

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

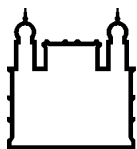
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Modulação do metabolismo energético na hanseníase

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

RIO DE JANEIRO

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Rychelle Clayde Affonso Medeiros

Modulação do metabolismo energético na hanseníase

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

Orientador: Dr. Flavio Alves Lara

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela

Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

M488 Medeiros, Rychelle Clayde Affonso

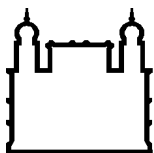
Modulação do metabolismo energético na hanseníase / Rychelle Clayde Affonso Medeiros. – Rio de Janeiro, 2014.

xvi, 107 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 87- 91

1. Glicose. 2. Metabolismo. 3. Hanseníase. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Rychelle Clayde Affonso Medeiros

Modulação do Metabolismo energético na Hanseníase

Orientador: Dr. Flávio Alves Lara

Aprovada em: 15/08/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

Prof. Dr. Claudio Akio Masuda / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Wagner Barbosa Dias / Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUPLENTE:

Prof. Dra. Mônica Montero Lomeli / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Cristiana Santos de Macedo / Instituto Oswaldo Cruz- RJ

REVISOR:

Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2014.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy

Agradecimentos

Aos meus pais, Evaldo e Mary, pelo grande amor, carinho e dedicação. Meus grandes incentivadores. Fonte de toda a minha inspiração na redação desta tese. Obrigada!

Aos meus irmãos, Evaldo e Rycharda por toda força e inspiração.

Ao meu amor Marcio Vinicius pelo carinho, apoio incondicional e paciência perante meus momentos de ausência ou de nervosismo diante da responsabilidade de conduzir um trabalho científico.

Ao meu orientador e mestre, Dr. Flávio Alves Lara por destinar a mim tamanha responsabilidade: desenvolver este projeto científico. Sua paciência, carinho e parceria com seus alunos é admirável. Sua orientação é fundamental para a minha formação acadêmica!

Ao Dr. Julio Jablonski por sua grande colaboração nos resultados de expressão gênica em pacientes.

Ao Dr. Milton Ozório Moraes por toda a sua ajuda na discussão dos resultados deste trabalho e na minha formação acadêmica.

Ao Dr. Mauro Sola-penna por me ajudar nos ensaios de atividade enzimática, discutir resultados e contribuir bastante para a formação deste trabalho.

Ao Dr. Marcus Fernandes de Oliveira por toda ajuda nos ensaios de potencial mitocondrial, disponibilizando seu tempo para inúmeras discussões sobre os nossos resultados e por ter aceitado ser o revisor deste trabalho. Obrigada!

À Dr. Luciana Silva Rodrigues por todo o seu carinho, atenção e ajuda nas análises por citometria de fluxo. Foi definitivamente peça fundamental na minha formação.

À Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani e Dr. Cristiana Santos Macedo pela grande ajuda intelectual no desenvolvimento deste projeto.

À minha ex-aluna de iniciação científica e agora aluna de mestrado, Karina Girardi, pela enorme ajuda em experimentos e por seu grande carinho. Torço muito por você!

Aos meus grandes amigos, Fabrício Motta e Jessica Ferreira pela intensa ajuda na elaboração deste trabalho. Além disso, foram primordiais para tornar os momentos “estressantes” de trabalho, em agradáveis e felizes. Para vocês, meu eterno carinho e amizade!

À amiga Livia Lobato pelo seu carinho e por me acompanhar em toda a jornada do mestrado. Sua amizade, companheirismo nas disciplinas, seminário discente e na dissertação foram importantíssimas!

À todos os meus amigos de laboratório: André, Chyntia, Robertha, Leonardo, Sabrina, Thábata Marcos, Fernanda, Débora, Camila, Eliza, Arthur, João, Larissa e Márcia por toda ajuda e agradável convívio! Obrigada !

Ao meu grande amigo Thiago Pinto por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Seu carinho e amizade também foram fundamentais nesses dois anos de trabalho, pois tornaram os dias mais engraçados e felizes! Meu eterno carinho e amizade! Obrigada !

Às agências de fomento CAPES, IOC, FAPERJ pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Lista de abreviaturas, siglas e símbolos..... | x |
| Lista de figuras..... | xiii |
| Lista de tabelas..... | xv |
| Resumo | xvi |
| Abstract | xvii |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 1.1 Hanseníase..... | 02 |
| 1.1.1 Considerações gerais | 02 |
| 1.1.2 Classificação..... | 05 |
| 1.1.3 Agente etiológico | 06 |
| 1.2 Metabolismo energético..... | 09 |
| 1.2.1 Glicose e glicólise | 09 |
| 1.2.2 Destino do piruvato em condições anaeróbias | 11 |
| 1.2.3 Destino do piruvato em condições aeróbias | 12 |
| 1.2.4 Fosforilação Oxidativa | 14 |
| 1.2.5 Via das pentose- fosfato | 15 |
| 1.2.6 Particularidades do metabolismo energético do gênero <i>Mycobacterium</i> | 17 |
| 1.3 As células de Schwann | 19 |
| 1.3.1 Células de Schwann e <i>M. leprae</i> | 20 |
| 1.4 Alterações metabólicas ocasionadas na infecção pelo <i>M. leprae</i> e em outras patologias infecciosas | 22 |
| 1.4.1 <i>M. leprae</i> induz a formação de Corpúsculos lipídicos | 22 |
| 1.4.2 Alterações metabólicas em outras patologias | 24 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 26 |
| 3. OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 Objetivo geral | 29 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 29 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 4.1 – Cultivo de micobactérias..... | 31 |
| 4.1.1 – <i>M. leprae</i> | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.2 – <i>M. bovis</i> -BCG | 31 |
| 4.1.3 – <i>M. Smegmatis</i> | 32 |
| 4.2 – Cultura de células, ensaios de infecção e recrutamento de pacientes | 32 |
| 4.2.1 –Schwannoma da linhagem ST8814 | 32 |
| 4.2.2 Pacientes | 33 |
| 4.3- Captação de glicose | 35 |
| 4.4 -Análise da concentração de lactato | 36 |
| 4.5- Potencial de membrana mitocondrial | 37 |
| 4.6 - Atividades Enzimáticas | 38 |
| 4.7- Quantificação de proteínas | 39 |
| 4.8 - PCR em tempo Real de lesões de pele | 40 |
| 4.9 - Análises Estatísticas | 40 |
| 5. RESULTADOS | 41 |
| 5.1- <i>M. leprae</i> é capaz de modular a captação de glicose na célula hospedeira..... | 42 |
| 5.2 – O aumento da captação de glicose não está associado ao aumento da atividade da enzima fosfofrutocinase-1 (PFK1)..... | 44 |
| 5.3 – Análise de enzimas da via das pentose-fosfato..... | 45 |
| 5.4 – A infecção diminui o potencial elétrico da membrana mitocondrial de células ST8814 | 48 |
| 5.5- Análise da fermentação láctica em células infectadas e amostras de pacientes | 52 |
| 5.6 – <i>M. leprae</i> foi capaz de aumentar a captação da enzima ATP citrato liase <i>in vitro</i> | 58 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 60 |
| 7. CONCLUSÕES | 69 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

| | |
|--------|---|
| °C | Graus Celsius |
| a.C | antes de Cristo |
| ACC | acetil CoA carboxilase |
| ACL | Atp citrato liase |
| ADC | Albumina bovina, dextrose, catalase |
| ANOVA | análise de variância |
| ASA | Ambulatório Souza Araújo |
| ATP | adenosina trifosfato |
| ATP6 | Gene para ATP sintase subunidade 6 |
| BAAR | bacilo álcool-ácido resistente |
| BCG | Bacilo de Calmette e Guérin |
| BB | “borderline borderline” |
| BL | “borderline” lepromatoso |
| BSA | albumina sérica bovina |
| BT | “borderline” tuberculóide |
| CCCP | cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona |
| cDNA | ácido nucleico complementar |
| CoA | Coenzima A |
| COX2 | Gene da citocromo c oxidase |
| CS | Célula de Schwann |
| CYTB | Gene para citocromo b |
| DMSO | “Dimethyl sulfoxide” |
| DNA | ácido Desoxirribonucléico |
| D.O. | densidade óptica |
| ESAT-6 | antígeno de secreção precoce de 6-kDa |
| et al. | e outros |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAD | Dinucleótido de flavina e adenina |
| FAZ | Ácido graxo sintase |
| FPP | Farnesil pirofosfato |
| GAPDH | gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| GLUT | Transportador de glicose |
| G6P | Glicose-6-fosfato |
| G6PD | Glicose-6-fosfato desidrogenase |
| HK | Hexocinase |

| | |
|----------------|--|
| IGF-1 | Fator semelhante à insulina I |
| iNOS | Óxido nítrico sintase |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| LL | Lepromatosos lepromatoso |
| M | Molar |
| M. | Mycobacterium |
| MAG | Glicoproteína associada a mielina |
| MBP | Proteína básica mielínica |
| Mb | mega pares de base |
| MB | Multibacilar |
| mL | Mililitro |
| μM | Micromolar |
| mM | Milimolar |
| MOI | multiplicidade de infecção |
| mRNA | ácido ribonucléico mensageiro |
| NAD | dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| 2- NBDG | 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose |
| nM | Nanomolar |
| Nm | Nanômetros |
| OMS | Organização mundial da saúde |
| PABA | ácido para-amino-benzóico |
| PARK | gene que codifica a proteína parkina |
| PB | Paucibacilar |
| PBS | tampão salina fosfato |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3- cinase |
| PMP22 | Proteína mielínica periférica 22 |
| PFK | 6-fosfofruto-1-cinase |
| PGL-I | glicolípídeo fenólico I |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| PK | Piruvato cinase |
| PQT | Poliquimioterapia |
| P ₀ | Proteína zero |
| qRT-PCR | RT-PCR quantitativo (em tempo real) |
| RD | região de diferença |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPM | rotações por minuto |

| | |
|------|--|
| SFB | soro fetal bovino |
| SNP | polimorfismo de base única |
| Th | linfócitos T auxiliares (T helper) |
| TLR | receptores do tipo Toll |
| TMRM | Tetrametil rodamina éster |
| TNF | fator de necrose tumoral |
| TOOS | N- ethyl-N-[2-hydroxy-3-sulfopropyl-]3-methylaniline |

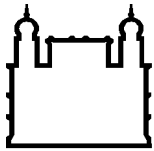
Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2013..... | 04 |
| Figura 1.2. Coeficiente de prevalência de hanseníase por 10 mil habitantes no Brasil | 05 |
| Figura 1.3: Formas clínicas da hanseníase | 06 |
| Figura 1.4. Cultivo de <i>M. leprae</i> em patas de camundongos nude. | 08 |
| Figura 1.5: Esquema da via glicolítica..... | 10 |
| Figura 1.6: Reação catalizada pela lactato desidrogenase..... | 11 |
| Figura 1.7: Lançadeira para a transferência de Acetil- CoA da mitocôndria para o citosol..... | 13 |
| Figura 1.8: Esquema geral da fosforilação oxidativa..... | 15 |
| Figura 1.9: Visão geral do metabolismo de Carboidratos | 16 |
| Figura 1.10: Esquema demonstrando o suporte metabólico oferecido pelas células gliais ao axônio..... | 20 |
| Figura 1.11: indução da formação de corpúsculos lipídicos nos dois tipos celulares preferencialmente infectados pelo bacilo | 23 |
| Figura 2 – Fluxograma das etapas do estudo da modulação do metabolismo energético na hanseníase..... | 27 |
| Figura 5.1. Células de Schwann infectadas com <i>M. leprae</i> apresentam aumento de intensidade de fluorescência do análogo de glicose 2-NBDG | 42 |
| Figura 5.2. Análise da captação de glicose em células ST8814 infectadas com <i>M.leprae</i> por citometria de fluxo | 43 |
| Figura 5.3. Atividade da enzima PFK-1 em lisados de células ST8814..... | 44 |
| Figura 5.4. <i>M. leprae</i> aumenta a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. | 45 |
| Figura 5.5. Células ST8814 infectadas com <i>M. leprae</i> apresentam aumento da atividade da enzima málica | 46 |
| Figura 5.6. Expressão relativa do gene G6PD em biópsias de pacientes | 47 |
| Figura 5.7. Expressão relativa do gene GSR em biópsias de pacientes..... | 48 |
| Figura 5.8 Determinação das condições ótimas para a análise do potencial mitocondrial das células ST8814 intactas por citometria de fluxo. | 49 |
| Figura 5.9. A infecção diminui o potencial elétrico das membranas mitocondriais das células hospedeiras | 50 |
| Figura 5.10. Análise do potencial mitocondrial de células ST8814 infectadas com o bacilo por 48 horas em citometria de fluxo | 51 |
| Figura 5.11. Sobreposição da mediana de intensidade de fluorescência nos ensaios de potencial elétrico por citometria de fluxo..... | 52 |
| Figura 5.12 <i>M. leprae</i> e não outras micobactérias é capaz de diminuir os níveis de lactato no sobrenadante da células infectadas | 53 |

| | |
|--|----|
| Figura 5.13. <i>M. leprae</i> é capaz de modular a atividade da enzima lactato desidrogenase isoforma M em células ST8814 | 54 |
| Figura 5.14. Expressão relativa de gene LDHA em fragmentos de pele lesionada de pacientes de ambos os polos da doença | 55 |
| Figura 5.15. Em células ST8814, o bacilo de Hansen parece não modular a atividade de LDH, isoforma H..... | 56 |
| Figura 5.16. Expressão relativa do gene LDHB em biópsias de pacientes | 57 |
| Figura 5.17. Os níveis de lactato são inferiores nos pacientes multibacilares em relação aos paucibacilares e indivíduos saudáveis | 58 |
| Figura 5.18. Células ST8814 infectadas com <i>M. leprae</i> apresentam um aumento da atividade da enzima ATP citrato liase | 59 |
| Figura 6.1: Modelo esquemático das etapas envolvidas na infecção de células de Schwann pelo <i>M. leprae</i> , baseado nos resultados e hipóteses gerados no presente estudo. | 67 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 – Comparação das características dos genomas de <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> (adaptado de Cole, 2001) | 09 |
| Tabela 4.1- Características dos pacientes hansenianos e controles sadios..... | 34 |
| Tabela 4.2 - Dados clínico-epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo..... | 34 |
| Tabela 4.3 - Reagentes utilizados no meio reacional para cada enzima analisada..... | 38 |
| Tabela 4.4 - Sequências dos iniciadores usados nas reações de qRT-PCR de espécimes cutâneos | 40 |



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

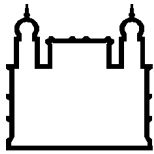
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Modulação do metabolismo energético na hanseníase

RESUMO

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

O *Mycobacterium leprae*, patógeno intracelular causador da hanseníase, infecta com sucesso células da glia do sistema nervoso periférico, denominadas células de Schwann (CS). Estas células são responsáveis pela mielinização e envio de metabólitos, como o lactato e o piruvato, para os axônios, mantendo assim os processos energéticos associados à transdução de sinal nos nervos periféricos. A interação entre o bacilo e sua célula hospedeira vem sendo alvo de muitos estudos de modulação imunológica, desmielinização e de metabolismo lipídico, porém as possíveis modulações sobre o metabolismo energético destas células impostas pelo patógeno permanecem negligenciadas e desconhecidas. Para determinar estas modulações, estudamos o metabolismo energético de uma linhagem de células de Schwann humanas (ST8814) infectadas *in vitro* por *M. leprae* purificado a partir de extratos de coxim plantar de camundongos atímicos nu/nu. Analisamos processos de entrada e quebra de glicose, a fermentação, potencial elétrico mitocondrial e biossíntese de lipídios. A internalização de glicose foi avaliada através do seu análogo fluorescente 2-NBDG e o potencial elétrico mitocondrial monitorado através da sonda lipofílica catiônica TMRM. Para analisar a fermentação da glicose quantificamos lactato através do kit lactato liquiform (Labtest) e analisamos a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) em suas duas isoformas. Para análises de quebra de glicose e biossíntese de lipídios foram avaliadas atividades de enzimas chaves como fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e ATP citrato liase (ACL) através do monitoramento da redução/oxidação de NADH ou redução de NADP⁺ em 340 nm. Células infectadas apresentaram aproximadamente o dobro da captação de 2-NBDG e liberaram no sobrenadante a metade do lactato observado nas culturas controle. Este efeito foi acompanhado da diminuição de atividade de LDH- M, isoforma capaz de converter piruvato em lactato. A fluorescência de TMRM indicou redução do potencial elétrico mitocondrial nas células infectadas. Em contrapartida estas células demonstraram aumento significativo de atividade das enzimas G6PD e ACL. Concluímos que o *M. leprae* é capaz de modular a captação de glicose, fermentação, potencial elétrico mitocondrial e enzimas chaves do metabolismo energético de células de schwann humanas da linhagem ST8814.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Energy Modulation in Leprosy

ABSTRACT

Rychelle Clayde Affonso Medeiros

Mycobacterium leprae, an intracellular pathogen which causes leprosy, is able to infect Schwann cells (SC) in peripheral nervous system. These cells are responsible for myelination and release of metabolites such as lactate and pyruvate to axons and signal transduction in peripheral nerves. The host-pathogen interaction in leprosy has been target of several studies of immune modulation, demyelination and lipid metabolism. However, modulations on the energy metabolism of these cells during infection by mycobacteria remain unknown. Here, we performed an *in vitro* study of the energy metabolism in the human SC cell line ST8814 infected with *M. leprae* purified from footpads of athymic mice and evaluate the glucose uptake and cleavage, fermentation, mitochondrial electrical potential and lipid biosynthesis. The glucose uptake was evaluated using a fluorescent analog, 2-NBDG, and mitochondrial electrical potential monitored using a lipophilic cationic probe, TMRM. Also, fermentation was evaluated by lactate quantification using Liquiform kit (Labtest) and by activity of lactate desidogenase (LDH) enzyme into its two isoforms. Then, we analyzed the activity of key enzymes in the glucose cleavage and lipid biosynthesis: 1-phosphofructokinase (PFK-1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and ATP citrate lyase (ACL) by monitoring the reduction / oxidation NADH or NADP⁺ reduction at 340 nm. We demonstrated infected cells increased 2-fold the uptake of 2-NBDG and reduced the lactate production when comparing with uninfected cultures. This effect was followed by a decreased activity of LDH-M isoform, which is converts pyruvate to lactate. The fluorescence of TMRM indicated a reduction of mitochondrial electrical potential in *M. leprae*-infected SC. Interestingly, these cells showed a significant increase of activity of G6PD and ACL enzymes. Thus, we conclude that *M. leprae* can modulate glucose uptake, fermentation, mitochondrial electrical potential and key enzymes of energy metabolism of human Schwann cells of lineage ST8814.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase.

1.1.1 Considerações gerais

A hanseníase é uma doença dermatológica e neurológica crônica resultado da infecção pelo patógeno não cultivável *Mycobacterium leprae*, que apresenta comportamento intracelular obrigatório e infecta principalmente macrófagos e células de Schwann (Kaplan e Cohn, 1986). A doença gera uma série de acometimentos como: lesões na pele, mucosas, nervos periféricos e danos neurais que, juntos, podem acarretar em desfiguração e deformidades nos pacientes caracterizando o estigma social associado a doença (Scollard et al., 2006). A expressão Lepra anteriormente relacionada à patologia foi substituída por hanseníase em 1976 no Brasil em homenagem ao descobridor do patógeno Gerhard Hansen. A troca teve como objetivo amenizar o preconceito e rejeição na qual os pacientes eram submetidos ao serem designados como “leprosos”.

Relatos sobre a doença demonstram a sua identificação há muitos séculos e as primeiras descrições efetivamente aceitas pela história são de textos oriundos da Ásia (660 a.C.), da Grécia (400 a.C.), da China (300 a.C.) e da Itália (100 a.C.). Nestes textos encontramos a definição dos sintomas detectados atualmente na hanseníase, como perda de sensibilidade, manchas brancas e avermelhadas, ulcerações, cegueira, rouquidão e deformações na face (Trautman, 1984; Robbins et al., 2009). Em algumas passagens do antigo testamento bíblico foi descrita a doença e a total desaprovação aos portadores dos seus sintomas, uma vez que a caracterizavam como “fonte de castigos divinos” ou de “impureza de espírito”. Recentemente, algumas análises em genômica comparativa, utilizando diferentes cepas de *M. leprae*, sugerem que a origem da hanseníase ocorreu no leste africano, em nossos ancestrais hominídeos, e se dispersou seguindo as migrações de nossa espécie (Monot, et. al, 2005).

O mecanismo exato de transmissão da doença ainda é desconhecido. Acredita-se que a transmissão se dá pelo contato direto entre pessoas, principalmente pelas vias respiratórias. Indivíduos com a doença em sua forma multibacilar, ou seja, apresentando uma grande quantidade de bacilos, são considerados como a principal fonte de infecção (Job et al., 2005). Atualmente sabe-se que o homem não é o único hospedeiro natural do bacilo. Na década de 70 foram relatados nos Estados Unidos tatus naturalmente infectados. Além disso, na mesma região alguns pacientes apresentavam o patógeno com a sequência de genes idêntica aos dos tatus, começando assim a suspeita que estes poderiam ser uma importante fonte para a dispersão do *M. leprae* (Kirchheimer & Storrs, 1971; Truman et al., 2011). O material genético do bacilo já foi encontrado em solos e águas de áreas endêmicas da Índia e da

Indonésia, levando a acreditar em forma de transmissão do bacilo por amostras ambientais (Matsuoka et al., 1999; Lavania et al., 2008).

O diagnóstico da doença é baseado em exames clínicos e laboratoriais. Na ausência de infraestrutura laboratorial, o reconhecimento se dá basicamente por sinais clínicos com a consequente análise dos sintomas. Os sinais mais claros da doença envolvem falta de sensibilidade, lesões cutâneas e espessamento dos nervos. Para detecção do patógeno, exames baciloscópicos e histopatológicos podem ser realizados utilizando esfregaços cutâneos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões) e biópsias cutâneas ou do ramo sensitivo dos nervos periféricos. Além disso, em casos extremamente difíceis, podem ser utilizados ensaios moleculares baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando amostras clínicas como linfa, sangue, secreção nasal e fragmentos de pele e nervos. (Martinez et al., 2006; Martinez et al., 2009; Martinez et al., 2011).

O primeiro medicamento eficaz utilizado contra a hanseníase foi a dapsona que inibe a divisão bacteriana pela competição com ácido para-amino-benzóico (PABA) (Seydel et al., 1980). Na década de 60, Adams e colaboradores perceberam através de avaliações clínicas o surgimento de cepas resistentes ao fármaco e com isso outras drogas como Rifampicina e Clofazimina foram utilizadas para a cura da doença. A Rifampicina atua inibindo a RNA polimerase dependente de DNA da bactéria, já a Clofazimina ainda apresenta mecanismo de ação desconhecido (Revisto por Scollard, 2006).

O aumento de cepas resistentes fez com que, em 1982, a organização mundial de saúde (OMS) implementasse o tratamento através da poliquimioterapia (PQT), onde o paciente era submetido às três diferentes drogas mencionadas anteriormente. Nos últimos 30 anos um grande número de casos de hanseníase que necessitavam da PQT foi relatado em mais de 122 países e ao longo desses anos cerca de 16 milhões de pacientes foram curados. Os fármacos são distribuídos gratuitamente pela OMS para unidades de saúde de regiões endêmicas pois o tratamento do paciente é fundamental para bloquear a fonte de infecção interrompendo a cadeia de transmissão da patologia (WHO, 2013; Ministério da saúde, 2013).

Apesar da implementação do tratamento a partir da PQT reduzir os níveis de prevalência da doença, a sua erradicação parece distante e a hanseníase ainda é considerada um sério problema de saúde pública. Em 2012, de acordo com notificações de 115 países e territórios, a doença apresentou 232.857 casos notificados e a prevalência global foi de 181.941, ou seja, 0,34 casos para cada 10.000 habitantes. O sudeste da Ásia (71%) e as Américas (16%) são as regiões que apresentaram o maior número de casos. Isto é claramente demonstrado na figura 1.1 obtida da organização mundial de saúde.

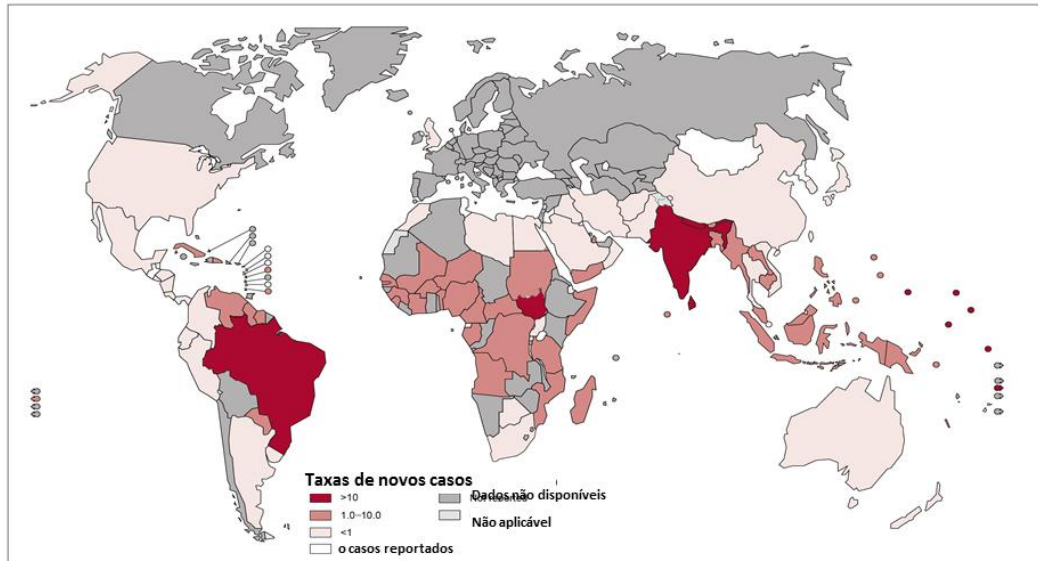


Figura 1.1: Taxas da prevalência mundial de hanseníase reportadas à OMS, no início do ano de 2013, referentes ao ano anterior. As taxas de novos casos referem-se a cada 100.000 habitantes. Adaptado de OMS, 2013.

Apesar da taxa de prevalência apresentar uma ligeira queda nos últimos três anos (WHO, 2013), o Brasil é o segundo em número de casos notificados, com cerca de 33.303, representando 14% do número total. O país só fica atrás da Índia, com 134.752 de novos casos (WHO, 2013).

No Brasil é claramente perceptível diferenças na prevalência da doença entre Estados e regiões, onde a concentração maior ocorre nos locais de grande pobreza. Em 2013, o ministério da saúde publicou dados referentes à distribuição da doença no país demonstrando a grande prevalência da doença nos estados de Mato Grosso, Maranhão e Tocantins (Fig – 1.2 A), e dentro destes, a alta prevalência em microrregiões com baixas condições socioeconômicas (Figura 1.2 B) (Ministério da Saúde, 2013).

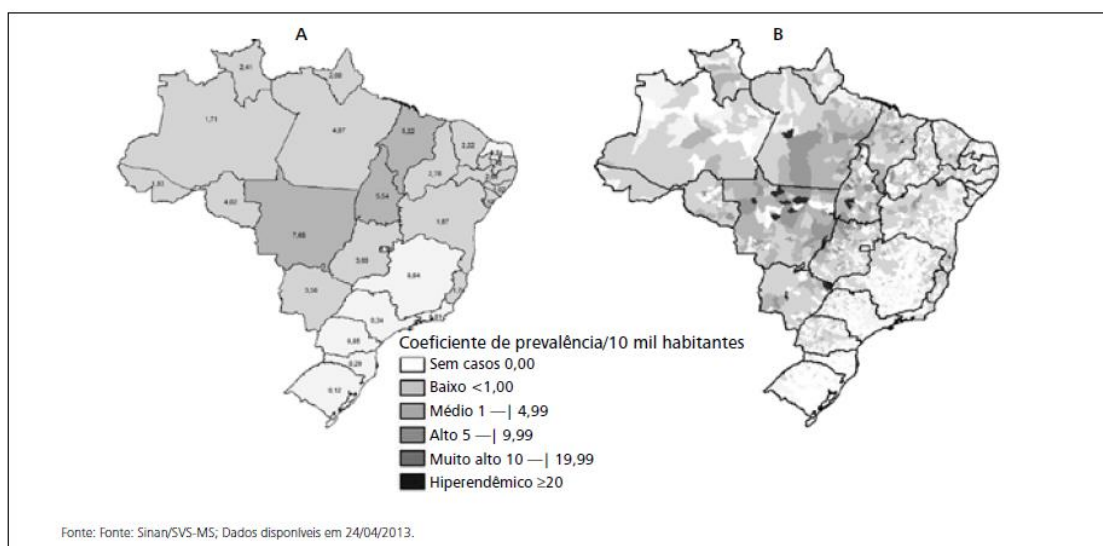


Figura 1.2. Coeficiente de prevalência de hanseníase por 10 mil habitantes no Brasil – 2012. (A) Estados (B) microrregiões. Estados com maior prevalência de Hanseníase encontram-se no Norte, Centro,Oeste e Nordeste do país (Ministério da Saúde, 2013).

1.1.2 Classificação

A classificação das formas clínicas da doença foi estabelecida por Ridley e Jopling em 1966 e combina muitos parâmetros, como os clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos. Esta classificação apresenta dois grandes pólos. Em um pólo encontram-se os pacientes lepromatosos (LL) que apresentam alta carga bacilar proveniente da inexistência de resposta celular contra o patógeno, apesar de apresentarem altos títulos de anticorpos contra o mesmo. No outro pólo encontramos os pacientes tuberculóides (TT) que apresentam uma forte resposta celular ao *M. leprae* e por isso, apresentam baixa carga bacilar, apesar de apresentarem baixos títulos de anticorpos contra o mesmo. Em geral os tuberculóides apresentam uma única lesão enquanto os lepromatosos, várias. Entre esses dois extremos encontram-se as formas intermediárias que denominamos *bordeline*: *bordeline* lepromatoso (*BL*), *bordeline bordeline* (*BB*) e *bordeline* tuberculoide (*BT*), onde a resposta imune celular e humoral é maior ou menor de acordo com a proximidade ao pólo tuberculóide ou lepromatoso.

A maioria dos indivíduos que entram em contato com o bacilo não desenvolve a doença. Os que desenvolvem, primeiramente entram em um estágio inicial e transitório que denominamos como indeterminado (I) e posteriormente evoluem para uma das cinco classificações mencionadas anteriormente (Fig 1.3) (Jopling & Mc Dougall, 1988).

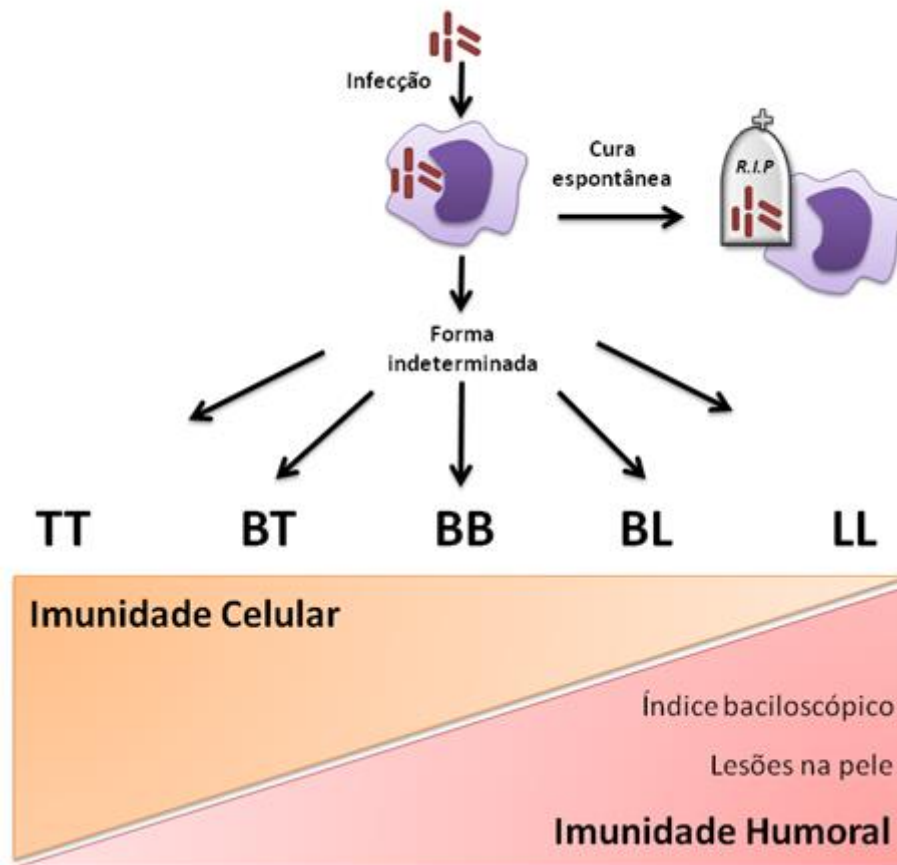


Figura 1.3: Formas clínicas da hanseníase. Esquema demonstra o perfil do espectro da doença. Representação baseada na classificação de Ridley e Jopling, 1966: TT (tuberculóide), BT (“borderline” tuberculóide), BB (“borderline borderline”), BL (“borderline” lepromatosa), LL (lepromatosa). Estão esquematizados aspectos da resposta imune do paciente, número de lesões na pele e índice baciloscópio.

Na tentativa de dinamizar o processo terapêutico, a OMS estabeleceu uma classificação simples baseada na carga bacilar. Os pacientes são divididos em dois grupos: multibacilares (MB) ou paucibacilares (PB). Os paucibacilares compreendem as formas clínicas TT, BT e I, já os multibacilares as formas BB, BL e LL. A duração do tratamento com a poliquimioterapia é diferenciada entre os grupos, onde pacientes PB apresentam seis meses de terapia e os multibacilares (MB) 12 meses (Britton e Lockwood, 2004).

1.1.3 O agente etiológico

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que apresenta até o momento tropismo descrito para dois tipos celulares do corpo humano: macrófagos de pele e células de Schwann (Bloom, 1986; Kaplan e Cohn, 1986). Foi caracterizado por Gerhard Hansen em 1874 e considerado então como o primeiro agente causador de uma doença (Hansen 1874). Hansen percebeu a presença de corpos em formas de bastões em amostras

oriundas de nódulos de pacientes, utilizando análise microscópica (Rees, 1985). Contudo, até hoje, não foi possível o seu cultivo *in vitro*, dificultando análises da sua biologia.

O gênero *Mycobacterium* apresenta mais de 70 espécies e pertence à ordem dos Actinomycetales e família Mycobacteriaceae. Deste gênero, três patógenos podem ser citados por causarem problemas à saúde humana, como o *Mycobacterium tuberculosis*, que causa a tuberculose, *Mycobacterium avium* e o *Mycobacterium intracellulare* que são espécies consideradas oportunistas.

O *M. leprae* é um bacilo gram-positivo, reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura. É considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois quando corado em vermelho pela fucsina não descora pela ação da solução álcool-ácida (método Ziehl-Nilsen). O seu crescimento é lento fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias (WHO 1987). A temperatura ótima para o seu crescimento é abaixo de 37°, sendo então o motivo pelo qual o bacilo apresenta preferência pelos arredores do corpo humano, ocupando os nervos periféricos (Shepard, 1965).

A sua parede celular é rica em ácidos micólicos ligados a uma camada eletrodensa de arabinogalactana e peptidoglicana. Além disso, mais externamente, apresenta fosfolipídeos e glicolipídeos. Esta estrutura única da parede é fundamental para todas as micobactérias, pois impede a passagem de várias drogas, acarretando em resistência a muitos medicamentos. Importante destacar a presença do glicolípido fenólico I (PGL-1) que é exclusivo no *M. leprae*, sendo por este motivo desde 1981 utilizado em diagnósticos precoces da doença (Hunter & Brennan, 1981; Vissa e Brennan, 2001).

A impossibilidade do cultivo *in vitro* desafiou cientistas na tentativa de promover alguma forma de reproduzir o bacilo. Shepard, na década de 60, demonstrou um crescimento local e limitado do patógeno em coxim plantar de camundongos, permitindo a abertura de campos de estudos neste sentido. A limitação do crescimento de bacilos no modelo adotado por Shepard originou-se da resposta imune do hospedeiro e devido a isso, iniciou-se o manejo ou a manipulação do sistema imunológico de camundongos na tentativa de disseminação efetiva de bacilos. Atualmente a utilização de camundongos atímicos (nude), com severa deficiência da produção de linfócitos T e B, permite uma grande quantidade de bacilos viáveis para serem utilizados em diferentes experimentos com diversas finalidades.



Figura 1.4. Cultivo de *M. leprae* em patas de camundongos BalbC Foxn1 nude). Demonstração da pata do animal 6 meses após inoculação com 5×10^7 bacilos (Imagem adaptada de Scollard et al., 2006).

Acredita-se que o patógeno tenha sido submetido a uma evolução reduitiva do genoma em relação a outras micobactérias. O genoma completo do *M. leprae* possui 3,27 megabases (Mb) e um conteúdo médio G+C de 57%. Esses valores são muito menores do que os encontrados no genoma do *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998), que contém 4,41 Mb, 65,6% G+C e aproximadamente 4000 genes codificantes. Além disso, o genoma do *M. leprae* possui características únicas, como o baixo número de genes codificantes (somente 49,5% do genoma), o elevado número de pseudogenes (27%) e regiões não codificantes (23,5%). Essa redução adaptativa do seu genoma resultou na eliminação de várias vias metabólicas, tornando-o um patógeno com necessidades metabólicas muito específicas, consequentemente impossibilitando o seu crescimento *in vitro*, demonstrando sua longa adaptação ao nicho intracelular (Cole et al., 2001).

O *M. leprae* apresenta um repertório menor de enzimas envolvendo a degradação de compostos de carbonos que o *M. tuberculosis*, mas é capaz de utilizar vias metabólicas como a glicólise e a β -oxidação. Em contraste, as vias anabólicas como síntese de purinas, pirimidinas, a maioria dos aminoácidos, nucleotídeos e a maioria das vitaminas e cofatores, parecem estar intactas no patógeno (Singh e Cole, 2011; Revisto por Scoland, 2006).

Tabela 1.1: Diferenciação entre os genomas de *M. leprae* e *M. tuberculosis* (Adaptado de Cole, 2001)

| Características | <i>M. leprae</i> | <i>M. tuberculosis</i> |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| Tamanho (pb) | 3.268.203 | 4.411.532 |
| Proteínas codificadas (%) | 49,5 | 90,8 |
| Genes codificantes (no.) | 1.604 | 3.959 |
| Pseudogenes | 1.116 | 6 |
| Conteúdo G-C (%) | 57,79 | 65,61 |

1.2 Metabolismo energético

1.2.1 glicose e glicólise

A glicose apresenta um papel central no metabolismo energético como combustível e fonte de carbono, representando grande reserva de energia potencial. Além disso, é um precursor altamente versátil de aminoácidos, coenzimas, ácidos graxos, colesterol, dentre outros (Nelson & Cox, 2011).

A captação de glicose nas células ocorre por meio de transportadores proteicos específicos denominados de GLUT (“Glucose Transporter” - transportadores de glicose). Um grande número de isoformas de GLUT já foram identificados e clonados, apresentando diferentes afinidades e capacidades de transportar glicose, sendo expressos em diferentes tecidos (Manolescu, *et al.*, 2007).

Ao entrar na célula, a glicose pode ser fosforilada pela ação da enzima hexocinase (HK) e o produto desta reação é a glicose-6-fosfato (G6P) que apresenta variáveis destinos, podendo ser incorporada a outras moléculas como o glicogênio e outros glicoconjugados, ou seguir vias metabólicas como a glicólise e a via das pentoses-fosfato (Nelson & Cox, 2011).

A oxidação da glicose pela via glicolítica é um importante caminho metabólico sendo bastante conservado na degradação de carboidratos na maioria dos organismos. Esta via gera como produto final duas moléculas de piruvato através de dez reações sequenciais realizadas por diferentes enzimas. As reações glicolíticas ocorrem no citosol e normalmente são

separadas em duas fases. A primeira fase é dita preparatória, onde há o requerimento de energia na forma de ATP para ativar a molécula de glicose através da sua fosforilação para as reações oxidativas posteriores, e a segunda, é denominada de pagamento ou produtora de energia. Na primeira, duas moléculas de adenosina trifosfato (ATP) são utilizadas para converter uma molécula de glicose em duas de gliceraldeído-3-fosfato. Na segunda fase, o gliceraldeído-3-fosfato é degradado em piruvato, com a produção de quatro equivalentes de ATP e dois equivalentes de NADH (Nelson & Cox, 2011). No final do processo temos a presença de duas moléculas de piruvato, dois equivalentes de ATP e nicotinamida adenosina dinucleotídeo reduzidos (NADH). As dez reações estão demonstradas na figura 1.5.

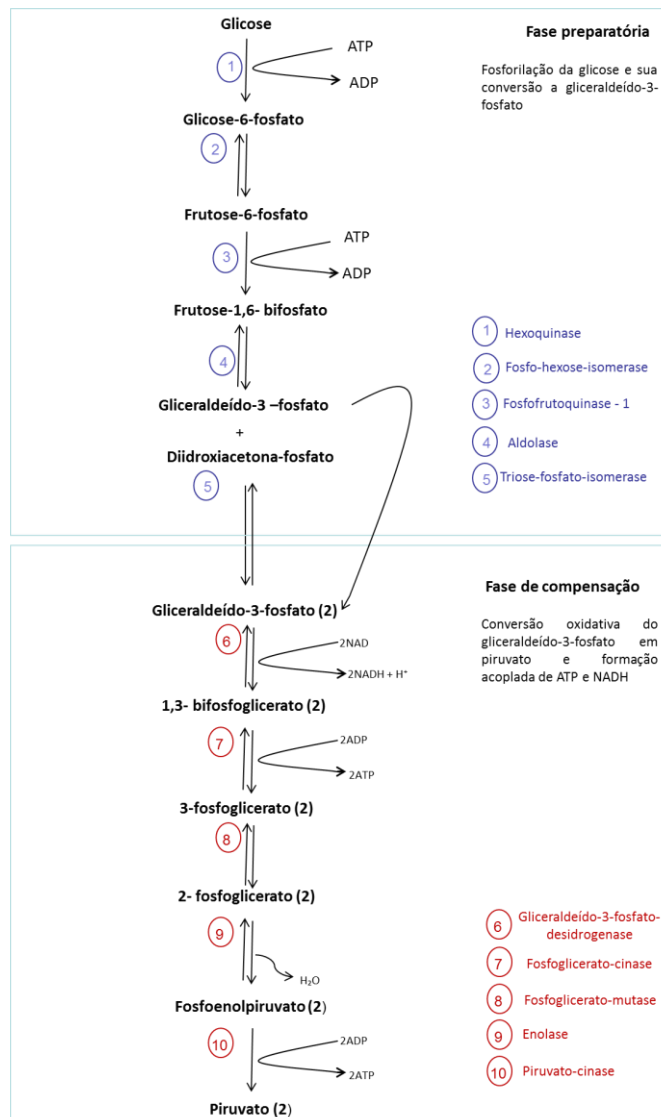


Figura 1.5: Esquema da via glicolítica. Dez reações citosólicas com consequente redução de NAD^+ , formação de duas moléculas de piruvato e saldo de 2 ATPs por glicose quebrada, caracterizam a via (Adaptado de Nelson e Cox, 2011)

Das reações demonstradas na figura 1.5, três são irreversíveis em condições fisiológicas. São essas, as reações catalisadas pelas enzimas: hexocinase (HK), 6-fosfofruto-1-cinase (PFK) e a piruvato cinase (PK). Por participarem de processos inconvertíveis na glicólise essas rotas são consideradas os principais alvos regulatórios em todo o fluxo de oxidação de glicose pela via glicolítica, apresentando várias formas de regulação (Mulukutla et al., 2010; Sola-Penna et al., 2010).

1.2.2 Destino do piruvato em condições anaeróbias

Em condições anaeróbias, ou de microaerofilia, o piruvato formado na glicólise é convertido em lactato, sendo reduzido através da oxidação do NADH pela atuação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esta redução é necessária na ausencia de oxigênio para se regenerar NAD^+ , uma vez que o mesmo não pode ser gerado a partir da redução do NADH na cadeia respiratória, impedindo assim a inibição da glicólise por falta de um aceptor de elétrons (Nelson e Cox, 2011).

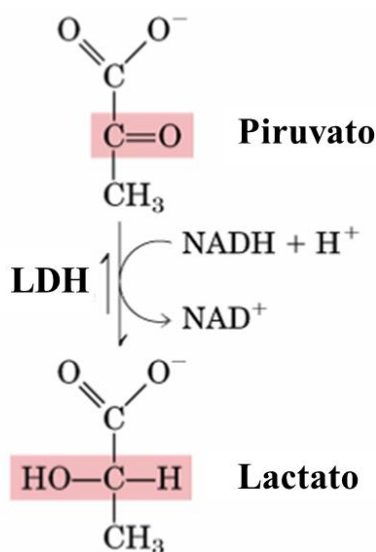


Figura 1.6: Reação catalizada pelo complexo lactato desidrogenase (Adaptado de Nelson e Cox, 2011).

A LDH é uma enzima tetramérica, formada por quatro subunidades que apresentam duas isoformas, M e H, que são codificadas pelos genes LDHA e LDHB respectivamente. A subunidade M (oriundo do inglês *Muscle*) está correlacionada com a conversão de piruvato em lactato em condições fisiológicas e a H (de *Heart*), de lactato à piruvato. A combinação

entre essas subunidades gera a formação de cinco isoformas: M4, M3H1, M2H2, M1H3 e H4. Os complexos lactato desidrogenase que apresentam grande proporção da isoforma H tendem a participar de tecidos com metabolismo aeróbico, onde há plena disponibilidade de oxigênio, como o tecido muscular cardíaco. A predominância da isoforma M por sua vez ocorre em tecidos com metabolismo anaeróbico ou microaeróbico frequente, como o músculo esquelético e também no fígado, que apesar de ser muito bem vascularizado, tem como função manter o nível de glicose sanguíneo através da gliconeogênese, se necessário, baseado em lactato (Markert CL et al., 1975; Swiderek & Paneth, 2011).

O lactato é transportado através da membrana por receptores específicos, os transportadores de monocarboxilato, ou proteínas MCTs. Existem, descritos na literatura, 14 isoformas de MCTs, das quais grande parte ainda não apresenta função determinada (revisito por Sola-penna et al., 2008). Células da glia, como os oligodendrócitos, são capazes de expressar MCT1 e MCT4. Youngjin e colaboradores demonstraram que a expressão de MCT1 no sistema nervoso central é exclusiva aos oligodendrócitos, co-localizando com proteínas de mielina e o seu silenciamento gera morte neuronal.

Na primeira metade do século passado, Otto Warburg detectou que células tumorais eram capazes de metabolizar glicose até 300 vezes mais avidamente que seus tecidos precursores, fermentando-a a lactato, mesmo em normóxia. Acredita-se que se trata de uma adaptação à vida no interior de um tumor sólido não vascularizado, onde para se manter os níveis de ATP em anaerobiose é necessário aumentar o consumo de glicose. Este fenômeno é conhecido como “efeito warburg” e desmistificou a ideia de que a via ocorreria apenas em anaerobiose (Revisito por Nelson & Cox, 2011).

1.2.3 Destino do piruvato em condições aeróbias

Em condições aeróbias o piruvato sofre ação do complexo piruvato desidrogenase (PDH) no interior da mitocôndria, catalisando a formação de Acetil-coA diante de NAD oxidado e coenzima A livre (CoA). O acetil-CoA gerado condensa com uma molécula de oxalacetato formando citrato o qual sofre sucessivas oxidações e desidrogenações com o objetivo principal de produzir energia (GTP) e reduzir coenzimas como NAD⁺ e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Em cada ciclo completo de reações utilizando uma molécula de acetil-CoA são gerados quatro co-substratos reduzidos: três NADH e um FADH₂ (Revisito por Buchakjian e Kornbluth, 2010).

O acetil-CoA que não é utilizado para a produção de energia é usado como precursor para a síntese de ácidos graxos ou se condensa para a síntese de colesterol no citosol. Como é

incapaz de atravessar a membrana mitocondrial, é necessário sua combinação com a molécula de oxaloacetato, formando o citrato, que por sua vez pode ser transportado para o citosol por receptores específicos (Hatzivassiliou, et al.,2005; Wang et al., 2010).

A enzima ATP citrato liase (ACL) é caracterizada como uma ligação direta entre o metabolismo da glicose e a formação de lipídios (revisto por Chypre, 2012). Esta é capaz de converter o citrato citosólico em acetil CoA e oxaloacetato, utilizando a hidrólise de ATP. Na via de síntese dos ácidos graxos, acetil CoA é carboxilado em malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC). Em seguida, a ácido graxo sintase (FAS) realiza a condensação de acetil - CoA e a malonil- CoA para produzir palmitato. Acetil-CoA também pode ser um precursor para a via do mevalonato sendo conduzido à síntese de farnesil - pirofosfato (FPP) que está envolvido na biossíntese do colesterol (Revisto por Buchakjian e Kornbluth, 2010).

O destino do oxaloacetato gerado a partir da ação da enzima ATP citrato liase pode ser a conversão em piruvato, por ações sequenciais de enzimas como a malato desidrogenase e a enzima málica citosólica. Desta forma o piruvato pode então retornar ao ambiente mitocondrial. Nesta conversão existe a formação de poder redutor na forma de nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Revisto por Nelson & Cox, 2011).

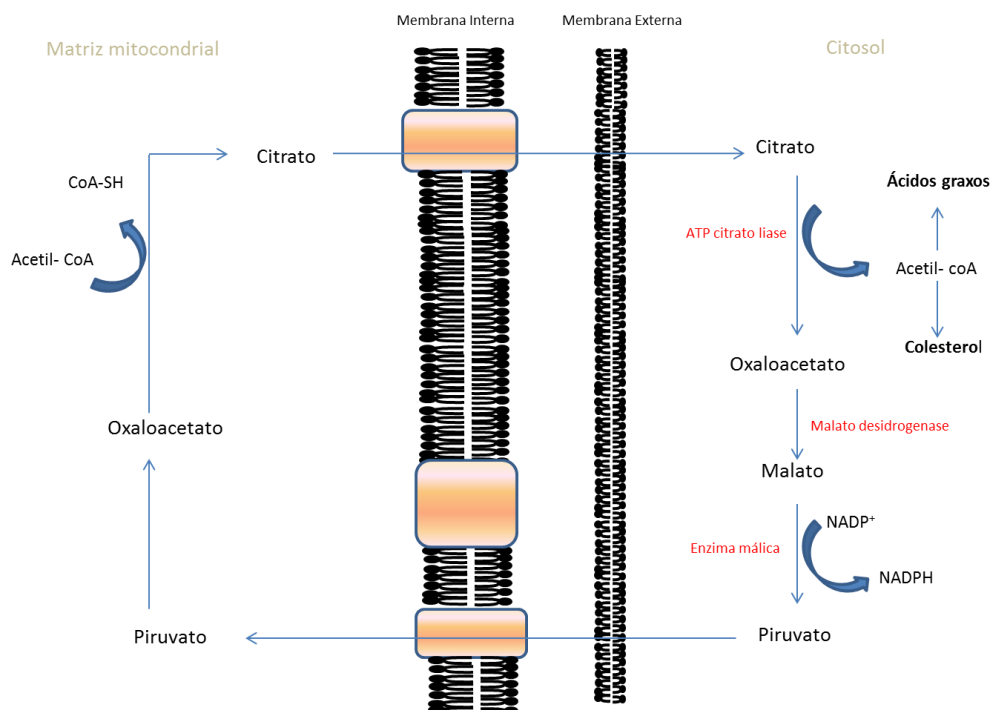


Figura 1.7: Lançadeira para a transferência de Acetil-CoA da mitocôndria para o citosol de forma resumida. O piruvato derivado do catabolismo da glicose no citosol é convertido em acetil-coA na matriz mitocondrial. Acetil CoA é exportado da mitocôndria como citrato. No citosol é convertido em lipídios. O oxaloacetato é reduzido a malato e este tem como principal destino a conversão em piruvato pela enzima málica

com consequente formação de poder redutor na forma de NADPH, sendo o piruvato produzido retornado para a matriz mitocondrial (Adaptado de Nelson & Cox, 2010).

1.2.4 Fosforilação oxidativa

As coenzimas reduzidas (NADH e FADH₂) são utilizadas como fonte de poder redutor pelos complexos transportadores de prótons da mitocôndria. Este transporte gera energia através da movimentação da ATP sintase, produzindo assim a maior parte (90%) do ATP total resultante do catabolismo da glicose (Mitchell & Moyle, 1965). Os prótons são recebidos na matriz mitocondrial pelo oxigênio, que se reduz a água, e por esse motivo a fosforilação oxidativa se encontra inibida na anaerobiose.

O transporte de elétrons é realizado pela cadeia respiratória mitocondrial que está localizada na membrana interna e consiste de quatro complexos, apresentando três “bombas” de prótons e uma ligação física ao ciclo do ácido cítrico. Os complexos são sequenciados de acordo com o seu potencial redox, assim a transferência de elétrons entre os complexos é feita no sentido de um potencial redox baixo para um potencial de redução mais elevado. Esta movimentação gera energia, que é utilizada no bombeamento de H⁺ da matriz para o espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria. Por difusão, os prótons tendem a voltar para a matriz mitocondrial, mas a membrana interna é impermeável, o que induz a passagem pelo complexo enzimático ATP sintase (complexo V). De forma geral o próton H⁺ provoca alterações conformacionais na enzima, necessárias para que esta ligue ADP e Pi, consequentemente, condensando-os e liberando ATP (Mitchel & Moyle, 1967).

Ao todo quatro complexos são capazes de induzir o deslocamento de elétrons na cadeia, são eles: *NADH-ubiquinona oxirreductase*, *NADH desidrogenase ou complexo I*, *succinato-ubiquinona reductase ou complexo II*, *CoQH₂ - citocromo c reductase ou complexo III e citocromo c oxidase, complexo IV*. O grupo prostético destes complexos representam o “fio condutor” por onde os prótons são transportados e podem ser quinóides (FMN, FAD, CoQ) ou metais de transição (centros FeS, hemos, proteínas ligadoras de Cu) (Revisto por Nelson & Cox, 2011).

É extremamente possível a inibição do processo de fosforilação oxidativa em seus vários estágios, bloqueando o transporte de elétrons ou a atividade da ATP sintase. A droga antimicina A interfere com o fluxo de elétrons no complexo III. Como a oxidação está acoplada à fosforilação, quando inibimos o complexo, não há transferência de elétrons e consequentemente também não haverá fosforilação do ADP, dado que não é gerada a força protomotriz necessária. Além disso, outras drogas permitem a permeabilidade da membrana a

prótons, ocorrendo a redução de O_2 em níveis elevados, mas essa redução não é acoplada a síntese de ATP, uma vez que o gradiente de prótons é dissipado. São, por isso, designados desacopladores. O cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona (CCCP) é um exemplo de dissipador de potencial elétrico da membrana de plasmática e das membranas mitocondriais (Shigehisa et al., 1973).

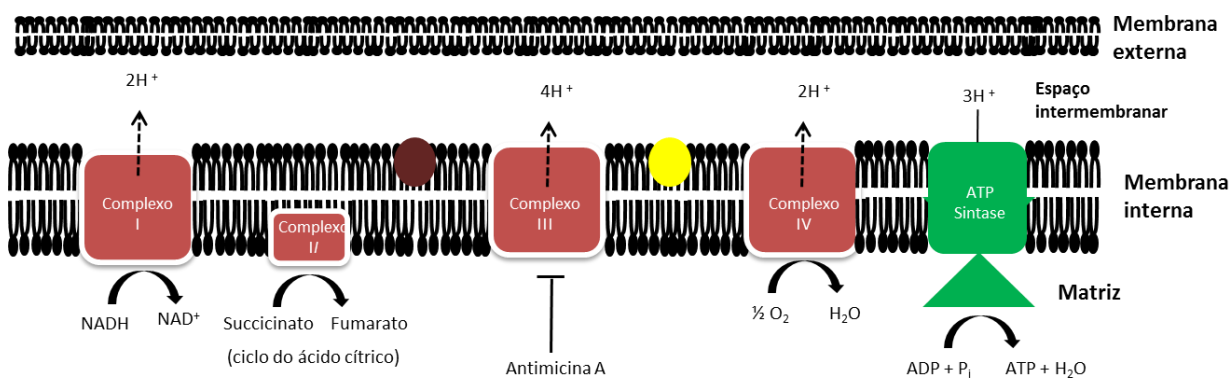


Figura 1.8: Esquema geral da fosforilação oxidativa. Transferência de elétrons entre os complexos com consequente redução do oxigênio, gera a energia na forma de prótons capaz de produzir ATP. Antimicina é capaz de inibir o complexo III, inviabilizando a passagem de elétrons e CCCP, capaz de dissipar prótons do espaço intermembranar. (Adaptado de Nelson e Cox, 2011)

1.2.5 Metabolização da glicose pela via das pentose-fosfato

Se não sofrer a oxidação pela via glicolítica, a glicose-6-fosfato pode ser metabolizada pela via das pentose-fosfato. Este caminho para a oxidação da glicose leva a produção de compostos importantes para a célula como a ribulose -5- fosfato, o qual pode atuar como precursor de coenzimas e nucleotídeos. Nesta via, o NADP é o aceptor final de elétrons, que uma vez reduzido pode ser utilizado em diversas vias anabólicas como as reduções de síntese de ácidos graxos e esteróis ou no combate a espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido (O_2^-), através da redução do sistema glutatona (Revisto por Nelson e Cox, 2011).

O poder redutor na forma de NAPH é então fundamental para o equilíbrio redox da célula sendo chave para a regeneração do sistema glutatona. Este sistema atua na remoção de H_2O_2 através da sua redução em água, utilizando elétrons provenientes da forma reduzida da glutatona (GSH). A glutatona oxidada originada dessa reação é regenerada pela glutatona redutase, que por sua vez depende de NAPH, em sua maioria produzido na reação catalisada pela G6PD. Sendo assim, um desequilíbrio na produção de NAPH pode de forma indireta

afetar um dos mais importantes sistema de defesa antioxidante da célula (Revisto por Nelson e Cox, 2011).

Importante ressaltar que a G6P, substrato da G6PD, uma vez oxidada pela via das pentoses pode ser reciclada para a glicólise, já que alguns dos produtos finais desta via são intermediários da via glicolítica, como o gliceraldeído-3-fosfato e a frutose-6-fosfato. (Revisto por Stanton, 2013).

A figura 1.9 mostra um esquema representativo adaptado do trabalho de Buchakijan e Kornbluth apresentando uma visão geral do metabolismo glicolítico sintetizando todas as rotas bioquímicas clássicas mencionadas neste projeto.

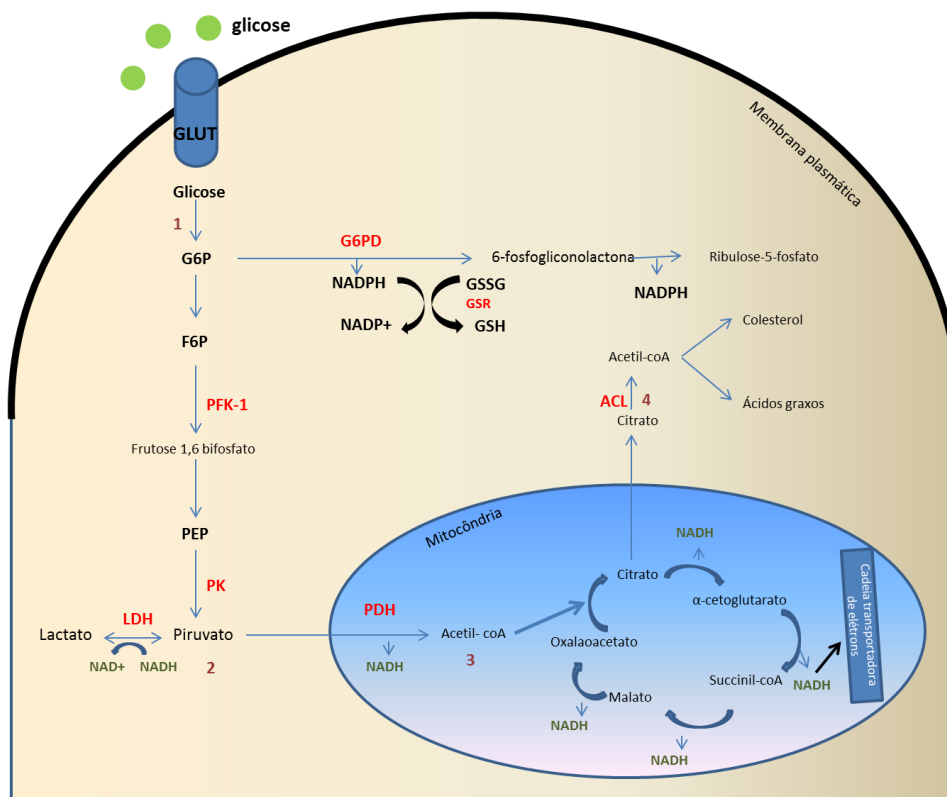


Figura 1.9: Visão geral do metabolismo de carboidratos. (1) A glicose entra na célula por receptores tipo GLUT e pode ser oxidada na glicólise ou encaminhar-se para a Via das pentoses-fosfato; (2) O piruvato, produto final da glicólise, pode ser reduzido a lactato pela LDH ou sofrer ação da PDH na mitocôndria, gerando acetil-CoA; (3) O acetil-CoA formado entra no ciclo do ácido cítrico gerando NADH e FADH₂, que será utilizado para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa; (4) O acetil-CoA se combina com o oxaloacetato gerando citrato, que é transportado para o citosol onde sofre ação da ACL gerando novamente acetil-CoA. (5) O acetil-CoA que não é utilizado na produção de energia é utilizado como precursor para a síntese de ácidos graxos; (6) ou se condensa para a biossíntese de colesterol através da via do mevalonato no citosol. GLUT transportador de glicose; G6P, glicose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; HK, hexocinase; PFK1, 6-fosfofruto-1-cinase; PK, piruvato cinase; LDH, lactato desidrogenase; PDH, piruvato desidrogenase; ACL, ATP citrato liase (Adaptado de Buchakijan e Kornbluth, Nature Reviews, 2010).

1.2.6. Particularidades do metabolismo energético no gênero *Mycobacterium*

A classificação das micobactérias iniciou-se em 1896 quando Lehmann e Neumann propuseram pela primeira vez o gênero *Mycobacterium*, no qual incluíram *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*. Com o avanço dos métodos e técnicas de identificação, muitas outras espécies de micobactérias foram descobertas e classificadas. Atualmente são reconhecidas 148 espécies e 11 subespécies dentro do gênero, das quais aproximadamente 60 podem causar doença no homem (Jarzembowski & Young, 2008; Wu, Lu & Lai, 2009).

Micobactérias intracelulares apresentam como principal fonte de energia a oxidação de lipídios oriundos do hospedeiro (Munoz-Elias and McKinney, 2005; Munoz-Elias and McKinney, 2006; Munoz-Elias et al., 2005; Munoz-Elias et al., 2006; Schnappinger et al., 2003; Pandey and Sasseti, 2008). Esta afirmação se consolidou com o sequenciamento dos genomas do *M. leprae* e *M. tuberculosis*, onde foi revelado um grande repertório de genes envolvidos na degradação lipídica, além de muitos pseudogenes antes relacionados à glicólise (Cole et al., 1998; Cole et al., 2001). Em *M. leprae* a utilização de lipídios parece proeminente no seu repertório bioquímico, porém, apresenta menor grau se comparado ao de *M. tuberculosis*. Nos dois patógenos foram identificados genes para lipólise, como lipases, e β -oxidação de ácidos graxos. O *M. leprae*, apesar da redução drástica sofrida ao longo de sua adaptação à vida intracelular, manteve em seu repertório genético ao menos uma cópia de cada um dos genes primordiais para a realização destas rotas, diferentemente de *M. tuberculosis* que apresenta redundância e vias alternativas. De forma a exemplificar, no bacilo causador da tuberculose foram detectados 22 genes para lipases para apenas 2 genes detectados em *M. leprae* (Cole, et al., 2001).

Os resultados mencionados anteriormente não eliminam a possibilidade de estes microorganismos utilizarem a glicose como fonte de energia. Dados em genômica também demonstraram a capacidade da maioria de seus representantes em oxidar este glicídio por vias como glicólise e via das pentoses-fosfato (Wheeler et al., 1983; Cole et al., 1998; Cole et al., 2001); Contudo o repertório de genes para degradação lipídica presente no gênero *Mycobacterium* é maior do que para a de carboidratos. Micobactérias que apresentam crescimento *in vitro* tem aproximadamente 70% de toda a glicose direcionada ao fluxo glicolítico, e apenas 30% sendo metabolizados pela via das pentoses-fosfato gerando poder redutor na forma de NADPH (Ratledge, 1976). Muitos ensaios *in vitro* utilizando estes organismos tem o glicerol como a fonte de carbono possível e sua fosforilação seguida de oxidação gera um intermediário da via glicolítica, a diidroxiacetona-fosfato, que segue o caminho através das sucessivas etapas do ciclo do ácido cítrico. A exceção do grupo é o *M.*

Bovis, devido a uma mutação pontual no gene responsável por codificar a piruvato cinase, não é capaz de utilizá-lo (Keating et al., 2005).

Durante seu crescimento, as micobactérias tanto *in vitro* como *in vivo*, são capazes de oxidar substratos reduzindo seus de transportadores de elétrons citoplasmáticos como NADH, FADH₂ ou ferredoxina. Em *M. tuberculosis* foi detectado cinco complexos participantes do sistema de transporte de elétrons para a oxidação destas coenzimas em aerobiose. São eles: NADH desidrogenase I, NADH desidrogenase II, succinato desidrogenase, bc₁ citocromo redutase e aa₃ citocromo c oxidase. O sistema de transporte de elétrons nas micobactérias é acoplado ao bombeamento de prótons, sendo capaz de gerar a força protomotriz de formação de adenosina trifosfato pela ATP sintase (Revisto por Cook et. al., 2009).

NADH desidrogenase também é o primeiro componente da cadeia respiratória em micobactérias, transferindo eletrons a partir de NADH a quinonas, como por exemplo a ubiquinona ou menaquinona (Weinstein et al. 2005). Existem duas classes de NADH desidrogenases identificadas até o momento em micobacterias: NDH-1, onde a transferência de elétrons é acoplada ao bombeamento de prótons através da membrana, e NDH-2, onde a oxidação de NADH não é acompanhada de translocação de prótons. No *M. leprae* a cadeia respiratória encontra-se truncada, uma vez que o óperon responsável pela formação de NDH-1 está truncado, com isso a oxidação de NADH não leva a formação de ATP através deste mecanismo (Cole et. al., 2001).

Em situações anaeróbias ou de microaerofilia o *M. tuberculosis* é capaz de manter a produção de ATP através do transporte de elétrons realizados por complexos na sua membrana plasmática, como a fumarato redutase, nitrato redutase e citocromo bd oxidase (Revisto por Cook et al., 2009). O sequenciamento do genoma de *M. leprae* demonstrou que o bacilo não é capaz de formar este sistema de transporte, mas alternativamente é capaz de oxidar NADH ou NADPH no desvio de fosfoenolpiruvato através de oxaloacetato em malato ou fumarato pela ação da enzima PEP carboxilase (Cole et al., 2001).

1.3 As células de Schwann

As células de Schwann (CS) são células gliais do sistema nervoso periférico e o seu nome provém da homenagem à Theodor Schwann, fisiologista alemão responsável por sua descrição (Armati, 2007). Nos períodos iniciais de sua descoberta, eram vistas apenas como “colas” que mantinham o sistema nervoso periférico unido, porém atualmente é conhecida a benéfica dependência entre estas células e os axônios no desenvolvimento e funcionamento normal da fibra nervosa (Armati, 2007).

As células de Schwann apresentam atividade análoga aos oligodendrócitos no sistema nervoso central, produzindo uma membrana que envolve as porções alongadas dos neurônios, denominada bainha de mielina. Esta tem como característica alta concentração lipídica e poucas proteínas, permitindo sua atuação como isolante elétrico, induzindo à rápida propagação dos potenciais de ação das sinapses nervosas ao órgão alvo. Além disso, células de Schwann também são reconhecidas como reguladoras do diâmetro axonal e moduladoras de células do sistema imune através da expressão de moléculas do complexo MHC (Armati, 2007; Bunge et al, 1980; Armati & Pollard, 1996).

Os axônios são capazes de induzir o crescimento e a diferenciação das células de Schwann a partir da secreção de neuroregulinas, assim, células da crista neural passam pelos estágios de CS precursora e CS imatura para CS diferenciada, que por sua vez pode apresentar fenótipo mielinizante ou não mielinizante no nervo maduro. CS mielinizantes e não mielinizantes envolvem as fibras nervosas dos nervos periféricos, formando inúmeras voltas em espiral numa proporção 1:1 célula- axônio no caso das primeiras, e vários axônios por célula no caso das segundas. As primeiras expressam principalmente RNAm de proteínas relacionadas à formação da bainha de mielina, como a proteína zero (P0), proteína mielínica periférica 22 (PMP22), glicoproteína associada à mielina (MAG) e a proteína básica mielínica (MBP) (Revisto por Jessen e Mirky, 1999; 2005).

Recentemente, Angus e colaboradores demonstraram que a célula de Schwann é capaz de armazenar glicogênio e este representa o principal suporte energético para axônios. A camada mais externa dos nervos periféricos é denominada de epineuro e é formada por tecido conjuntivo frouxo, contendo vasos, fibroblastos e fibras de colágeno tipo I. A camada média de tecido conjuntivo, chamada de perineuro, apresenta células pavimentosas fortemente unidas que irão se distribuir em camadas concêntricas em relação às fibras nervosas. Entre as sucessivas camadas celulares são encontradas fibras de colágeno tipo I e tipo III. Esta disposição das camadas é importante, pois pode atuar como uma barreira seletiva ao trânsito de substâncias com alto peso molecular (Guth, 1956; Cajal, 1959; Lundborg, 1993), dificultando assim a passagem de grandes complexos lipoprotéicos, tornando a glicose principal fonte de carbono, energia e poder redutor.

Em processos catabólicos, o glicogênio das células é convertido em glicose, a qual pode ser oxidada pela via glicolítica e possivelmente convertida a lactato através da fermentação. O lactato gerado será transportado do compartimento glial para o axônio, onde é convertido em piruvato, utilizado para a produção de ATP. Dessa forma a produção e exportação de lactato tornam-se fundamentais para o suporte energético dos axônios (Angus, et al., 2013).

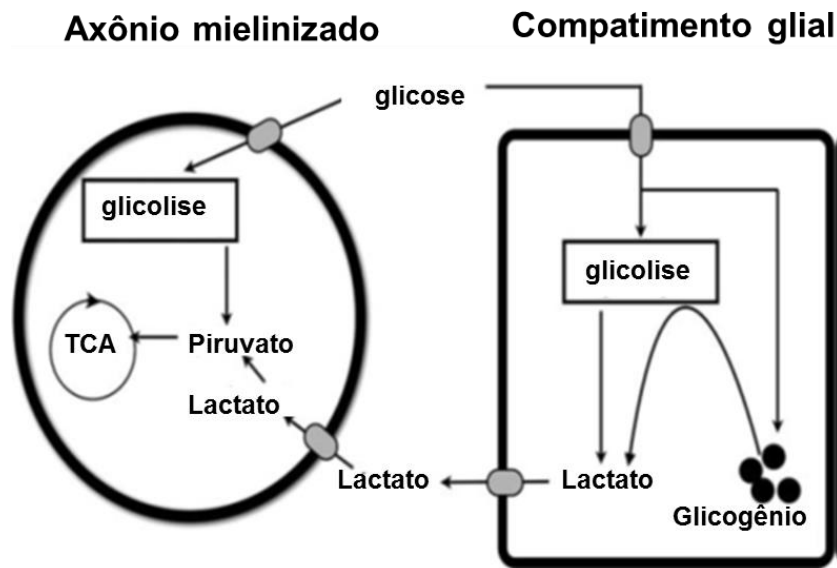


Figura 1.10: Esquema demonstrando o suporte metabólico oferecido pelas células gliais ao axônio. Lactato é exportado para suprir a demanda metabólica do axônio (Adaptado de Angus et al., 2013).

O isolamento e purificação de nervos periféricos de mamíferos adultos é extremamente difícil e complexo, o que nos impede muitas vezes de utilizar células primárias em ensaios laboratoriais e nos induz a utilização de linhagens. A linhagem de CS ST8814 foi isolada de um tumor maligno de paciente com neurofibromatose tipo 1. Assim como as células de Schwann primárias, são positivas para os marcadores S-110, P0 e MBP (Morrissey *et al.*, 1991; Rutkowski *et al.*, 1992; Ryan *et al.*, 1994). São de fácil cultivo, apresentam bom crescimento em baixas concentrações de soro, podendo funcionar como bom modelo para ensaios experimentais (Yan *et al.*, 1994).

1.3.1 Células de Schwann e *M. leprae*

O *M. leprae* é capaz de ocupar os nervos periféricos através da ligação de suas adesinas de superfície HLP (proteína semelhante a histona) e PGL-1 (glicolípido fenólico -1) ao domínio globular da cadeia $\alpha 2$ da laminina 2. Esta isoforma de laminina é a mais abundantemente presente na lâmina basal que envolve as células de Schwann (Rambukkana *et al.*, 1997; Ng *et al.*, 2000; Shimojie *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2000).

Após a adesão às células, o bacilo é lentamente fagocitado. Uma vez no interior das CS os efeitos do patógeno sobre a fisiologia dessas células ainda é pouco conhecido.

Trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa demonstraram que os bacilos viáveis localizam-se em vesículas pouco acidificadas, contrastando com os bacilos irradiados que se apresentam em vesículas com alto grau de acidificação (Alves et al., 2004). Estes resultados sugerem que o bacilo viável é capaz de modular a endocitose das CS impedindo a formação do fagolisossomo e conseqüentemente garantindo a sua sobrevivência.

Alguns estudos mostram a relação harmoniosa que o patógeno apresenta com a sua célula hospedeira. Antia e Colaboradores em 1985 mostraram que a infecção de culturas de gânglios da raiz dorsal de camundongos neonatos apresentou grande proliferação de bacilos, mas que este aumento observado não foi acompanhado de morte dos componentes celulares envolvidos na formação dos gânglios. Além disso, em 1997 Antia e Shetty ao analisar histopatologicamente biópsias de nervos de pacientes da forma lepromatosa apresentando grande carga bacilar observaram ausência de toxicidade celular.

Estudos *in vitro* sugeriram que o *M. leprae* é capaz de invadir preferencialmente as CS não mielinizantes, contudo, ao aderirem as CS mielinizantes tanto bacilos viáveis quanto irradiados são capazes de induzir a desmielinização destas células (Rambukkana et al., 2002). Além disso, durante a indução da desmielinização as CS foram capazes de se proliferarem significativamente aumentando o fenótipo não mielinizado e garantindo o nicho intracelular do bacilo. Tapinos e colaboradores em 2006 demonstraram que a desmielinização era resultado da ligação direta da bactéria na ativação do receptor tirosina quinase ErbB2 e conseqüente fosforilação de Erk ½ por uma via dependente de Ras/Raf/MEK. A inibição farmacológica através de UO126 da ativação de Erk ½ por esta via diminuiu drasticamente a desmielinização em CS induzidas por *M. leprae*. Os mesmos autores em outro trabalho detectaram que o bacilo internalizado é capaz de ativar a proliferação das CS através da ativação de Erk ½ por uma via dependente de p56Lck, um membro da família das Src (tirosino quinase não receptores), promovendo o acúmulo nuclear de ciclina D1 e conseqüente proliferação das CS. (Tapinos & Rambukkana, 2005)

Recentemente, nosso grupo demonstrou que o *M. leprae* é capaz de promover a sobrevivência de CS quando são privadas de soro em cultura (Rodrigues et al., 2010). Para isto, o patógeno induz o aumento do fator de crescimento semelhante a insulina I (IGF-1), que é capaz de ativar vias de sobrevivência celular através de uma ampla sinalização envolvendo PI3K (fosfoinositol- 3- quinase) e AKT (Cheng *et al.*, 2000).

1.4 Alterações metabólicas ocasionadas na infecção pelo *M. leprae* e em outras patologias infecciosas.

1.4.1 *M. leprae* induz a produção de corpúsculos lipídicos nas células hospedeiras.

Em 1883 o cientista Rudolf Virchow descreveu a presença de macrófagos espumosos em lesões de pacientes lepromatosos. Essas células apresentavam grande quantidade de corpúsculos lipídicos e bacilos e o seu crescimento se dava como um “tumor”, podendo acarretar na desfiguração do hospedeiro. Mesmo após esta descoberta, os mecanismos moleculares responsáveis por esta modulação ficaram desconhecidos durante mais de um século (Elamin et al., 2012).

Trabalhos iniciados por Mattos e colaboradores permitiram a detecção dos mecanismos moleculares de formação destes agregados lipídicos e a sua relação com o sucesso da infecção. Em CS a presença do bacilo viável gera a ativação do receptor TLR6 (*Toll-like receptor 6*), acarretando na indução da via de PI3K ativando a síntese de lipídeos, envolvendo ativação do retículo endoplasmático, complexo de golgi e reorganização do citoesqueleto. Além disso, os corpúsculos são recrutados e acumulados em fagossomos contendo a bactéria (Mattos et al. 2011a; Mattos et al., 2011b). Desta forma um grande paradigma foi quebrado, pois durante mais de um século acreditava-se que os macrófagos se tornavam espumosos por acumular lipídeos oriundos da parede do bacilo, rica em ácidos micólicos. Na verdade os lipídios acumulados na forma de corpúsculos lipídicos são do próprio hospedeiro, tratando-se de uma combinação de indução da síntese *de novo* combinada a uma maior captação de lipídeos plasmáticos.

Apesar das duas células preferencialmente infectadas pelo bacilo apresentarem esta indução durante a infecção, ela não ocorre igualmente nos dois tipos celulares. Diferentemente de macrófagos, a formação de corpúsculos lipídicos nas CS é dada apenas na presença da bactéria viva e não é determinada por fatores solúveis, uma vez que meios condicionados não foram capazes de induzir corpúsculos em outras células. Em macrófagos, a ligação a TLR2 (*Toll-like receptor 2*) e a TLR6 parece ser realizada de forma dependente, pois a deleção destes dois receptores em ensaios experimentais impediu a formação de corpúsculos neste tipo celular (Mattos et al., 2010). Na figura 1.11 podemos diferenciar a indução da formação de corpúsculos lipídicos nos dois diferentes tipos celulares preferencialmente infectados pelo bacilo.

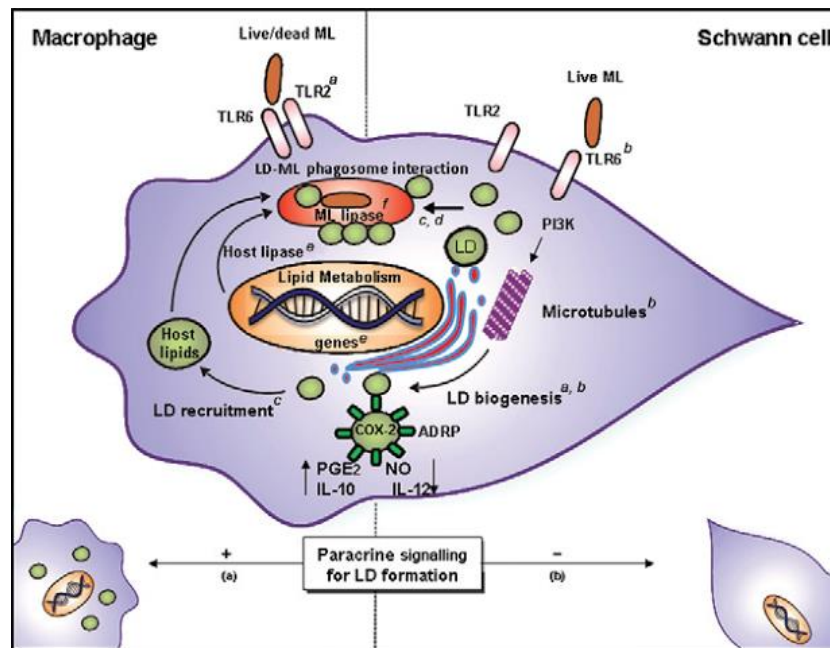


Figura 1.11: indução da formação de corpúsculos lipídicos nos dois tipos celulares preferencialmente infectados pelo bacilo. Diferenças como ativação de receptores, sinalização parácrina e necessidade de bactéria viável são encontradas entre os dois tipos de células que o bacilo prefere infectar. (Retirado de Mattos, *et al.*, 2012)

Acredita-se que a formação destes corpúsculos é uma estratégia do bacilo para eficácia da sua infecção e persistência nas células hospedeiras. Corpúsculos lipídicos são relacionados à produção de imunomoduladores como a prostaglandina E2, que na hanseníase funciona como um imunossupressor modulando o macrófago a um perfil Th2, mais “brando” à infecção. (Mattos et al. 2010). Bloqueando a sua formação, permitimos que células como os macrófagos sejam capazes de matar as bactérias invasoras *in vitro* (Revisto por Mattos et. al, 2012).

Evidências genéticas sugerem que o bacilo utiliza os corpúsculos para obtenção de fontes nutricionais. A possibilidade do *M. leprae* assimilar ácidos graxos e fosfolípidios oriundos dos corpúsculos é bastante plausível, pois o sequenciamento do seu genoma demonstrou a conservação de duas lipases e uma fosfolipase, apesar da perda maciça de genes relacionados à glicólise (Cole, *et al.*, 2001). Além disso, outros estudos de metabolismo e proteômica complementaram a teoria na qual a beta oxidação dos ácidos graxos é extremamente ativa no bacilo, sugerindo os lipídios como a fonte principal de carbono destes organismos (Wheeler 1989, 2003; Marques *et al.* 2008). Não coincidentemente o método padrão ouro para mensurar a viabilidade do bacilo é baseado na sua capacidade de oxidar palmitato radioativo (revisto por Mattos, *et al.*, 2012).

1.4.2 Alterações metabólicas em outras doenças infecciosas.

O desenvolvimento de uma doença infecciosa em um indivíduo envolve interações complexas entre o microorganismo e o hospedeiro. Os microorganismos podem produzir patologias eliminando ou diferenciando células do hospedeiro, através da liberação de toxinas ou da própria resposta imune do hospedeiro (Abbas, 2008).

Rotineiramente em inflamações, estão envolvidos na amplificação do dano tecidual antígenos microbianos ou fatores intracelulares do próprio hospedeiro liberados como resultado de trauma ou danos teciduais metabólicos. São considerados como auto-antígenos: proteínas de choque térmico, histonas e até mesmo fragmentos de DNA. (revisto por Mervyn Singer, 2014). Receptores específicos (como por exemplo o sistema tipo Toll) reconhecem essas moléculas e regulam a transcrição de genes não só para proteínas envolvidas no processo inflamatório (tais como citocinas), interferindo também em vias envolvendo os sistemas cardiovascular, endócrino, imunológico e o metabolismo energético (Abraham & Singer, 2007).

Produtos da inflamação e consequente ativação de macrófagos, espécies radicalares como o óxido nítrico (NO), podem ser produzidos abundantemente (Ojeda et al., 2011; Santos, et al., 2012) o que pode acarretar em modulação funcional mitocondrial. Entre estas modulações está a sua ação direta na inibição alostérica do complexo IV do sistema de transporte de elétrons ou possível peroxidação dos lipídios da membrana mitocondrial ocasionando desagregação dos complexos (Cleeter et al., 1994; Paradies et al., 2012). Desta forma para alguns tipos celulares, como os neurônios que sabidamente apresentam fluxo glicolítico inferior a células da glia e que são incapazes de aumentar este fluxo em situações de estresse, os efeitos de NO são considerados extremamente nocivos e pró-apoptóticos (Almeida et al, 2004; Mendez et al., 2009).

Determinada por um agente infeccioso e atribuída a uma grande inflamação sistêmica, a sepse, tem sido bastante estudada quanto as variações metabólicas geradas no hospedeiro. Discute-se bastante as alterações mitocondriais, especificamente na supressão do metabolismo oxidativo e o papel de espécies radicalares na patologia da doença. Em 2014, Lee e Huttemann propuseram um modelo no qual a sinalização inflamatória induzida por LPS ou padrões moleculares relacionados a patógenos (PAMPs) conduziria a alterações no estado de fosforilação de proteínas mitocondriais, incluindo fosforilação da subunidade catalítica da Citocromo C oxidase. Este efeito resulta em inibição da fosforilação oxidativa e no modelo proposto, consequente redução do potencial elétrico de membrana mitocondrial que, por

consequente diminui os níveis de ATP podendo resultar na patogenia principal da doença, falência múltipla de órgãos (Revisto por Lee & Huttemann, 2014).

Muitas infecções virais têm sido associadas ao aumento de captação e utilização de glicídios, demonstrando representantes de vários vírus como herpesvírus e retrovírus sendo capazes de induzir essas alterações em células de mamíferos infectadas (Gray, et al., 1983; Garry, et al., 1986; El Bacha, et al., 2004; Munger, et al., 2006; Munger, et al., 2008; Sorbanaa, et al., 1996). Como exemplo, o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) foi capaz de aumentar os níveis de RNAm de Glut 3, aumentando a internalização de glicose em linfócitos infectados. Estas alterações podem acarretar na produção de energia e precursores biossintéticos necessários para a replicação viral. Além disso, alguns autores acreditam que esse mecanismo pode representar uma resposta da célula infectada contra o vírus (Sorbara, et al., 1996; Costa, et al, 2012).

Fortalecendo nossos exemplos, trabalhos já demonstraram a interação do vírus da hepatite C em diferentes pontos da cascata de sinalização de insulina na infecção de hepatócitos, podendo induzir a resistência a este hormônio. (Vespasiani-Gentilucci, et al., 2014). A insensibilidade a este hormônio gerado pela resistência induzida está intimamente ligada à obesidade, aumentando os riscos de eventos cardiovasculares (Deltenre, et al., 2011). Além disso, Bacha e colaboradores demonstraram que o vírus da dengue (DEN-2) foi capaz de levar alterações nas mitocôndrias de hepatócitos humanos da linhagem HEPG2. Dentre essas modificações encontram-se modificações morfológicas mitocondriais, aumento do consumo de oxigênio e diminuição do potencial elétrico mitocondrial ($\Delta\Psi$) que acarretaram em diminuição da eficiência destas células para produzir ATP. Acredita-se que estas modulações possam estar correlacionadas à patogênese do vírus na infecção.

Dessa forma, a elucidação completa de vias metabólicas onde células são moduladas por patógenos torna-se fundamental para o entendimento de patogenias e sucesso de microorganismos na colonização de novos hospedeiros, possibilitando a descoberta de mecanismos atuantes na reversão dos efeitos nocivos das doenças e na viabilidade dos patógenos.

2. JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz comandou uma extensa análise de expressão gênica em diferentes modelos de Hanseníase, com a finalidade de determinar possíveis alvos envolvidos na patogenia da doença. Análise de microarranjos com posterior confirmação por qPCR em células de Schwann primárias infectadas demonstraram diminuição da expressão de genes envolvidos na fosforilação oxidativa como *NDI*, *CYTB*, *COX2* e *ATP6*, esses dados se repetiram em amostras provenientes de nervos de pacientes da forma lepromatosa (Ferreira, 2011 ;Guerreiro, et al., 2012).

Os resultados da expressão de genes mitocondriais instigaram o nosso grupo a acreditar que o bacilo poderia estar modulando o metabolismo energético da célula hospedeira. Testes de funcionalidade mitocondrial de células infectadas foram realizados no intuito de primeiramente determinar se a expressão gênica estaria efetivamente determinando o fenótipo. Devido ao fato da metabolização de glicose poder gerar ATP sem a efetiva participação mitocondrial, somado ao fato deste glicídio se caracterizar como um precursor de várias moléculas fundamentais para a célula, nosso grupo se concentrou em determinar o metabolismo glicolítico da célula de Schwann infectada. O fluxograma abaixo mostra os principais métodos e caminhos que levaram a formação deste projeto.

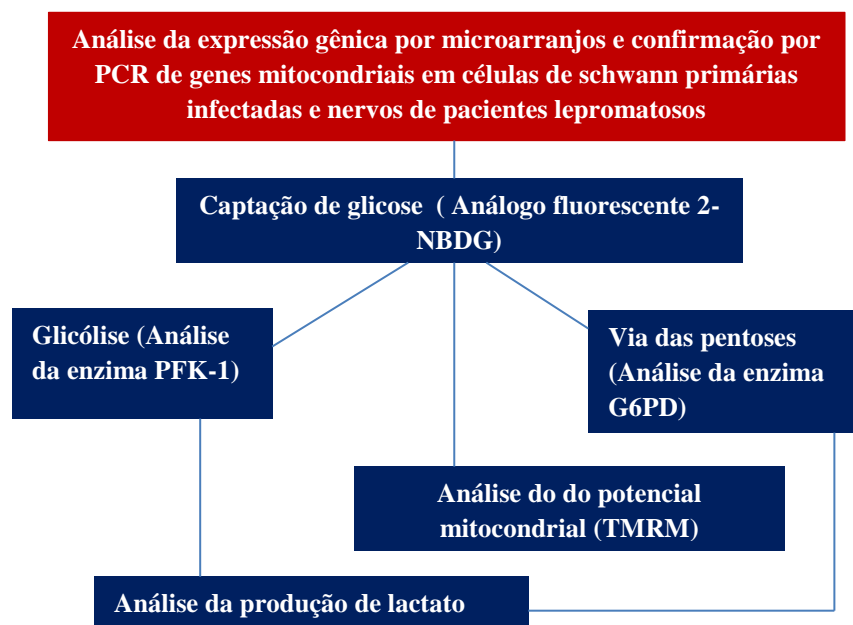


Figura 2.1 – Fluxograma das etapas do estudo da modulação do metabolismo energético na hanseníase. As etapas em vermelho representam aquelas conduzidas pelo laboratório de hanseníase- IOC, ao passo que as etapas em azul representam as etapas realizadas nesta tese de mestrado.

3. OBJETIVOS

3. Objetivo Geral

Analisar a modulação do metabolismo energético que o *M. leprae* é capaz de exercer sobre as células de Schwann humanas da linhagem ST8814

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a modulação do bacilo nos processos de captação de glicose durante a infecção da célula hospedeira por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo utilizando o análogo fluorescente da glicose 2-NBDG.
- ✓ Analisar as vias de oxidação de glicose como glicólise e via das pentoses através da atividade de enzimas chaves como a fosfofrutoquinase-1 (PFK) na via glicolítica e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) na via das pentoses.
- ✓ Identificar o processo de fermentação através da mensuração da quantidade de lactato no sobrenadante das células infectadas e atividade das enzimas relacionadas: complexo lactato desidrogenase.
- ✓ Analisar a atividade mitocondrial das células ST8814, através da mensuração do potencial mitocondrial por TMRM (tetrametil rodamina metil ester) e o ionóforo CCCP (cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona), por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.
- ✓ Correlacionar os dados obtidos com amostras de soro e lesões de pele de pacientes contidas na soroteca do Lab. de Microbiologia Celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultivo de micobacterias

4.1.1 *M. leprae*

O *M. leprae* vivo utilizado nesse estudo, cedido pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa (Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP), foi proveniente do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (*nu/nu*). Os bacilos foram quantificados por contagem direta conforme descrito por Shepard e McRae (1968) e a viabilidade medida pelo método Live/Dead BacLight (Life Technologies, EUA). A viabilidade foi determinada por coloração fluorescente utilizando o método Live/Dead BacLight bacterial viability kit (componente A) e 30 µM de iodeto de propídio (componente B) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após a coloração, foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro. Através da microscopia de fluorescência, bactérias vivas e mortas foram quantificadas por contagem dos bacilos verdes e vermelhos, respectivamente.

4.1.2 *M. bovis* BCG

A cepa vacinal BCG Moreau (doada por Carolina Zavareze – Fundação Ataulfo de Paiva) foi cultivada em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO laboratories, EUA) contendo 0,02% glicerol, 0,05% Tween-80 (DIFCO laboratories, EUA) e suplementado com 10% Middlebrook ADC (albumina bovina, dextrose e catalase). O tempo de cultivo foi de aproximadamente duas semanas, sob constante agitação, à temperatura de 37° C. Nesse período, a cultura foi centrifugada a 500 rpm por 5 min para evitar grumos micobacterianos e o sobrenadante foi utilizado para aferir a densidade óptica (DO 600nm). Ao atingir aproximadamente 0,8 de DO ($0,8 = 2 \times 10^8$ bactérias / mL), correspondente à fase exponencial do crescimento micobacteriano, o cultivo foi interrompido e aliquoteado em 20% glicerol e estocado em freezer -70°C. Para a utilização nos ensaios de infecção, as alíquotas congeladas de *M. bovis* BCG em 20% glicerol foram centrifugadas a 18000 x g por 10 min e ressuspensas em meio RPMI-1640 sem adição de antibióticos. A pureza do cultivo foi avaliada pelo método de Kinyoun. Brevemente, foram adicionados 10 µL da cultura em lâmina de vidro e realizado um esfregaço. Depois de seco, o esfregaço foi fixado por calor, utilizando-se um bico de Bunsen. Posteriormente a lâmina de vidro foi coberta com fucsina fenicada por cerca de 5 min. O excesso de fucsina foi retirado por lavagem delicada em água corrente e em seguida adicionado solução álcool-ácido para descoloração. Após lavagem em água corrente, foi adicionado azul de metileno por cerca de 30 segundos. Após essa etapa, a

lâmina foi novamente lavada, e após secagem em temperatura ambiente, foi conduzida até o microscópio óptico com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em aumento de 100 x para ser avaliada quanto a possíveis contaminações e contagem de bacilos. A cultura foi determinada livre de contaminação, quando observados apenas bacilos corados com fucsina (em rosa). Uma vez determinada a pureza, a quantificação da cultura foi determinada por contagem direta das lâminas como descrito por Shepard e McRae (1968). A viabilidade foi aferida através do kit Live/Dead BacLight (Life Technologies, EUA), já mencionado anteriormente.

4.1.3 *M. Smegmatis*

O *M. Smegmatis* mc² 155 foi doado por Thomas Dick da Universidade de Cingapura, sendo cultivado em meio Middlebrook 7H9 (beckton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA). O meio então foi suplementado com 0.05 % de Tween 80 e 10% de ADC [0,2% de glicose, 0.5% de albumina de soro bovino (BSA), 0,085 % de cloreto de sódio] sob agitação constante com barras magnéticas em incubadora a 37° C. O cultivo foi interrompido quando a cultura atingiu uma densidade óptica (600nm) igual a 1,0 em espectrofômetro (Ultrospec 2100 pro UV/ visible), correspondente a fase exponencial de crescimento destas bactérias. O número de bacilos foi determinado através do método de Shepard e McRae (1968) e as alíquotas foram então congeladas em nitrogênio líquido até o seu uso. A viabilidade foi aferida através do kit Live/Dead BacLight (Life Technologies, EUA), já mencionado anteriormente.

4.2. Cultura de células, ensaios de infecção e recrutamento de pacientes.

4.2.1 Obtenção e Manutenção de Células de Schwann da linhagem ST8814

A linhagem de Schwannoma ST8814 foi obtida após isolamento de CS malignas de um paciente com neurofibromatose tipo I e doada pelo Dr. Jonathan A. Flecher do departamento de Patologia de Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA. Estas células foram estocadas em alíquotas no nitrogênio líquido em solução contendo 10% de DMSO e 90% de soro fetal bovino.

As alíquotas foram descongeladas em banho-maria a 37° C e ressuspensas em 10 ml de meio RPMI 1640 (LGC, Brasil) completo [10mM de HEPES, 1mM de L-glutamax (Invitrogen, Carlsbad, EUA)] suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de Penicilina e 100 U/mL estreptomicina. Esta suspensão contendo as células foi então

centrifugada a 400x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino.

As células foram então expandidas em estufa, com atmosfera de 5% de CO₂ a 37° C em garrafas de cultura de 25 cm², até obter uma confluência de aproximadamente 90%. No repique, o sobrenadante era descartado e, em seguida, as células eram lavadas com PBS e retiradas da placa com o auxílio de tripsina a 0,125% (LGC, Brasil). Após o bloqueio da tripsina com solução de soro fetal bovino, as células eram centrifugadas a 400x g por 10 minutos, com o posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet contendo as células em RPMI completo suplementado com 10% SFB, 100U/ml de estreptomicina e 100U/ml de penicilina. Em seguida, as células eram distribuídas em uma nova garrafa de cultura de 75m² e incubadas por mais 48 horas em estufa. As culturas foram utilizadas em ensaios experimentais até a 4^a passagem, ou eram novamente congeladas em solução contendo 90% de SFB e 10% de DMSO.

Em todos os ensaios realizados com as células, após o plaqueamento e o tempo de aderência as placas, de aproximadamente 24 horas, realizamos infecção com o *M. leprae* ou as diferentes micobactérias utilizando o índice de multiplicidade de infecção (MOI) de 50:1, com conseqüente tempo de incubação de 48 horas em estufa a 33° C em 5 % de CO₂.

4.2.2 Pacientes

O recrutamento dos pacientes ocorreu de forma voluntária no centro de referência de tratamento de Hanseníase Ambulatório Souza Araújo da Fundação Oswaldo Cruz-RJ. A classificação foi realizada de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (Ridley & Jopling, 1966). Utilizamos soros e biópsias de tais pacientes, onde os classificados como BT apresentam índices baciloscópicos (IB) de 0 (n= 15) e LL acima de 2 (n = 16). Amostras provenientes de soros de 12 indivíduos sadios foram incluídos neste estudo. Para os estudos em lesões de pele, foram adquiridos fragmentos (6 mm de diâmetro), de pacientes BT (n=4) e LL (n=4) contendo tanto epiderme quanto derme, previamente coletados para fins de diagnóstico, no Ambulatório Souza Araújo. A tabela 4.1 resume as características dos pacientes hansenianos e controles sadios incluídos no estudo e a tabela 4.2 mostra os dados clinico-epidemiológicos destes indivíduos. Os procedimentos incluídos no presente estudo receberam aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Fiocruz (Protocolo n° 504/09).

Tabela 4.1. Características dos pacientes hansenianos e controles sadios.

| Características | Soro | | | Biópsia | |
|-----------------|--------|-------|-------|---------|------|
| | Sadios | BT | LL | BT | LL |
| Indivíduos (n) | 12 | 11 | 12 | 4 | 4 |
| Sexo masc. | 4 | 4 | 9 | 2 | 2 |
| Sexo fem. | 8 | 7 | 3 | 2 | 2 |
| Média idade | 35,83 | 45,27 | 35,75 | 68,5 | 73,5 |

Tabela 4.2. Dados clínico-epidemiológicos dos indivíduos incluídos no estudo.

| Iniciais | Idade | Sexo | IB | Forma clínica | Tratamento | Soro ou Biópsia |
|----------|-------|------|------|---------------|------------|-----------------|
| ANS | 23 | M | 4 | LL | 1 MÊS | S |
| ECS | 39 | M | 4,75 | LL | NT | S |
| CPS | 25 | M | 4 | LL | NT | S |
| JCS | 24 | M | 4,25 | LL | NT | S |
| EAO | 36 | F | 4,57 | LL | 2 MESES | S |
| MDS | 27 | F | 5,2 | LL | 15 DIAS | S |
| ESX | 39 | M | 4,5 | LL | 15 DIAS | S |
| CBF | 22 | M | 4 | LL | 1 MÊS | S |
| RAO | 52 | M | 5 | LL | NT | S |
| ORF | 53 | M | 5 | LL | 1 MÊS | S |
| INL | 54 | F | 0 | BT | 1 MÊS | S |
| VSR | 51 | F | 0 | BT | 1 MÊS | S |
| CRR | 28 | F | 0 | BT | NT | S |
| JMC | 55 | F | 0 | BT | 2 MESES | S |
| JM | 45 | F | 0 | BT | 1 MÊS | S |
| RFS | 30 | M | 0 | BT | 1 MÊS | S |
| MEC | 42 | F | 0 | BT | NT | S |
| LBN | 53 | F | 0 | BT | NT | S |
| FRV | 27 | M | 0 | BT | NT | S |
| FFS | 65 | M | 0 | BT | NT | S |

| | | | | | | |
|-----|----|---|-----|----|---------|---|
| PLS | 48 | M | 0 | BT | 2 MESES | S |
| SCC | 68 | F | 5 | LL | NT | S |
| LJL | 21 | M | 4 | LL | NT | S |
| LS | 88 | M | 4,5 | LL | NT | B |
| OCX | 84 | F | 4,5 | LL | NT | B |
| RSS | 56 | F | 4 | LL | NT | B |
| AJR | 66 | M | 4 | LL | NT | B |
| DMS | 80 | F | 0 | BT | NT | B |
| MMM | 87 | M | 0 | BT | NT | B |
| DHV | 44 | M | 0 | BT | NT | B |
| JMS | 63 | F | 0 | BT | NT | B |

4.3. Análise da captação de glicose.

A captação de glicose foi monitorada através de um análogo fluorescente 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-d-glucose (2-NBDG- BioTECH). Para os ensaios em microscopia, células foram distribuídas em placas de 24 poços (2×10^5 em cada poço) com lamínula de vidro e embebidas em meio RPMI com 10% de SFB. Após a infecção e o tempo de espera com as diferentes micobactérias ocorreu a marcação com 500 nM do análogo fluorescente de glicose (2-NBDG) por 30 minutos em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, seguindo instruções do fabricante. No caso específico da microscopia utilizamos dois diferentes índices de multiplicidade de infecção (MOI): 20:1 e 50:1. As lamínulas de vidro foram lavadas duas vezes com PBS 1X por 2 minutos e colocadas em lâminas de vidro onde foram analisadas rapidamente. Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se o microscópio invertido de fluorescência Zeiss AxioObserver com sistema de iluminação Colibri com objetiva Plan-neofluar 40X com 1.4 de abertura numérica (Zeiss). O sinal verde do NBDG foi fotografado em câmera monocromática HMR Axiocan (Zeiss) através do software Axiovision versão 3.2 (Zeiss). O sistema de iluminação utilizou led de 470nm e filtro Zeiss 61.

As análises da captação de glicose por citometria seguiram condições utilizadas na microscopia, onde as diferenças primordiais encontram-se na quantidade do análogo, na ausência de lamínula e na utilização de tampões e técnicas específicas. Após sucessivas titulações em citômetro, 20 micromolar de 2-NBDG foi aplicado nas células por 30 minutos. Após marcação e lavagens, células foram então retiradas do poço com 0,125% de tripsina e

ressuspensas em tampão de citometria (10% SFB em PBS), colocadas em gelo e rapidamente submetidas a aquisição de 10.000 eventos no citômetro AcuriC6 (Becton & Dickison – BD, Franklin Lakes, EUA) em canal de fluorescência FL1-A. As aquisições foram analisadas pelo programa Accuri. Os resultados representam a diferença de fluorescência entre as células mantidas a 37°C e 4°C (controle de negativo para a captação de 2-NBDG) durante a marcação.

4.4. Análise da concentração de lactato.

Para a quantificação de lactato foram analisados sobrenadantes de células infectadas com as diferentes micobactérias e soros de pacientes listados na tabela 4.2. Células destinadas à quantificação foram cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB sem a presença de vermelho de fenol para evitar a sua interferência na absorção de luz a 550 nm. Em cada poço de uma placa de 24 foram colocadas 5×10^5 células e novamente, após a aderência, células foram infectadas com uma MOI de 50:1 e o tempo de infecção de 48 horas.

A mensuração foi realizada a partir do kit lactato liquiform (LABTEST) que consiste na formação de um reagente de trabalho com a presença primordialmente das enzimas lactato oxidase e peroxidase e seus tampões ideais de trabalho. A lactato oxidase na presença de ácido láctico promove a formação de piruvato e peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e TOOS, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneína que tem máximo de absorbância em 550 nm.

Em uma microplaca de 96 poços de fundo plano são aplicados o padrão (concentração de lactato já determinada) e os “brancos”, como o meio utilizado nas células para os sobrenadantes e água para os soros. O reagente de trabalho consiste na mistura do reagente 1 (tampão 50 mmol/L pH 7.2; 4-aminoantipirina) e 2 (tampão 50 mmol/L pH 7.2, lactato oxidase e N-ethyl-N-[2-hydroxy-3-sulfopropyl-]3-methylaniline- TOOS) na proporção 0.8 do 1 para 0.3 de 2 para uma solução final de 1 mL. O reagente produzido é aplicado diretamente nas amostras, branco e padrão utilizando a proporção 80:1 de reagente de trabalho : volume final de reação. A leitura é feita em espectrofotômetro e as absorbâncias dos poços são diminuídas do branco, divididas pela absorbância padrão e multiplicadas pelo fator de calibração correlacionando a concentração de lactato em mg/dL para cada poço, seguindo as instruções do fabricante.

4.5. Análise do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

O potencial elétrico de membrana mitocondrial foi monitorado, com a utilização de tetrametilrodamina metil éster (TMRM). TMRM é um marcador fluorescente lipofílico catiônico, derivado da rodamina123 capaz de acumular na mitocôndria, de acordo com o seu potencial elétrico de membrana ($\Delta\psi$). O resultado é dado pela relação fluorescência da sonda (TMRM) pela fluorescência da sonda na presença do ionoforo de protons CCCP. Uma série de titulações foram realizadas para a determinação da concentração ideal do marcador, com isso, células ST8814 (4×10^5) foram incubadas em faixa de concentração que variava de 0.1nM a 1nM. O estabelecimento da concentração de TMRM nos permitiu titular a quantidade ideal do desacoplador CCCP onde as células foram submetidas a uma faixa de 5 μ M a 70 μ M. Além disso, testes com 2 μ g/ml de antimicina A resultaram em fluorescência emitida próxima ao que foram incubadas com o desacoplador. O ensaio padronizado então resultou de 0.5 nM de TMRM e 15 μ M de CCCP. O tempo de incubação com CCCP ou com Antimicina A (2 μ g/mL) foi de 10 minutos antes da marcação com TMRM. Células foram expostas a sonda por 10 minutos.

Após a marcação, células são lavadas em PBS por duas vezes, retiradas da placa através de tripsina 0,125%, ressuspensas em tampão de citometria contendo PBS com 10% de SFB, colocadas em gelo e rapidamente levadas para análise sendo submetidas a aquisição de 10.000 eventos em FACSCalibur (Becton & Dickison – BD, Franklin Lakes, EUA) em canal de fluorescência FL2- A. As aquisições foram analisadas pelo programa Accuri.

As análises do potencial por microscopia foram realizadas em placas de cultura de 24 poços onde as células se encontravam aderidas à lamínulas de vidro em concentração de 2×10^5 por poço. A marcação através do fluoróforo TMRM e CCCP seguiu o modelo da citometria.

As lamínulas de vidro foram lavadas duas vezes com PBS 1X por 2 minutos e colocadas em lâminas de vidro onde foram analisadas rapidamente. Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se o microscópio invertido de fluorescência Zeiss AxioObserver com sistema de iluminação Colibri com objetiva Plan-neofluar 40X com 1.4 de abertura numérica (Zeiss). O sinal vermelho do TMRM foi fotografado utilizando iluminação por led 530nm e o filtro Zeiss 50.

4.6 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram analisadas a partir de garrafas de cultura contendo 3×10^6 células. Em cada experimento 4 garrafas eram preparadas: células controles, células infectadas com *M. leprae*, células expostas ao bacilo irradiado e células expostas ao *M. Smegmatis*. Nem todas as enzimas apresentaram o controle com a micobactéria patogênica *M. smegmatis*. Após as condições de MOI 50:1 e 48 horas de infecção em estufa a 33° C e 5% de CO₂, o meio RPMI com 10% de soro é retirado e as células são lavadas 2x com PBS por 2 minutos. Após a lavagem, as células são tripsinizadas e neutralizadas com SFB. Desta suspensão é retirada uma alíquota de 10 µl de cada garrafa para ocorrer a contagem de células. Células foram centrifugadas para retirar a solução com tripsina a 1500 rpm por 10 minutos. Cada pellet proveniente de cada garrafa foi ressuspendido em 3 mL de água para a lise celular e então separados em 6 alíquotas que foram congeladas imediatamente. Cada alíquota foi utilizada para a leitura de uma diferente enzima. O descongelamento só ocorreu no momento da leitura onde as amostras são colocadas em microplacas de 96 poços. São aplicados 100 microlitros do lisado para cada 100 microlitros do meio reacional de cada enzima nas placas. A análise de cada alíquota referente a uma enzima foi realizada em quadruplicata e a oxidação/redução do NADH/NAD⁺ ou a redução de NADP⁺ foi acompanhada pela medida da absorvância em 340 nm no leitor de microplacas Victor 3 (PerkinElmer, EUA). A sobra de cada tubo (aproximadamente 100µl) foi utilizada para a quantificação de proteínas. O meio reacional utilizado para a leitura das diferentes enzimas encontra-se na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Reagentes utilizados no meio reacional para cada enzima analisada.

| | G6PD | Málica | LDH- M | LDH- H | ACL | PFK-1 |
|------------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|------------|--------------|
| Tris- HCl (pH= 7.4) | 50 Mm | 50 mM | 50 mM | 50mM | 50mM | 50 mM |
| MgCl ₂ | 5Mm | 5mM | 5mM | 5mM | 5mM | 5mM |
| NADP ⁺ | 0.2 mM | 0.2 mM | - | - | - | - |
| NAD ⁺ | - | - | - | 0.2 mM | - | - |
| NADH | - | - | 0.2 mM | - | 0.15 mM | 0.1 mM |
| ATP | - | - | - | - | 100 mM | 100 mM |

| | | | | | | |
|----------------|-----|-----|------|------|--------|--------|
| Piruvato de | | | | | | |
| sódio | - | - | 1 mM | - | - | - |
| Lactato de | | | | | | |
| Sódio | - | - | - | 1 mM | - | - |
| Citrato | - | - | - | - | 20 mM | - |
| 2- | | | | | | |
| mercaptoetanol | - | - | - | - | 10 mM | - |
| Malato | | | | | | |
| desidrogenase | - | - | - | - | 2 U/mL | - |
| CoA | - | - | - | - | 0.3 mM | - |
| Frutose- 6- | | | | | | |
| fosfato | - | - | - | - | - | 1 mM |
| Coquetel de | | | | | | |
| enzimas (PFK) | - | - | - | - | - | 0.1 mM |
| Malato | - | 1mM | - | - | - | - |
| Glicose-6- | | | | | | |
| fosfato | 1Mm | - | - | - | - | - |

*G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; Málica: enzima málica; LDH-M: lactato desidrogenase isoforma M; LDH-H: lactato desidrogenase isoforma H; ACLY: ATP citrato liase; PFK-1: fosfofrutoquinase-1; MgCl₂: Cloreto de magnésio; NADP⁺: nicotinamida adenina nucleotídeo fosfato- forma oxidada; NAD⁺: Nicotinamida adenina nucleotídeo- forma oxidada; NADH: Nicotinamida adenina nucleotídeo – forma reduzida; *Coquetel enzimas PFK-1 : aldolase, triosefosfatoisomerase e α -glicerofosfato isomerase

4.7. Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas dos lisados de células foi realizada pelo método colorimétrico Pierce® BCA protein assay (Thermo scientific, EUA) segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Primeiramente foram misturadas 50 partes do reagente A (BCA em tampão bicarbonato) com uma parte do reagente B (sulfato de cobre 4%). Em uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-one, Brasil) foi aplicada a curva padrão, o “branco” (SDS 1%) e as amostras (10 μ L / poço). Em seguida, em cada poço foram adicionados 200 μ L da mistura dos reagentes A e B, seguido de incubação a 37° C por 30 min. A leitura da placa

foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm e os resultados analisados pelo software SoftMax® data acquisition and analysis (Molecular Devices, EUA).

4.8 PCR em tempo real de lesões de pele.

Espécimes de lesões de pele congeladas em N₂ de pacientes LL (n=4) e BT (n=4) (6 mm) foram maceradas usando-se “beads” de tungstênio e um mixer mil MM301 (Retsh, Haan, Alemanha). Os dados clínico-epidemiológicos desses casos encontram-se na tabela 4.2. Os RNAs foram isolados usando o RNeasy minikit da Qiagen, realizando-se a digestão do DNA na própria coluna com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA) e posterior purificação. Os cDNAs foram sintetizados usando o QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen). Para os RT-PCRs, foram usados QuantiTect SYBR green PCR kit (Qiagen) e a máquina 7500 da Applied Biosystems (Foster City, USA). As reações continham os iniciadores senso e anti-senso a 0,4 M cada. Todos os resultados foram normalizados com base nos níveis de mRNA da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os iniciadores usados nessa etapa do trabalho foram desenhados com auxílio do programa qPrimerDepot (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>) e suas sequências encontram-se na tabela 4.4.

Tabela 4.4. Sequências dos iniciadores usados nas reações de qRT-PCR de espécimes cutâneos.

| Gene | Sequencia do iniciador |
|--------------------|-------------------------------|
| G6PD / senso | AGAGCTTTTCCAGGGCGAT(61,246) |
| G6PD / anti- senso | CACCAGATGGTGGGGTAGAT(59,655) |
| GSR / senso | CAAGCTGGGTGGCACTTG(61,462) |
| GSR / anti-senso | TTGGAAAGCCATAATCAGCA(59,257) |
| LDHB / senso | GGTATGGCGTGTGCTATCAG(59,178) |
| LDHB / anti-senso | TGCTGCAGATCCATCATTTTC(59,763) |
| LDHA / senso | GGCCTGTGCCATCAGTATCT(60,104) |
| LDHA / anti-senso | GGAGATCCATCATCTCTCCC(58,403) |

4.9 Análise Estatística

Os resultados foram representados como média ±E.P.M. (erro padrão da média) e avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA). Os valores foram considerados significativos quando o *p* foi igual ou inferior a 0,05 (*p*<0,05). Para a análise estatística deste trabalho foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1. *M. leprae* é capaz de modular a captação de glicose na célula hospedeira

O 2-NBDG é um análogo fluorescente da glicose que é absorvido naturalmente pelas células. As suas semelhanças estruturais permitem que a intensidade de fluorescência deste reagente seja uma importante ferramenta para uma análise da taxa de internalização da glicose por uma célula ou tecido (Yoshioka, et al., 1995; Zou et al., 2005). No sentido de entender qual o efeito da presença do bacilo na captação de glicose da sua célula hospedeira, nossas primeiras análises consistiram em incubar as células com o análogo fluorescente de glicose 2-NBDG e gerar imagens em microscópio invertido de fluorescência com sistema de iluminação Colibri. Para estes ensaios utilizamos dois diferentes índices de multiplicidade de infecção: correspondente a 20 bacilos por célula (20:1) (fig.B) e 50 bacilos por célula (50:1) (fig.C). A figura 5.1 representa o resultado de três diferentes experimentos realizados independentemente onde claramente é perceptível o acréscimo da intensidade de fluorescência de 2-NBDG nas células infectadas e que este aumento é proporcional à carga bacilar.

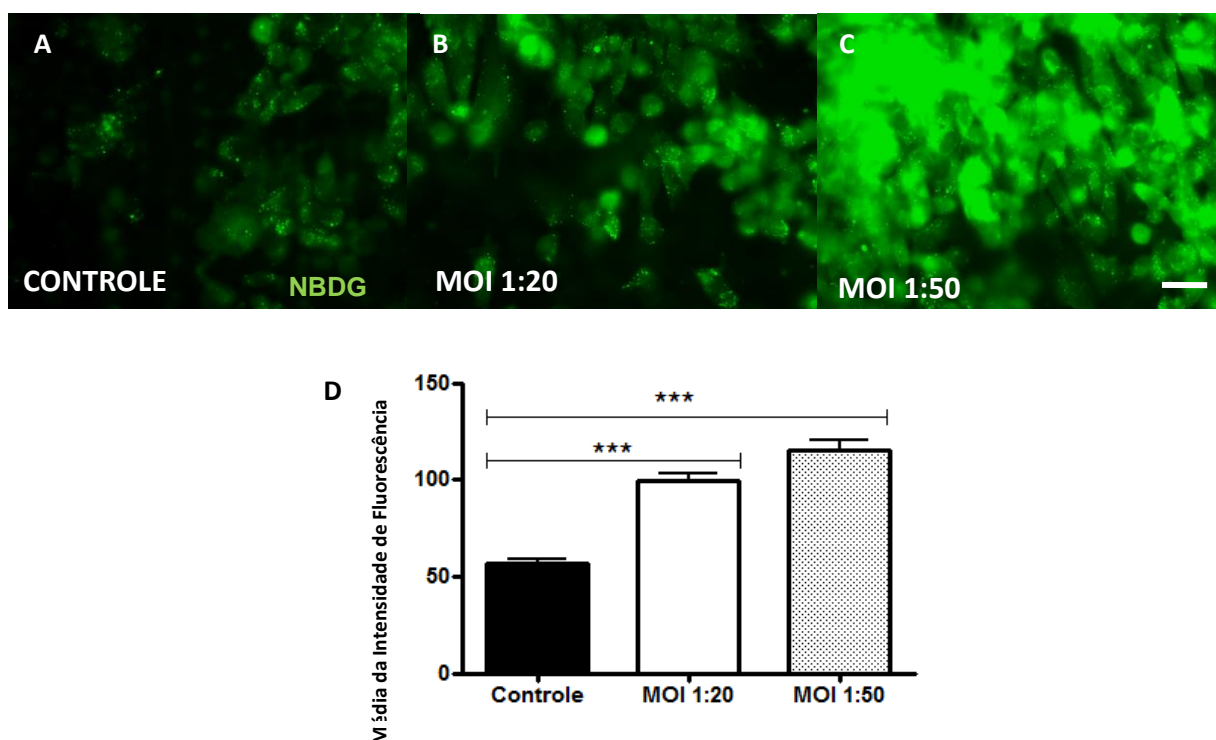


Figura 5.1. Culturas de células de Schwann infectadas com *M. leprae* apresentam aumento de intensidade de fluorescência do análogo de glicose 2-NBDG. Imagens de fluorescência de células marcadas com 2-NBDG após 48 horas de infecção. Células controle (A), células infectadas com o bacilo em uma MOI de 20:1 (B), e 50:1(C). Em (D) média e desvio padrão da quantificação da intensidade de fluorescência de 2-NBDG de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (***) $p < 0.001$). Barra de escala representa 50 μ m.

Somente a intensidade de fluorescência do análogo não é suficiente para empregarmos o diagnóstico de sua captação. Neste sentido, utilizamos também a mensuração da fluorescência de NBDG por citometria de fluxo retirando as possíveis ligações do NBDG aos receptores das membranas plasmáticas das células hospedeiras. Empregamos no desenvolvimento das análises o controle a 4^o C, onde algumas células são submetidas ao gelo cinco minutos antes e por todo o tempo de incubação com o análogo.

A figura 5.2 mostra os resultados de intensidade de fluorescência da sonda a 37^o C já reduzida do controle de associação à membrana a 4^o C. Com isso células de Schwann da linhagem ST8814 foram infectadas por 48 horas com *M. leprae* viável e de forma a determinar se este era um efeito específico ou, correspondente a virulência do patógeno foram utilizados bacilos irradiados e a infecção por *M. bovis* (BCG) viável. O índice de multiplicidade de infecção (MOI) nestes ensaios foi de 50:1.

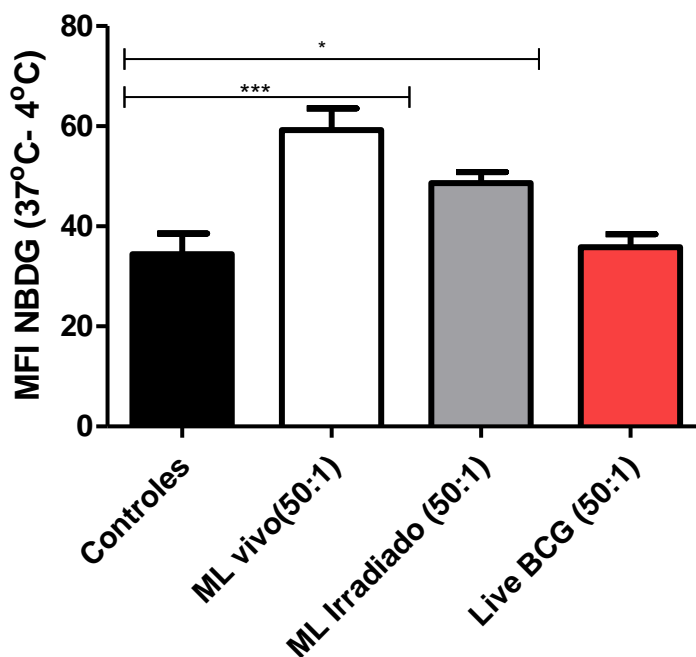


Figura 5.2. Análise da captação de glicose em células ST8814 infectadas com *M.leprae* por citometria de fluxo. Medianas das intensidades de fluorescência obtidas a partir da aquisição de 10.000 em canal de fluorescência FL1- A de células ST8814 incubadas com o análogo fluorescente de glicose 2-NBDG após 48 horas de infecção / exposição à MOI de de 50:1. Podemos observar as medianas de intensidade de fluorescência da sonda a 37^o C já deduzida do controle de ligação inespecífica a 4^o C. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (Erro padrão da média) de três experimentos realizados de forma independente em triplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (***) $p < 0.001$; * $p < 0.05$).

O bacilo irradiado também foi capaz de induzir a captação do análogo, mas não tão intensamente quanto o bacilo vivo que apresentou p valor menor que 0.001 em relação aos

controles. A utilização então da cepa não patogênica *M. bovis* demonstrou que este efeito parece ser específico do *M. leprae*, uma vez que seus níveis de captação foram semelhantes aos dos controles. Esses dados demonstram que o bacilo foi capaz de promover o aumento da internalização do análogo de glicose nas células ST8814 e que seus fatores de virulência potencializaram o efeito observado.

5.2. O aumento da captação de glicose não está associado ao aumento de atividade da enzima fosfofrutocinase-1 (PFK-1)

Um importante caminho metabólico para a glicose, a glicólise, foi avaliada na infecção das células pelo bacilo através da mensuração da atividade da enzima 6- fosfofruto-1-cinase ou fosfofrutocinase-1 (PFK-1). A PFK-1 é capaz de converter a frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato na presença de ATP sendo esta reação dificilmente reversível. A figura 5.3 mostra a atividade desta enzima analisada a partir de lisados oriundos de células ST8814 infectadas ou expostas ao *M.leprae*, em sua forma viável e irradiada e como controle de especificidade a outra micobactéria a *M. Smegmatis*.

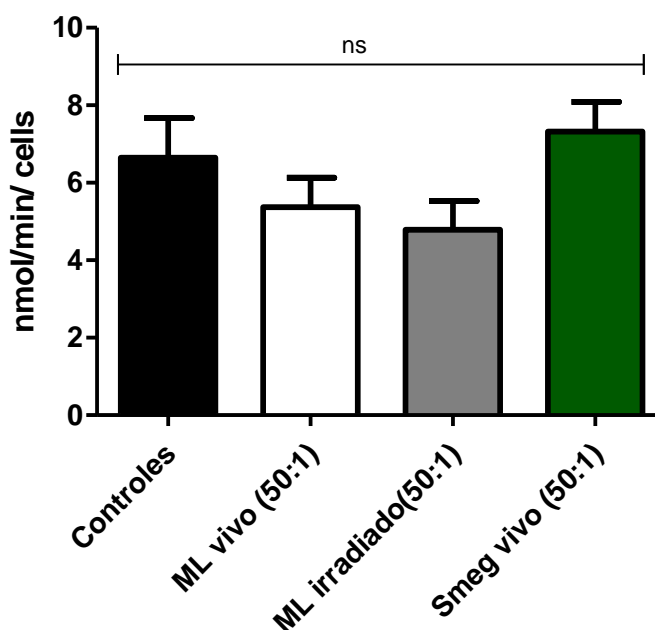


Figura 5.3. Atividade da enzima PFK-1 em lisados de células ST8814. A atividade enzimática da PFK-1 foi analisada em extratos celulares após 48 horas de infecção/exposição às diferentes micobactérias através da oxidação de NADH, monitorada em 340 nm normalizada pelo número de células. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (Erro padrão da média) de três experimentos realizados de forma independente em quadruplicata. Apesar de uma aparente diminuição na atividade da enzima, os resultados não apresentaram diferença estatística.

Apesar de uma aparente diminuição na atividade enzimática de células infectadas com o bacilo vivo e expostas ao irradiado, as diferenças não foram significativas. O bacilo então não foi capaz de aumentar a atividade desta enzima nos lisados analisados, indicando que o aumento da captação de glicose na infecção não foi acompanhado do aumento da atividade de uma enzima chave da glicólise, a PFK-1.

5.3. Análise de enzimas envolvidas na via das pentose-fosfato.

A análise da atividade da PFK-1 nos induziu a procurar outros destinos para a glicose na célula com a consequente análise da via das pentoses fosfato. Nossa busca baseou-se na caracterização do perfil catalítico da primeira e principal enzima da via, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). Todos os parâmetros anteriormente citados como índice de multiplicidade e tempo de infecção de 48 horas foram respeitados. Assim, a figura 5.4 mostra a análise de três experimentos independentes, onde células de Schwann foram incubadas com patógeno viável ou submetido à irradiação.

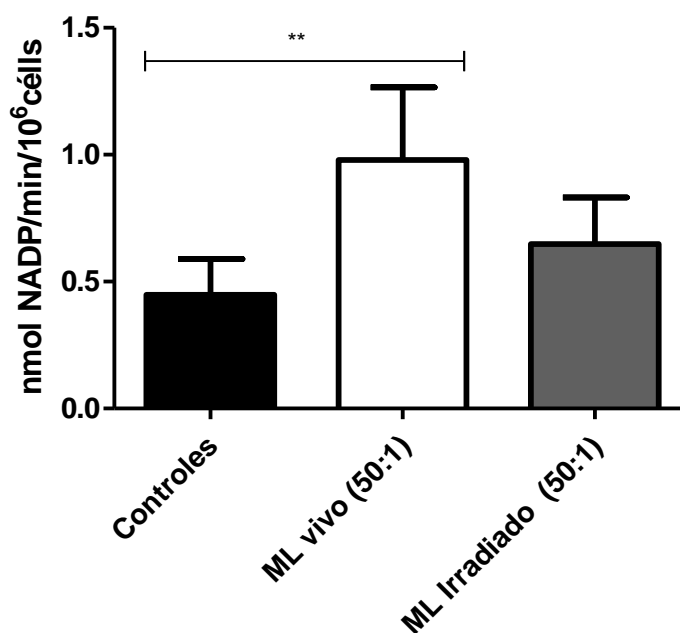


Figura 5.4. *M. leprae* aumenta a atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, a primeira enzima da via das pentoses-fosfato. A atividade enzimática da PFK-1 foi analisada em extratos celulares após 48 horas de infecção / exposição às diferentes micobactérias através da redução de NADPH, monitorada em 340 nm, normalizada pelo número de células. Podemos observar clara indução da atividade enzimática nas células infectadas pelo *M. leprae* quando comparadas ao controle. Os resultados estão expressos em média \pm Erro padrão de média de três experimentos realizados de forma independente, com leitura feita em triplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (** $p < 0.05$).

A enzima apresentou sua atividade aumentada em aproximadamente 2x nos lisados provenientes de células infectadas pelo bacilo, quando comparados aos controles. Porém as células que foram expostas ao bacilo irradiado não apresentaram aumento significativo da atividade desta enzima, demonstrando que a modulação desta enzima do hospedeiro por parte do bacilo não depende somente de seus antígenos, mas de uma interação mais profunda com os metabólitos do mesmo, presente apenas no bacilo viável. Acreditamos que isso se deve ao fato da célula infectada necessitar de uma maior demanda de poder redutor na forma de NADPH, essencial para a exacerbada síntese de lipídeos que sabidamente ocorre na célula infectada e é fundamental para a sobrevivência do *M. leprae* (Mattos et al., 2010 e 2014). Nossa hipótese foi aprimorada com a análise da atividade enzima málica, capaz de converter o malato em piruvato reduzindo o NADP⁺, rota monitorada pelo nosso ensaio.

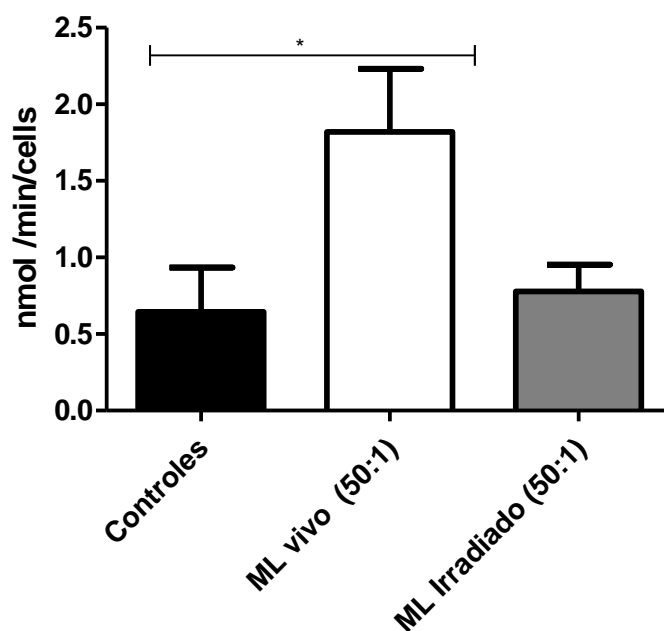


Figura 5.5. Células ST8814 infectadas com *M. leprae* viável apresentam aumento da atividade da enzima málica. A atividade enzimática foi analisada em extratos celulares após 48 horas de infecção/exposição às diferentes micobactérias através da adição do meio reacional e monitoramento da redução de NADP⁺ em 340 nm. A atividade foi normalizada pela concentração de proteínas. A barra em preto denomina células controles, a barra em branco células infectadas com o bacilo viável e em cinza com o bacilo irradiado. Os resultados estão expressos em média ± Erro padrão da média de três experimentos realizados de forma independente e a leitura realizada em triplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (** p<0.05).

A figura 5.5 demonstra os nossos achados da atividade da enzima málica. Os lisados oriundos de células infectadas demonstraram aumento estatístico de atividade da enzima corroborando com a hipótese de uma maior demanda de poder redutor na forma de NADPH

nas células infectadas e possível importância deste equivalente para o sucesso da infecção feita por *M. leprae*.

Nosso grupo também avaliou a expressão do gene G6PD por qPCR em lesões de pele de pacientes, onde multibacilares (LL) apresentaram expressão aumentada desta enzima em relação ao paucibacilares. Este resultado está demonstrado na figura 5.6.

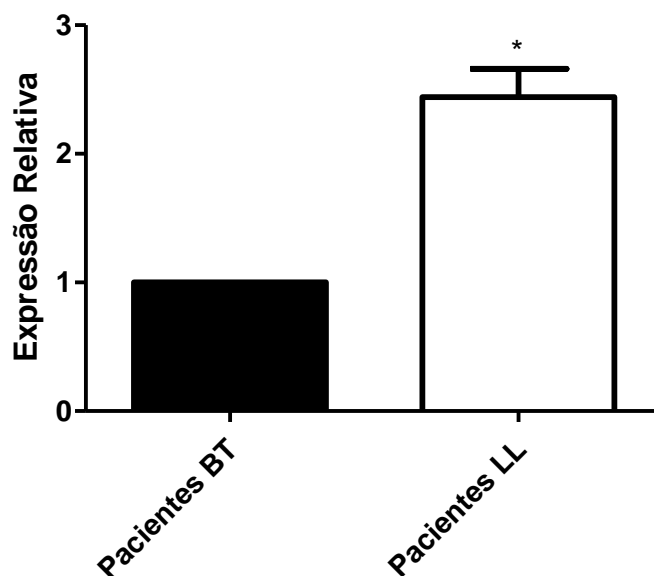


Figura 5.6. Expressão relativa do gene G6PD em biópsias de pacientes. Fragmentos de lesões de pele de 4 pacientes paucibacilares (BT) e 4 multibacilares (LL) foram utilizadas na análise. Observamos um incremento dos níveis de expressão da G6PD nos tecidos ricos em bacilos (LL) quando comparados aos tecidos oriundos de pacientes BT. Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene GAPDH. Significância estatística foi calculada por teste de “student” (t), (* $p < 0.05$).

Este resultado demonstrou que pacientes que apresentam grande carga bacilar conferem em suas lesões aumento da expressão deste gene onde a atividade do seu produto, a enzima G6PD foi mensurada por nós e encontrou-se aumentada em lisados infectados. A expressão do gene da enzima *in vivo* acompanhou os ensaios de sua atividade *in vitro*, o que leva o nosso grupo a questionar a importância destas rotas na hanseníase.

O NADPH, agente redutor produto da ação das enzimas G6PD e málica é essencial na regeneração da glutatona na sua forma oxidada para a reduzida, reação catalisada pela enzima glutatona redutase. Avaliamos também em lesões de pele de pacientes a expressão do gene responsável pela produção de glutatona redutase (GRS) e este resultado encontra-se na figura 5.7.

Amostras oriundas de pacientes multibacilares (LL) apresentaram aumento significativo na expressão deste gene em detrimento aos paucibacilares.

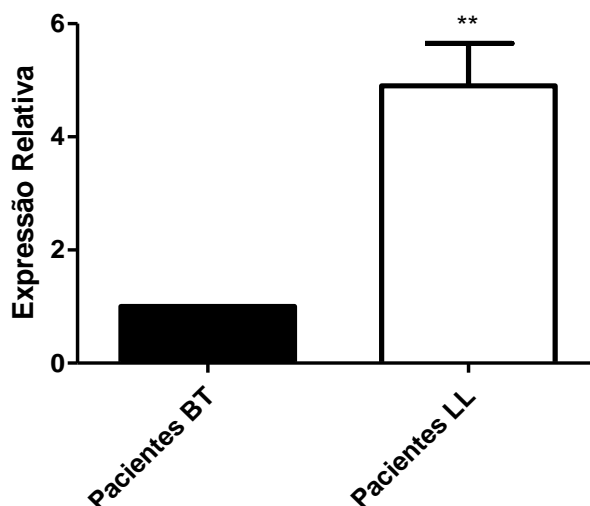


Figura 5.7. Expressão relativa do gene GSR em biópsias de pacientes. Fragmentos de lesões de pele de 4 pacientes paucibacilares (BT) e 4 multibacilares (LL) foram utilizadas na análise. Observamos um incremento dos níveis de expressão da GSR nos tecidos ricos em bacilos (LL) quando comparados aos tecidos oriundos de pacientes BT. Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene GAPDH. Significância estatística foi calculada por teste de “student” (t), (** $p < 0.05$).

5.4. A infecção diminui o potencial elétrico mitocondrial da célula hospedeira

O potencial elétrico mitocondrial foi mensurado através do fluoróforo tetrametil rodamina metil ester (TMRM), sonda catiônica que se distribui através das membranas celulares e se acumula na matriz mitocondrial. Por sua característica lipofílica é capaz de penetrar facilmente nas bicamadas lipídicas da célula e mitocondrial (Ehrenberg, et al., 1988). A grande dificuldade na análise do potencial mitocondrial utilizando sondas sensíveis a voltagem é o fato de serem também sensíveis ao potencial da membrana citoplasmática. Devido a isso uma série de controles foram realizados no sentido de se determinar qual a verdadeira contribuição do potencial mitocondrial na fluorescência da sonda, dentre eles o uso do dissipador de potencial elétrico de membranas cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona (CCCP) e Antimicina A, potente inibidor da cadeia respiratória. A determinação das condições ótimas foi demonstrado na figura 5.8.

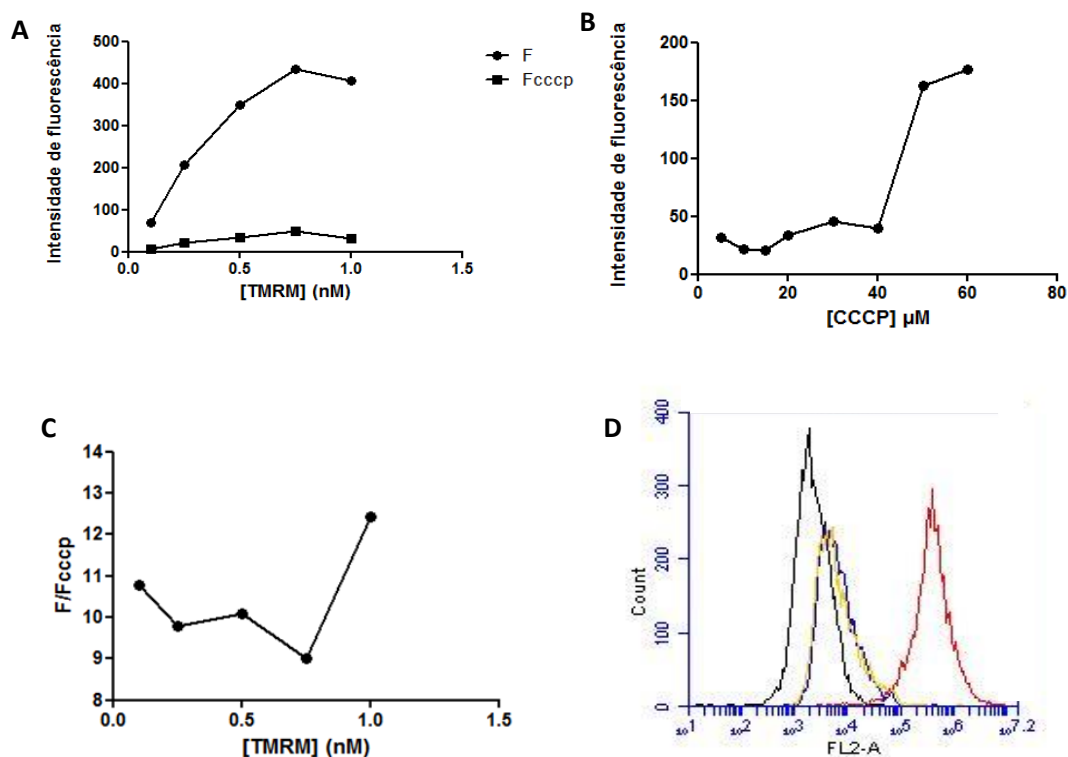


Figura 5.8. Determinação das condições ótimas para a análise do potencial mitocondrial das células ST8814 intactas por citometria de fluxo. (A) determinação da concentração de TMRM. (B) determinação da concentração de CCCP em 0.5 nM de TMRM (C) Razão TMRM/TMRM cccp (F/F_{cccp}) (D) Sobreposição da intensidade de fluorescência encontrada em células ST8814, comprovando potencial específico proveniente da mitocôndria. Intensidade de fluorescência de células não coradas (linha preta), incubadas com TMRM 0.5 nM (linha vermelha), com 0.5 nM de TMRM e 15 μ M de CCCP (linha azul), TMRM 0.5 nM e Antimicina A 2 μ g/mL (linha amarela).

Determinamos a quantidade exata de sonda e ionóforo relacionando a melhor relação entre ambos. Neste sentido, aferimos a concentração exata de TMRM e do ionóforo para o nosso modelo de estudo. Ao final, a concentração de TMRM ideal foi determinada entre 0.1 e 0.5 nM, e a concentração utilizada de CCCP, entre 10 e 15 μ M (fig. 5.8). Ao adicionar 2 μ g/ml de Antimicina A e interromper o transporte de elétrons, a intensidade de fluorescência encontrada era análoga a intensidade de fluorescência com a incubação de CCCP. Diante destas análises estamos de fato mensurando potencial elétrico mitocondrial e os resultados são expressos pela relação TMRM / TMRM + cccp (F/F_{cccp}).

Após a padronização dos experimentos, células da linhagem ST8814 foram infectadas com o bacilo com uma MOI de 50 para cada célula. Ao final de 48 horas de infecção analisamos o potencial através de microscopia e citometria de fluxo. A figura abaixo mostra imagens em microscopia de fluorescência demonstrando que a intensidade de fluorescência do TMRM está diminuída nas células infectadas.

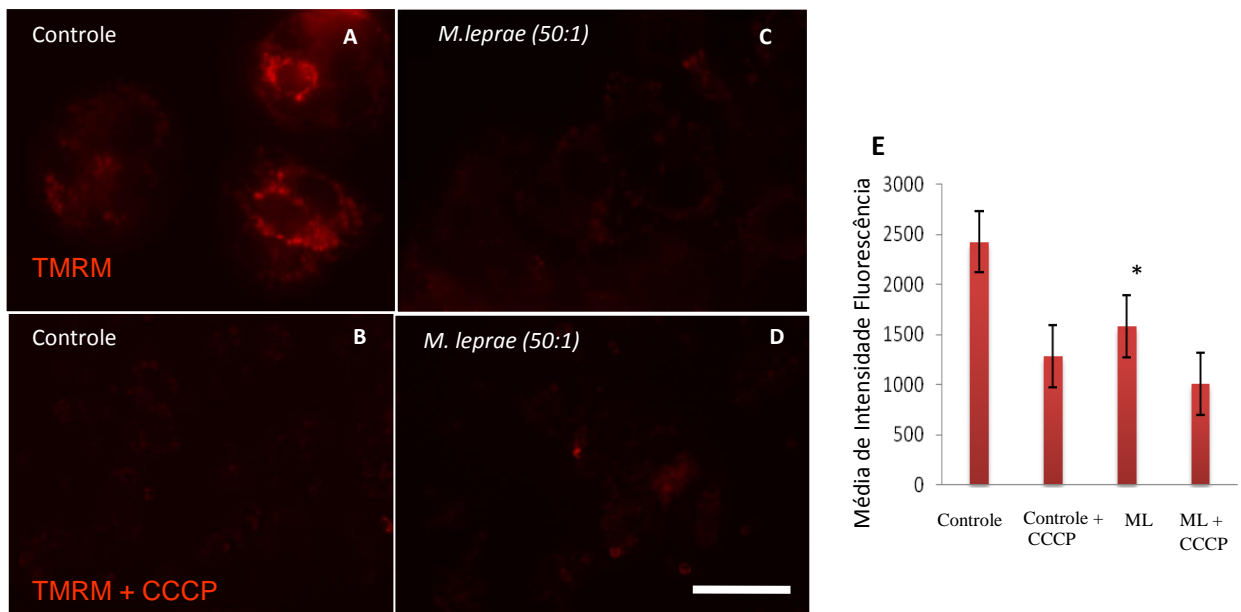


Figura 5.9. A infecção diminui o potencial elétrico das membranas mitocondriais das células hospedeiras. Imagens de fluorescência de células incubadas com TMRM por 10 minutos, após 48 horas de infecção com MOI de 50:1. Como controle, alguns grupos de células infectadas ou não infectadas (controles) foram incubadas com o ionóforo CCCP 10 minutos antes da marcação com TMRM. (A) células controle com TMRM; (B) células controles incubadas com CCCP antes da marcação com TMRM; (C) Células infectadas com TMRM e (D) Células infectadas anteriormente incubadas com CCCP. (D) Quantificação da intensidade de fluorescência de TMRM encontrada nas imagens mostradas. Fotos representativas de três experimentos independentes. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (***) $p < 0.001$). Barra de escala representa $50\mu\text{m}$.

Células infectadas apresentaram intensidade de fluorescência de TMRM similar ao de células controles incubadas previamente com o ionóforo, apresentando diminuição significativa em relação às células controles (Fig. 5.9 E). O potencial elétrico mitocondrial mostrou-se reduzido nas análises por microscopia e de forma a ratificar nossos achados novos experimentos em citometria de fluxo foram realizados. A figura 5.10 demonstra a análise do potencial por citometria de fluxo de três diferentes experimentos realizados em triplicatas. Percebemos claramente a diminuição do potencial elétrico mitocondrial nas células infectadas com o bacilo. Novamente, para fins de comparação utilizamos o bacilo irradiado e o *Mycobacterium Bovis* (BCG), os quais não apresentaram diferenças significativas em relação às células controles.

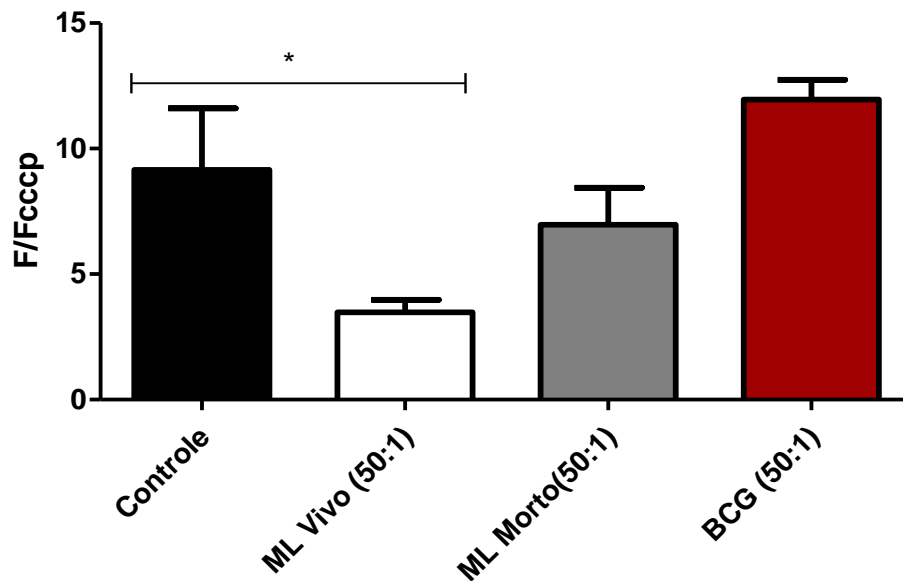


Figura 5.10. Análise do potencial elétrico mitocondrial de células ST8814 infectadas com o bacilo por 48 horas em citometria de fluxo. Medianas das intensidades de fluorescência obtidas a partir da aquisição de 10.000 eventos em canal de fluorescência FL2- A de células ST8814 incubadas com o TMRM após 48 horas de infecção / exposição à MOI de 50:1. Como controle, grupos de células de cada condição foram previamente incubadas com o desacoplador CCCP. Os resultados estão expressos através da relação entre a mediana de intensidade de fluorescência de TMRM total e na presença do desacoplador (F/Fcccp) \pm EPM (Erro padrão da média) de três experimentos realizados de forma independente em triplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (* $p < 0.05$).

De forma a apenas representar os ensaios realizados por citometria de fluxo, a figura 5.11 mostra as sobreposições das medianas de intensidade de fluorescência encontrada em um dos experimentos realizados por citometria de fluxo.

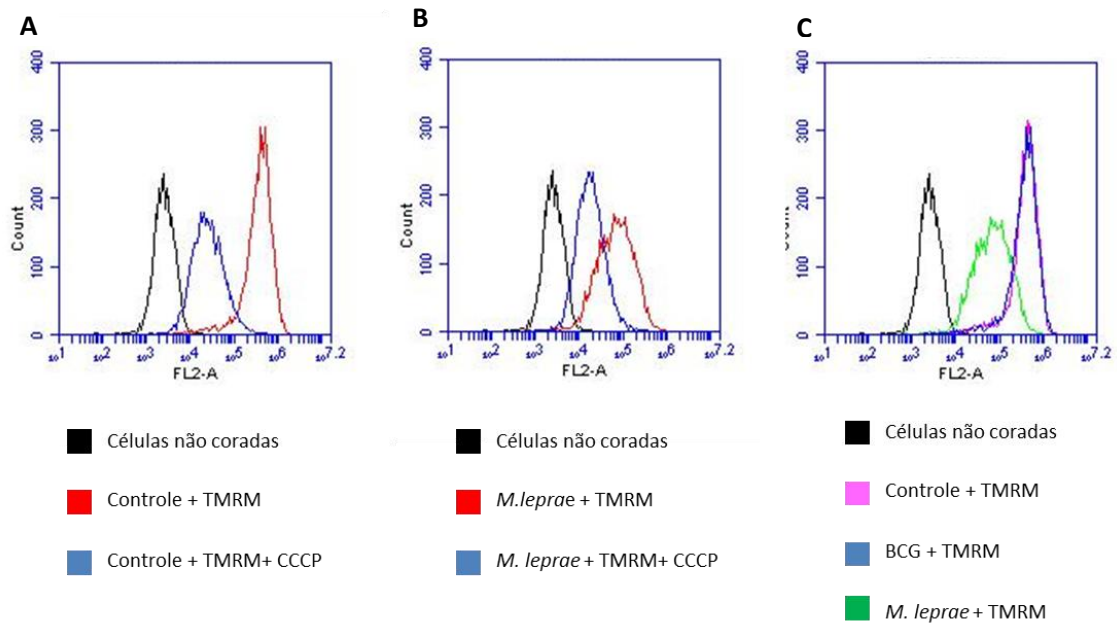


Figura 5.11. Sobreposição da mediana de intensidade de fluorescência nos ensaios de potencial elétrico por citometria de fluxo. (A) fluorescência da sonda nas células controle e na presença do ionóforo. (B) intensidade da sonda em células infectadas com o bacilo viável e também na presença do ionóforo. (C) diferenças na intensidade da sonda entre as células controle, infectadas e na presença de BCG.

5.5. Análise da fermentação láctica em células infectadas e em amostras provenientes de pacientes.

Diante da diminuição do potencial elétrico mitocondrial, nosso grupo avaliou a fermentação láctica destas células utilizando sobrenadantes para a quantificação de lactato e extratos celulares para aferir a atividade da enzima lactato desidrogenase em suas duas isoformas. Nestes ensaios além do bacilo viável e irradiado, utilizamos as duas micobactérias não patogênicas *M. Smegmatis* (Smeg) e *M. Bovis* (BCG). A figura 5.12 mostra os níveis de lactato encontrados no sobrenadante de células ST8814.

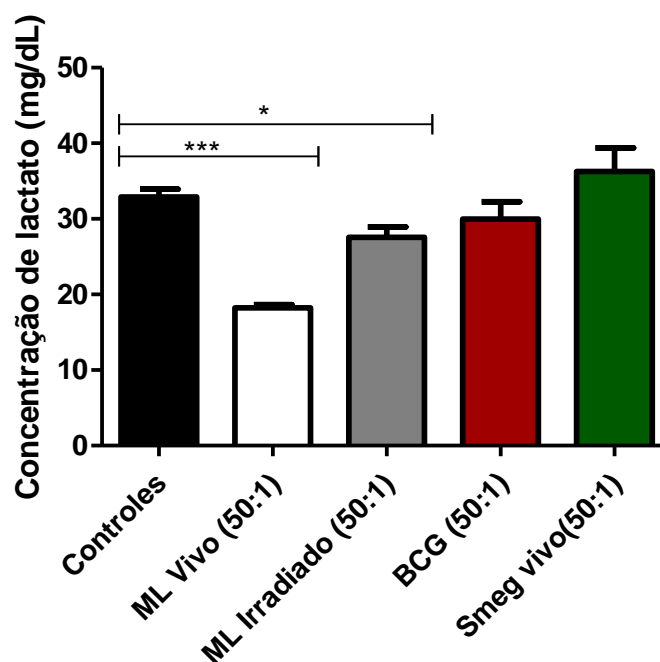


Figura 5.12. *M. leprae* e não outras micobactérias é capaz de diminuir os níveis de lactato no sobrenadante das células infectadas. Quantificação de lactato em sobrenadantes de células ST8814 infectadas / expostas por 48hs à MOI de 50:1. A barra em preto denomina células controles, a barra em branco células infectadas com o bacilo viável. Em cinza, vermelho e verde representamos as células na presença do bacilo irradiado, infectadas com *M. Bovis* (BCG) ou *M. Smegmatis*, respectivamente. Os resultados estão expressos em média \pm EPM (Erro padrão da média) de três experimentos realizados de forma independente em duplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (***) $p < 0.0001$; * $p < 0.05$).

As células infectadas apresentaram uma diminuição de aproximadamente 50 % de lactato no seu sobrenadante. O sobrenadante de células expostas ao bacilo irradiado também apresentou queda significativa de lactato, porém, menos expressiva se comparado ao bacilo viável. Desta forma, acompanhando os ensaios demonstrados neste trabalho a potencialização do efeito parece ser determinada pela virulência do bacilo. A especificidade do efeito foi garantida ao utilizar outras micobactérias não patogênicas, incapazes de atingir o citosol da célula. Em ambos os casos, as bactérias encontravam-se viáveis, conforme descrito na metodologia deste trabalho.

A diminuição de lactato nos sobrenadantes de células infectadas foi acompanhada do decréscimo de atividade da enzima lactato desidrogenase isoforma M, a isoforma capaz de converter piruvato em lactato. Essa redução é igualmente mais intensa nas células infectadas pelo *M. leprae* quando comparadas às demais condições, mostrando a importância dos seus

fatores de virulência. A figura 5.13 expressa o resultado de três experimentos independentes em quadruplicata da atividade desta enzima pela formação de NAD^+ .

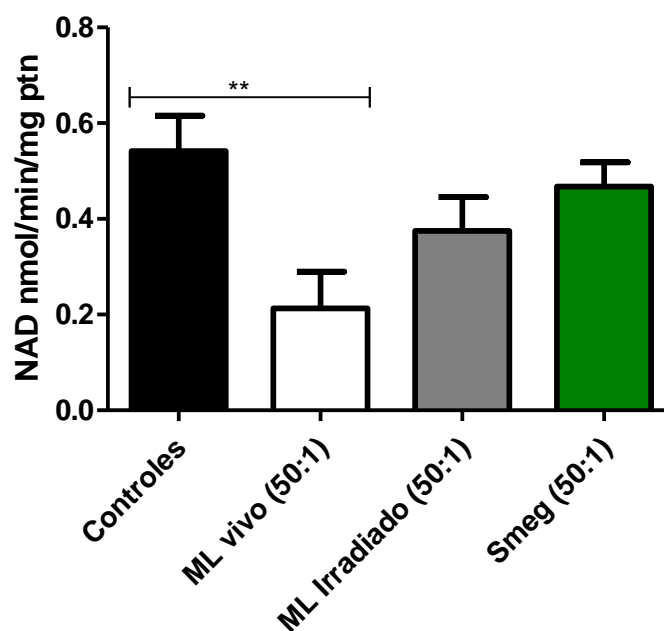


Figura 5.13. *M. leprae* diminui a atividade da enzima lactato desidrogenase isoforma M em células ST8814. A atividade enzimática da isoforma M foi analisada em extratos celulares após 48 horas de infecção / exposição às diferentes micobactérias através do monitoramento da oxidação de NADH em 340 nm. A atividade desta enzima foi normalizada pela concentração de proteínas. Podemos observar uma relação direta entre a infecção pelo *M. leprae*, a diminuição da atividade enzimática e subsequente liberação de lactato no sobrenadante de células infectadas. A barra em preto denomina células controles, a barra em branco células infectadas com o bacilo viável. Em cinza e em verde representamos as células na presença do bacilo irradiado e da micobactéria não patogênica *M. Smegmatis*. Os resultados estão expressos em média \pm Erro padrão da média de três experimentos realizados de forma independente e a leitura realizada em triplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (** $p < 0.05$).

Comparativamente utilizamos *Mycobacterium Smegmatis* (*Smeg*), outra micobactéria não patogênica, e percebemos que novamente não houve alteração na atividade da enzima. Esse resultado foi também replicado *in vivo*, onde pacientes multibacilares, denominados LL, mostraram em suas lesões de pele diminuição na expressão desta enzima em relação à pacientes paucibacilares, denominados BT, onde os níveis de bacilo são extremamente baixos. A figura 5.14 mostra a expressão relativa do gene LDHA, codificante da isoforma M, feita por PCR em tempo real em fragmentos de lesão de pele de 4 pacientes BT e 4 pacientes LL. Os resultados de expressão relativa entre pacientes destas duas formas clínicas demonstrou uma diminuição drástica da expressão de LDH- M em lesões de pacientes do polo LL.

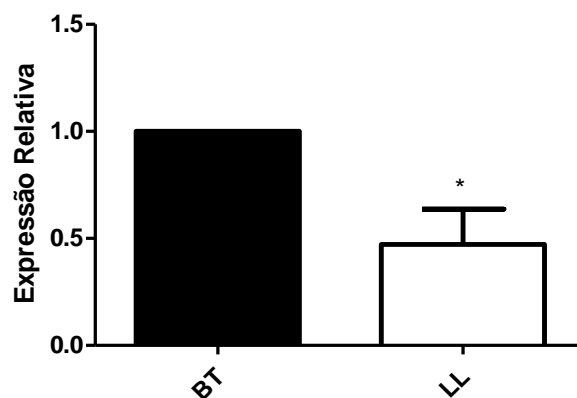


Figura 5.14. Expressão relativa do gene LDHA em fragmentos de pele lesionada de pacientes de ambos os polos da doença. Fragmentos áreas de lesão de pele de 4 pacientes paucibacilares (BT) e 4 multibacilares (LL) foram utilizadas na análise. Observamos um incremento dos níveis de expressão do gene LDHA, responsável pela produção da isoforma M da lactato desidrogenase, nos tecidos ricos em bacilos (LL) quando comparados aos tecidos oriundos de pacientes BT. Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene GAPDH. Significância estatística foi calculada por teste de “student” (t), (* $p < 0.05$).

Sucessivamente a análise da lactato desidrogenase isoforma M, mensuramos a atividade da isoforma H, responsável pela formação de piruvato a partir de lactato e a figura 5.15, mostra o resultado dos três experimentos realizados pelo nosso grupo.

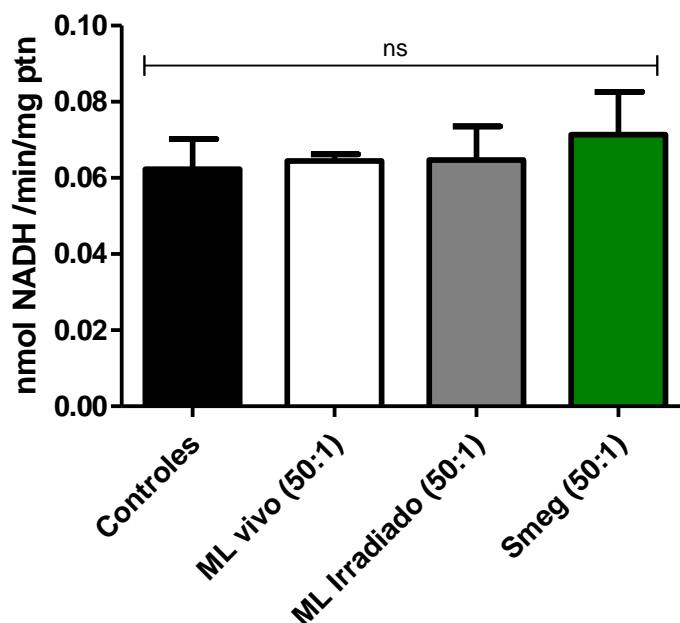


Figura 5.15. Em células ST8814, o bacilo de Hansen parece não modular a atividade de LDH isoforma H. A atividade enzimática da isoforma H foi analisada em extratos celulares após 48 horas de infecção/exposição às diferentes micobactérias através do monitoramento da redução de NAD^+ em 340 nm. A atividade desta enzima foi normalizada pela concentração de proteínas. A barra em preto denomina células controles, a barra em branco células infectadas pelo *M. leprae*. Em cinza e em verde representamos a atividade enzimática de células na presença do bacilo viável e da micobactéria não patogênica *M. Smegmatis*. Os resultados estão expressos em média \pm Erro padrão da média de três experimentos realizados de forma independente e a leitura realizada em triplicata. Os resultados não apresentaram significância estatística.

Uma vez que não detectamos diferenças na modulação da atividade da isoforma H através da metodologia adotada, decidimos avaliar a expressão de gene LDHB, responsável pela produção da isoforma LDH-H em lesões de pele de pacientes. Os resultados encontrados estão na figura 5.16 e demonstram aumento da expressão do gene em pacientes multibacilares em relação aos pacientes paucibacilares.

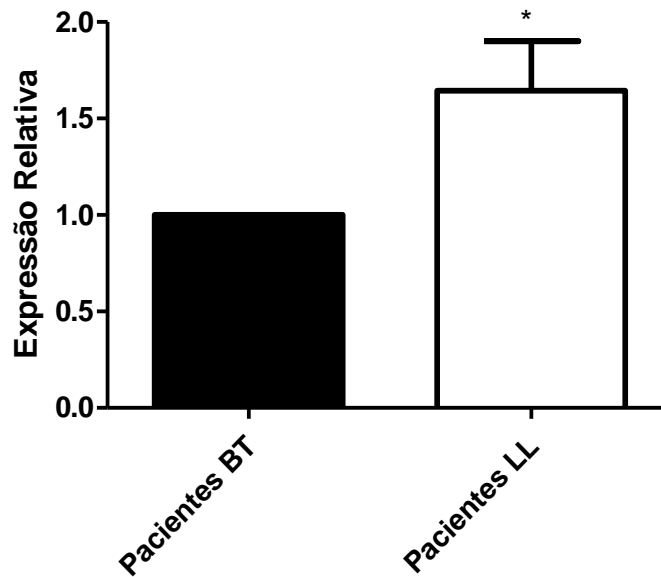


Figura 5.16. Expressão relativa do gene LDHB em biópsias de pacientes. Fragmentos de áreas de pele lesionadas de 4 pacientes paucibacilares (BT) e 4 multibacilares (LL) foram utilizadas na análise. Observamos um incremento da expressão da isoforma H nos tecidos ricos em bacilos (LL) quando comparados aos tecidos oriundos de pacientes BT. Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene GADPH. Os níveis de expressão foram normalizados pelo gene GADPH. Significância estatística foi calculada por teste de “student” (t), (* $p < 0.05$).

Esta discrepância entre a não indução da atividade enzimática da isoforma H pela infecção, e o aumento da expressão do gene LDHB observado em fragmentos de pele de pacientes multibacilares, pode ter sido acarretada ao *M. leprae* induzir o gene LDHB nos tipos celulares majoritários da derme e não em células de Schwann ou que a indução gênica não está se refletindo em atividade enzimática devido a controles pós-transcricionais.

Soros de pacientes provenientes do Ambulatório Souza Araújo foram também analisados quanto à concentração de lactato. A descrição detalhada dos pacientes envolvidos na pesquisa encontra-se na tabela 4.2. Observamos claramente que o nível de lactato sérico decresce numa proporção direta à carga bacilar, sendo praticamente idêntico ao controle sadio nos pacientes paucibacilares (BT) e baixo nos pacientes multibacilares (LL), com p valor abaixo de 0.05 quando comparado ao soro de indivíduos controle. Este dado, juntamente com resultados preliminares apontando para a diminuição de lactato nos sobrenadantes de hepatócitos da linhagem HEPG2 infectados com bacilo nos dá indícios de que o fenômeno é comum à vários tecidos do corpo humano, incluindo o fígado.

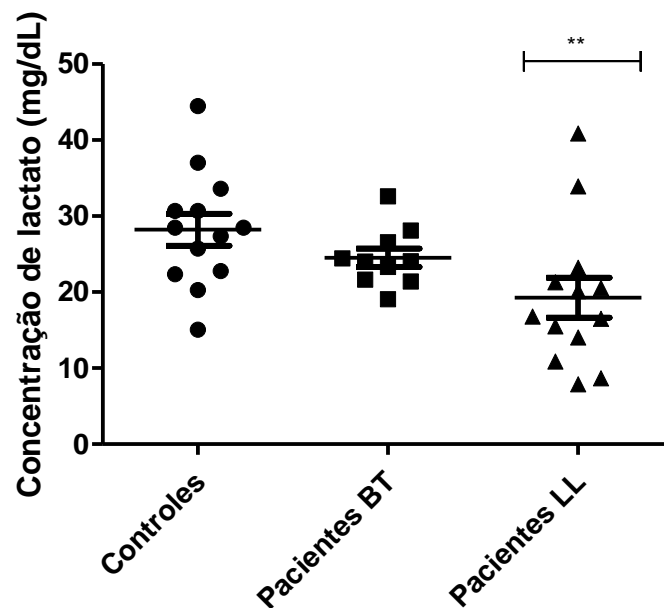


Figura 5.17. Os níveis de lactato são inferiores nos pacientes multibacilares em relação aos paucibacilares e indivíduos saudáveis. Os níveis de lactato foram mensurados através de método descrito anteriormente. Observamos a diminuição nos níveis de lactato sérico numa relação inversa ao índice bacilosκόpio. Foram recrutados para o estudo 12 indivíduos saudáveis, 11 classificados como *Borderline-tuberculoides* (BT) e 12 na forma extrema lepromatosa (LL). ** P<0.05

5.6. O *M. leprae* foi capaz de aumentar a atividade da enzima ATP citrato liase *in vitro*.

A análise dos resultados de captação de glicose somados à diminuição da fermentação láctica observadas em células infectadas, e corroborados com os dados da literatura evidenciando a indução da síntese de lipídeos pelo bacilo em células hospedeiras, conduziram o nosso grupo a mensurar a atividade da enzima ATP citrato liase (ACLY) em células infectadas e tecidos afetados pela doença. ACLY catalisa a conversão de citrato em acetil-CoA, utilizando uma molécula de ATP, e é caracterizada como uma ligação direta entre o metabolismo da glicose e a formação de lipídios (revisto por Chypre, 2012). O Resultado da análise está na figura 5.18.

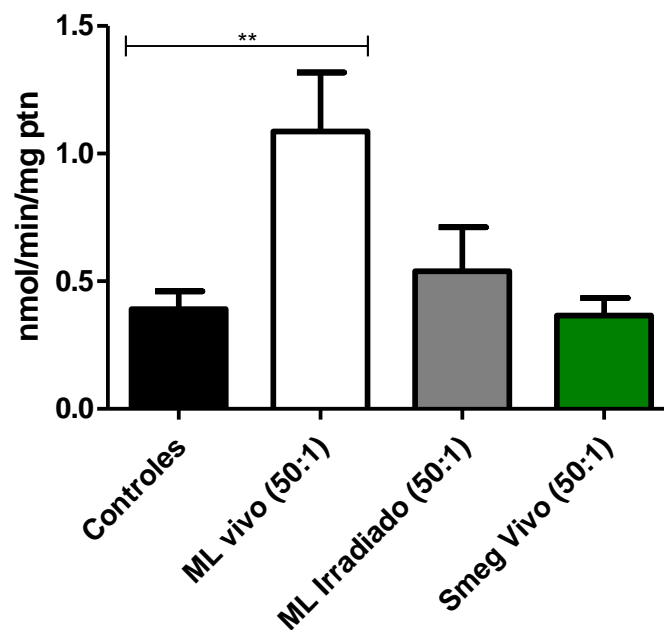


Figura 5.18. Células ST8814 infectadas com *M. leprae* apresentam aumento de atividade da ATP citrato liase. A atividade enzimática foi analisada em extratos celulares após 48 horas de infecção/exposição às diferentes micobactérias através do monitoramento da oxidação de NADH em 340 nm. A atividade foi normalizada por proteínas. A barra em preto denomina células controles, a barra em branco células infectadas com o bacilo viável. Em cinza e em verde representamos a atividade enzimática de extratos de células previamente expostas ao bacilo irradiado e a micobactéria não patogênica *M. Smegmatis*. Os resultados estão expressos em média \pm Erro padrão da média de três experimentos realizados de forma independente e a leitura realizada em triplicata. Significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (** $p < 0.05$).

Os lisados oriundos das células infectadas apresentaram aproximadamente o dobro da atividade de ACL quando comparados aos lisados referentes às células controle. Já o aparente aumento observado nas culturas expostas ao bacilo inativado não foi confirmado estatisticamente. Este resultado experimental acompanha os dados da literatura onde apenas bacilos viáveis são capazes de induzir nas CS a formação de agregados lipídicos (Revisto por Mattos, *et al.*, 2012). Os lisados provenientes da incubação com a micobactéria não patogênica *M. Smegmatis* não apresentaram diferenças significativas na atividade de ACL em relação aos controles conferindo assim a especificidade do efeito com *M. leprae*, como observado também na indução do acúmulo lipídico (Mattos *et al.*, 2010).

6. DISCUSSÃO

A hanseníase é uma doença capaz de gerar neuropatias periféricas aos pacientes, determinantes para o desenvolvimento de deformidades, as quais podem levar à incapacidades físicas por toda a vida. A lesão neural é o aspecto mais reconhecido da doença, relacionada à capacidade do *M. leprae* em infectar as células de Schwann (CS). Apesar de estudos demonstrarem interações entre o bacilo e as CS, os efeitos da infecção sobre o metabolismo energético da célula hospedeira é negligenciado e até o momento desconhecido. Acreditamos que é preciso descrever estes efeitos e que as modulações nestas vias em decorrência da infecção, como o aumento da captação de glicose, podem explicar o sucesso e a adaptação do *M. leprae* como patógeno intracelular.

No presente estudo, observamos que células infectadas pelo *M. leprae* apresentam um aumento na captação do análogo fluorescente de glicose 2-NBDG (Fig. 5.2). Esse aumento ocorre de forma concomitante à redução do potencial de ação mitocondrial (Fig 5.10). Não podemos classificar neste momento esses eventos como uma ativação do metabolismo fermentativo por parte do *M. leprae*, pois observamos também que as células de Schwann infectadas reduzem a liberação de lactato para o meio extracelular (Fig. 5.12).

Construímos com esse conjunto de dados a hipótese, a ser confirmada em estudos posteriores, de que trata-se de fato de uma ativação metabólica das vias fermentativas da célula hospedeira por parte do patógeno, porém o carbono que a ser exportado na forma de lactato está sendo reutilizado na exacerbada síntese de lipídeos sabidamente modulada pelo patógeno (Mattos et al., 2010 e 2014). Este também seria o mecanismo através do qual a célula reciclaria o seu *pool* de NAD^+ e NADP^+ . Esse "reuso" do lactato induzido pelo patógeno à célula hospedeira está sendo proposto tendo por base o aumento da expressão da subunidade H (Fig.5.16) da enzima lactato desidrogenase, responsável por oxidar lactato a piruvato, na derme de pacientes multibacilares, além da diminuição da expressão e atividade da subunidade M, responsável por reduzir piruvato a lactato, em derme e células de Schwann respectivamente(Figs. 5.14 e 5.13).

Um estudo recente do nosso grupo descreve um dos mecanismos que podem estar envolvidos no aumento da captação de glicose pela célula infectada. Rodrigues e colaboradores (2010) demonstraram que o *M. leprae* é capaz de induzir o aumento da expressão de IGF-1 nas células de Schwann. IGF-1 faz parte do grupo de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFS), podendo apresentar efeitos em crescimento, proliferação, prevenção de apoptose, diferenciação celular e metabolismo energético (revisto por Denley e col., 2005). O receptor tipo 1 de IGF-1 (IGF-IR) apresenta em seu domínio intracelular uma tirosina quinase que contem cerca de 80% de similaridade estrutural com o receptor de insulina. A ligação de fatores de crescimento nesses receptores gera sua

autofosforilação em uma série de reações que culminam no recrutamento de PI3K e ativação de proteínas quinases sinalizadoras de sobrevivência como Akt (Cheng, et al.,2000). Esse pode ser o mecanismo por trás da não indução de apoptose por parte do *M. leprae* (Lahiri et al., 2010; Rodrigues et al., 2010) mesmo gerando uma forte redução do potencial elétrico mitocondrial, efeito que pode induzir a morte celular (Palanisaamy et al., 2013; Reis et al., 2014).

Olianas e Colaboradores em 2010 demonstraram que a ativação de receptores δ -opioides em células de ovário de hamster chinês (“CHO cells”) aumentavam a captação de um análogo da glicose ([3H]-2-deoxy-D-glucose and 3-O-[methyl-[3H]]-D-glucose) através da ativação do receptor IGFR- 1R. Esta ativação aumentava a atividade intrínseca de GLUT-1 (“glucose transporter 1”) através de uma cascata de sinalização envolvendo PI3K. Sendo assim, acreditamos que a indução de IGF-1 realizada pelo patógeno nas CS seja primordial na indução da captação do análogo fluorescente (2-NBDG) de glicose observada nos nossos resultados uma vez que já foi detectada expressão de GLUT-1 nestas células (Muona et al., 1992.)

Em nossas análises os níveis extracelulares de lactato nas células infectadas encontraram-se diminuídos (Fig. 5.12). Acreditamos em duas possibilidades para este efeito, a primeira está relacionada aos nossos resultados quanto à atividade da enzima lactato desidrogenase isoforma M, onde CS infectadas apresentaram significativa diminuição de sua função catalítica (Fig. 5.13). Desta forma o lactato pode não estar sendo formado e por isso os seus níveis no sobrenadante estão diminuídos. Corroborando com esses achados, esta enzima apresentou baixa expressão em lesões de pele de pacientes multibacilares em relação aos paucibacilares. A segunda possibilidade refere-se ao transporte de lactato através do seu receptor específico MCT, pois este pode ter sua expressão diminuída em CS infectadas e por esse motivo o lactato não ser enviado para o meio extracelular. Essa possibilidade foi aventada e um estudo preliminar foi realizado, com o objetivo de quantificar lactato nos lisados destas células infectadas, porém as absorbâncias encontradas foram similares ou inferiores as detectadas no “branco” experimental não sendo susceptíveis a quantificação.

Por outro lado observamos que esse efeito, seja pela redução da produção de lactato, seja pela redução de sua exportação, é um fenômeno comum a diversos tipos celulares, logo de maior impacto na patofisiologia da doença, devido ao fato do mesmo ter sido observado em soros de pacientes da forma lepromatosa, com alta carga bacilar (Fig. 5.17). Acreditamos que a modulação hepática seja responsável por essa diminuição sérica, pois resultados preliminares demonstraram diminuição de lactato também em sobrenadantes de hepatócitos humanos da linhagem HEPG2.

É importante ressaltar que muitos estudos demonstraram que as células da glia apresentam grande responsabilidade quanto ao suporte metabólico dos axônios, enviando metabólitos como lactato para os neurônios para seu suporte energético (Revisto por Saab et al, 2013). No sistema nervoso central a dependência deste transporte para a sobrevivência dos neurônios já foi bem caracterizado e células da glia, como os oligodendrócitos, são conhecidamente capazes de expressar os transportadores de lactato MCT1 e MCT4 (Youngjin, et al, 2012: Revisto por Saab et al., 2013). De forma a exemplificar, Youngjin e colaboradores demonstraram que a expressão de MCT1 no sistema nervoso central é exclusiva aos oligodendrócitos, co-localizando com proteínas de mielina, e o seu silenciamento gera morte neuronal. Porém outros trabalhos demonstram que o envio de lactato também pode ser realizado por astrócitos (Revisto por Baltan, 2014). A importância do transporte de lactato das células de Schwann para os axônios no sistema nervoso periférico ainda é pouco conhecida, porém alguns trabalhos como de Angus e colaboradores demonstraram a importância do envio deste metabólito em condições de baixa glicêmica em tecidos imunoprivilegiados como o nervo periférico. Uma vez que as camadas de tecido conjuntivo dos nervos periféricos apresentam uma disposição que atua como uma barreira para grandes complexos lipoprotéicos (Guth, 1956; Cajal, 1959; Lundborg, 1993), a glicose torna-se a principal fonte de carbono, energia e poder redutor. Tendo em mãos os presentes dados, podemos elucubrar que a diminuição da produção ou exportação de lactato nas células infectadas possa ocasionar conseqüente diminuição do suporte energético axonal, constituindo-se um possível novo mecanismo de lesão neural.

Em nossos resultados encontramos o potencial elétrico da membrana mitocondrial da célula infectada diminuído. Vamos agora discorrer sobre algumas hipóteses, a serem analisadas futuramente, sobre os possíveis mecanismos envolvidos nesta modulação. Esta diminuição foi observada apenas em células expostas ao *M. leprae* viável, o que nos direciona a análise aos mecanismos de virulência do bacilo envolvidos com seu metabolismo / mecanismos de escape. A primeira hipótese envolve o fator de virulência ESAT-6. A RD-1 é uma região do genoma micobacteriano responsável por codificar fatores intrínsecos à sua virulência. Esta região é responsável por codificar as proteínas CFP-10 (do inglês 10- KDa culture filtrate protein) e ESAT-6 (“6kDa early secreted antigenic”). A Cepa de BCG não apresenta essa região, não sendo capaz de atingir o citosol da célula hospedeira e por esse motivo é considerada não patogênica. Recentes estudos demonstraram que ESAT-6 é capaz de abrir poros nas membranas dos fagossomos contendo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo este um mecanismo utilizado pelo bacilo para evadir de ambientes hostis atingindo ambientes imunoprivilegiados como o citosol, característica já demonstrada também pelo *M. leprae*, e

sabidamente não realizada pelo mesmo quando inativado (Van der Wel et al., 2007). Infecções em células HeLa com *Lysteria monocitogenes* revelaram modulação e disfunção mitocondrial através da toxina formadora de poros listeriolisina O, de função homóloga à ESAT-6 do *M. leprae* (Stavru and Cossart, 2011). Acreditamos então que o bacilo, ao atingir o citosol e ativar os mecanismos de resposta imune inata sabidamente indutores de mitofagia como a parquina (Deretic et al., 2010), além de abrir poros na membrana interna mitocondrial através da ESAT-6, provocando dessa forma desacoplamento, queda do potencial de ação mitocondrial e posterior mitofagia, gerando por fim a redução nos níveis de expressão dos genes mitocondriais observados por Guerreiro e colaboradores (2013).

Pesquisadores brasileiros, em colaboração com membros do Pavilhão Hanseníase (IOC/Fiocruz), identificaram em 2004 SNPs (*single nucleotide polymorfisms*) no gene PARK2 que conferem susceptibilidade à hanseníase. O produto de PARK2, uma E3 ligase denominada parkina é eficaz no controle de qualidade mitocondrial levando-as na senescência às rotas de mitofagia (Deretic V, et al., 2010). Ademais, colaboradores do nosso grupo perceberam a indução da enzima Heme-oxigenase 1 (HO-1) em macrófagos infectados. Esta enzima é responsável pela degradação do grupo heme a biliverdina (Wise, et al, 1964), com consequente liberação de monóxido de carbono (CO), potente inibidor da resposta imune e da citocromo C oxidase (Alonso, et al., 2003). Acreditamos que este também seja um caminho para a modulação encontrada na mitocôndria, uma vez que resultados pilotos demonstraram uma diminuição da atividade desta enzima em células de Schwann infectadas (dados não mostrados).

A abundância de ácidos graxos nas células infectadas pelo *M. leprae* é conhecida a muitas décadas, sendo os macrófagos altamente infectados observados em lesões de pele classificados como espumosos. A contribuição de trabalhos anteriores do nosso grupo foi demonstrar que os lipídeos que ocupavam grande parte do citosol dessas células não são oriundos da parede rica em lipídio desta micobacéria ou captados do meio externo, e sim sintetizados *de novo*, após a subversão dos mecanismos celulares pelo patógeno (Mattos et al., 2010, 2014). Ácidos graxos são reconhecidos por ativarem proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs), e esse pode ser mais um dos mecanismos envolvidos na diminuição no potencial elétrico da membrana mitocondrial das CS infectadas (Jezek et al., 1994).

A infecção pelo *M. leprae* sabidamente induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF α (Nogueira et al., 1983; Godal, 1984; Yamamura et al., 1992; Moraes et al., 1999; Teles et al., 2002), que por sua vez induzem aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que contribuem para o controle de patógenos intracelulares. Por outro lado a inibição do complexo IV da cadeia respiratória pela geração de óxido nítrico

(Cleeter et al., 1994), não parece ser uma explicação para o fenômeno, uma vez que o *M. leprae* sabidamente não é um bom indutor desta espécie radicalar (Lobato et al., 2014). Somado a isso o BCG, sabidamente um bom indutor de óxido nítrico (Morcos et al., 2001), não foi capaz de gerar a redução do potencial de ação mitocondrial (Figura 5.9, barra vermelha).

Acompanhando o aumento da captação de glicose (Figura 5.2) encontramos um grande acréscimo na atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase nas células infectadas (Figura 5.4). Estes resultados geram a hipótese de um consequente aumento da via das pentose-fosfato produzindo equivalentes redutores na forma de NADPH para satisfazer as necessidades celulares de biossíntese de lipídeos e manutenção do estado redox da célula (Revisto por Kletzien, 1994). A G6PD *in vitro* mostrou-se ser regulada pela relação de NADPH / NADP, de modo que quando esta razão diminui, sua atividade aumenta para contrabalancear a concentração de NADPH (Holten, 1976). Desta forma, acreditamos que a célula está sendo submetida a grande consumo deste equivalente, devido à alta síntese de lipídeos, ou a pressão oxidante sobre o sistema glutationa, ou ambos. Além da glutathione redutase, outra enzima é dependente de NADPH para seu funcionamento: óxido nítrico sintase (iNOS). iNOS é dependente de NADPH para converter arginina em citrulina e óxido nítrico (NO^{*}) (Revisto por Stanton, 2013). Porém resultados do nosso grupo de pesquisa não detectaram níveis relevantes de NO em CS infectadas (Lobato et al., 2014).

As CS infectadas pelo *M. leprae* são induzidas à proliferação (Tapinos et al., 2006), sendo assim o produto final da via das pentoses, a ribulose-5-fosfato, um precursor de coenzimas e nucleotídeos, tornar-se um substrato fundamental. Além disso, trabalhos já demonstraram a relação da atividade de G6PD no crescimento de células normais ou neoplásicas, onde sua inibição impediu o crescimento e sua superexpressão o exacerbou (Kletzien, et al., 1994; Tian, et al., 1998). Dados na literatura indicaram que a G6PD pode ser ativada por vias de sinalizações envolvendo PI3K e AKT (revisto por Stanton, 2013), vias igualmente ativadas pelo estímulo de IGF-1, podendo dessa forma também ser atribuída à indução de IGF-1 nas células infectadas.

Em nossos ensaios a enzima ATP citrato liase (ACL) apresentou o dobro de atividade nas células infectadas quando comparadas aos controles (Figuras 5.17), indicando o provável aumento do transporte de citrato da mitocôndria para o citosol, sendo este utilizado para síntese de ácidos graxos ou colesterol. Outra evidência de que o citrato esteja sendo exportado para fora da mitocôndria é a ligeira diminuição encontrada na atividade da enzima PFK-1, afinal o citrato é capaz de inibir alostericamente esta enzima (Nelson e Cox, 2011), e por ser a PFK uma enzima essencialmente citosólica, este fato complementa a nossa hipótese de

acrécimo dos níveis de citrato no citosol. Diante da atividade de ACL atrelada ao aumento da atividade de G6PD e enzima málica, sabidas fontes de poder redutor na forma de NADPH, além de trabalhos de Mattos e colaboradores demonstrando a indução de acúmulos de lipídios na célula infectada pelo *M. leprae*, acreditamos que o carbono da glicose esteja sendo desviado para a síntese de lipídios. Dessa forma o bacilo poderia garantir sua fonte de carbono preferencial, além de aumentar a síntese de mediadores químicos para a indução de um perfil anti-inflamatório e permissivo ao seu crescimento em macrófagos, como a prostaglandina E2 (D'Avila et al., 2006; Almeida et al., 2009; Mattos et al. 2010; 2011b).

Em suma, podemos concluir que o *M. leprae* foi capaz de induzir o aumento da captação de glicose em células de Schwann da linhagem ST8814 e que este efeito foi acompanhado da diminuição dos níveis de lactato no meio extracelular, atividade da enzima lactato desidrogenase isoforma M e diminuição do potencial elétrico mitocondrial. Além disso, o bacilo também foi capaz de aumentar a atividade de enzimas que geram poder redutor na forma de NADPH, como G6PD e enzima málica. Por fim, *M. leprae* foi capaz de aumentar a atividade de ACL caracterizada como uma ligação direta entre o metabolismo de carboidratos e a síntese de lipídios.

Na figura 6.1 encontramos um modelo proposto por nosso grupo de interação e modulação metabólica do *M. leprae* com a célula de Schwann hospedeira, baseado nos resultados e hipóteses gerados no presente estudo.

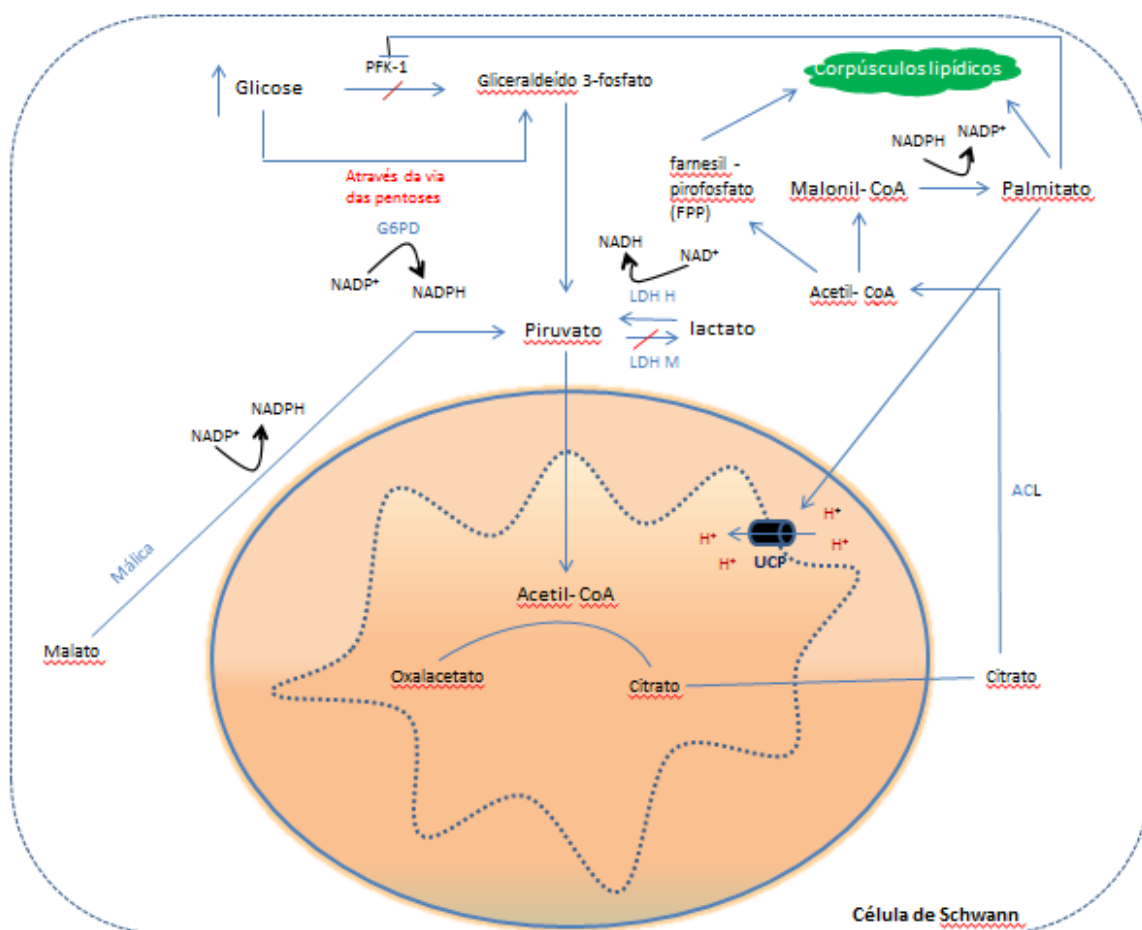


Figura 6.1: Modelo esquemático proposto das etapas envolvidas na infecção de células de Schwann pelo *M. leprae*, baseado nos resultados e hipóteses gerados no presente estudo. Após a sua internalização o *M. leprae* induz o aumento da captação de glicose e consequente aumento da atividade de G6PD e não de PFK-1. A glicose oxidada pela via das pentoses pode gerar gliceraldeído-3-fosfato que alimentará as vias glicolíticas com consequente formação de piruvato. Este pode ser convertido em acetil- CoA e posteriormente em citrato em reações do ciclo do ácido cítrico na matriz mitocondrial. Com o aumento da atividade de ACL, este, pode seguir o caminho de biossíntese de lipídica e ser utilizado na formação dos corpúsculos lipídicos. Enzima málica também apresentou aumento em sua atividade acarretando também em maior produção de NADPH. A ação de LDH-M encontrou-se diminuída. O incremento da produção ou exportação de lactato nas células infectadas possa ocasionar consequente diminuição do suporte energético axonal, constituindo-se um possível novo mecanismo de lesão neural. O excesso de ácidos graxos formados na biossíntese lipídica pode ativar UCPs e prover o desacoplamento mitocondrial encontrado em CS infectadas e dessa forma diminuir os níveis de ROS que poderiam atuar na morte de *M. leprae* no interior das CS.

É importante ressaltar que muitas rotas afirmadas neste modelo precisam ser avaliadas e confirmadas por outros estudos, sendo necessário a caracterização do fluxo global de metabolitos e a total determinação da regulação das enzimas envolvidas. Além disso, o NADPH, agente redutor produto da ação das enzimas G6PD e málica, além da biossíntese de

lipídios, pode ser utilizado na proteção da célula contra derivados de oxigênio altamente reativos. Este efeito não foi mostrado no modelo proposto.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados demonstrados neste estudo, podemos concluir que:

- O *M. leprae* foi capaz de induzir o aumento da captação de glicose na célula de Schwann da linhagem ST8814;
- A infecção foi capaz de diminuir os níveis de lactato no sobrenadante assim como a atividade da lactato desidrogenase isoforma M nas células infectadas. Além disso, esses dados *in vitro* foram corroborados com dados clínicos *in vivo*, uma vez que os níveis de lactato também estão diminuídos no soro de pacientes com a forma multibacilar da doença;
- O potencial elétrico mitocondrial foi drasticamente diminuído na célula infectada, e o mesmo não foi observado na célula exposta ao bacilo morto ou as diferentes micobactérias não patogênicas;
- *M. leprae* viável foi capaz de aumentar a atividade de enzimas envolvidas na formação de poder redutor na forma de NADPH como G6PD e málica. Além disso, resultados *in vivo* mostraram aumento da expressão de G6PD e GSR em lesões de pacientes multibacilares;
- *M. leprae* foi capaz de aumentar a atividade da enzima ATP citrato liase, caracterizada como uma ligação direta entre o metabolismo de carboidratos e a síntese de lipídios.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFIAS

Abbas A., Lichtman, A. H. Shiv, P. *Imunologia celular e molecular*. 6ª Edição. 2007

Abraham E, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit. Care Med*. 2007; 35:2408 - 16.

Almeida A., Moncada, S. , Bolanõs J.Salvador . Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway *nature cell biology* 2004; 6 :45-51

Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Töröcsik D, D'Avila H, Dezsö B, Magalhães KG, Castro-Faria-Neto HC, Nagy L, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor-expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism and pathogenesis. *J Immunol* 2009 ; 183: 1337-1345.

Alonso, F. Cardellach, S. López, J. Casademont and O. Miró. Carbon monoxide specifically inhibits cytochrome C oxidase of human mitochondrial respiratory chain. *Pharmacology and toxicology* 2003; 93; 142-146

Alves L, de Mendonça Lima L, da Silva Maeda E, Carvalho L, Holy J, Sarno EN, Pessolani MC, Barker LP. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238: 429-437.

Angus M. Brown, PhD, Richard D. Evans, PhD, Joel Black, PhD, and Bruce R. Ransom, MD, PhD. Schwann Cell Glycogen Selectively Supports Myelinated Axon Function. *Ann Neurol* 2012; 72:406–418

Antia NH, Shetty VP. The peripheral nerve in leprosy and other neuropathies. Pathology of nerve damage in leprosy. In Oxford University Press 1997; p.79-137

Armati, P.J. The biology of Schwann cells: development, differentiation and immunomodulation. Cambridge University Press. 2007 1: 6-9

Berger AK, Cortese GP, Amodeo KD, Weihofen A, Letai A, LaVoie MJ: Parkin selectively alters the intrinsic threshold for mitochondrial cytochrome c release. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(22) 4317–4328

Bloom B. Learning from leprosy: a perspective on immunology a the third world. *J Immunol* 1986; 131:1-10.

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet* 2004; 363: 1209-1219

Buchakjian A., Kornbluth S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010; 11(10):715-27

Cajal, S. R. Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, Hafner, p.469, 1959.

Cheng HL, Steinway M, Delaney CL, Franke TF, Feldman EL. IGF-1 promotes Schwann cell motility and survival via activation of Akt. *Mol Cell Endocrinol.* 2000; 170(1-2): 211-5

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence *Nature* 1998;393(6685):537-44.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409(6823):1007-11

Chen D, Gao F, Li B *et al.*: Parkin mono-ubiquitinates Bcl-2 and regulates autophagy. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(49), 38214–38223 .

Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994 May 23;345(1):50-4.

D'Avila H, Melo RCN, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of LBs: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol* 2006; 176: 3087-3097

Deltenre P, Louvet A, Lemoine M, Mourad A, Fartoux L, Moreno C, Henrion J, Mathurin P, Serfaty L. Impact of insulin resistance on sustained response in HCV patients treated with pegylated interferon and ribavirin: a meta-analysis. *J Hepatol* 2011; 55: 1187-1194.

Deretic V: Autophagy in infection. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010 22(2), 252–262

Ehrenberg B., Montana, V., Wuskell, J. P., Loew, L. M. Membrane Potential can be determined in individual cells from the Nernstian distribution of cationic dyes. Biophysical Society. May 1988; 785-794.

El-Bacha T1, Midlej V, Pereira da Silva AP, Silva da Costa L, Benchimol M, Galina A. Da Poian, A. Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. Biochim Biophys Acta. 2007 Oct;1772(10):1158-66. Epub 2007 Sep 15.

El-Bacha T, Menezes MMT, Azevedo e Silva MC, Sola-Penna M, Da Poian AT) Mayaro virus infection alters glucose metabolism in cultured cells through activation of the enzyme 6-phosphofructo 1-kinase. Mol Cell Biochem 2004; 266: 191–198.

Evans RD1, Brown AM, Ransom BR. Glycogen function in adult central and peripheral nerves. J Neurosci Res. 2013 Aug;91(8):1044-9.

Fernandes MP, Inada NM, Chiaratti MR, Araújo FF, Meirelles FV, Correia MT, Coelho LC, Alves MJ, Gadelha FR, Vercesi AE. Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin. J Bioenerg Biomembr. 2010 Feb;42(1):69-78.

Ferreira A. B. R. Estudos moleculares da interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann: uma abordagem de expressão gênica global. 2011. 162f. Tese (Doutorado) Biologia Computacional e de Sistemas. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.

Floryk D., Houustek J., Tetrametil Rhadamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. Biosci Rep. 1999 Feb;19 (1): 27-34

Rocca, F. J. & Ramakrishnan, L., TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species, *Cell*. 2013; 153: 521–534.

Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* 2008; 4:1000018.

Garbay, B., Heape, A. M.; Sargueil, F., Cassagne, C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology*.2000; v.61, p.267-304.

Garry RF, Bostick DA, Ulug ET Sindbis virus infection increases hexose transport in quiescent cells. *Virology* 1986; 155(2): 378–391.

Gray MA, Micklem KJ, Brown F, Pasternak CA Effects of vesicular stomatitis virus and semliki forest virus on the uptake of nutrients and intracellular cation concentration. *J Gen Virol* 1983; 64(Pt 7): 1449–1456.

Guerreiro LTA, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, et al. (2013) Gene Expression Profiling Specifies Chemokine, Mitochondrial and Lipid Metabolism Signatures in Leprosy. *PLoS ONE* 8(6): e64748.

Guth L. Regeneration in the mammalian peripheral nervous system. *Peripheral Nervous System Regeneration*, 1956; 36:441-478,

Hatzivassiliou, F. Zhao, D.E. Bauer, C. Andreadis, A.N. Shaw, D. Dhanak, S.R. Hingorani, D.A. Tuveson, C.B. Thompson, ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth, *Cancer Cell* 2005; 8: 311–321.

Holten D, Procsal D, Chang HL. Regulation of pentose phosphate pathway dehydrogenases by NADP⁺/NADPH ratios. *Biochem Biophys Res Commun.* 1976; 68:436–441.

Hunter SW & Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity, *Journal of bacteriology* 1981;147(3):728.

Jarzembowski, J. A. & Young, M. B. Nontuberculous mycobacterial Infections. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2008 132 (8): 1333-1341.

Jezek P, Orosz DE, Modriansky M, Garlid KD. Transport of anions and protons by the mitochondrial uncoupling protein and its regulation by nucleotides and fatty acids. A new look at old hypotheses. *J Biol Chem.* 1994 269:26184-90.

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

Jopling WH & McDougall AC. *Handbook of leprosy*. 2. ed. 1988.

Jopling WH. Reactions in leprosy. *Lepr Rev* 1970;(1):62-3.

Lee I., Huttemann, M., Energy crisis: The role of oxidative phosphorylation in acute inflammation and sepsis. 1842(9):1579-1586

Lobato LS, Rosa PS, Ferreira JD, Neumann AD, Silva MG, Nascimento DC, Soares CT, Pedrini SC, Oliveira DS, Monteiro CP, Pereira GM, Ribeiro-Alves M, Hacker MA, Moraes MO, Pessolani MC, Duarte RS, Lara FA Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 No prelo.

Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev* 1986; 57 (2): 199-202

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

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a “housekeeping” enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *Faseb J.* 1994; 8:174–181.

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

Lavana M, Katoch K, Katoch VM, Gupta AK, Chauhan DS, Sharma R, et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. *Infection Genetics and Evolution* 2008; 8(5):627-31.

Lundborg, G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *Journal of Hand Therapy*, 1993; 6:179-188.

Manolescu, A.R.; Witkowska, K.; Kinnaird, A.; Cessford, T.; Cheesemann, C. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology (Bethesda)* 2007; 22: 234-240,

Markert CL, Shaklee JB, Whitt GS. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 1975. 189: 102–114.

Marques MA, Neves-Ferreira AG, da Silveira EK, Valente RH, Chapeaurouge A, Perales J, da Silva BR, Dobos KM, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MC. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics* 2008; 8: 2477-2491.

Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN et al. 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* 2006; 44(9):3154.

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

Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(10):e1354

Matsuoka M, Izumi S, Budiawan T, Nakata N, Saeki K. Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. *Indian J Lepr* 1999;71:61–7.

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

Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RC, Manso PP, Sarno EN, Bozza PT, Pessolani MC. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol* 2011;13(2):259-73

Mattos KA, Oliveira VG, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol.* 2011; 1;187(5):2548-58.

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

Mcwhirter S. M.; Tenoever, B. R.; Maniatis, T. Connecting mitochondria and innate immunity. *Cell*, 2005 ; 122; 645–647.

Mendez, A. A., Angeles A. Fernandez E., Maestre C., Moncada S., Bolanos S. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1. 2009 Jun;11(6):747-52

Mira MT, Alcais A, Van Thuc N, Moraes MO, Di Flumeri C, Thai VH, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004; 427(6975):636-40.

Ministério da Saúde - Secretaria de vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico 2013; Volume 44 N° 11.

Mitchell P, Moyle J. Evidence discriminating between the chemical and the chemiosmotic mechanisms of electron transport phosphorylation. *Nature*, 1965; 208 (5016): 1205-6.

Mitchell P, Moyle J. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 1967; 213 (5072): 137

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol*. 1999 Nov;50(5):541-9.

Morcos E., Jansson OT, Adolfsson J, Ehrén I, Wiklund NP. *Bacillus Calmette-Guerin* induces long-term local formation of nitric oxide in the bladder via the induction of nitric oxide synthase activity in urothelial cells. *J Urol*. 2001 Feb;165:678-82.

Munger J, Bajad SU, Collier HA, Shenk T, Rabinowitz JD. Dynamics of the cellular metabolome during human cytomegalovirus infection. *PLoS Pathog* 2006; 2(12): e132.

Munger J, Bennett BD, Parikh A, Feng XJ, McArdle J, et al. Systemslevel metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat Biotechnol* 2008; 26(10): 1179–1186.

Munoz-Elias EJ, McKinney JD. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med.* 2005; 11:638–644.

Munoz-Elias EJ, McKinney JD. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 2006; 8:10–22.

Munoz-Elias EJ, Timm J, Botha T, Chan WT, Gomez JE, McKinney JD. Replication dynamics of Mycobacterium tuberculosis in chronically infected mice. *Infect Immun.* 2005; 73:546–551.

Munoz-Elias EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD. Role of the methylcitrate cycle in Mycobacterium tuberculosis metabolism, intracellular growth, and virulence. *Mol Microbiol.* 2006; 60:1109–1122.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science* 2005; 308 (5724) 1040-2.

Muona P, Sollberg S, Peltonen J, Uitto J. Glucose transporters of rat peripheral nerve. Differential expression of GLUT1 gene by Schwann cells and perineural cells in vivo and in vitro. *Diabetes.* 1992 Dec;41(12):1587-96

Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J. Neurosci* 1991; 11: 2433-2442

Mulukutla, B. C., Khan, S., Lange, A., Hu, W.S. Glucose metabolism in mammalian cell culture: new insights for tweaking vintage pathways. *Trends Biotechnol.* 2010 28(9):476-84.

Nelson, D. L., Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 5ª Edição. 2011

Olianas M. C., Dedoni S., Onali P. d-opioid receptor stimulation of glucose uptake. *British Journal of Pharmacology* 2011; 163: 624–637

Organização Mundial da Saúde. Global leprosy situation 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 87:317-28.

Osana Y, Sakakibara Y, Ishii N. Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. *Journal of bacteriology* 2009; 191(10):3321-7.

Paetkau,V.; Lardy H.A. Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 1967 ; 242 :2035-2042.

Palanisamy AP, Cheng G, Sutter AG, Evans ZP, Polito CC, Jin L, Liu J, Schmidt MG, Chavin KD. Mitochondrial uncoupling protein2 induces cell cycle arrest and necrotic cell death. *Metab Syndr Relat Disord.* 2014 Mar;12(2):132-42

Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Ruggiero, F. M. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage, *Gene*. 2002; 286 :135–141.

Ratledge C. The physiology of the mycobacteria. *Adv Microb Physiol*. 1976; 13:115–244.

Ratledge, C. Nutrition, growth and metabolism. In: Ratledge, C.; Stanford, J., editors. *The biology of the mycobacteria*. Academic Press, Ltd; London, United Kingdom: 1982. p. 186-212.

Rambukkana A1, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*. 2002 May 3;296(5569):927-31.

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

Reis FH, Pardo-Andreu GL, Nuñez-Figueredo Y, Cuesta-Rubio O, Marín-Prida J, Uyemura SA, Curti C, Alberici LC. Clusianone, a naturally occurring nemorosone regioisomer, uncouples rat liver mitochondria and induces HepG2 cell death. *Chem Biol Interact*. 2014 Apr 5;212:20-9

Ribeiro-Resende VT, Ribeiro-Guimarães ML, Lemes RM, Nascimento IC, Alves L, Mendez-Otero R, et al. Involvement of 9-O-Acetyl GD3 ganglioside in *Mycobacterium leprae* infection of Schwann cells. *J Biol Chem* 2010; 285(44):34086-96.

Ridley DS & Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr* 1966; 34.

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

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

Rudel T, Kepp O, Kozjak-Pavlovic V. Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:693-705

Rutkowski JL, Tennekoon GI, McGillicuddy JE. Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves. *Ann Neurol* 1992; 31: 580-586.

Ryan JJ, Klein KA, Neuberg TJ, Leftwich JA, westin EH, Kauma S, Fletcher JA, Devries GH, Huff ,TF. Role for the stem cell factor/kit complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J Neurosci Res* 1994; 37:415-432

.

Sampaio EP, Sarno EN, Galilly, R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomine selectively inhibits tumor necrosis factor- alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med.* 1991; 173: 699-703.

Sampaio EP, Moraes MO, Nery JAC, Santos AR, Matos HC, Sarno EN. Pentoxifylline decreases in vivo and in vivo tumour necrosis factor–alpha (TNFa) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin Exp Immunol* 1998; 111:300–8.

Scollard, D. M., Adams L.B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; 19: 338–381.

Seydel JK, Richter M, Wempew E.. Mechanism of action of the folate bocker diaminodiphenylsufone (dapsone, DDS) studied in *E. coli* cell-free enzyme extracts in comparison to sulfonamides (SA). *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1980; 48:18-29.

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

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

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

Shepard CC & McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1968; 36(1):78-82.

Shigehisa. Disruption of Charge Separation Followed by that of the Proton Gradient in the Mitochondrial Membrane by CCCP. *J. Biochem.*, 1974; 76: 213-216.

Silva da Costa L, Pereira da Silva AP, Da Poian AT, El-Bacha T Mitochondrial Bioenergetic Alterations in Mouse Neuroblastoma Cells Infected with Sindbis Virus: Implications to Viral Replication and Neuronal Death. PLoS ONE 2012; 7(4): e33871.

Singer, V. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure Landes Bioscience. 2014; 66–72.

Singh P & Cole ST. Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity. Future Microbiol 2011; 6(1):57-71.

Sola-penna M., Da silva, D. Coelho, W. S., Marinho- Carvalho, M. M., Zancan, P.Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. IUBMB Life 2010 62: 791-796.

Sola- Penna. Metabolic regulation by lactate. IUBMB Life, 60(9): 605–608, September 2008.

Sorbara L. R.,Maldarelli F., Chamoun G., Schilling, B., Chokekijcahi S., Staudt, et al. Human Immunodeficiency virus type 1 infection of H9 cells induced Increase Glucose Transporter Expression. Journal of virology, oct. 1996, p. 7275-7279.

Stanton RC, Seifter JL, Boxer DC, Zimmerman E, Cantley LC. Rapid release of bound glucose-6- phosphate dehydrogenase by growth factors. Correlation with increased enzymatic activity. J Biol Chem. 1991; 266:12442–12448.

Staton, R. C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. *IUBMB Life*. 2012 May ; 64(5): 362–369.

Stavru F, Bouillaud F, Sartori A, Ricquier D, Cossart P. *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:3612–7.

Tobin, D.M., Roca, F.J., Oh, S.F., McFarland, R., Vickery, T.W., Ray, J.P., Ko, D.C., Zou, Y., Bang, N.D., Chau, T.T., et al. (2012). Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell* 148, 434–446.

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk ½ via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 9188-9193.

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

Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res*. 2002 355-62.

Tian WN, Pignatere JN, Stanton RC. Signal transduction proteins that associate with the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor mediate the PDGF-induced release of glucose-6-phosphate dehydrogenase from permeabilized cells. *J Biol Chem*. 1994; 269:14798–14805.

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

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

Van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. M tuberculosis and M leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells Cell 2007(7):1287-98.

Vespasiani-Gentilucci U, Gallo P, De Vincentis A, Galati G, Picardi A. Hepatitis C virus and metabolic disorder interactions towards liver damage and atherosclerosis. World J Gastroenterol 2014; 20(11): 2825-2838.

Virchow R. Die krankhaften Geschwulste, August Hirschwald, Berlin, 1863; 208 pp.

Vissa, VD & Brennan, PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. Genome biology, 2001;2(8).

Wang, S. Li, L. Jiang, Y. Zhou, Z. Li, M. Shao, W. Li, Y. Liu, Deficiency in hepatic ATP-citrate lyase affects VLDL-triglyceride mobilization and liver fatty acid composition in mice, J. Lipid Res. 2010; 51: 2516–2526.

Weinstein EA, Yano T, Li LS, Avarbock D, Avarbock A, Helm D, McColm AA, Duncan K, Lonsdale JT, Rubin H. Inhibitors of type II NADH:menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:4548–4553.

Wheeler P. R. K., Athleenb U., Atledge C. Fatty acid oxidation and the P-oxidation complex in *Mycobacterium leprae* and two axenically cultivable mycobacteria that are pathogens

Wheeler PR. Biosynthetic pathways in *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol* 1989; 7: 21-24.

Wheeler PR. Leprosy - clues about the biochemistry of *Mycobacterium leprae* and its host-dependency from the genome. *World J Microbiol Biotechnol* 200319: 1-16.

Wise, C.D., and D>L. Drabkin, 1964. Degradation of haemoglobin and heminto biliverdin by a new cell-free system obtained from the hemophagous organ of dog placenta. *Fed. Proc.* 23:323.

Word Heath Organization. Laboratory Techniques for leprosy. 1987; p.62.

Word Heath Organization. Global leprosy: update on the 2012 situation. 2013 vol.88 35:365-38.

Wu, T., Lu, C. & Lai, H.,. Current Situations on Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *Journal of Biomedical Laboratory Sciences*, 2009 21 (1): 1-6.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*. 1991 11; 254:277-9.

Yoshioka K1, Takahashi H, Homma T, Saito M, Oh KB, Nemoto Y, Matsuoka H. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1996 9;1289 :5-9

Zou C1, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods*. 2005 Sep 30;64(3):207-15.