**see**  
19 **discussion below**).

20 The healing process in injured muscle usually comprises 3 phases: (1)  
21 degeneration and inflammation; (2) regeneration and fibrosis; (3) remodeling<sup>3 27</sup>. The  
22 regenerative capacity of skeletal muscle is due to the presence of a tissue-specific population of  
23 myogenic stem cells termed satellite cells. The satellite cell was first described by Mauro<sup>1</sup> and is

1 gamma and relaxin improve muscle regeneration functionally and histologically by directly or  
2 indirectly blocking TGF- $\beta$ 1 activity<sup>28 29 53-58</sup>. The event that triggers TGF- $\beta$ 1 induction is the  
3 muscle injury and it depends on the severity of the damage. Therefore, it is reasonable to think  
4 that ASC do not modulate muscle fibrosis induced by injury. Additionally ASC were injected  
5 one week after muscle laceration.

6 In conclusion, data from our study lead us to suggest that treatment with ASC cells may  
7 accelerate the process of muscle **repair**, probably by paracrine mechanisms **since the number of**  
8 **regenerating muscle fibers and muscle developed force only increased two weeks after**  
9 **treatment (but not at four weeks) and ASC were not present in host tissue in these time**  
10 **points. Furthermore, the therapy seems to be unable to block the fibrotic signaling cascade**  
11 **induced by skeletal muscle injury.**

12 Funding support

13

14 This work was supported by CAPES-MEC, MCT-PRONEX, FAPERJ, CNPq and IVB

15

16 Conflict of interest

17

18 All authors have no conflict of interest

19

## 1 **References**

- 2 1. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961;9:493-5.
- 3 2. Anderson JE. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency,  
4 conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol* 2006;209(Pt 12):2276-92.
- 5 3. Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kaariainen M, Kalimo H, Jarvinen M. Muscle injuries: biology and  
6 treatment. *Am J Sports Med* 2005;33(5):745-64.
- 7 4. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr*  
8 *Comp Physiol* 2005;288(2):R345-53.
- 9 5. Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, et al. Direct isolation of  
10 satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 2005;309(5743):2064-7.
- 11 6. Qu Z, Balkir L, van Deutekom JC, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of  
12 approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J Cell Biol*  
13 1998;142(5):1257-67.
- 14 7. Cossu G, Mavilio F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful  
15 thinking or therapeutic perspective? *J Clin Invest* 2000;105(12):1669-74.
- 16 8. Shi D, Reinecke H, Murry CE, Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow  
17 stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 2004;104(1):290-4.
- 18 9. Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, et al. Autologous  
19 bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush  
20 injury in rats. *Tissue Eng* 2006;12(2):361-7.
- 21 10. Dezawa M, Ishikawa H, Itokazu Y, Yoshihara T, Hoshino M, Takeda S, et al. Bone marrow  
22 stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. *Science*  
23 2005;309(5732):314-7.

- 1 11. Winkler T, von Roth P, Matziolis G, Mehta M, Perka C, Duda GN. Dose-response  
2 relationship of mesenchymal stem cell transplantation and functional regeneration after  
3 severe skeletal muscle injury in rats. *Tissue Eng Part A* 2009;15(3):487-92.
- 4 12. Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y. Allogeneic bone  
5 marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal  
6 muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng* 2004;10(7-8):1093-112.
- 7 13. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from  
8 human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7(2):211-  
9 28.
- 10 14. de Villiers JA, Hourelid N, Abrahamse H. Adipose derived stem cells and smooth muscle  
11 cells: implications for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 2009;5(3):256-65.
- 12 15. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and  
13 clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007;25(4):818-27.
- 14 16. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation,  
15 expansion and differentiation. *Methods* 2008;45(2):115-20.
- 16 17. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue  
17 is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279-95.
- 18 18. Oishi K, Noguchi H, Yukawa H, Miyazaki T, Kato R, Kitagawa Y, et al. Cryopreservation of  
19 mouse adipose tissue-derived stem/progenitor cells. *Cell Transplant* 2008;17(1-2):35-41.
- 20 19. Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress  
21 mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*  
22 2007;13(6):1185-95.

- 1 20. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-  
2 derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler*  
3 *Thromb* 2006;13(2):77-81.
- 4 21. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al.  
5 Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells.  
6 *Circulation* 2004;109(10):1292-8.
- 7 22. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, et al. Novel  
8 autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by  
9 cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*  
10 2005;25(12):2542-7.
- 11 23. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, et al. Suppression of  
12 hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to  
13 promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* 2007;25(12):3234-43.
- 14 24. Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK. Hepatocyte growth factor affects satellite cell  
15 activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*  
16 2000;278(1):C174-81.
- 17 25. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, et al. Growth factors  
18 improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82(1):131-7.
- 19 26. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Suturing versus  
20 immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse  
21 model. *Am J Sports Med* 1999;27(2):222-9.
- 22 27. Charge SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol*  
23 *Rev* 2004;84(1):209-38.

- 1 28. Bedair HS, Karthikeyan T, Quintero A, Li Y, Huard J. Angiotensin II receptor blockade  
2 administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal  
3 skeletal muscle. *Am J Sports Med* 2008;36(8):1548-54.
- 4 29. Chan YS, Li Y, Foster W, Fu FH, Huard J. The use of suramin, an antifibrotic agent, to  
5 improve muscle recovery after strain injury. *Am J Sports Med* 2005;33(1):43-51.
- 6 30. Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JV, Paredes BD, Mannheimer EG, Carvalho FG, et al.  
7 Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve  
8 function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells* 2008;26(5):1307-14.
- 9 31. Quintanilha LF, Mannheimer EG, Carvalho AB, Paredes BD, Dias JV, Almeida AS, et al.  
10 Bone marrow cell transplant does not prevent or reverse murine liver cirrhosis. *Cell*  
11 *Transplant* 2008;17(8):943-53.
- 12 32. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL. In situ type 1 cytokine gene expression  
13 and mechanisms associated with early leprosy progression. *J Infect Dis*  
14 2003;188(7):1024-31.
- 15 33. Li J, Deane JA, Campanale NV, Bertram JF, Ricardo SD. The contribution of bone marrow-  
16 derived cells to the development of renal interstitial fibrosis. *Stem Cells* 2007;25(3):697-  
17 706.
- 18 34. Olivares EL, Ribeiro VP, Werneck de Castro JP, Ribeiro KC, Mattos EC, Goldenberg RC, et  
19 al. Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts.  
20 *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(2):H464-70.
- 21 35. Di Rocco G, Iachininoto MG, Tritarelli A, Straino S, Zacheo A, Germani A, et al. Myogenic  
22 potential of adipose-tissue-derived cells. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 14):2945-52.



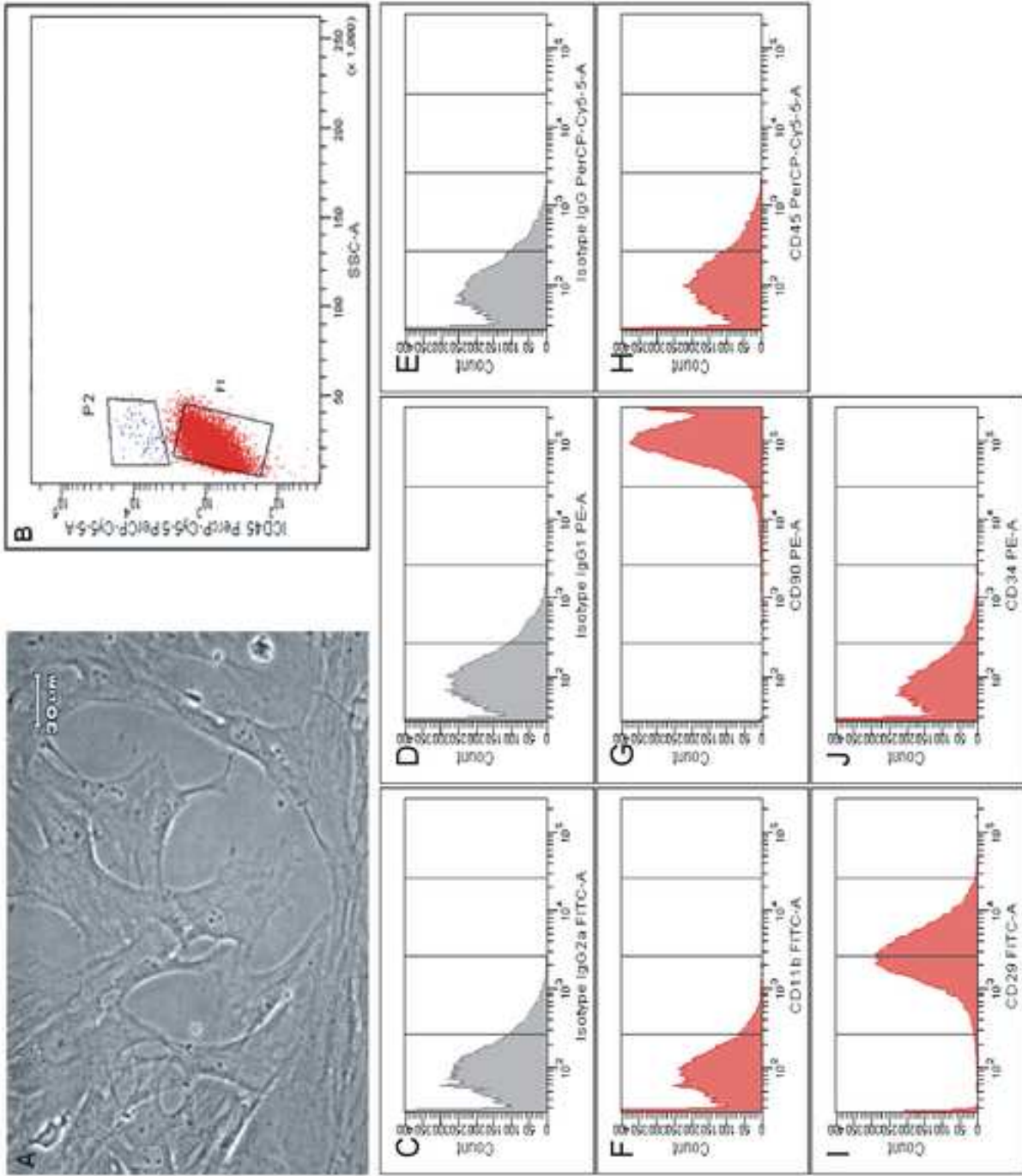
- 1 36. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, et al. Adipocyte  
2 differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem*  
3 *Biophys Res Commun* 2004;315(2):255-63.
- 4 37. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation  
5 by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 2002;109(1):199-209;  
6 discussion 10-1.
- 7 38. Yukawa H, Noguchi H, Oishi K, Takagi S, Hamaguchi M, Hamajima N, et al. Cell  
8 transplantation of adipose tissue-derived stem cells in combination with heparin  
9 attenuated acute liver failure in mice. *Cell Transplant* 2009;18(5):611-8.
- 10 39. Wei Y, Hu H, Wang H, Wu Y, Deng L, Qi J. Cartilage regeneration of adipose-derived stem  
11 cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. *Cell Transplant* 2009;18(2):159-  
12 70.
- 13 40. Ohta Y, Takenaga M, Tokura Y, Hamaguchi A, Matsumoto T, Kano K, et al. Mature  
14 adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery  
15 from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Cell Transplant*  
16 2008;17(8):877-86.
- 17 41. Sanz-Ruiz R, Fernandez-Santos E, Dominguez-Munoz M, Parma R, Villa A, Fernandez L, et  
18 al. Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease. *Cell*  
19 *Transplant* 2009;18(3):245-54.
- 20 42. Bacou F, el Andalouzi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, et al.  
21 Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional  
22 capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant* 2004;13(2):103-11.

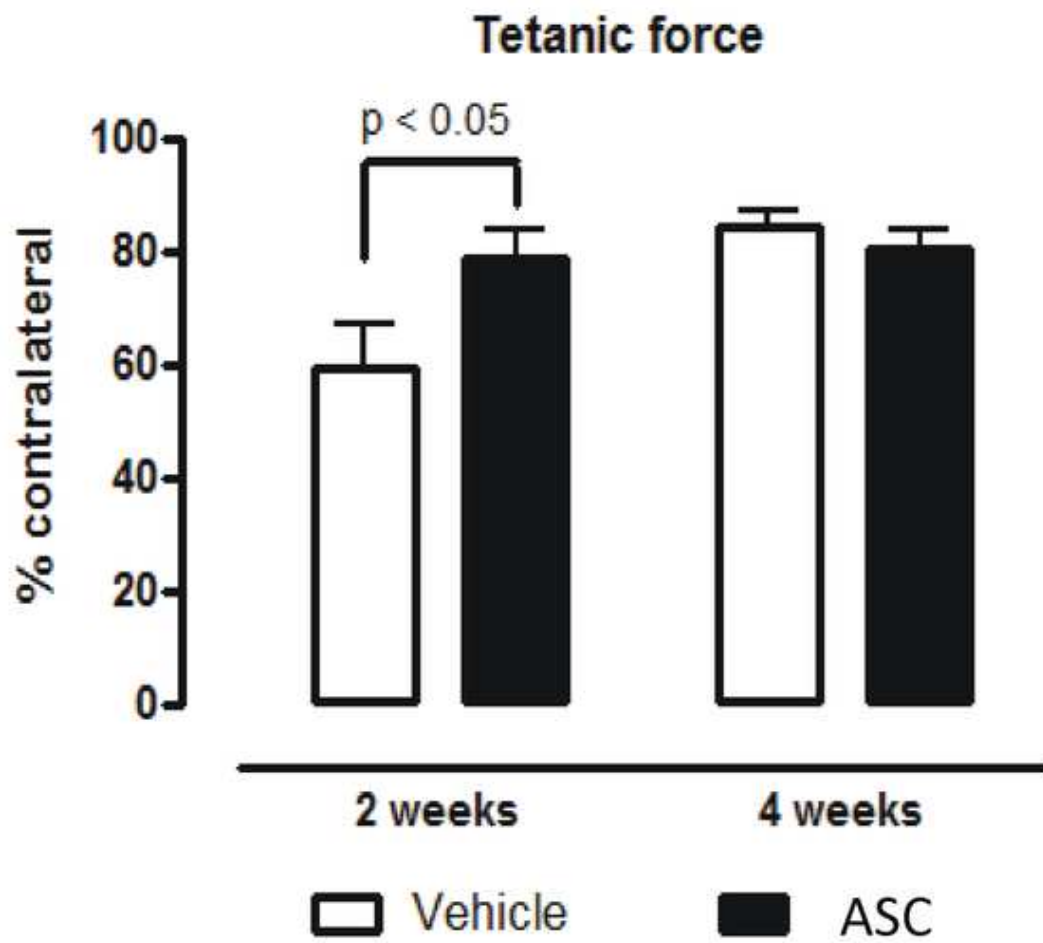
- 1 43. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al.  
2 Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces  
3 dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*  
4 2005;201(9):1397-405.
- 5 44. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal  
6 adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*  
7 1998;194(1):114-28.
- 8 45. Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. Hepatocyte growth factor  
9 activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol* 1995;165(2):307-  
10 12.
- 11 46. Tatsumi R, Liu X, Pulido A, Morales M, Sakata T, Dial S, et al. Satellite cell activation in  
12 stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J*  
13 *Physiol Cell Physiol* 2006;290(6):C1487-94.
- 14 47. Hayashi S, Aso H, Watanabe K, Nara H, Rose MT, Ohwada S, et al. Sequence of IGF-I,  
15 IGF-II, and HGF expression in regenerating skeletal muscle. *Histochem Cell Biol*  
16 2004;122(5):427-34.
- 17 48. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix  
18 protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat  
19 glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994;93(6):2431-7.
- 20 49. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth  
21 factor-beta(1). *Mol Genet Metab* 2000;71(1-2):418-35.
- 22 50. Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1  
23 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994;45(3):916-27.

- 1 51. Camoretti-Mercado B, Solway J. Transforming growth factor-beta1 and disorders of the  
2 lung. *Cell Biochem Biophys* 2005;43(1):131-48.
- 3 52. Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, et al. Transforming growth factor-  
4 beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal  
5 muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *Am J Pathol* 2004;164(3):1007-19.
- 6 53. Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, et al. Relationships between  
7 transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal  
8 muscle fibrosis. *J Biol Chem* 2007;282(35):25852-63.
- 9 54. Chan YS, Li Y, Foster W, Horaguchi T, Somogyi G, Fu FH, et al. Antifibrotic effects of  
10 suramin in injured skeletal muscle after laceration. *J Appl Physiol* 2003;95(2):771-80.
- 11 55. Sato K, Li Y, Foster W, Fukushima K, Badlani N, Adachi N, et al. Improvement of muscle  
12 healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis. *Muscle*  
13 *Nerve* 2003;28(3):365-72.
- 14 56. Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in  
15 skeletal muscle. *J Orthop Res* 2003;21(5):798-804.
- 16 57. McLoon LK. Focusing on fibrosis: halofuginone-induced functional improvement in the mdx  
17 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*  
18 2008;294(4):H1505-7.
- 19 58. Negishi S, Li Y, Usas A, Fu FH, Huard J. The effect of relaxin treatment on skeletal muscle  
20 injuries. *Am J Sports Med* 2005;33(12):1816-24.

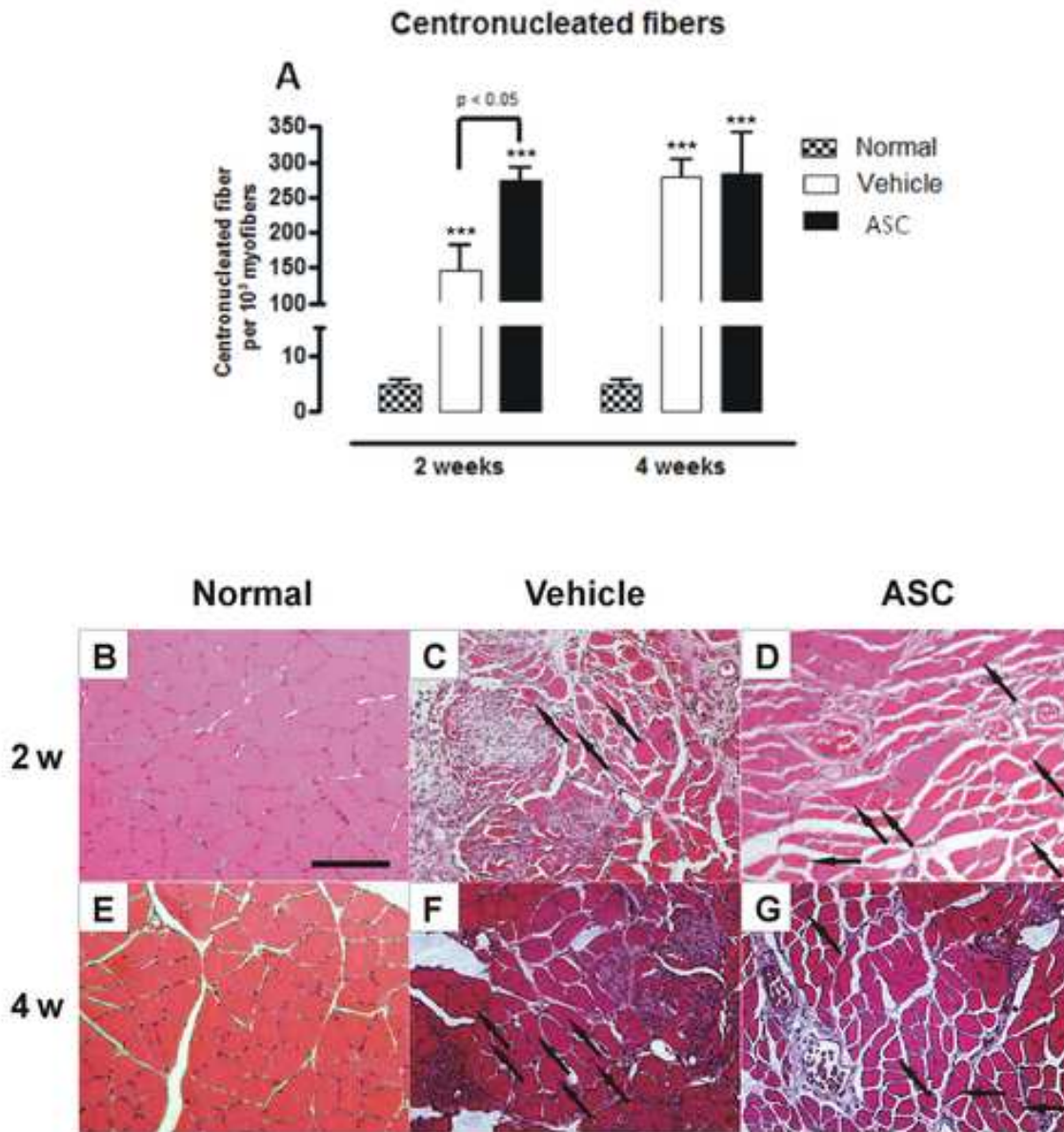
21

- 1 **10 ng**). Real time PCR for the detection of the SRY gene as an estimation of male cell chimerism
- 2 in rat female skeletal muscle at 3h, 24h, 72h, 14 days and 28 days after ASC engraftment.
- 3 Results represent mean of three independent biological replicates (B). \* **p < 0.05**; \*\* **p < 0.01**;
- 4 \*\*\* **p < 0.001 compared to positive control**





**Figure 3**  
[Click here to download high resolution image](#)



**Figure 5**  
[Click here to download high resolution image](#)

