

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fabício da Mota Ramalho Costa

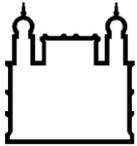
**Impacto funcional do fator de crescimento semelhante à insulina I
(IGF-I) na infecção de macrófagos pelo *Mycobacterium leprae***

Orientadores: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Dra. Luciana Silva Rodrigues

RIO DE JANEIRO

2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fabício da Mota Ramalho Costa

**Impacto funcional do fator de crescimento semelhante à insulina I
(IGF-I) na infecção de macrófagos pelo *Mycobacterium leprae***

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

Orientadores: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Dra. Luciana Silva Rodrigues

RIO DE JANEIRO

2016

Costa, Fabrício da Mota Ramalho.

Impacto funcional do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) na infecção de macrófagos pelo *Mycobacterium leprae* / Fabrício da Mota Ramalho Costa. - Rio de Janeiro, 2016.

100 f.; il.

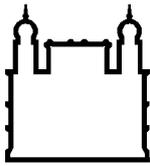
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Orientadora: Maria Cristina Vidal Pessolani.

Co-orientadora: Luciana Silva Rodrigues.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Hanseníase. 2. *Mycobacterium leprae*. 3. IGF-I. 4. Corpúsculos lipídicos. 5. Macrófagos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fabício da Mota Ramalho Costa

**Impacto funcional do fator de crescimento semelhante à insulina I
(IGF-I) na infecção de macrófagos pelo *Mycobacterium leprae***

Orientador: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Dra. Luciana Silva Rodrigues

Aprovado em: 27/04/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro / Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Prof. Dra. Katherine Antunes de Mattos / Biomanguinhos - Fiocruz

Prof. Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro/ Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

SUPLENTES:

Prof. Dra. Rosana Barreto Rocha Ferreira / Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira / Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Rio de Janeiro, Abril de 2016

“O êxito é fácil de obter. O difícil é merecê-lo”.
Albert Camus

À minha família que sempre me apoiou incondicionalmente em tudo na minha vida.

AGRADECIMENTOS:

Aos meus pais, Jorge Luiz da Costa Araújo e Rita de Cássia da Mota Ramalho Costa, pelo apoio incondicional e incentivo fundamental em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos Fábio (em memória) e Danillo, por todos os momentos que passamos juntos e pelo apoio de ambos não só durante a minha vida acadêmica, mas por toda a vida. Amo todos vocês!

À Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, primeiramente pelas oportunidades de iniciação científica, mestrado e de doutorado. Quero que saiba a grande influência sobre a minha vida, principalmente no campo profissional! Se hoje estou concluindo um mestrado, com aprovação para o doutorado, é pelo aprendizado adquirido pela convivência com a senhora. Muito obrigado mesmo!

Durante toda a nossa vida surgem grandes pessoas, e eu gostaria de destacar a Dra. Luciana Silva Rodrigues, que não veio apenas como uma pessoa, mas sim como um anjo! Quero agradecer toda a bagagem científica que ela me proporcionou através de grandes explicações, paciência infinita e, claro, dos puxões de orelha (que tenho certeza que foram para o meu bem!). Mas isso não é tudo, ela me ensinou algo muito mais valioso, que foi sonhar! Além de me mostrar um mundo maior do que eu conhecia e que se eu me esforçar eu posso conquistá-lo. Se hoje eu almejo grandes conquistas foi graças a você! Saiba que te vejo como uma mãezona (e sim, aceite ter adotado um filho de 20 e poucos anos...)!

Ao Dr. Leonardo Ribeiro. Cara, você não sabe quanta coisa eu aprendi com você! Haha... Ensinou-me tudo que sei sobre experimentos de bancada, além das discussões intelectuais que eu sempre me perdia no meio! Obrigado por tudo!

À Dra. Fernanda Kehdy, porque sua atenção e paciência durante todas as análises genéticas, mesmo eu sendo chato, ela foi uma fofa em tudo! Queria dizer que aprendi muito com você! Obrigado por tudo!

À minha “mãe adotiva”, Dra. Cristiana Macedo, por todo o apoio, incentivo e suporte chocolatício internacional! A todos os meus amigos de laboratório que fizeram

desses anos maravilhosos! Saibam que o nosso coleguismo foi um dos fatores para minha entrada no mestrado. Não citarei nomes pra não causar intrigas, porque vocês são demais, como diria um membro ilustre do nosso grupo: “adoram um assunto”! Mas saibam que por mim eu trabalharia eternamente com todos vocês, seus lindos!

Aos meus colegas de laboratório LAHAN, tanto da sala 5 quanto da 19, por todos os momentos que passamos juntos nesses alguns anos que estou no prédio, além de empréstimo de equipamentos e materiais.

À minhas professoras MSc. Maria Célia Ferreira e Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida, por toda a paciência, vocês sabem que sou enrolado! Quero explicitar o ganho intelectual obtido com vocês, cresci muito com a influência das duas. Sim, sintam-se culpadas por fazer despertar em mim essa curiosidade e amor pela ciência. Quero agradecer a todos os meus outros professores por tudo que eles fizeram por mim, sejam os ensinamentos, as chamadas de atenção, as dicas, enfim, por tudo.

Não posso esquecer o meu eterno grupo de trabalhos, sofrimentos e risadas, ou meus amiguinhos da BCM, são eles: Alan, Aline, Gabrielly, Nathalia e Paulinha (em ordem alfabética porque vocês são favelados e vão brigar entre si! Haha). Vocês foram as grandes descobertas da minha pós-graduação, sem vocês não teria a menor graça! Sentirei saudades da nossa diferente e única rotina de realizar trabalhos! Tomara que a ciência nos reserve muitos encontros e colaborações pela vida! Amo vocês!

Existem pessoas que são mais que especiais na nossa vida, não poderia jamais esquecer da Danielle Miranda, da Rachell Ramalho e do Djan Krystlonc, vocês foram essenciais nesse processo! Não nos afastaremos nunca nessa vida, nem na outra, nem na outra, nem na outra...

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

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:

μL	Microlitros
μM	Micromolar
a.C.	Antes de Cristo
ADRP	Adipofilina
Ag85B	Antígeno 85B
ATCC	do inglês “American type culture collection”
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	Borderline-Borderline
BCA	Kit para dosagem de proteínas
BL	Borderline-Lepromatoso
BT	Borderline-Tuberculóide
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLs	Corpúsculos lipídicos
cm^2	Centímetro quadrado
COPPE	Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia
CT	do inglês “Threshold cycle”
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	1,4 Ditiotretitol
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
FAS	Ácido graxo sintase
g	Gramas
HMGCoA reductase	3-hidroximetil glutaril coenzima A redutase
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF1R	Receptor de IGF do tipo 1
IGFBP	proteína ligadora de IGF

IL	Interleucina
IR	Receptor de Insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LL	Lepromatoso-Lepromatoso
LPS	Lipopolissacarídeo
M6P	Manose 6 fosfato
mA	Mili Ampére
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
Mb	Megabases
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
NLRP	Família NLR, proteínas contendo domínio pirina
Nm	Nanômetro
NOD	Domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORO	do inglês “Oil Red O”
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Tampão Salino Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGL-I	Glicolípido Fenólico I
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PMA	Acetato miristato de forbol
PQT	Poliquimioterapia
qRT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida de PCR em tempo real
RLEP	Elemento repetitivo do <i>M. leprae</i>
RI	Receptor de insulina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RNA _r	Ácido Ribonucleico Ribossomal

SFB	Soro Fetal Bovino
RNAi	RNA de interferência
SNP	Polimorfismo de Base única
SP	São Paulo
SREBP	proteína ligadora do elemento regulado por esteróis
SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Tampão de eluição
Th	Linfócitos T Auxiliares
TLR	receptor do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
U	Unidades
V	Volts

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1.1: Taxas da incidência mundial de Hanseníase reportadas pela OMS referente ao ano de 2013	19
Figura 1.2. Morfologia do <i>Mycobacterium leprae</i> e cultivo em pata de camundongo	21
Figura 1.3. Principais vias associadas a predisposição à hanseníase	23
Figura 1.4. Formas clínicas da Hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966)	26
Figura 1.5: Composição dos corpúsculos lipídicos	31
Figura 1.6: O sistema de fatores de crescimento semelhantes à Insulina	33
Figura 4.1: Modulação da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos pelo IGF-I	53
Figura 4.2: Avaliação da expressão de ADRP em monócitos primários humanos estimulados com IGF-I	55
Figura 4.3: Avaliação da expressão de HMGCoA Redutase e FAS em monócitos primários humanos tratados com IGF-I	57
Figura 4.4: Avaliação da expressão de ABCA1 e ABCG1 em monócitos primários humanos tratados com <i>M. leprae</i> ou IGF-I	58
Figura 4.5: Avaliação do acúmulo de colesterol intracelular em monócitos primários humanos tratados com IGF-I	59
Figura 4.6: Avaliação da capacidade do IGF-I em induzir a produção de PGE ₂ em monócitos	60
Figura 4.7: Modulação da expressão e secreção de IGF-I pelo <i>M. leprae</i> em macrófagos humanos derivados de monócitos (MDM)	61
Figura 4.8: Modulação da expressão e secreção de IGF-I pelo <i>M. leprae</i> em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 (MdTHP-1)	62
Figura 4.9: Modulação da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos pelo IGF-I por Oil Red O	63
Figura 4.10: Avaliação da expressão de ADRP em macrófagos humanos derivados de monócitos (MDM) estimulados com IGF-I	64
Figura 4.11 Avaliação da capacidade do IGF-I em induzir a produção de PGE ₂ em monócitos e macrófagos	65

Figura 4.12: Participação do IGF-I na formação de corpúsculos lipídicos pelo <i>M. leprae</i> em macrófagos humanos (MDMs)	66
Figura 4.13: Avaliação do silenciamento de IGF1R sobre a viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 (MdTHP)	68
Figura 4.14: Avaliação do silenciamento IGF1R sobre a expressão de catelicidina frente à infecção pelo <i>M. leprae</i> em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1	69
Figura 4.15: SNPs selecionados para o estudo de associação à hanseníase no gene IGF-I	71
Figura 4.16 – Mapa de desequilíbrio de ligação (LD) dos SNPs nas populações de Bambuí, Pelotas e Salvador	72

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Sequência dos iniciadores senso e antissenso utilizados na reação de PCR por sistema SYBR Green	44
Tabela 2: Frequência dos SNPs selecionados pela análise <i>in silico</i> .	70

SUMÁRIO:

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:	viii
LISTA DE FIGURAS:	xi
LISTA DE TABELAS:	xiii
RESUMO:	xvi
ABSTRACT:	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 A Hanseníase: Aspectos gerais	18
1.2 Os corpúsculos lipídicos e a Hanseníase:	31
1.3 O IGF-I e a hanseníase:	33
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3. METODOLOGIA	38
3.1 Mycobacterium leprae	38
3.2 Cultivo e manutenção da linhagem monocítica humana THP-1	39
3.3 Obtenção e cultivo de monócitos e macrófagos primários	39
3.4 Purificação de ácidos nucleicos:	40
3.4.1 Extração de RNA	40
3.4.2 Extração de DNA	41
3.4.3 Quantificação dos ácidos nucleicos	41
3.4.4 Análise da integridade do RNA	41
3.4.5 Tratamento do RNA com DNase	42
3.4.1 Síntese de cDNA	42
3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real:	43
3.5.1 RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR)	43
3.5.2 RT-PCR para análise da viabilidade do intracelular do <i>M. leprae</i>	44
3.6 Neutralização do receptor IGF1R	45
3.6.1 Neutralização com anticorpo neutralizante específico para o IGF1R	45
3.6.1 Silenciamento gênico do receptor de IGF-I (IGF1R) com RNAi	45
3.7 Quantificação dos níveis proteicos de IGF-I	46
3.8 Ensaio de avaliação e indução de corpúsculos lipídicos	46
3.8.1 Coloração com <i>Oil Red O</i>	46
3.8.2 Coloração com Tetróxido de Ósmio	47
3.9 Análise da expressão de proteínas por western blot	48
3.9.1 Quantificação de proteínas	48
3.9.2 Expressão proteica de ADRP por Western blot	48

3.10 Dosagem de Prostaglandina E ₂	49
3.11 Dosagem de Colesterol intracelular.....	49
3.12 Busca de SNPs no gene IGF-I.....	50
3.13 Análise dos dados	51
4. RESULTADOS	52
4.1 IGF-I induz a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos primários humanos.....	52
4.2 IGF-I é capaz de induzir a expressão de ADRP em monócitos primários humanos	54
4.3 Modulação da expressão de RNA mensageiro de enzimas-chave na biossíntese de colesterol e ácidos graxos pelo IGF-I.....	56
4.4 <i>M. leprae</i> modula positivamente a expressão de ABCA1 e ABCG1 em monócitos primários humanos	57
4.5 Efeito do IGF-I nos níveis de colesterol intracelular em monócitos primários humanos.....	58
4.6 Efeito do IGF-I sobre a produção de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂) por monócitos primários humanos	59
4.7 <i>M. leprae</i> induz o aumento de RNAm de IGF-I em macrófagos humanos.....	60
4.8 IGF-I induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos.....	62
4.9 Efeito do IGF-I na produção de Prostaglandina E ₂ (PGE ₂) por macrófagos humanos.....	64
4.10 Envolvimento do IGF-I na biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos pelo <i>M. leprae</i> em macrófagos primários humanos.....	65
4.11 Envolvimento do IGF-I na sobrevivência do <i>M. leprae</i> em macrófagos humanos	67
4.12 IGF-I induzido pelo <i>M. leprae</i> inibe a expressão de catelicidina em macrófagos humanos.....	68
4.13 Seleção de SNPs no gene IGF-I que possam estar associados à Hanseníase – análise <i>in silico</i>	69
5. Discussão	73
6. Conclusão	83
7. Perspectivas	84
8. Referências	85
9. Anexos	98
9.1 Aprovação do comitê de ética	98
10. Apêndices	99
10.1 Artigo: <i>Mycobacterium leprae</i> -induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages.....	99
10.2 Artigo: Neutrophil CD64 expression as a potential biomarker for Erythema Nodosum Leprosum	100

RESUMO:

Impacto funcional do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) na infecção de macrófagos pelo *Mycobacterium leprae*

Macrófagos e células Schwann infectados pelo *Mycobacterium leprae* e com aspecto espumoso são encontrados nas lesões de pele e nervo, respectivamente, de pacientes com hanseníase multibacilar. Recentemente foi mostrado que este aspecto espumoso se deve ao acúmulo de lipídeos na célula infectada, resultante da capacidade do *M. leprae* de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (CLs), tanto em monócitos quanto em células de Schwann, sendo este fenômeno importante para sua sobrevivência intracelular. No entanto, os mecanismos que levam ao acúmulo de lipídeos na célula infectada permanecem pouco esclarecidos. Estudos anteriores demonstraram a capacidade do *M. leprae* de induzir a expressão do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) tanto em macrófagos como em células de Schwann. O IGF-I é um hormônio que apresenta múltiplas ações biológicas, dentre elas a modulação do metabolismo lipídico e a regulação da resposta imune e inflamatória. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do IGF-I na biogênese de CLs induzidos pelo *M. leprae* e na sobrevivência bacteriana em macrófagos humanos. Para tal, monócitos e macrófagos derivados de monócitos primários humanos ou macrófagos derivados da linhagem THP-1 foram utilizados em diferentes protocolos, a saber: a) para investigar a capacidade do IGF-I em induzir CLs, após tratamento com o hormônio, as células foram coradas com Oil Red O e os corpúsculos quantificados por microscopia; também a expressão da proteína adipofilina (ADRP) e de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico foram avaliadas por RT-PCR quantitativo (qPCR); b) para analisar o papel do IGF-I na indução de CLs pelo *M. leprae* em macrófagos, as células foram infectadas na presença de anticorpo neutralizante específico para o receptor de IGF-I (IGF1R), seguida da marcação por Oil Red O e quantificação dos CLs por microscopia; e c) para avaliar a influência do IGF-I nos mecanismos microbicidas do macrófago e na sobrevivência intracelular do *M. leprae*, o IGF1R foi silenciado utilizando RNAi e tanto a expressão do peptídeo anti-microbiano catelicidina como a viabilidade do *M. leprae* foram avaliados por qPCR. Verificamos que o IGF-I *per se* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos tanto em monócitos como em macrófagos humanos. Também o IGF-I se mostrou capaz de regular positivamente os níveis de RNAm da ADRP e da enzima HMGCoA redutase (via de biossíntese de colesterol) em monócitos humanos. Em macrófagos, mas não em monócitos, a indução de CLs por IGF-I parece ser acompanhada da secreção de prostaglandina E₂ (PGE₂). O bloqueio da via do IGF-1R resultou numa redução na formação de CLs induzida por *M. leprae*, sugerindo que este hormônio tem um papel na biogênese de corpúsculos induzida pelo *M. leprae*. Finalmente, foi demonstrado que o IGF-I modula negativamente a expressão de catelicidina, produto da via microbicida dependente de vitamina D, favorecendo a sobrevivência do *M. leprae*. Em conjunto, nossos dados sugerem que o IGF-I contribui para a manutenção de um nicho favorável para a sobrevivência do *M. leprae* na célula hospedeira, participando do acúmulo de lipídeos e atenuando mecanismos microbicidas no macrófago infectado. Como parte final deste trabalho, tendo em vista o papel relevante do IGF-I na patogenia da hanseníase, através de uma análise genética identificamos 6 polimorfismos de base única (SNP) candidatos no gene do IGF-I que poderiam estar associados a uma maior ou menor susceptibilidade à hanseníase na população brasileira.

ABSTRACT:

Functional impact of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the infection of macrophages by *Mycobacterium leprae*

Foamy macrophages and Schwann cells containing high numbers of *Mycobacterium leprae* are found in skin and nerve lesions, respectively, of patients with multibacillary leprosy. It was recently demonstrated that the foamy aspect of infected cells is due to the accumulation of host cell lipids as a result of the capacity of *M. leprae* to induce the formation of lipid bodies (LBs), this event being important for bacterial intracellular survival. However, the mechanisms that lead to lipid accumulation were not fully elucidated. It was previously demonstrated that *M. leprae* is able to induce the expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in macrophages and Schwann cells. IGF-I is a hormone that has multiple biological actions, such as modulation of lipid metabolism and regulation of the immune and inflammatory responses. The main goal of this work was to evaluate the participation of IGF-I in the biogenesis of LBs induced by *M. leprae* in human macrophages and in bacterial survival. To accomplish this goal, human primary monocytes and monocyte-derived macrophages or macrophages derived from the THP-1 monocytic cell line were used in the following protocols: a) to investigate the capacity of IGF-I to induce LBs, after hormone treatment cells were stained with Oil Red O and LBs were quantified by microscopy; additionally, the expression levels of adipophilin (ADRP) and other genes involved in lipid metabolism were measured by quantitative RT-PCR (qPCR); b) to analyze whether IGF-I participates in the LB biogenesis induced by *M. leprae*, macrophages were infected in the presence of a neutralizing antibody specific to the IGF-I receptor (IGF1R) followed by Oil Red O staining; c) to evaluate the effect of IGF-I on the macrophage anti-bacterial mechanisms and *M. leprae* intracellular survival, IGF1R was silenced using RNAi and both the expression of the microbicidal peptide cathelicidin and *M. leprae* viability were assessed by qPCR. We found that IGF-I *per se* is able to induce LB formation in human monocytes and macrophages. IGF-I was also able to induce the expression of ADRP and HMGCoA reductase, in macrophages, but not in monocytes, LB induction seems to correlate with prostaglandin E₂ (PGE₂) production. Moreover, blocking IGF-1R signaling resulted in decreased levels of LB formation induced by *M. leprae* in macrophages, suggesting that this hormone plays a role in LB biogenesis during *M. leprae* infection. Finally, it was shown that IGF-I negatively modulates the expression of cathelicidin, a product of the vitamin D-microbicidal dependent pathway, favoring the survival of *M. leprae*. Altogether, our data suggest that IGF-I contributes to maintain a favorable niche for *M. leprae* survival inside the host cell, by inducing lipid accumulation and attenuation of microbicidal mechanisms in infected macrophages. Based on the potential relevance of IGF-I in leprosy pathogenesis, as a last step of this study, we performed an *in silico* genetic analysis, identifying six single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IGF-I gene as candidates that may be linked to leprosy susceptibility in the Brazilian population.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Hanseníase: Aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta preferencialmente a pele e os nervos periféricos, podendo levar a danos permanentes se não tratada (1).

Acredita-se que os primeiros registros da hanseníase ocorreram antes dos tempos bíblicos; escavações na Índia revelaram a presença da forma lepromatosa da hanseníase em esqueletos (cerca de 2000 a.C.). Outros relatos que descrevem os sintomas da doença ocorreram no Egito (1500 a.C.), no sul da Ásia (600 a.C.), na Grécia (400 a.C.), na China (300 a.C.) e na Itália (100 a.C) (citado por 2). A hanseníase era conhecida como “lepra”, sendo também, abordada na bíblia, que tratava a pessoa leprosa como pessoa suja que havia sido repreendida por Deus por ser desobediente (Velho testamento - Levítico 13:2-3). Com isso, a hanseníase foi estigmatizada como uma doença dos pecadores, e durante muitos anos os ditos “leprosos” foram excluídos da sociedade – medida esta tomada como prevenção da transmissão da doença. Em 1976, no Brasil, a terminologia “lepra” foi substituída por hanseníase em homenagem a Gerard Hansen por ter descrito o agente etiológico da doença, e a partir de 1995, com a lei federal 1.010/95, foi proibida a utilização do termo “lepra”.

Em 1981, a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu a poliquimioterapia (PQT), tratamento que consiste na administração de três drogas: a dapsona, a clofazimina e a rifampicina. A administração da PQT se mostrou extremamente eficaz reduzindo drasticamente a incidência da doença. Hoje, o tratamento da hanseníase é gratuito e fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Atualmente, a hanseníase é considerada uma doença negligenciada que ainda persiste como um problema de saúde pública. De acordo com a OMS, em 2013 foram diagnosticados 155.385 novos casos da doença no sudeste asiático, dado este que representa 72% dos novos casos da doença reportados no mundo. Logo em seguida, a região das Américas reportou 33.084 casos reportados de hanseníase à OMS, representando 15% dos novos casos detectados, sendo que destes, 31.044 foram diagnosticados no Brasil (figura 1.1 - OMS, 2014).

Detecção de novos casos de Hanseníase por 100 000 indivíduos, 2013.

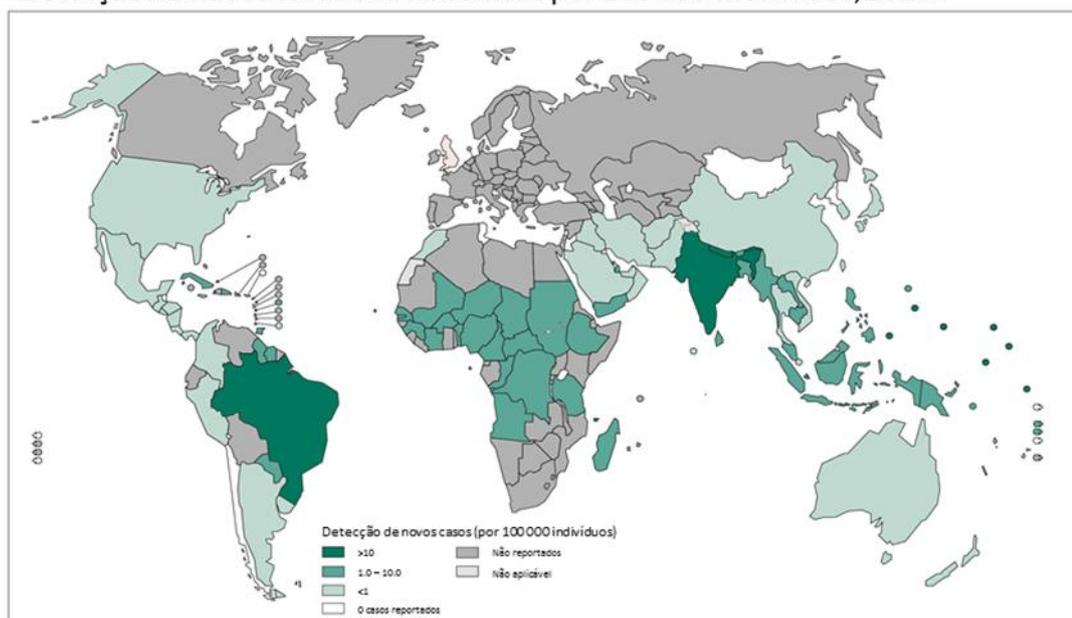


Figura 1.1: Taxas da incidência mundial de hanseníase reportadas pela OMS referente ao ano de 2013. Mapa que demonstra a detecção de novos casos de hanseníase pelo mundo reportados à OMS. As taxas de novos casos referem-se a cada 100.000 habitantes. Em tons de verde está a representação da detecção de novos casos, quanto mais escuro, maior o número de casos reportados em dado país. Adaptado de OMS, 2014.

Segundos dados do Ministério da Saúde, em 2014 foram diagnosticados 31.064 novos casos de hanseníase no Brasil, sendo 13.523 no nordeste, 6.113 no norte, 4.536 no centro-oeste, 4.510 no sudeste e 1.035 no sul do país (3).

1.1.1 O agente etiológico:

Em 1873, Gerhard Henrick Armauer Hansen (1841 – 1912), identificou o *Mycobacterium leprae* como agente etiológico da hanseníase. Taxonomicamente, esta bactéria pertence ao reino Monera, filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero Mycobacterium.

Primeiramente chamado de bacilo de Hansen, o *M. leprae* é um considerado um bacilo gram positivo – embora não se core bem pelo método de Gram, que possui uma leve curvatura, medindo de 1,5 a 8 micra de comprimento por cerca de 0,2 à 0,5 micra de largura (figura 1.2A), e a temperatura ótima para o crescimento desta micobactéria é abaixo de 37°C (revisto por 1). Assim como outras micobactérias, é um bacilo álcool-ácido resistente, pois se cora em vermelho pela fucsina, sendo resistente a descoloração

por solução álcool-ácida na técnica de coloração de Ziehl-Nilsen. Nas lesões dos pacientes, os bacilos podem ser encontrados isolados ou agrupados, formando globias (4).

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que apresenta tropismo por fagócitos mononucleares e células de Schwann dos nervos periféricos (revisto por 1). Outra característica deste bacilo é apresentar alta infectividade e baixa patogenicidade.

A parede celular do *M. leprae* é considerada um componente-chave na interação entre a micobactéria e suas células de predileção. Contém peptidoglicana e galactana ligadas a cadeias ramificadas de arabinana. Unidas a arabinana, são encontrados ácidos micólicos que formam um folheto interno. O folheto interno é rico em ácidos micólicos e ácidos micoserosólicos, como também de glicolípideos fenólicos, mais especificamente o PGL-I, o qual é um glicolípideo exclusivo do *M. leprae* (1).

O genoma do *M. leprae* possui características distintas das outras micobactérias, pois possui um baixo número de genes codificantes, os quais representam somente 49,5% do genoma. Possui um elevado número de pseudogenes, cerca de 27% de seu genoma, regiões não codificantes que compreendem 23,5%, além de sequências repetitivas. A comparação do genoma do *M. leprae* com o de outras micobactérias demonstra que esse patógeno passou por um processo de evolução reductiva, com uma possível perda de mais de 2.000 genes, onde determinados genes se tornam inativos, uma vez que certas funções não são mais necessárias em nichos altamente especializados (5).

Existem relatos da ocorrência de animais infectados pelo *M. leprae*, como o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*). Esses animais apresentam uma infecção disseminada com um caráter patológico semelhante ao dos indivíduos com Hanseníase (6). Durante anos o principal modelo experimental para cultivo “*in vivo*” desta micobactéria foi através de infecção nessa espécie de tatu. Bactérias viáveis também podem ser obtidas de biópsias de pacientes com a forma lepromatosa da doença.

Um grande empecilho para os estudos em hanseníase é a impossibilidade de cultivo “*in vitro*” desta micobactéria, possivelmente resultante de uma redução evolutiva de seu genoma micobacteriano, restringindo significativamente seus nichos de replicação. Shepard, em 1960, demonstrou que ao inocular pequenas quantidades do bacilo, provenientes de pacientes lepromatosos, em coxim plantar de camundongos BALB/c ocorre uma multiplicação deste bacilo, sendo que lenta, pois o *M. leprae* apresenta um tempo de geração de cerca de duas semanas, além de fatores limitantes

como a resposta imunológica do hospedeiro. Este modelo foi de extrema importância para estudos relacionados ao tratamento da hanseníase.

A supressão da resposta imune em camundongos por timectomia e irradiação resultou em um aumento da infecção e disseminação do bacilo. Nesses camundongos atímicos, a multiplicação do bacilo é mais eficaz, sendo este um dos modelos que permitem a realização de culturas com um grande número de bacilos altamente viáveis para o uso experimental (7–9). O modelo atual de obtenção de *M. leprae* viável é pela infecção de camundongos nus, que são camundongos que não possuem resposta imunológica adaptativa eficaz devido à falta de linfócitos T. Este modelo é baseado na infecção do *M. leprae* no coxim plantar (figura 1.2B) desses camundongos e ele representa a fonte mais rentável e eficaz de *M. leprae* viável para experimentação (1).

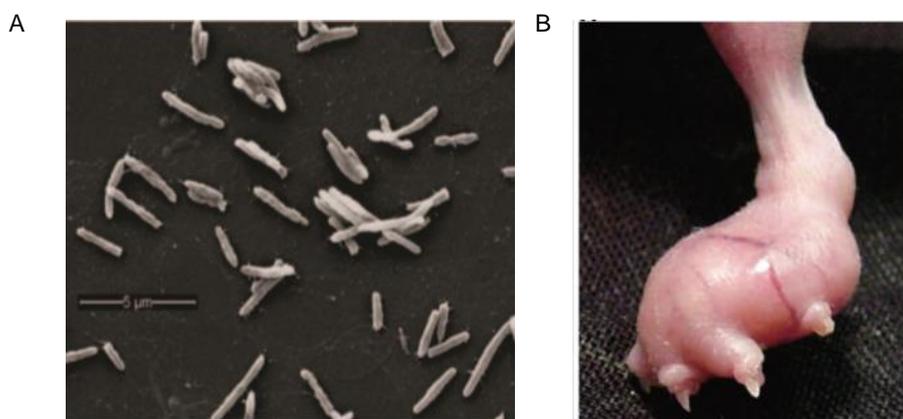


Figura 1.2. Morfologia do *M. leprae* e cultivo em pata de camundongo. A) Suspensão da micobactéria obtida de cultivo em pata de camundongo nude, microscopia eletrônica com aumento de 800x. **B)** Pata edemaciada de camundongo nude, seis meses após infecção com 5×10^7 de *M. leprae*. (1).

1.1.2 Transmissão e diagnóstico:

Acredita-se que a transmissão da hanseníase ocorra principalmente pelo contato direto com pessoas infectadas pelo *M. leprae*, sendo o trato respiratório superior a principal porta de entrada e saída desta micobactéria (10). Em 2013, Silva e colaboradores (11) demonstram que o *M. leprae* é capaz de invadir células do epitélio alveolar e nasal humanos “in vitro”, e ainda há persistência da infecção nessas células. Neste mesmo trabalho, os autores também demonstraram que a infecção intra-nasal em camundongos com esta micobactéria resultou na infecção de células epiteliais

pulmonares e macrófagos, reforçando a importância das vias aéreas para a infecção causada pelo *M. leprae*.

O diagnóstico da hanseníase é basicamente clínico, ou seja, através da análise da sintomatologia e sinais da doença. Os principais sintomas são as lesões cutâneas, espessamento dos nervos e perda de sensibilidade local. Existem, ainda, diferentes recursos laboratoriais que podem ser utilizados, como exames histopatológicos e baciloscópicos, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) que identificam anticorpos anti-PGL1, e mais recentemente, a detecção deste patógeno através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Este ensaio molecular consiste na amplificação de sequências específicas do DNA do *M. leprae*, utilizando diferentes genes alvos para detecção do patógeno como o RLEP, Ag85B e o 16S RNA ribossomal (12–14). Outra aplicação da PCR é avaliar a viabilidade do *M. leprae*, para isso, uma razão entre a expressão do gene ribossomal 16S e do DNA da micobactéria é realizada. Dessa maneira, quanto maior a proporção de cópias das moléculas de RNA de *M. leprae* implica em uma maior viabilidade da micobactéria (13).

1.1.3 Marcadores genéticos associados à hanseníase:

A influência genética acerca da predisposição à hanseníase começou a ser estudada na década de 60, e foram confirmadas em estudos observacionais de gêmeos, análise de agregação familiar e segregação complexa. Desde então, a busca de marcadores associados ao adoecimento em hanseníase vem, a cada dia, ganhando mais força. Com o passar dos anos alguns polimorfismos que poderiam afetar as respostas imunes inata e adaptativa já foram investigados e associados à predisposição a doença (15), conforme demonstrados na figura abaixo.

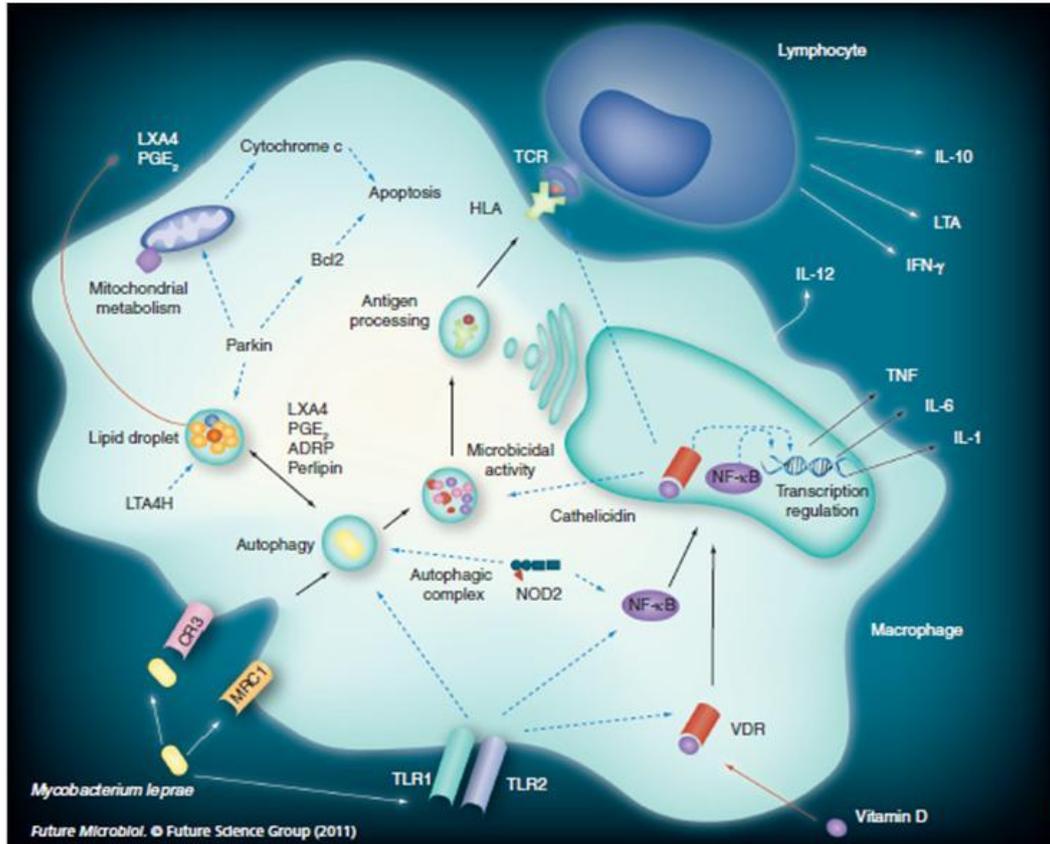


Figura 1.3. Principais vias associadas a predisposição à hanseníase. Modelo esquemático representativo das principais vias imunológicas em que já foi demonstrada uma associação genética associada ao a predisposição à hanseníase. Siglas: LXA4, Lipoxina A 4; PGE2, prostaglandina E2; ADRP, adipofilina; VDR, receptor de vitamina D; HLA, antígeno leucocitário humano; CR3, receptor de complemento 3; MRC1, receptor de manose; IL, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; TCR, receptor de célula T; TLR, receptores do tipo toll; IFN- γ , interferon gama (13).

Marcadores genéticos correspondem a regiões do DNA, podendo ter, ou não, localização conhecida no cromossomo, que através de mutações podem revelar polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados ou de uma mesma espécie (16). O genoma humano é bem complexo, contém cerca de 25.000 genes distintos e aproximadamente 3 bilhões de pares de base (17). Além disso, existem diversas sequências repetitivas que variam de pessoa para pessoa, e isto também ocorre em outros seres vivos.

Dentre os diferentes marcadores moleculares presente no DNA, polimorfismos de base única (do inglês “single nucleotide polymorphism - SNP) apresentam grande destaque. Estes caracterizam-se por uma mudança de apenas uma base em uma dada sequência e pode ocorrer tanto em regiões intrônicas como exônicas (18).

Diversos estudos relacionando polimorfismos à susceptibilidade ou resistência a diferentes doenças vem sendo realizados ao redor do mundo. Em hanseníase, os primeiros estudos genéticos buscaram investigar se SNPs no gene que codifica o Antígeno Leucocitário Humano (HLA) estariam associados à doença e foi identificado que o locus HLA/interferon (IFN), no cromossomo 6, estaria relacionado as diferentes formas clínicas encontradas na Hanseníase (19).

Com o passar dos anos, outros trabalhos demonstraram diversos outros polimorfismos que estariam associados à hanseníase de diferentes maneiras. Pereira e colaboradores (20) demonstraram que um SNP no gene que codifica a interleucina-10 (IL-10) poderia ser um marcador molecular associado à hanseníase. Os indivíduos que apresentam esse SNP produzem menos IL-10, levando a um processo inflamatório exacerbado que permite a evolução para a doença.

Também foi investigada a associação entre um SNP no gene IFN- γ e hanseníase, neste trabalho os autores demonstraram que a presença desse polimorfismo estaria associada à proteção à doença (20). Em seguida, este mesmo grupo evidenciou que um SNP no gene que codifica o fator de necrose tumoral (TNF) estaria associado à proteção a doença, visto que os indivíduos que apresentam esse SNPs possuem uma maior produção de TNF e consequente proteção à hanseníase (21).

Recentemente, foi demonstrado que um polimorfismo no gene NLRP1 estaria associado à hanseníase, sendo que nesse trabalho os autores observaram que esse SNPs estava mais evidenciado em pacientes com as formas paucibacilares da doença, em comparação aos multibacilares (22). Utilizando um chip com sondas para diversos polimorfismos, Zhang e colaboradores (2009) realizaram uma grande busca de polimorfismos que poderiam estar associados à hanseníase com esta abordagem de amplo espectro, e identificaram um polimorfismo no gene NOD2 que apresentou uma forte associação em pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase quando comparado aos pacientes com a forma tuberculóide (23). Posteriormente, foi demonstrado que este polimorfismo estaria associado ao adoecimento em hanseníase (24).

A busca de genes alvos relacionados à hanseníase está apenas começando, visto que inúmeros polimorfismos podem estar, em associação, regulando um perfil mais protetor ou de susceptibilidade a doenças. Dado isso, investigar SNPs em hanseníase poderia auxiliar a esclarecer mais esse complexo painel associado a essa doença.

1.1.4 Classificação, aspectos clínicos e imunológicos:

Em 1960, os patologistas Ridley e Jopling (25) propuseram uma classificação da doença baseada nos aspectos clínico-evolutivos, baciloscópicos, imunológicos e histológicos. Segundo esta classificação, a qual é adotada até os dias atuais, a hanseníase apresenta-se como um amplo espectro de formas clínicas, onde em uma extremidade deste espectro encontra-se a forma clínica Lepromatosa-Lepromatosa (LL), caracterizada por indivíduos com uma alta carga bacilar associada a uma baixa produção de IFN- γ em resposta a antígenos do *M. leprae*. No outro extremo, encontra-se a forma Tuberculóide-Tuberculóide (TT), onde os pacientes apresentam uma baixa carga bacilar associada a uma alta produção de IFN- γ antígeno-específica. Entre os polos existem os grupos intermediários denominados “borderline”. São eles, BL (Borderline-Lepromatoso), BB (Borderline-Borderline) e o BT (Borderline-Tuberculóide), onde a resposta imune celular é maior conforme a proximidade do polo Tuberculóide e menor quanto mais próximo do polo Lepromatoso (figura 1.4). Uma classificação simplificada estabelecida pela OMS (1997), para fins de escolha do regime terapêutico a ser empregada no doente, divide a hanseníase em multibacilar e paucibacilar. As formas clínicas multibacilares compreendem LL, BL e BB e as formas paucibacilares TT e BT.

Entre os polos extremos da doença (TT e LL), observa-se uma grande diferença na organização e composição celular na lesão de pele desses pacientes. A partir da análise histológica de fragmentos de pele de um paciente com a forma clínica TT observa-se uma inflamação granulomatosa bem desenvolvida com raros bacilos no tecido lesado. Já uma característica marcante na lesão do paciente LL é a presença de macrófagos de aspecto espumoso devido ao acúmulo de lipídeos, denominados células de Virchow (26).

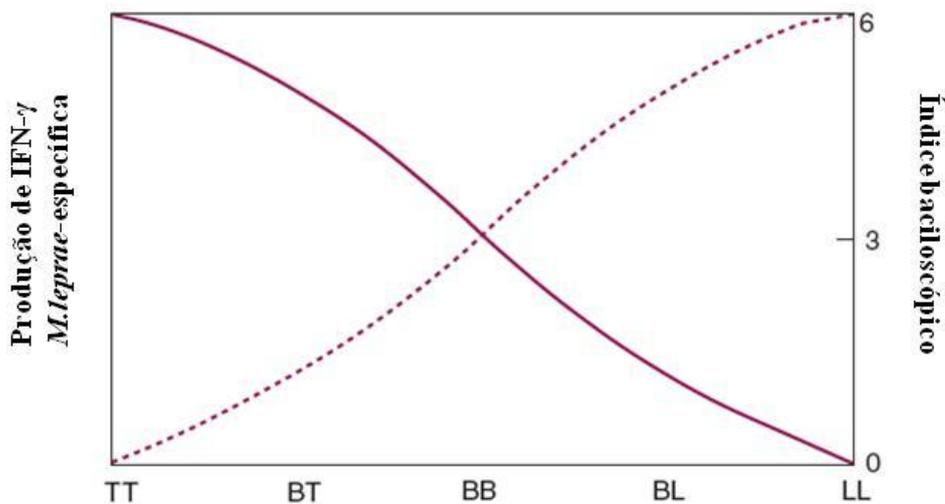


Figura 1.4. Formas clínicas da Hanseníase de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1966). A linha tracejada indica o índice baciloscópico que, como pode ser observado, é elevado em pacientes do polo LL e próximo à zero no pacientes do polo tuberculóide. Já a linha preenchida indica a produção de IFN- γ *M. leprae*-específica, que é elevada no polo TT e reduzida no polo LL. Abreviações: TT (Tuberculóide-Tuberculóide), BT (Borderline-Tuberculóide), BB (Borderline-Borderline), BL (Borderline Lepromatoso), LL (Lepromatoso-Lepromatoso) (20).

1.1.4.1 Resposta imune adaptativa na hanseníase

O IFN- γ é uma citocina que apresenta um papel chave no controle de patógenos intracelulares. Esta citocina é originalmente conhecida com um fator ativador de macrófagos e é amplamente produzida pelos linfócitos Th1. A ativação da resposta imune inata pelo IFN- γ induz uma diretamente uma resposta microbicida, assim como o ele regula positivamente o processamento e apresentação de antígenos. O IFN- γ também orchestra a atração e maturação de diferentes tipos celulares como monócitos, células natural killers e, ainda, é capaz de regular funcionalmente os linfócitos B (28).

Após exposição ao IFN- γ ocorre uma queda na população de linfócitos com perfil Th2 e aumento de macrófagos classicamente ativados, que por sua vez possuem uma alta capacidade microbicida, grande parte devido à ativação da via de vitamina D e consequente produção de catelicidina (28).

Em um estudo realizado com pacientes portadores de hanseníase, os autores avaliaram a produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com as formas multibacilares e paucibacilares frente ao estímulo com antígenos do *M. leprae*. Neste estudo, foi demonstrado que após estimulação com

antígenos específicos da micobactéria houve uma falha na produção de IFN- γ pelo PBMC de pacientes multibacilares, mostrando que nesses indivíduos a exposição ao *M. leprae* resulta nessa deficiência na produção de IFN- γ (29).

As diferenças entre a forma lepromatosa e tuberculóide em resposta ao *M. leprae* também podem ser observadas através dos padrões de citocinas produzidas por esses pacientes. Yamamura e colaboradores (30) utilizaram o paradigma de linfócitos T auxiliares Th1 e Th2 para explicar os diferentes perfis de resposta. Através da análise de expressão gênica de citocinas a partir de RNA mensageiro extraído de lesões de pele pacientes, os autores observaram que a expressão de IL-2, linfotóxina alfa e IFN- γ é aumentada em lesões de pacientes tuberculóides e a expressão de IL-4, IL-5 e IL-10 é predominante nas lesões de pacientes lepromatosos.

Reforçando esse dado, Sieling e Modlin (31) verificaram que clones de linfócitos T CD4 isolados de lesão de pele de pacientes do polo TT secretam preferencialmente IFN- γ , enquanto os clones isolados de lesão de pele de pacientes do polo LL produzem predominantemente IL-4. Misra e colaboradores também demonstraram, através da análise da expressão gênica e produção de citocinas por células mononucleares de sangue periférico (PBMC), que pacientes tuberculóides apresentam um padrão de resposta do tipo Th1, enquanto as células obtidas dos pacientes lepromatosos apresentam um padrão de resposta do tipo Th2 (32) Muitos pacientes possuem, contudo, um perfil de resposta misto, com produção de IFN- γ , IL-2 e IL-4, quebrando, assim, o paradigma Th1/Th2 que prevaleceu durante décadas em relação à hanseníase (1).

Com o passar dos anos, novas subpopulações de células T vem sendo descobertas e seu papel na hanseníase tem sido estudado. Por exemplo, as células Th17 foram reconhecidas por uma alta produção de IL-17 e envolvimento em processos inflamatórios como a psoríase, artrite reumatoide e esclerose múltipla (33). Um estudo recente observou uma menor expressão de RNAm para IL-17 tanto em lesão de pele, quanto em PBMCs de pacientes com a forma lepromatosa da doença, quando comparados aos pacientes com a forma tuberculóide e indivíduos saudáveis, cogitando a possibilidade de utilizar essa redução na expressão de IL-17 como um marcador dos diferentes polos da hanseníase (34).

Outra subpopulação de linfócitos investigada na hanseníase foi a de células T reguladoras (Tregs), células T reconhecidas por seu papel em suprimir a resposta imunológica e manter a homeostasia local. Foi observada a presença de clones de linfócitos T que expressavam Foxp3, um marcador característico deste fenótipo celular,

em pacientes com as formas multibacilares da hanseníase. Neste mesmo trabalho foi encontrada uma alta expressão de TGF- β , citocina esta que estaria atuando não somente para uma supressão da resposta inflamatória, como também, poderia estar associado ao aumento de células Tregs nestes pacientes (35). Posteriormente, foi descrita a capacidade dessas células Treg em produzir TGF- β , que juntamente com a alta produção de IL-10 por essas mesmas células, estariam suprimindo a resposta inflamatória (36). Finalmente, a função reguladora dessas células foi demonstrada, através da depleção desta população, e consequente recuperação da resposta imune efetora em humanos (37).

1.1.4.2 Resposta imune inata

Os macrófagos estão entre as células que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos, compondo o sistema imune inato do hospedeiro. Contudo, paradoxalmente, os macrófagos são as células preferencialmente infectadas pelo *M. leprae*, tornando-se nichos adequados para sua sobrevivência e multiplicação no ser humano. Juntamente com os monócitos do sangue e células dendríticas, os macrófagos constituem o sistema de fagócitos monucleares, cuja função principal é a fagocitose, apresentação de antígenos e a produção de um conjunto de sinais necessários para a geração da resposta imune adaptativa. Primeiramente descritos por Metchnikof no final do século 19, os macrófagos são células multifuncionais que estão presentes na maioria dos tecidos dos animais vertebrados (34). Durante o processo inflamatório, os monócitos, que tem sua origem na medula óssea a partir de células progenitoras hematopoiéticas, sofrem diapedese e migram do sangue para o sítio de inflamação onde se diferenciam em macrófagos e células dendríticas convencionais. Contudo, em condições de homeostasia, macrófagos residentes são encontrados na maioria dos tecidos e o fato destas células constituírem uma população independente, não derivada de monócitos e capaz de se perpetuar no tecido, foi recentemente demonstrada (39).

Os macrófagos são células que apresentam papel chave nas respostas imune inata e adaptativa e são mediadores cruciais na resposta inflamatória (revisito por 35). Eles podem ser ativados por diversos estímulos, podendo então assumir diferentes características morfológicas e funcionais (41). A ativação clássica de macrófagos, em geral, é mediada por estímulos como lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral- α (TNF), Interferon- γ (IFN- γ) e do fator de crescimento de colônias de

granulócitos e macrófagos (GM-CSF), correspondendo aos macrófagos denominados M1. Esses macrófagos são capazes de secretar uma gama de mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, e IL-23. Já a ativação alternativa, geralmente mediada por citocinas como IL-4 e IL-13 polarizando, então, macrófagos para um perfil M2. Este último apresenta um perfil menos efetor e com ações imunomoduladoras. Os macrófagos M2 são caracterizados pela produção de diversas citocinas e mediadores de caráter anti-inflamatório e imunomodulador, tais como a IL-8, IL-10, IL-5, PGE₂, MCP-1, MIP-1 β , RANTES e IGF-I. Vale ressaltar que os macrófagos M2 são considerados uma população altamente heterogênea, podendo assumir diferentes perfis de ativação sendo então classificados como M2a, M2b, dentre outros (36, 37).

Durante a resposta imune inata, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos por uma gama de receptores presentes nas células do sistema imune inato. Os receptores do tipo “Toll” são descritos como importantes na ativação e diferenciação de monócitos para macrófagos, promovendo a atividade microbicida dessas células, sendo o heterodímero TLR1-TLR2 e o homodímero TLR2 responsáveis pelo reconhecimento de antígenos micobacterianos (43,44). Vem sendo caracterizado um possível envolvimento entre os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), TLR e os receptores do tipo NOD2, no reconhecimento do *M. leprae* através de estudos de susceptibilidade genética à hanseníase. A sinalização via NOD está relacionada a uma regulação negativa na produção de fatores antimicrobianos, e que agindo sinergicamente com os TLRs estaria favorecendo a infecção pelo *M. leprae* (15). O primeiro contato do *M. leprae* com os macrófagos envolve PRRs, e a fagocitose do bacilo ocorre devido aos receptores de complemento, como CR1, CR3 e CR4, e do receptor de manose (45).

Nas lesões tuberculóides, os macrófagos apresentam fenótipo predominante microbicida (M1). Este perfil de ativação de macrófagos é capaz de produzir IL-12, citocina esta que vai favorecer a diferenciação de linfócitos com o perfil Th1, que por sua vez produzem IFN- γ . Esse IFN- γ pode atuar ativando a via da vitamina D-catelidina, via esta importante para a atividade microbicida destes macrófagos frente a micobactérias (46)

Uma característica do sítio inflamatório do paciente LL é a presença de alta expressão de IL-10 na lesão, citocina esta que poderia estar atuando na modulação de

macrófagos para o perfil M2, ou seja, tornando esse macrófago mais permissivo à infecção pelo *M. leprae* (30). Além disso, O *M. leprae* é capaz de modular a expressão de indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), que é capaz de ativar macrófagos alternativamente, sendo corroborado a um segundo trabalho em que foi encontrada uma maior expressão desta molécula em macrófagos de pacientes do polo LL da doença, contribuindo para a imunossupressão característica destes pacientes (47). Ainda para manter um ambiente mais favorável, o *M. leprae* é capaz de induzir um aumento da expressão de CD163, um receptor tipo “scavenger”, favorecendo a entrada desta micobactéria na sua célula hospedeira (48).

Estudos recentes vêm avaliando a participação do Interferon do tipo 1, ou Interferon- β , na infecção pelo *M. leprae*. Teles e colaboradores (49) demonstram que o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão de IFN- β , IL-27 e IL-10 em monócitos humanos, prevenindo assim, a resposta microbicida mediada celular por IFN- γ . Ainda neste contexto, Silva e colaboradores (50) observaram que o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão e produção do fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), que possui papel antiinflamatório, em macrófagos murinos. Ainda neste estudo, foi demonstrado que o pré-tratamento desses macrófagos com anticorpo neutralizante para o receptor majoritário do IGF-I (IGF1R) foi capaz de reestabelecer a atividade microbicida dessas células.

Outra característica da lesão de pele de pacientes do polo LL é a presença de células de Virchow, assim denominadas em homenagem ao patologista Rudolf Virchow, que são macrófagos ditos espumosos, pois possuem um acúmulo de lipídeos e são altamente infectados pelo *M. leprae* (26). Mais tarde verificou-se a capacidade desta micobactéria em replicar-se dentro de fagossomos ricos em lipídeos (51). Com o passar dos anos diversos estudos acerca da origem desses lipídeos foram realizados evidenciando-se que grande parte desses lipídeos provém de síntese *de novo* da própria célula hospedeira estocados na forma de corpúsculos lipídicos (CLs) e que a presença destas organelas estaria associada a macrófagos com menor atividade microbicida (52–54). De fato, em monócitos estimulados com *M. leprae* foi verificada uma correlação entre a presença de CLs e a produção de Prostaglandina-E₂ (PGE₂), mediador lipídico que contribui para o fenótipo permissivo observado em macrófagos infectados *in vivo* com o bacilo (55).

1.2 Os corpúsculos lipídicos e a Hanseníase:

Os CLs são organelas ricas em lipídeos, encontradas tanto em células procarióticas como eucarióticas. São organelas esféricas de 50µm a 200µm limitadas por uma monocamada de fosfolipídeos e em seu interior são encontrados diversos lipídeos neutros, como o triacilglicerol, diacilglicerol ou ésteres de colesterol. Acreditava-se que os CLs eram organelas apenas para estocagem e tráfego de lipídeos em células animais e/ou vegetais. Já em procariotos, acreditava-se que a indução de CLs era devido a uma resposta a um estresse ambiental. Hoje em dia são consideradas organelas dinâmicas e funcionalmente ativas que participam de diversos processos biológicos, tais como metabolismo de lipídios, sinalização e ativação celular, tráfego de membrana, síntese e secreção de mediadores inflamatórios, dentre outros (50).

Essas organelas apresentam um conteúdo proteico diverso, que incluem proteínas da família PAT, que compreende a perilipina, a adipofilina (ADRP) e a TIP47 (figura 1.5) (57,58).

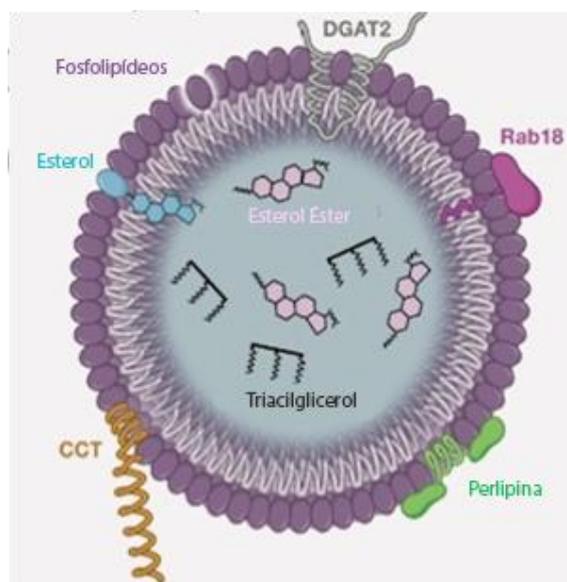


Figura 1.5: Composição dos corpúsculos lipídicos: Esquema representativo dos componentes estruturais e lipídeos internos dos corpúsculos lipídicos. Estão representados por siglas a diacilglicerol aciltransferase (DGAT2) e a fosfolipina citidiltransferase (CCT) (56).

Dados da literatura indicam que os CLs podem estar favorecendo a infecção por *Trypanosoma cruzi* em camundongos, no qual este patógeno induz a formação de CLs em macrófagos peritoneais (60). Também já foi verificado que o bacilo Calmette-Guerrin (BCG) é capaz e induzir a formação destas organelas em macrófagos, e ainda neste trabalho, foi demonstrado que essa indução era dependente de TLR2 (61).

Estudos em hanseníase demonstraram que o aspecto espumoso de macrófagos e células de Schwann infectadas com *M. leprae* encontrados em lesões de pacientes LL deriva do acúmulo de CLs nestas células (54,62). Nestes trabalhos foi demonstrada a capacidade *in vitro* do *M. leprae* em induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos via o heterodímero TLR2/TLR6 e em células de Schwann via TLR6. Ainda nestes estudos, foi verificada uma correlação entre a presença de CLs e a produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂). Além disso, os autores também evidenciaram que os CLs são recrutados para o fagossoma que contém a bactéria, sendo que a inibição desde recrutamento resulta na morte do *M. leprae*.

Dentre os lipídeos acumulados na célula infectada, colesterol e éster de colesterol foram identificados. Mattos e colaboradores (63) verificaram que o *M. leprae* também foi capaz de induzir acúmulo de colesterol intracelular através da modulação positiva de receptores de captação de colesterol extracelular e da síntese *de novo* do mesmo. Além disso, os autores demonstraram que ao reduzir as concentrações de colesterol intracelular com uso de estatina, que possui como ação inibir a atividade da hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase (HMGC_oA redutase), havia, em consequência, uma redução na viabilidade da micobactéria. Corroborando estes dados, Lobato e colaboradores (64) demonstraram que as estatinas são capazes de aumentar a atividade microbicida da rifampicina, antibiótico utilizado na rotina do tratamento de hanseníase, sugerindo assim que o aumento dos níveis de colesterol intracelular possui um caráter anti-inflamatório protegendo a bactéria, não somente do sistema imunológico, como de antibióticos.

Existem diferentes os mecanismos relacionados a regulação dos níveis de colesterol intracelular, entre eles, existe a síntese de novo, a captação de colesterol extracelular ou então pelo efluxo de colesterol intracelular, que em geral é realizado pelos transportadores do tipo ABCA1 e ABCG1(65).

Sabe-se atualmente que diferentes estímulos são capazes de induzir a formação de CLs como o lipopolissacarídeo (LPS), a lipoproteína de baixa densidade (LDL), assim como infecções parasitárias e bacterianas (66,67). Recentemente, vêm sido

demonstrada a capacidade de fatores de crescimento celular na indução da formação destas organelas (68). Dentre os diferentes hormônios capazes de modular os níveis de colesterol e CLs dentro da célula, o IGF-I se apresenta como um potente candidato, visto que ele é capaz de induzir um aumento na expressão gênica de diversas enzimas importantes para a biossíntese de colesterol, como a HMGCoA redutase, e da síntese de ácidos graxos, como a ácido graxo sintase (FAS) (69).

1.3 O IGF-I e a hanseníase:

O IGF-I compõe uma família complexa conhecida como “o sistema IGF”. Este compreende diversos peptídeos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e metabolismo dos mamíferos, além de atuar em processos metabólicos celulares como a proliferação, diferenciação, sobrevivência e migração celular (70).

Esta família compreende três peptídeos ligantes (IGF-I, IGF-II e a Insulina), receptores de superfície como o receptor de IGF do tipo 1 (IGF-1R), o receptor de manose 6 fosfato/IGF-IIR (M6P/IGF-IIR), o receptor híbrido (IGF-1R/IR), e o receptor de insulina (RI), além de seis proteínas ligantes de alta afinidade (IGFBP-1 à 6) e suas proteases (70,71). O esquema representado na figura 1.6 ilustra os componentes desta família.

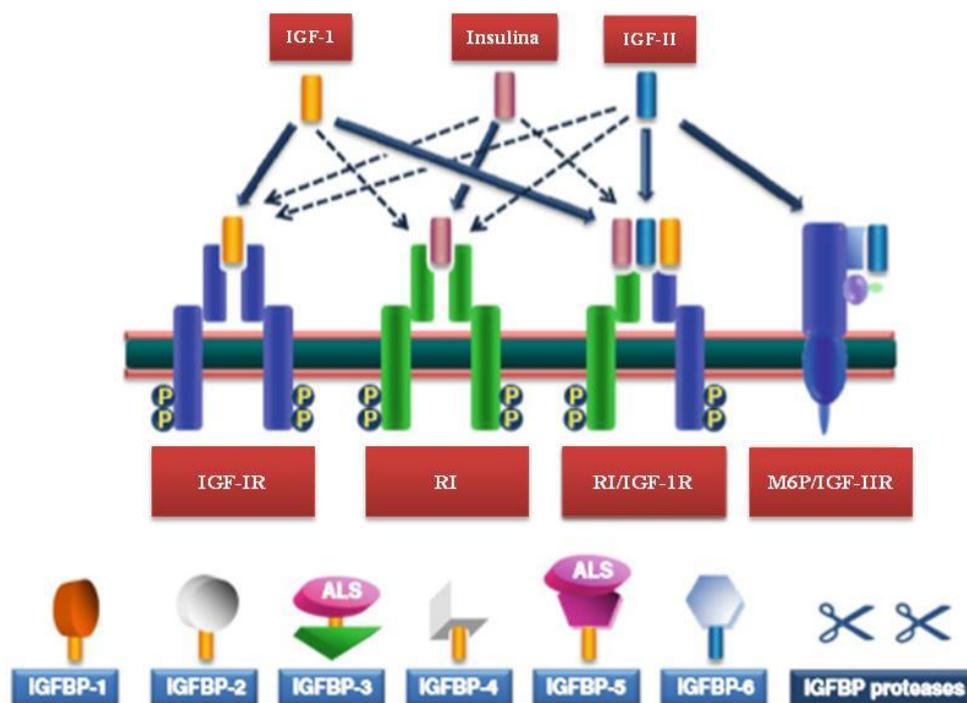


Figura 1.6: O sistema de fatores de crescimento semelhantes à Insulina. Esquema representativo dos componentes dessa família. Em pontilhado ligações de menor afinidade entre as proteínas e os receptores. Siglas: IGF, fator de crescimento semelhante à insulina; RI, receptor de insulina; M6P, manose 6 fosfato; IGFBP, proteína ligadora de IGF; P, fosforilação (70).

O IGF-I é um hormônio peptídico que compartilha aproximadamente 50% de homologia em sua sequência de aminoácidos com a pró-insulina. Em geral o IGF-I é majoritariamente reconhecido pelo receptor IGF1R e a insulina pelo RI. A ativação do receptor IGF1R fosforila preferencialmente IRS-2, que por sua vez é um potente mitógeno, possui atividade anti apoptótica e é capaz de regula a replicação, diferenciação e sobrevivência celular. Já a ativação do RI fosforila IRS-1, a qual possui grande atividade metabólica em comparação ao IGF-I (72).

As ações biológicas dos IGFs são mediadas, principalmente, pelo IGF-1R, uma glicoproteína expressa na superfície celular cujo domínio intracelular promove a ativação de duas principais vias de transdução de sinal: MAPK (proteínas quinase ativadas por mitógenos) e PI 3-K (fosfatidil inositol 3-quinase), sendo estas envolvidas na sobrevivência, proliferação e prevenção de apoptose (70,73).

Dentre outros ligantes, o IGF-I é considerado um importante fator de crescimento, pois estimula o crescimento de diferentes tipos celulares além de possuir grandes efeitos metabólicos (74), como na modulação transcricional de elementos envolvidos na síntese

e acúmulo de lipídeos como a HMGCoA redutase (enzima chave da biossíntese de colesterol), a Ácido Graxo Sintase (enzima chave da biossíntese de ácidos graxos), o receptor de LDL, além de modular, ainda, fatores de transcrição como SREBP1 e -2 (do inglês *Sterol Regulator Element-Binding Protein*) em mioblastos (69).

IGF-I é um fator trófico que circula em altas concentrações na corrente sanguínea ligado a IGFbps, sendo produzido no fígado, e é regulado majoritariamente pelo hormônio do crescimento (GH). O GH, por sua vez, é produzido pela hipófise, sob regulação da somatostatina e do hormônio de liberação do GH (GHRH). Entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de produzir este fator de crescimento, o qual pode atuar de maneira endócrina, autócrina ou parácrina (75). A expressão de IGF-I pode ser regulada em muitas etapas: na transcrição gênica, por “splicing” alternativo e na tradução do RNAm, assim como na sua secreção (73).

Dados da literatura indicam que o IGF-I favorece a infecção por *Leishmania amazonensis*, um patógeno intracelular que infecta preferencialmente macrófagos. Estudos *in vitro* demonstraram um aumento do tamanho de lesões de pele de camundongos infectados com formas promastigostas de *Leishmania* pré-tratadas com IGF-I, além de uma maior proliferação deste parasita (76,77). Em seguida, demonstraram que o IGF-I atua diretamente como um fator de crescimento para *Leishmania amazonensis*, pois esta apresenta receptor para este hormônio, além de bloquear a ativação de macrófagos e modular a resposta inflamatória local (78,79). Posteriormente, este mesmo grupo verificou que o IGF-I é essencial na infecção pela *Leishmania* pois ao reduzirem os níveis deste, através de estímulo com IFN- γ , ocorreu uma queda no número de parasitas dentro da célula, o qual foi reestabelecido após tratamento com IGF-I exógeno (80). Também foi elucidado o mecanismo pelo qual o IGF-I estaria favorecendo a infecção pela *Leishmania*, Vendrame e colaboradores (81) demonstraram que o IGF-I estaria induzindo a expressão de arginase, que por sua vez atuaria suprimindo a resposta inflamatória da célula.

Também foi descrita a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão de IGF-I em macrófagos murinos. Neste modelo, o IGF-I modula negativamente a atividade microbicida destes macrófagos, reduzindo a produção de óxido nítrico (50). Outro estudo do mesmo grupo mostrou que o *M. leprae* também era capaz de induzir a expressão de IGF-I em células de Schwann humanas, e neste contexto, o IGF-I induzido pela micobactéria estaria atuando protegendo a célula de Schwann de morte por apoptose (82).

Tendo em vista a capacidade do *M. leprae* em induzir, não somente a expressão e produção de IGF-I em macrófagos e células de Schwann (50,82), como também induzir um aumento na formação de corpúsculos lipídicos (54,62), e associando esses dados a capacidade lipogênica deste fator de crescimento (69), o presente trabalho buscou compreender se este fator de crescimento possuiria um papel na sobrevivência do *M. leprae* em macrófagos humanos e na formação de corpúsculos lipídicos na infecção de macrófagos humanos pelo *M. leprae*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação do IGF-I na biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos pelo *M. leprae* e na sobrevivência bacteriana em macrófagos humanos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade tanto do *M. leprae*, quanto do IGF-I, em induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos e macrófagos humanos;
- Avaliar habilidade do IGF-I em modular transcricionalmente o metabolismo lipídico de monócitos humanos;
- Verificar a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão de IGF-I em macrófagos humanos;
- Investigar a participação do IGF-I na indução de corpúsculos lipídicos pelo *M. leprae*;
- Avaliar a influência do IGF-I sobre a viabilidade intracelular do *M. leprae*;
- Investigar a influência do IGF-I induzido pelo *M. leprae* sobre a expressão de catelicidina;
- Buscar mutações de base única (SNP) *in silico* no gene IGF-I que possam estar associados com o adoecimento em hanseníase

3. METODOLOGIA

3.1 *Mycobacterium leprae*

Amostras de *M. leprae* viável obtido de coxim plantar de camundongos atímicos “nude” (nu/nu) foram doados pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. A purificação do *M. leprae* a partir do coxim plantar de camundongos nude infectados é realizada mensalmente pelo técnico de laboratório e ocorre após a infecção da pata dos camundongos atingir uma carga bacilar de cerca de 10^9 - 10^{10} /g de tecido. Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, os camundongos são sacrificados asfixiados com CO₂ no interior de uma cabine de segurança biológica de classe II e tratados com luz UV por 3 minutos. A pata infectada é removida, imersa em iodo 20% por 20 minutos e, posteriormente, em álcool 70%, sendo posteriormente fragmentada. As patas são mantidas em meio RPMI (LGC Biotecnologia) com 10% Soro Fetal Bovino (SFB - Cripion Biotecnologia LTDA) a 4 °C e são enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular – Pavilhão de Hanseníase (Fiocruz-RJ) para purificação. Os tecidos são fragmentados picando em pedaços menores com tesoura pequena e pinça estéreis. Os fragmentos são transferidos para uma placa de 6 poços, aos quais se adiciona meio RPMI 1640. Adiciona-se solução de colagenase-dispase 2x no poço em uma proporção 1:1 com o meio já no poço em conjunto com uma solução de ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA) com concentração final de 50µg/mL. Homogeneiza-se a placa por agitação suave e incuba-se a placa por 2 horas a 33°C. Após a incubação, homogeneiza-se novamente com o auxílio de uma ponteira de 1 mL e transfere para tubos plásticos de 1,5 mL. Em seguida realiza uma centrifugação de 16000 x g por 5 minutos, em que se descarta o sobrenadante e lava o precipitado por duas vezes com água estéril livre de pirogênio. Posteriormente, dissolve-se o precipitado com uma solução de NaOH 0,1N estéril e então centrifuga novamente a 16000x g por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida, dissolve-se o precipitado com 1 mL de meio RPMI 1640 estéril e com o auxílio de uma seringa de insulina de 1 mL todo o volume é homogeneizado para remover os grumos (83). As bactérias foram quantificadas e alíquotas contendo 10^9 células/mL cada. Também foi realizado um controle sobre a viabilidade dessas bactérias utilizando o kit *Live and Dead* (Molecular Probes), utilizando o protocolo descrito pelo fabricante.

Amostras de *M. leprae* foram letalmente irradiadas pelo Laboratório de Instrumentação Nuclear – Coppe/UFRJ.

3.2 Cultivo e manutenção da linhagem monocítica humana THP-1

THP-1 é uma linhagem monocítica humana que foi obtida através da purificação de monócitos do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda. Foi adquirida do banco de células ATCC (E.U.A) e mantida congelada em nitrogênio líquido. Para início do cultivo, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e descongeladas em banho-maria a 37° C. Esta linhagem foi mantida em meio RPMI (LGC biotecnologia) suplementado com 10% SFB (Cripion). As células ficaram incubadas em garrafas de cultura (NUNCLON. NUNC FLASK, 25 cm²) em estufa de 5% de CO₂ a 37° C. As culturas foram mantidas através de repiques semanais e após a décima passagem foram desprezadas e uma nova alíquota da linhagem descongelada para reinício do cultivo. O crescimento e viabilidade da linhagem nas condições de cultivo foram determinados através de contagem das células em câmara de Neubauer a cada repique utilizando azul de tripan (SIGMA Aldrich).

Para diferenciação em macrófagos derivados da linhagem THP-1, foi realizado um estímulo com Acetato miristato de forbol (PMA) (SIGMA Aldrich) a 80 nM durante 24 horas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e mantidos em estufa de 5% de CO₂ a 37°C, sendo que nos ensaios onde houve a infecção com *M. leprae* vivo as células foram mantidas à 33°C.

3.3 Obtenção e cultivo de monócitos e macrófagos primários

A obtenção de sangue periférico de voluntários sadios no presente projeto encontra-se amparada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ de número 504/09.

Monócitos foram obtidos a partir de sangue periférico de indivíduos sadios, através de separação por gradiente de concentração Ficoll Hypaque (GE healthcare). Para isso, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos heparinizados, diluído 1:2 em solução salina tamponada (PBS – LGC Biotecnologia) e centrifugada a 913 x g sobre o gradiente de densidade Ficoll Hypaque (GE healthcare), seguindo uma proporção de 20 mL de Ficoll para 30 mL de sangue diluído. O anel contendo as células mononucleares de sangue periférico (PBMCs – do inglês “periferal blood mononuclear cells”), que se encontra na interface Ficoll/plasma foi coletado, lavado com PBS e centrifugado a 514 x g durante 10 minutos a 4°C. Este processo de lavagem foi realizado por duas vezes. O

sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB). As células foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer, e a quantificação de células viáveis foi feita pelo método da exclusão por meio de coloração com azul de tripan. Os monócitos foram separados por adesão, esse protocolo consiste no plaqueamento do PBMC em placas de cultura durante 2 horas em meio RPMI suplementado com apenas 2% de SFB, após, o sobrenadante foi removido e as células aderidas foram lavadas com PBS por duas vezes.

Para diferenciação em macrófagos, os monócitos primários foram mantidos em cultura por sete dias para em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB.

3.4 Purificação de ácidos nucleicos:

3.4.1 Extração de RNA

O RNA total das culturas de monócitos primários ou de macrófagos derivados da linhagem THP-1 foi extraído utilizando o regente TRIZOL[®] (Life technologies, EUA). Após os períodos de estímulo ou infecção, o sobrenadante das culturas foram retirados e aliqüotados, e então adicionado 1 mL de TRIZOL[®] em cada poço, para lise das células aderentes. Após raspagem com ponteira, o conteúdo lisado foi transferido para tubos de 1,5 mL (Eppendorf). Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL contendo 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e incubada a -70° C por no mínimo um dia para precipitação do RNA. As fases intermediária e orgânica foram armazenadas a -20 °C para posterior extração de DNA, no caso dos ensaios de para avaliar a viabilidade do *M. leprae*. Após o período de incubação, foi adicionado 1 µL de GlycoBlue[®] (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do sedimento, e então centrifugados a 14000 x g por 20 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por uma vez e centrifugado a 10000 x g por 10 minutos a 4° C. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos e em seguida ressuspensos em 20 µL de água tratada com dietilpirocarbonato 0,01% (DEPC, Life Technologies, EUA).

3.4.2 Extração de DNA

A fase intermediária armazenada a -20°C foi utilizada para a extração de DNA para a realização dos experimentos de viabilidade bacteriana. Em cada tubo foram adicionados $100\ \mu\text{L}$ de tampão TE (5mM Tris; $0,1\ \text{mM}$ EDTA) e $150\ \mu\text{L}$ de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada no aparelho FastPrep[®] 120 (MP biomedical, EUA) na configuração de velocidade a $6,5$ metros por segundo (m/s) por 45 seg. Os tubos foram incubados no gelo por 5 minutos e centrifugados a $12000\ \times\ g$ por 10 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo de $1,5\ \text{mL}$ contendo $300\ \mu\text{L}$ de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e armazenada a -70°C por no mínimo um dia. Após, foi adicionado $1\ \mu\text{L}$ GlycoBlue[®] (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do precipitado, e então centrifugados a $12000\ \times\ g$ por 30 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com $500\ \mu\text{L}$ de etanol 70% por centrifugação a $12000\ \times\ g$ por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por 15 minutos e ressuspensos em $20\ \mu\text{L}$ de água de ampola.

3.4.3 Quantificação dos ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop[®] ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Inicialmente foi lido $1\ \mu\text{L}$ de água DEPC/água de ampola para determinar o “branco”. Em seguida, $1\ \mu\text{L}$ de cada amostra foi lido contra o “branco” no comprimento de onda de $260\ \text{nm}$. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: $A_{260/280}$ indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto $A_{260/230}$ indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$ apresentaram valores $> 1,8$.

3.4.4 Análise da integridade do RNA

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de agarose (Life technologies, EUA) $1,2\%$ em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se $200\ \text{ng}$ de RNA a 35% formamida, MOPS 1X , $0,125\%$ corante azul de bromofenol e $1\ \mu\text{L}$ de SYBR Green II 100X (Life technologies, EUA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho seco a 65°C

por 15 minutos e depois aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de foto documentação (L-Pix touch, Loccus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

3.4.5 Tratamento do RNA com DNase

Após a quantificação e confirmação da integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit *TURBO DNA-free*TM (Life technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30 μ L. Inicialmente, em tubos de 0,5 mL, foi adicionado 3 μ g de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10x e 1 μ L da enzima Turbo DNase, seguido por incubação a 37° C durante 30 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação enzimática. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos, agitando os tubos manualmente 2-3 vezes durante esse período para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 2 minutos, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado.

3.4.1 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas de macrófagos derivados da linhagem THP-1, monócitos ou macrófagos primários humanos mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III[®] (Life technologies, EUA) em uma reação com volume final de 20 μ L. Inicialmente, 1 μ g de RNA e de Oligo (dT) foram incubados a 65° C por 5 minutos para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação foi adicionado o tampão da enzima em concentração de 1X, dNTP 0,125 mM, DTT 10 mM, 40 U de RNase Out[®] e 200 U da enzima Superscript III[®]. Essa mistura foi incubada a 50° C por 1 hora para transcrição, seguida de incubação a 70° C por 5 minutos para inativação da enzima. Após a incubação as amostras foram armazenadas a -20° C.

3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real:

3.5.1 RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (qRT-PCR)

Para as análises da expressão gênica do IGF-I e IGF1R foi utilizando o sistema Taqman[®]. Foi amplificado um gene constitutivo, o GAPDH, como controle de carregamento. As reações foram realizadas no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus[®] (Applied Biosystems, EUA), seguindo as condições a seguir: 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto.

Para as análises em que foram utilizadas o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), além de serem amplificados alguns genes de interesse (Tabela 1), foi amplificado o gene constitutivo RPL13 (tabela1). As reações, também, foram realizadas na máquina de PCR em tempo real StepOne Plus[®], seguindo as condições: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após ocorrerem todos os ciclos, foi realizada uma curva de dissociação (do inglês “melting curve”), seguindo as condições: 15 minutos à 95°C, seguido de 1 hora à 60°C e, por fim, 15 minutos à 60°C.

A análise da expressão de IGF-I, foi avaliado por PCR quantitativo através do sistema TaqMan. A normalização da expressão relativa do IGF-I foi realizada através do controle constitutivo GAPDH e os valores obtidos (CT = “cycle threshold”) foram corrigidos e convertidos pela expressão relativa que é igual a $2^{-\Delta\Delta CT}$. Utilizando o sistema SyBr Green foi avaliada a expressão dos seguintes genes: PLIN-2 (ADRP), HMGCR, FAS, ABCA1, ABCG1 e cAMP (Catelecidina) (Tabela 1), e a normalização foi realizada com a expressão do gene RPL13 (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência dos iniciadores senso e antissenso utilizados na reação de PCR por sistema SYBR Green:

Gene	Senso	Antissenso
PLIN-2	GTGAAGACCATCACCTCCGT	TGTCTAGCCCCTTACAGGCA
HMGCR	CCTGTTTGCAGATGCTAGGTGTT	GCCAATGCTGCCATAAGTGA
FAS	TGGCCTACACCCAGAGCTAC	GTGAACTGCTGCACGAAGAA
ABCA1	AGCGACTCCACATAGAAGACT	TGCAACGTCCACTACTGTCT
ABCG1	GGAGCTGGACGTGGAAAATG	TCTGCCCGGATTTTGTACCT
cAMP	GCTGGTGAAGCGGTGTATG	TGCCAATCTTCTTTAGATTTC
RPL13	GACAAGAAAAAGCGGATGGT	GTA CTTCAGCCAACCTCGT

3.5.2 RT-PCR para análise da viabilidade do intracelular do *M. leprae*

Para estimar a viabilidade intracelular do *M. leprae* foi utilizado o sistema de PCR em tempo real para detecção dos níveis de RNAr 16S (Senso: GCATGTCTTGTGGTGGAAA / Antissenso: CACCCACCAACAAGCTGAT) do bacilo, conforme protocolo descrito por Martinez e colaboradores (2009). A partir das células infectadas com o bacilo viável foi extraído o DNA e o RNA, o RNA foi reversamente transcrito em cDNA, utilizando random primer. Os níveis de RNAr 16S foram normalizados pela detecção de DNA 16S. Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos descritos em Martinez e colaboradores (13).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas com 500 ng de DNA e cDNA em volume final de 20 µL contendo TaqMan PCR Master Mix 1X (Applied Biosystem), 0,1 µM da sonda e 0,5 µM de cada oligonucleotídeo. As reações foram incubadas a 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minutos no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus®.

A viabilidade do *M. leprae* foi determinada através da realização de uma razão entre a expressão de RNAr 16S e a expressão de DNA 16S.

3.6 Neutralização do receptor IGF1R

3.6.1 Neutralização com anticorpo neutralizante específico para o IGF1R

Para os ensaios com anticorpo neutralizante para IGF-1R foram utilizados macrófagos primários humanos, que após a diferenciação, foram estimuladas previamente ou não com o anticorpo neutralizante α -IGF-1R (1 μ g/mL) ou, então, com IgG (1 μ g/mL) 30 minutos antes do estímulo com *M. leprae* letalmente irradiado. As culturas permaneceram incubadas por mais 48 horas, e em seguida foi realizada uma marcação com Oil Red O, conforme descrito posteriormente (item 3.10.1).

3.6.1 Silenciamento gênico do receptor de IGF-I (IGF1R) com RNAi

Para o silenciamento da expressão gênica de IGF1R, macrófagos derivados da linhagem THP-1 foram transfectados com RNA silenciador contra IGF1R sintetizado pela IDT Technologies (Senso: rArGrGrGrCrArArUrUrUrGrCrUrCrArUrUrArArCrA / Antissenso: rUrUrArArUrGrArGrCrArArArUrUrGrCrCrCrUrUrG), RNA silenciador negativo pré-desenhado (Silencer Select RNAi Negative Control, Life Technologies, EUA), utilizando o reagente Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, foram plaqueadas 2×10^5 células por poço, em placas de 6 poços (Corning, EUA), onde foram diferenciadas em macrófagos conforme o protocolo descrito anteriormente. A mistura de transfecção contendo o reagente Lipofectamine® 2000 e o RNA silenciador foi preparada para um volume final de 300 μ L. Primeiramente, 9 μ L de Lipofectamine® 2000 foi diluído em meio Opti-MEM® (Life Technologies, EUA) para volume final de 150 μ L, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Em paralelo, o RNA silenciador e o RNA silenciador negativo foram diluídos a 100 nM em meio Opti-MEM® para volume final de 150 μ L e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as diluições dos RNAs e Lipofectamine® 2000 foram misturadas (razão 1:1), seguido de incubação por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura (complexo RNA-reagente) foi adicionada às culturas de macrófagos por 24 horas. No dia seguinte, as células foram estimuladas com *M. leprae* letalmente irradiado por 24 ou 48 horas e tiveram seu DNA e RNA total extraído utilizando os métodos descritos no item de purificação de ácidos nucleicos.

A eficiência do silenciamento foi avaliada por RT-PCR em tempo real. Os resultados obtidos foram demonstrados como porcentagem de inibição, onde, foi adotado como 100% a expressão do IGF1R das amostras tratadas com RNAi negativo seguida da razão entre a expressão de IGF1R das amostras tratadas com RNAi para o receptor sobre a expressão do controle negativo.

3.7 Quantificação dos níveis proteicos de IGF-I

Sobrenadantes de culturas de macrófagos primários ou derivados da linhagem THP-1 estimulados ou não com *M. leprae* letalmente irradiado foram coletados e armazenados a -20°C até o momento de sua utilização. A quantificação dos níveis de IGF-I foi realizada por ensaio imunoenzimático utilizando Kit de ELISA específico (R&D Systems), seguindo as orientações do fabricante.

3.8 Ensaios de avaliação e indução de corpúsculos lipídicos

3.8.1 Coloração com Oil Red O

Cerca de 2×10^5 células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro (Corning) em placas de cultura de 24 poços, em meio RPMI suplementado com 2% de SFB. As culturas foram estimuladas, ou não, com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1 ou com IGF-I recombinante (50ng/mL). Primeiramente foi realizada uma curva temporal (2, 4, 24 e 48 horas) de indução de corpúsculo lipídico, tanto pelo *M. leprae*, quanto pelo IGF-I, em monócitos primários humanos. Em seguida, foi avaliada a indução de corpúsculos lipídicos em macrófagos primários humanos com estímulos de 48 horas. Todas as culturas foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Ao final dos tempos de estímulo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos a 4°C e, posteriormente, lavadas com PBS por duas vezes.

Os corpúsculos lipídicos foram corados utilizando o ORO, o qual cora lipídeos neutros, por isso é possível visualizar a estrutura dessas organelas. Esse protocolo consiste em cobrir as células com propilenoglicol 100% por 5 minutos, remover sem lavar, em seguida adicionar ORO por 7 minutos, retirar sem lavagem, por fim, adicionar propilenoglicol 85% por 3 minutos. As lamínulas contendo as células foram então lavadas 3 vezes com PBS. Também foi realizada uma marcação nuclear com DAPI (diluição 1:10000 em PBS) durante 1 minuto, seguida de lavagem com PBS por 3

vezes. As lamínulas foram colocadas em lâminas de vidro com a face coberta pelas células voltada para baixo, entrando em contato, assim, com uma solução anti-*fadding* (Prolong gold – Invitrogen), por fim, as lamínulas foram seladas à lâmina com auxílio de Entellan (Harleco EM Science). A formação de corpúsculos lipídicos foi avaliada através da visualização em microscópio de fluorescência Zeiss.

Também foi avaliada a formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo *M. leprae* em macrófagos humanos, nos quais foram realizados o silenciamento do receptor IGF1R seguindo o mesmo protocolo descrito acima.

3.8.2 Coloração com Tetróxido de Ósmio

Cerca de 2×10^5 macrófagos derivados da linhagem THP-1 foram plaqueados sobre lamínulas de vidro (Corning) em placas de cultura de 24 poços, em meio RPMI suplementado com 2% de SFB. As células foram estimuladas, ou não, com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1 ou com IGF-I recombinante (50ng/mL) por 48 horas. Ao final dos tempos de estímulo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 20 minutos a 4°C e, posteriormente, lavadas com PBS por duas vezes.

Os corpúsculos foram corados com a solução de ácido cacodilato (0,1M) e tetróxido de ósmio a 1,5% por 30 minutos, na ausência de luz. Em seguida, as lamínulas foram lavadas por duas vezes com água Milli-Q e incubadas com solução de tiocarbohidrazida por 3 minutos à temperatura ambiente. Após este processo, as lamínulas foram lavadas, coradas novamente, com tampão cacodilato e tetróxido de ósmio. Após as lavagens, as lamínulas foram mantidas na capela até sua secagem completa. Em seguida, as lamínulas foram fixadas, voltadas para cima à lâminas com o auxílio de Entellan (Harleco EM Science). A formação de corpúsculos lipídicos foi avaliada através da visualização em microscópio óptico.

A quantidade de corpúsculos lipídicos foi avaliada com auxílio do programa ImageJ, onde foi calculada a área de corpúsculos lipídicos e feita uma razão pelo número de células. Os valores foram obtidos a partir de 200 células.

3.9 Análise da expressão de proteínas por western blot

As culturas foram lisadas com 80 µL do tampão de lise RIPA (TRIS-HCl 50mM pH7,5; 1% Nonidet p40; 0,25% Deoxicolato de sódio; 0,1% SDS), contendo inibidores de proteases (Mini Complete, Roche) por 15 min no gelo. Logo em seguida, os lisados foram coletados, passados em seringa de 1 mL para a quebra do DNA e centrifugados a 14.000 x g por 15 minutos a 4°C.

3.9.1 Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas extraídas 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 µL / poço). Em seguida, em cada poço, foram adicionados 200 µL 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).

3.9.2 Expressão proteica de ADRP por Western blot

Cerca de 30µg de proteínas do lisado total foram diluídas em tampão de amostra (para 10 ml de solução: 1,25 ml de Tris pH 6,8 a 0,5 M; 4 ml de Glicerol; 0,2 g de SDS; 0,5 ml de β-Mercaptoetanol, 0,25 ml de azul de bromofenol a 0,05%, completado com água deionizada) e fervidas por 10 minutos. As amostras e proteínas com massa molecular conhecida (padrão de massa molecular) foram aplicadas em gel de poliacrilamida composto por um gel de empilhamento a 6% e um gel de separação a 12%. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0,1% de SDS), sob amperagem constante de 20 mA em cuba de eletroforese (S600 – Amersham).

Finalizada a corrida, o gel foi submetido à transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose (GE, São Paulo, Brasil) em tampão de transferência (25 mM de Tris; 192 mM de glicina; metanol 20%). A transferência foi realizada “overnight” sob voltagem constante de 20V.

As membranas foram coradas com solução de Amido Black (metanol 40%, ácido acético 10%, Amido Black 0,1%) para a confirmação da transferência proteica e identificação do padrão de massa molecular e, posteriormente, descorada por lavagens com solução de TBS/T (10 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; Tween-20 0,05%).

Atestada a eficiência da transferência, a membrana foi bloqueada com solução TBS/T com 5% de leite desnatado por 1 hora e incubada “overnight” com anticorpo policlonal anti-ADRP (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:500. Após esta incubação, as membranas foram lavadas com TBS/T e logo em seguida, foram incubadas por 1 hora com anticorpo anti-mouse IgG, conjugado a peroxidase e diluído 1:10000 em TBS-T com 5% de leite desnatado. A revelação foi realizada utilizando substrato quimioluminescente (ECL Advanced Western Blotting Detection Kit, GE, São Paulo, Brasil).

Após a revelação, a membrana foi submetida a uma remoção química do complexo proteína-anticorpo, através de incubação com NaOH 0,2 M, sob agitação por 5 minutos. A membrana foi novamente bloqueada por 1 hora com TBS/T contendo 5% de leite desnatado e então foi realizada uma nova incubação com anticorpo para GADPH (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) na diluição de 1:1000 “overnight”. Em seguida, a membrana foi lavada com TBS/T uma vez e incubado anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma, Saint Louis, EUA), a revelação foi realizada da mesma maneira ao descrito para o anticorpo anti-ADRP.

3.10 Dosagem de Prostaglandina E₂

Sobrenadantes de culturas de monócitos primários humanos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado em diferentes concentrações ou IGF-I recombinante, também em diferentes concentrações, foram submetidos à dosagem de PGE₂ utilizando o Kit EIA Prostaglandin E₂ Monoclonal (Cayman) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.11 Dosagem de Colesterol intracelular

Cerca de 5×10^5 monócitos ou macrófagos primários foram estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado em diferentes concentrações, ou estimulados com IGF-I recombinante em diferentes concentrações, por 48 horas. Após o período de incubação as células foram lisadas com tampão RIPA e as concentrações de colesterol intracelular

foram mensuradas com o Kit Amplex Red Cholesterol (molecular probes, Life technologies) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.12 Busca de SNPs no gene IGF-I

A primeira busca de SNPs na região do gene IGF-I, presentes na população brasileira, foi realizada através da pesquisa no banco de dados do consórcio Epigen (Kehdy *et al*, 2015). O Banco epigen se apresenta como uma ferramenta em potencial para este estudo, pois por meio dele podemos identificar os SNPs que certamente estão presentes na população brasileira. O consórcio EPIGEN-Brasil é uma iniciativa estratégica do Ministério da Saúde na área de Epidemiologia Genômica (www.epigen.grude.ufmg.br) que envolve cinco centros: Fundação Oswaldo Cruz de Belo Horizonte (Profa. Maria Fernanda Lima Costa), Universidade Federal de Pelotas (Prof. Bernardo Horta), Universidade Federal de Minas Gerais (Prof. Eduardo Tarazona Santos), Universidade Federal da Bahia (Prof. Maurício Barreto) e a Universidade de São Paulo (Prof. Alexandre Pereira). A proponente, Dra Fernanda de Souza Gomes Kehdy teve uma participação efetiva no Projeto EPIGEN-Brasil durante sua residência pós doutoral realizada na Universidade Federal de Minas Gerais sob supervisão do Prof. Eduardo Tarazona Santos. O projeto visou realizar o primeiro conjunto de estudos de associação por varredura genômica (GWAS: Genome-Wide Association Study) com dados longitudinais e explorando as interações entre genética, ancestralidade e ambiente, e estudar a estrutura genética da população brasileira em alta resolução, envolvendo aproximadamente 6700 indivíduos das três maiores coortes populacionais brasileiras: coorte de crianças de Salvador (n=1309 com 15 anos de acompanhamento; Barreto et al. 2006), coorte de idosos de Bambuí (n=1442; Lima-Costa et al. 2010 com 17 anos de acompanhamento) e coorte de nascidos vivos de Pelotas (n=3736 com 25 anos de acompanhamento; Barros et al. 2006). Estes dados consistem em: (1) genotipagem de 2.5 milhões de SNPs em cada um dos 6700 indivíduos do projeto, utilizando o arranjo HumanOmni2.5 (Illumina); (2) genotipagem de 4.3 milhões de SNPs em cada um de 270 indivíduos, utilizando o arranjo HumanOmni5-Quad (Illumina); (3) sequenciamento de genomas completos de 30 indivíduos (cobertura obtida: 42X). Desta forma, devido a grande quantidade de dados, o banco de dados do Projeto EPIGEN-Brasil representa uma poderosa e inédita fonte de informações acerca da estrutura genômica específica da população brasileira que pode ser muito útil na triagem de genes e SNPs candidatos em populações brasileiras de estudos caso-controle.

Utilizando estes dados, buscamos SNPs não somente na região referente ao gene de interesse, mas também em região de até 25.000 pares “upstream” ou “downstream” de bases antes ou depois da região de leitura do gene SNPs candidatos que poderiam estar relacionados ao controle de expressão deste gene.

Foram encontrados um total de 193 SNPs, em seguida foi realizada a anotação desses SNPs encontrados utilizando o programa MASSA (Souza, 2014 – dados não publicados), este software faz uma busca simultânea e automática em diversos bancos como: dbSNP, UCSC, Gene ontology, PharmGKB, OMIM, Reactome, HGNC, PolyPhen-2, Provean/SIFT e NHGRI GWAS Catalog. Os resultados dessa anotação funcional dos SNPs, foram usados para selecionar SNPs que possivelmente poderiam regular a expressão gênica, seriam esses localizados em regiões próximas ao gene (nearGene) ou em regiões intrônicas 3' não traduzida (3'UTR).

Após a seleção dos possíveis SNPs candidatos pelo MASSA foram calculados a frequência alélica desses SNPs na população brasileira baseado no banco EPIGEN. Além da anotação por MASSA, esses SNPs foram consultados em bancos públicos de eQTLs (SQLite Express, Zeller *et al.*, 2010; Blood eQTL Browser, Westra *et al.*, 2014).

Foram considerados possíveis candidatos aqueles SNPs que apresentavam MAF acima de 0,05. Posteriormente, foi realizado um estudo de análise de desequilíbrio de ligação dos SNPs com MAF acima de 0,05 nas populações do EPIGEN, e foram considerados em desequilíbrio de ligação SNPs que apresentassem LD com R^2 acima de 0,6.

3.13 Análise dos dados

Os resultados foram representados com erro padrão. O número de replicatas experimentais independentes está especificado em cada legenda das figuras, bem como a significância e o teste estatístico utilizado no determinado experimento. A análise estatística dos dados apresentados foram realizadas através do software GraphPad Prism 5. Foi utilizado Teste T *Student* para análises em que haviam apenas duas variáveis e ANOVA seguida de pós-teste Bonferroni quando mais de duas variáveis.

4. RESULTADOS

4.1 IGF-I induz a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos primários humanos

Para efeito de comparação com resultados previamente obtidos pelo grupo (54,63), o presente trabalho foi iniciado utilizando o modelo de monócitos primários humanos. O *M. leprae* possui a capacidade de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nessas células, e esses corpúsculos são altamente importantes para a sobrevivência intracelular do *M. leprae* (54,63). Com isso, o primeiro passo deste projeto foi avaliar se o IGF-I, assim como o *M. leprae*, teria a capacidade de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos.

Para isso foi realizada uma cinética temporal em monócitos primários estimulados com IGF-I recombinante na concentração de 50ng/mL, concentração essa anteriormente padronizada pelo nosso laboratório (11,50). Nestes ensaios, *M. leprae* letalmente irradiado na proporção de 50 bactérias por célula (50:1) foi utilizado como controle positivo. É importante ressaltar que foi utilizado *M. leprae* letalmente irradiado para a realização destes ensaios. Nós optamos por este estímulo em face à dificuldade de obtenção de *M. leprae* vivo. Além disso, já foi descrito que a indução de corpúsculos lipídicos pelo *M. leprae* ocorre via reconhecimento por receptores do tipo *Toll* e, especificamente em monócitos humanos, de forma independente da viabilidade bacteriana (54).

Como se pode visualizar na figura 4.1, IGF-I foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos e esta indução ocorreu de maneira tempo dependente. Nos tempos de 24 e 48 horas de estímulo, uma indução de aproximadamente 4 vezes foi observada em relação ao controle (figura 4.1). Outra informação que podemos obter a partir deste ensaio é que o IGF-I apresentou um perfil de indução de corpúsculos lipídicos semelhante ao *M. leprae* irradiado.

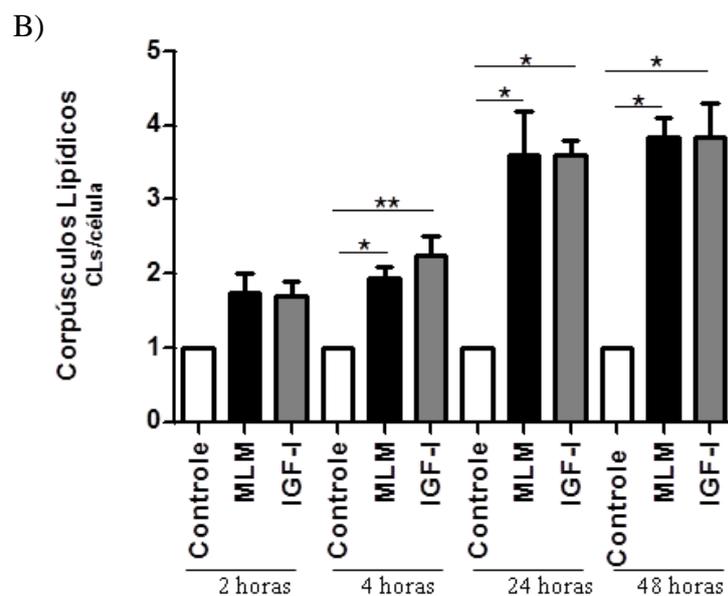
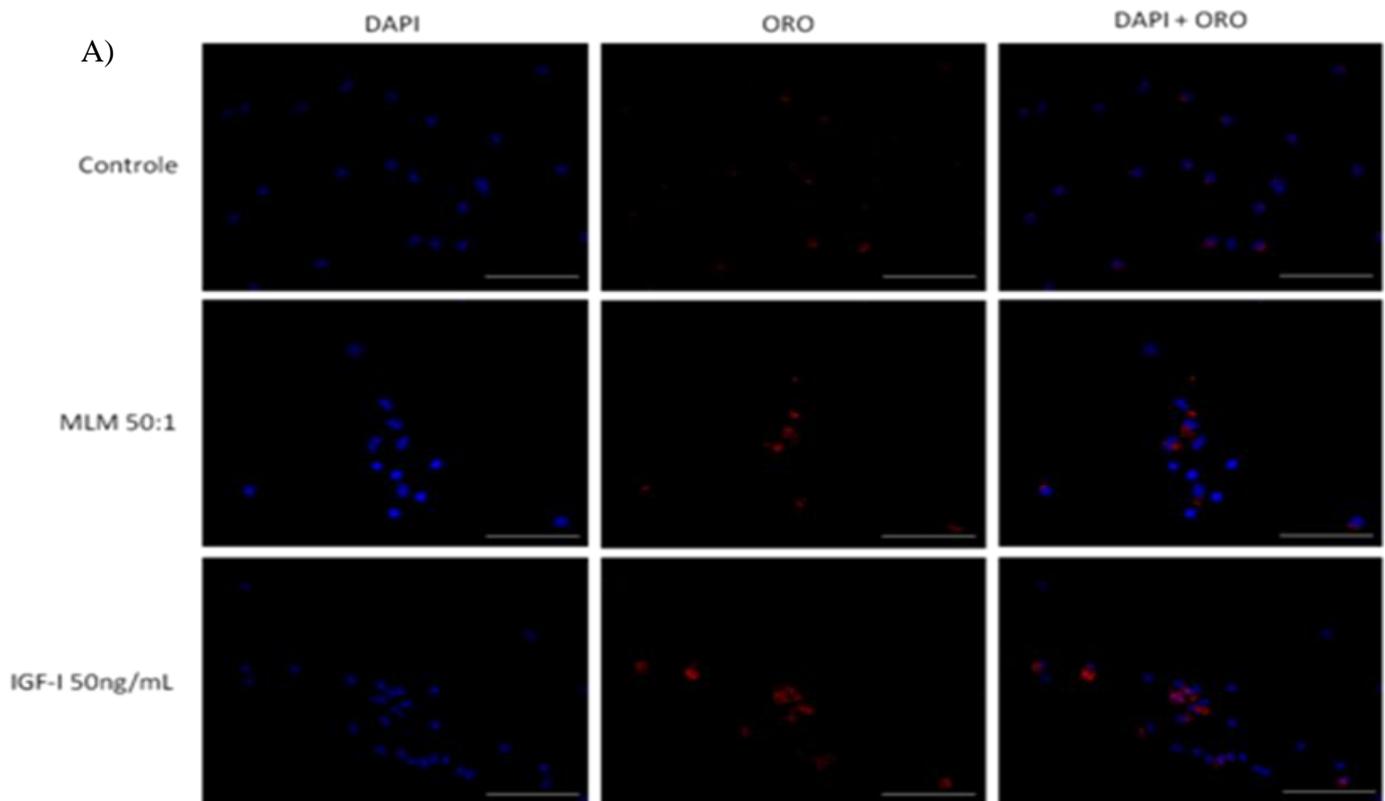


Figura 4.1: Modulação da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos pelo IGF-I. (A) Formação de corpúsculos lipídicos em monócitos primários estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria célula de 50:1 ou IGF-I recombinante (50ng/mL) por 48 horas. As células foram fixadas, os núcleos corados com DAPI e os corpúsculos lipídicos evidenciados pela coloração com ORO. (B) Curva temporal de indução de corpúsculos lipídicos em monócitos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado ou IGF-I (50ng/mL) durante 2, 4, 24 e 48 horas. As imagens foram capturas em microscópio de fluorescência. Foi realizada uma razão entre a quantidade de CLs/célula, sendo um total de 200 células analisadas (N=4). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra de escala: 50 μ m. As imagens representativas foram feitas com aumento de 2 vezes frente a imagem original (DAPI+ORO).

4.2 IGF-I é capaz de induzir a expressão de ADRP em monócitos primários humanos

Os corpúsculos lipídicos apresentam um conteúdo proteico diverso, incluindo as proteínas da família PAT, que compreende a perilipina, a adipofilina (ADRP) e a TIP47. A ADRP é uma proteína específica da estrutura dos corpúsculos lipídicos e vem sendo empregada como marcador destas organelas (57,58). Para confirmar a capacidade do IGF-I em induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos, numa etapa seguinte deste trabalho analisamos a expressão de PLIN-2 em monócitos primários humanos tratados com IGF-I.

Para isto, estimulamos monócitos primários humanos com IGF-I recombinante (50ng/mL) ou com *M. leprae* (50:1). Para os ensaios de expressão gênica (RT-PCR) para PLIN-2 optamos pelo tempo de incubação de 4 horas, visto que nesse mesmo tempo de estímulo já é possível observar um aumento significativo na formação de corpúsculos lipídicos induzidos tanto pelo *M. leprae* irradiado quanto por IGF-I, além do fato de a expressão de RNA mensageiro ser um evento anterior à síntese proteica. Já para os ensaios de análise de expressão proteica (Western blot), optamos pelo tempo de incubação de 48 horas, pois neste tempo observou-se um expressivo aumento na formação de corpúsculos lipídicos frente ao controle experimental.

Reforçando o dado anteriormente mostrado, observamos que IGF-I foi capaz de induzir um aumento significativo na expressão de PLIN-2, tanto em nível transcricional - em cerca de 3 vezes quando comparado ao controle (figura 4.2A) – quanto em nível proteico – cerca de 2 vezes frente ao controle experimental (figura 4.2B e C). O estímulo com *M. leprae*, utilizado como controle positivo, também foi capaz de regular positivamente a expressão de RNAm, em cerca de 3 vezes, e da proteína ADRP (figura 4.2) corroborando dados previamente publicados por Mattos e colaboradores (54).

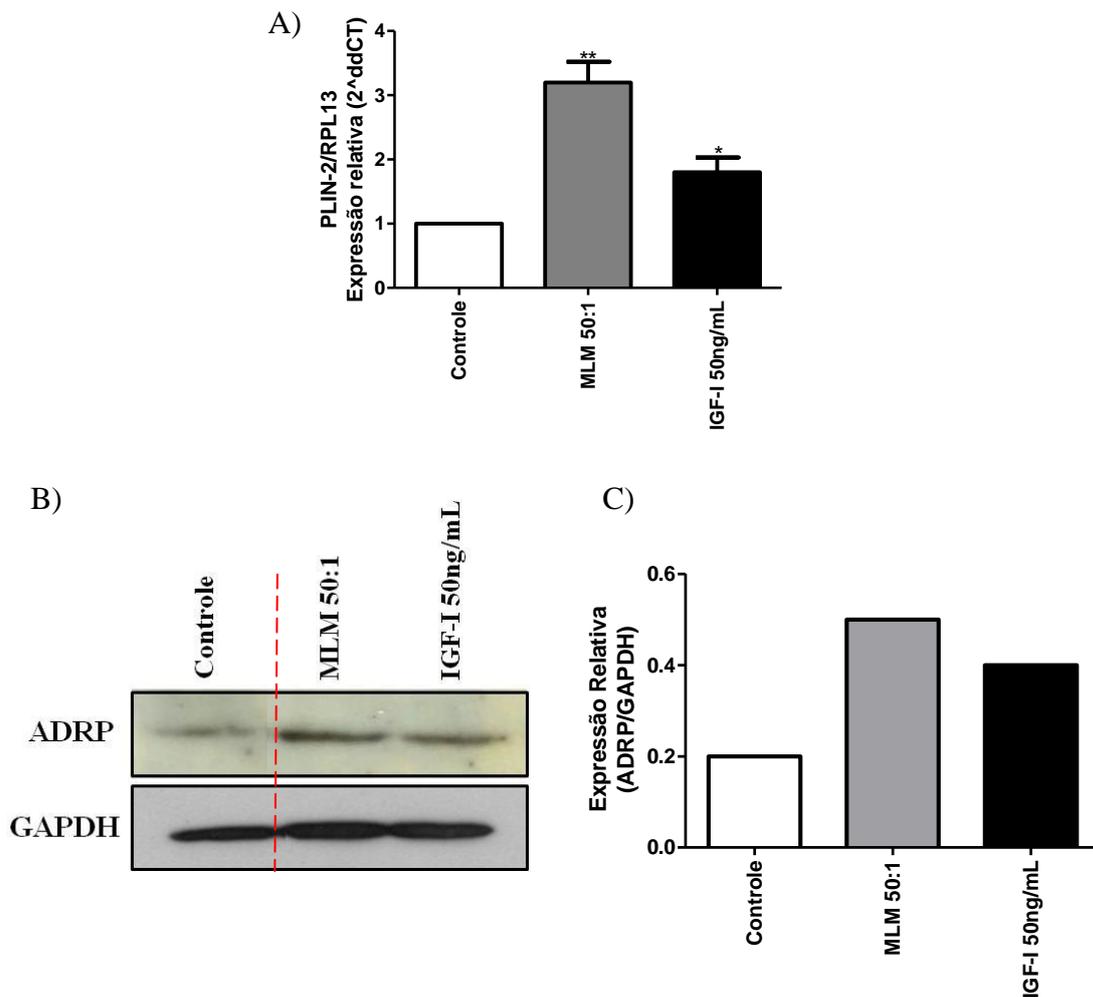


Figura 4.2: Avaliação da expressão de ADRP em monócitos primários humanos estimulados com IGF-I. (A) Expressão de RNAm para Perlipina 2 humana (PLIN-2 / ADRP) em células estimuladas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado (MLM) na proporção bactéria:célula de 50:1 ou com IGF-I (50ng/mL) por 4 horas (N=3), avaliado por RT-PCR em Tempo Real. (B) Expressão de ADRP em monócitos primários humanos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1, ou estimulados com IGF-I (50ng/mL) por 48 horas, avaliada por Western blot. Como controle de carregamento foi utilizado o GAPDH (N=1) *Foram removidas as bandas sem significância para o experimento. (C) Análise densitométrica da figura B. *p<0,05; **p<0,01.

4.3 Modulação da expressão de RNA mensageiro de enzimas-chave na biossíntese de colesterol e ácidos graxos pelo IGF-I

Os corpúsculos lipídicos abrigam no seu interior uma gama de lipídeos neutros, como o triacilglicerol, diacilglicerol ou ésteres de colesterol (84). Conforme descrito na literatura, o *M. leprae* é capaz, não somente de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, mas também o acúmulo intracelular de colesterol, indicando que os corpúsculos lipídicos induzidos por esta micobactéria são ricos em colesterol (63). Ainda neste trabalho foi verificado que o *M. leprae* induz a biossíntese *de novo* de colesterol através da indução das enzimas que compõem esta via.

Tendo em vista que o IGF-I é capaz de regular positivamente a expressão de HMGCoA redutase e ácido graxo sintase, enzimas-chave na síntese de colesterol e ácidos graxos, respectivamente (69), nosso próximo passo foi avaliar se o IGF-I também seria capaz de induzir a expressão dessas duas enzimas em nível transcricional em monócitos humanos por RT-PCR quantitativo. Conforme mostrado na figura 4.3A, o IGF-I foi capaz de induzir um aumento nos níveis de RNAm para HMGCoA redutase em cerca de 2 vezes. Mais ainda, corroborando a literatura o *M. leprae* foi capaz de induzir um aumento nos níveis de RNAm para esta enzima em cerca de 4 vezes frente ao controle experimental não estimulado. Já em relação à enzima ácido graxo sintase, verificamos que o *M. leprae* foi capaz de regular positivamente os níveis de RNAm dessa enzima em cerca de 1.5 vezes, dado este ainda não descrito na literatura. Já o estímulo com IGF-I apresentou apenas uma tendência de aumento na expressão desta enzima, pois não foi observada diferença estatisticamente significativa (Figura 4.3B).

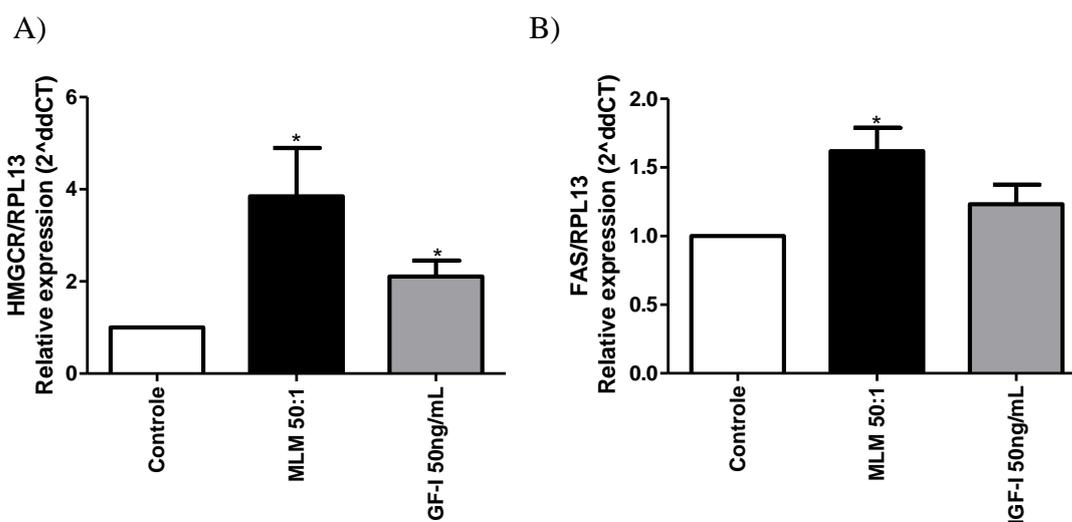


Figura 4.3: Avaliação da expressão de HMGC α Redutase e FAS em monócitos primários humanos tratados com IGF-I. Níveis de RNAm para HMGC α redutase (A) e de FAS (B) determinados por RT-PCR quantitativo em monócitos primários humanos estimulados ou não com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1 ou com IGF-I (50ng/mL) por 4 horas (N=3). *p<0,05.

4.4 *M. leprae* modula positivamente a expressão de ABCA1 e ABCG1 em monócitos primários humanos

Numa etapa seguinte, investigamos se o IGF-I seria capaz de modular a expressão dos transportadores reversos de colesterol ABCA1 e ABCG1, responsáveis pela excreção do excesso de colesterol intracelular (85). Em paralelo, foi avaliada a capacidade do *M. leprae* em modular estes transportadores, tendo em vista que isto ainda não havia sido investigado. Para tal, os níveis de RNAm dos genes ABCA1 e ABCG1 foram quantificados por RT-PCR quantitativo em células tratadas

De maneira interessante, o *M. leprae* foi capaz de induzir um aumento significativo na expressão tanto de ABCA1, em cerca de 3.5 vezes (figura 4.4A), quanto de ABCG1, em cerca de 1.7 vezes (figura 4.4B). Já o estímulo com IGF-I não se mostrou capaz de regular a expressão de ABCA1 (figura 4.4A), mas apresentou uma tendência em regular positivamente a expressão de ABCG1 (figura 4.4B).

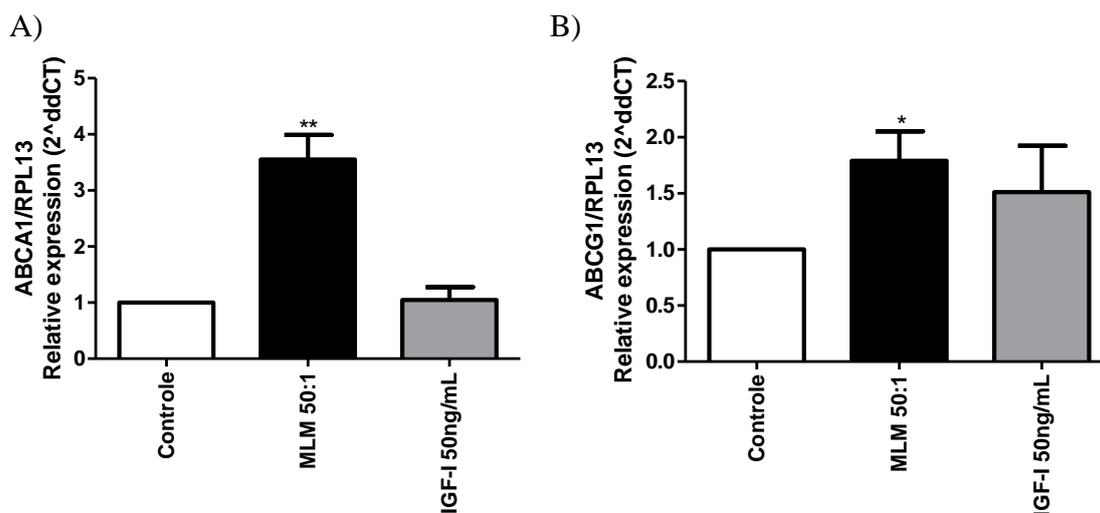


Figura 4.4: Avaliação da expressão de ABCA1 e ABCG1 em monócitos primários humanos tratados com *M. leprae* ou IGF-I. Expressão de RNAm para ABCA1 (A) e ABCG1 (B) determinados por RT-PCR quantitativo em monócitos estimulados ou não com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1 ou com IGF-I (50ng/mL) por 4 horas (N=3). *p<0,05. **p<0,01

4.5 Efeito do IGF-I nos níveis de colesterol intracelular em monócitos primários humanos

Tendo em vista os resultados anteriores onde verificamos que o IGF-I é capaz de induzir a expressão da enzima HMGCoA redutase e o aumento na formação de corpúsculos lipídicos, sem alterar, contudo, a expressão de genes envolvidos no transporte reverso do colesterol, um próximo passo do presente estudo foi verificar se estaria havendo o acúmulo de colesterol intracelular nos monócitos tratados com IGF-I. Como esperado, o *M. leprae* foi capaz de induzir o acúmulo de colesterol intracelular após 24 horas de estímulo em cerca de 1.5 vezes (figura 4.5A). Já após 48 horas de estímulo com *M. leprae* verificamos uma tendência de aumento de colesterol intracelular, porém não houve diferença estatística frente ao controle não estimulado analisado no mesmo período (figura 4.5B). Por outro lado, o acúmulo intracelular de colesterol não foi observado em monócitos primários tratados com IGF-I durante o período avaliado (Figura 4.5).

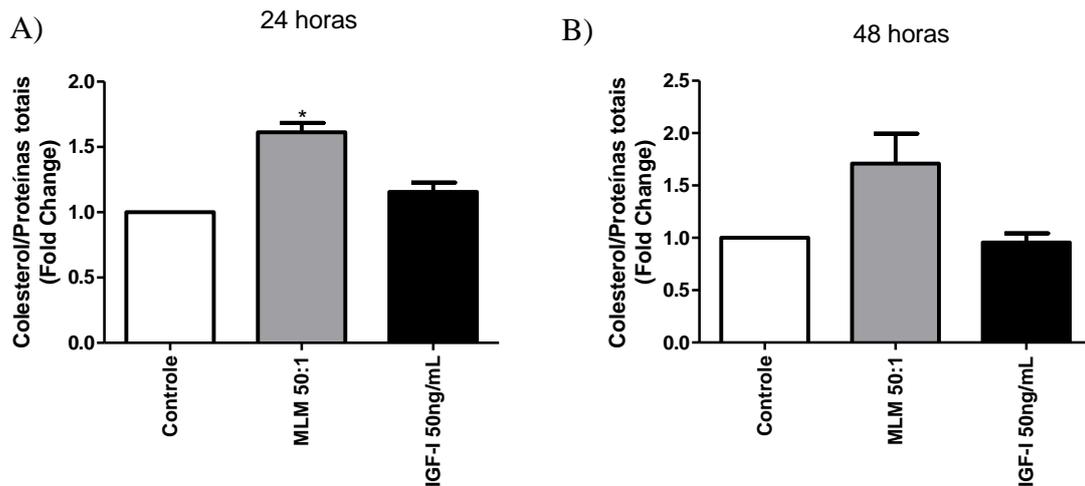


Figura 4.5: Avaliação do acúmulo de colesterol intracelular em monócitos primários humanos tratados com IGF-I. Dosagem de colesterol intracelular em monócitos primários humanos estimulados ou não com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1 ou com IGF-I (50ng/mL) por 24 horas (A) e 48 horas (B). A dosagem foi realizada utilizando ensaio colorimétrico. (N=3) *p<0,05.

4.6 Efeito do IGF-I sobre a produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂) por monócitos primários humanos

A PGE₂ é um mediador lipídico que tem sua origem a partir do ácido araquidônico e possui um grande potencial anti-inflamatório (86). Mattos e colaboradores (54) observaram uma correlação positiva entre a presença de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE₂, reforçando a ideia de que estas organelas são sítios de produção deste eicosanóide. Um passo seguinte do nosso trabalho foi, então, investigar se o IGF-I seria capaz de induzir a síntese de PGE₂ em monócitos, através de sua quantificação em sobrenadantes de cultura por ensaio imuno enzimático (EIA).

Corroborando os dados da literatura, o *M. leprae* apresentou uma tendência em induzir a síntese de PGE₂ em monócitos humanos nas proporções de bactéria:célula de 10:1 e 50:1 (figura 4.6). Já o IGF-I parece não ser capaz de induzir a síntese de PGE₂ nestas células (figura 4.6), independente da concentração de IGF-I utilizada.

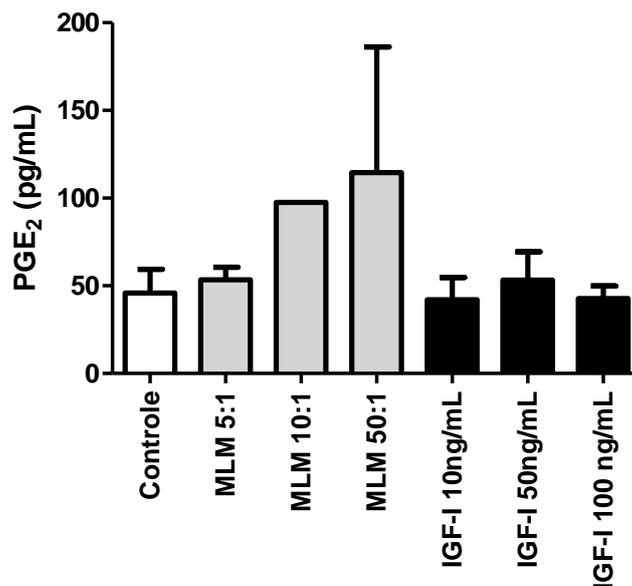


Figura 4.6: Avaliação da capacidade do IGF-I em induzir a produção de PGE₂ em monócitos. Análise dos níveis de PGE₂ em sobrenadantes de culturas de monócitos primários humanos estimulados com IGF-I em diferentes concentrações ou com *M. leprae* letalmente irradiado em diferentes proporções bactéria célula (5:1, 10:1 ou 50:1), por 48 horas (N=2). Os níveis de PGE₂ foram quantificado nos sobrenadantes de cultura por EIA.

4.7 *M. leprae* induz o aumento de RNAm de IGF-I em macrófagos humanos

Os ensaios que constituíram a primeira parte deste trabalho investigaram alguns aspectos do metabolismo lipídico de monócitos humanos que poderiam ser modulados pelo IGF-I, já que os trabalhos anteriores haviam analisado o efeito do *M. leprae* no metabolismo lipídico neste tipo celular (54,63). Contudo, como os macrófagos residentes nas lesões lepromatosas são considerados os nichos de replicação do *M. leprae*, achamos pertinente repetir esta análise num modelo de estudo de macrófagos diferenciados a partir de monócitos humanos de sangue periférico (MDM). Vale ressaltar que, anteriormente, nosso grupo já havia descrito a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão de IGF-I em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 (50), e, conforme descrito na literatura o IGF-I possui características lipogênicas (69).

O primeiro passo dessa parte do trabalho foi investigar se o *M. leprae* também seria capaz de induzir a expressão e produção de IGF-I em MDMs. Como podemos observar nas figuras 4.7A, o estímulo com o *M. leprae* na proporção bactéria:célula de 50:1, foi capaz de induzir um aumento significativo da expressão de RNAm para IGF-I

nestas células de maneira tempo dependente, chegando a 4 vezes de diferença frente ao controle não estimulado. Entretanto, não foi detectada diferença nos níveis proteicos de IGF-I quantificados nos sobrenadantes destas culturas (4.7B). Resultado semelhante foi observado quando utilizamos macrófagos obtidos por meio da diferenciação de monócitos da linhagem THP-1 (MdTHP-1). Verificamos que o *M. leprae* induziu um aumento significativo na expressão de RNAm para IGF-I de cerca de 4 vezes após 24 horas de estímulo (figura 4.8A). Já na dosagem de IGF-I nos sobrenadantes de culturas de MdTHP-1 podemos visualizar que independente da proporção bactéria:célula não conseguimos notar diferença na produção de IGF-I (figura 4.8B).

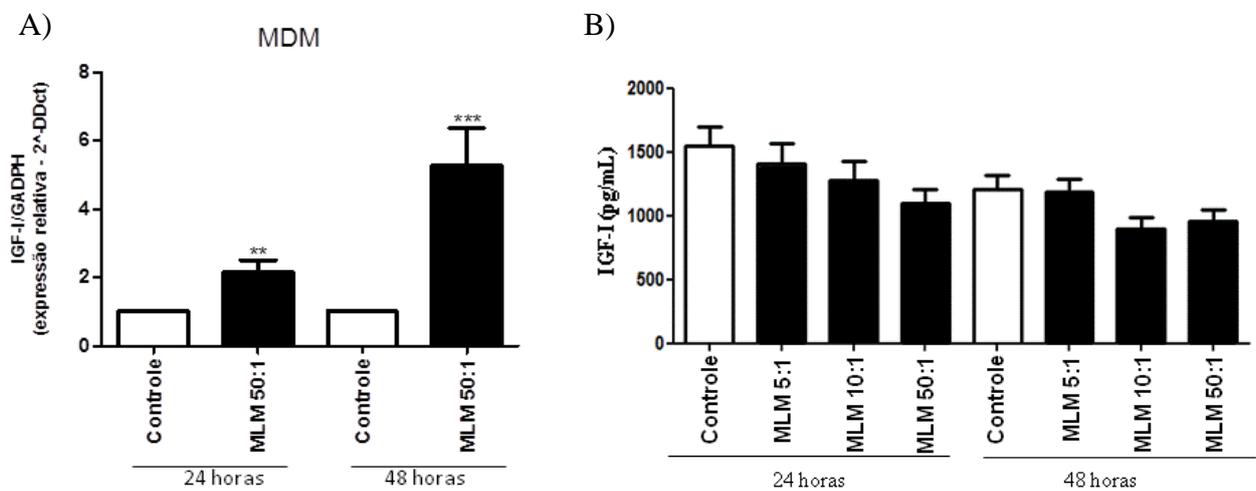


Figura 4.7: Modulação da expressão e secreção de IGF-I pelo *M. leprae* em macrófagos humanos derivados de monócitos (MDM). (A) Expressão gênica de IGF-I em MDMs estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1 durante 4 ou 24 horas, avaliados por RT-PCR em Tempo Real (N=3). (B) Níveis de IGF-I determinados por ELISA nos sobrenadantes de cultura de MDMs estimulados com *M. leprae* em diferentes multiplicidades de infecção (5:1, 10:1 ou 50:1) por 24 ou 48 horas (N=3).

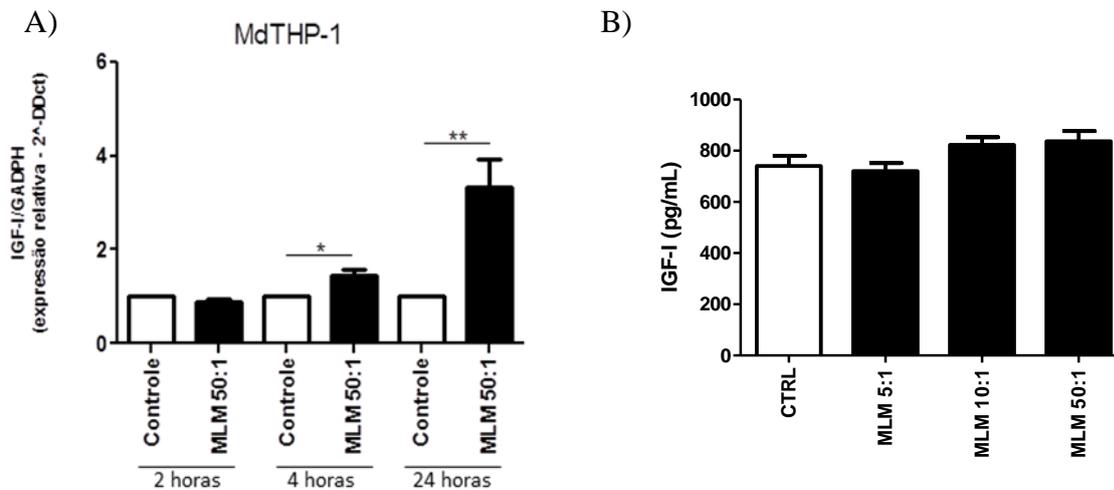


Figura 4.8: Modulação da expressão e secreção de IGF-I pelo *M. leprae* em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 (MdTHP-1). (A) Expressão gênica de IGF-I em MdTHP-1 estimulado com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria célula de 50:1 durante 2, 4 ou 24 horas, avaliados por RT-PCR tempo real (N=5). (B) Níveis de IGF-I nos sobrenadantes de culturas de MdTHP-1 estimuladas com *M. leprae* letalmente irradiado em diferentes concentrações (5:1, 10:1 ou 50:1) por 48 horas (N=5). $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.8 IGF-I induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos

Tendo em vista os dados anteriores obtidos em monócitos humanos em que o *M. leprae* e o IGF-I se mostraram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, nesta etapa investigamos se este mesmo fenômeno de indução de corpúsculos lipídicos se repetia em MDMs, utilizando as mesmas condições de ensaio.

Verificamos que o *M. leprae* letalmente irradiado se mostrou capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em MDM em cerca de 5 vezes frente ao controle (figura 4.9). Também o IGF-I foi capaz de induzir um aumento significativo na formação de corpúsculos (figura 4.9A) em macrófagos primários humanos em cerca de 10 vezes frente ao controle (figura 4.9B). A capacidade do IGF-I induzir corpúsculos lipídicos em MDMs foi reforçada por um aparente aumento na expressão de ADRP nestas células (figura 4.10).

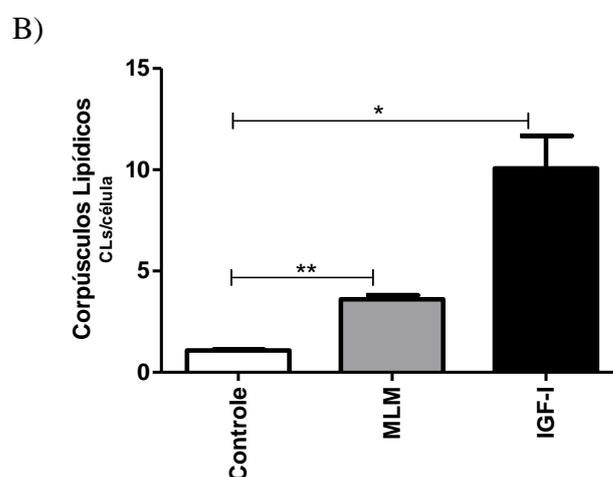
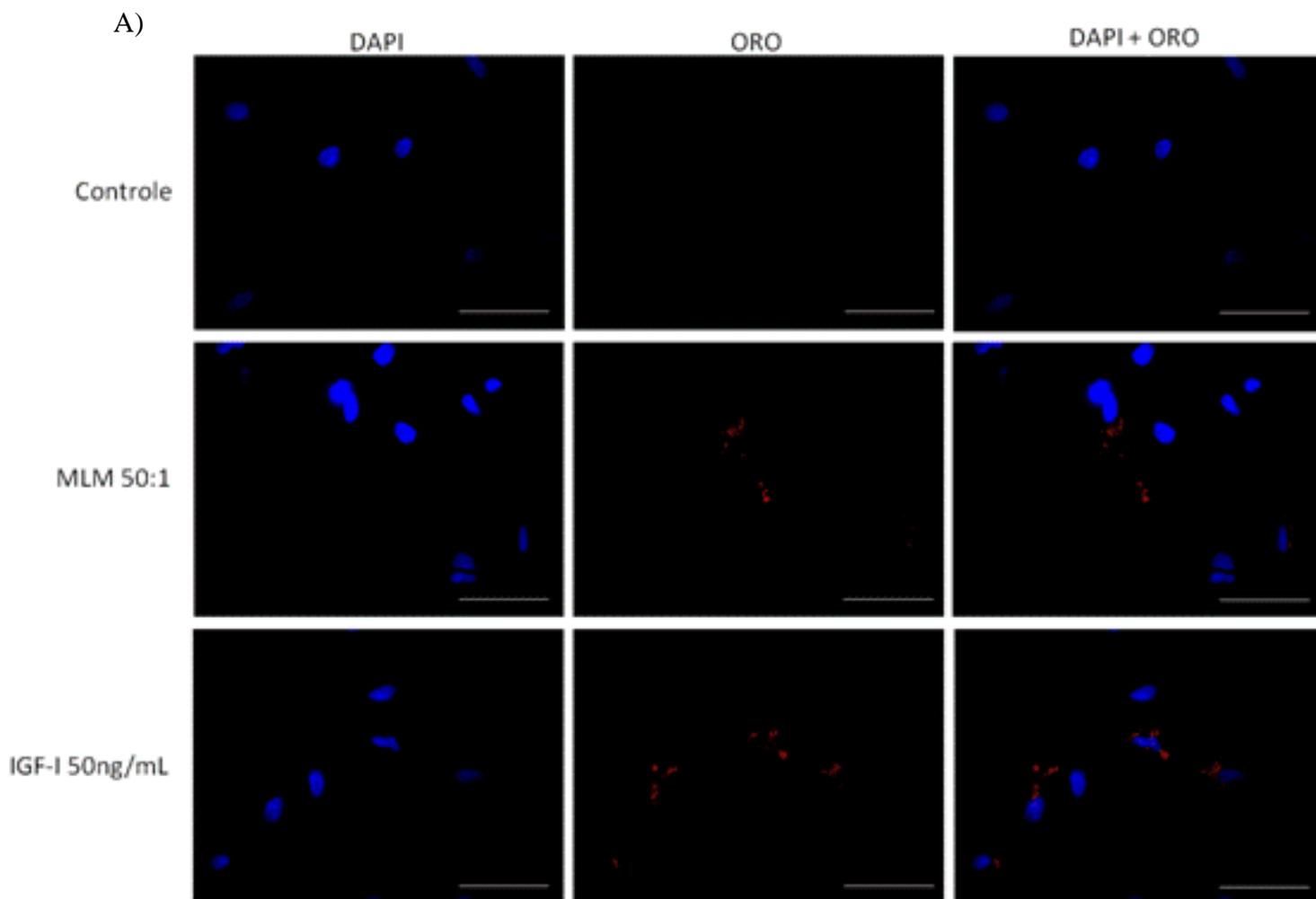


Figura 4.9: Modulação da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos pelo IGF-I por Oil Red O. (A) Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos primários humanos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria célula de 50:1 ou IGF-I recombinante (50ng/mL) por 48 horas. As células foram fixadas, os núcleos corados com DAPI e os corpúsculos evidenciados com Oil Red O. As imagens foram capturas em microscópio de fluorescência. (B) Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos primários humanos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado e IGF-I (50ng/mL) durante 48 horas. Foi realizada uma razão entre a quantidade de CLs/célula (N=3). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra de escala: 50 μ m; As imagens representativas foram feitas com aumento de 2 vezes frente a imagem original (DAPI + ORO).

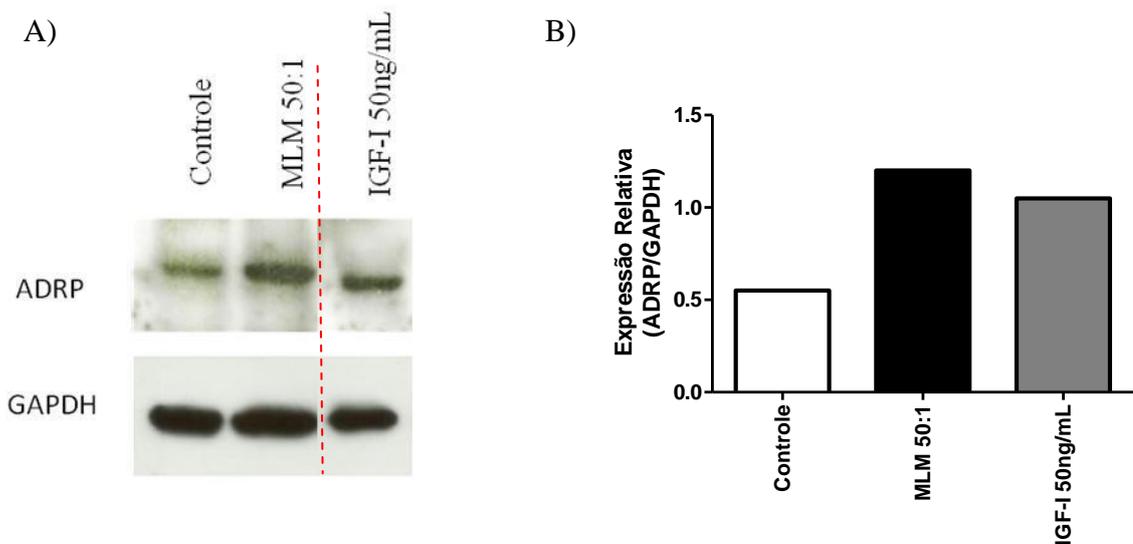


Figura 4.10: Avaliação da expressão de ADRP em macrófagos humanos derivados de monócitos (MDM) estimulados com IGF-I. (A) Expressão de ADRP em macrófagos primários humanos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria:célula de 50:1, ou estimulados com IGF-I (50ng/mL) por 48 horas, avaliada por Western blot. Como controle de carregamento foi utilizado o GAPDH (N=1) *Foram removidas as bandas sem significância para o experimento. (C) Análise densitométrica da figura B. *p<0,05.

4.9 Efeito do IGF-I na produção de Prostaglandina E₂ (PGE₂) por macrófagos humanos

Uma vez que os corpúsculos lipídicos são potenciais sítios de produção de PGE₂, e que não foi possível visualizar uma maior produção de PGE₂ em monócitos primários humanos, nesta etapa investigamos se, à semelhança dos monócitos, o IGF-I não seria capaz de induzir a secreção deste eicosanóide nos MDMs estimulados.

Corroborando com os dados da literatura, o *M. leprae* parece induzir a síntese de PGE₂ em macrófagos humanos, assim como em monócitos. De maneira interessante, o IGF-I, independente da dose utilizada, parece ser capaz de induzir a síntese de PGE₂ em MDMs após 48 horas de estímulo, ao contrário do observado em monócitos humanos (figura 4.11).

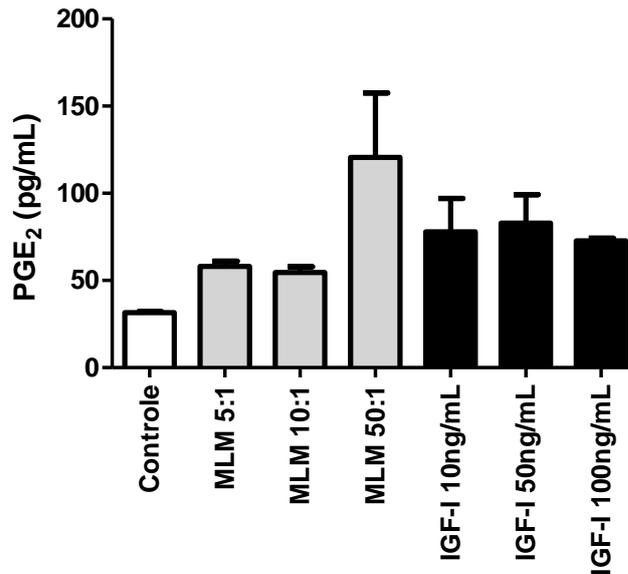


Figura 4.11 Avaliação da capacidade do IGF-I em induzir a produção de PGE₂ em macrófagos. Análise dos níveis de PGE₂ em sobrenadantes de culturas de macrófagos primários humanos estimulados com IGF-I em diferentes concentrações ou com *M. leprae* letalmente irradiado em diferentes proporções bactéria célula (5:1, 10:1 ou 50:1), por 48 horas (N=2). Os níveis de PGE₂ foram quantificados nos sobrenadantes de cultura por EIA.

4.10 Envolvimento do IGF-I na biogênese de corpúsculos lipídicos induzidos pelo *M. leprae* em macrófagos primários humanos

Após ser verificada a capacidade do IGF-I em induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos assim como em macrófagos primários humanos (figuras 4.9 e 4.10), e aliados aos dados da literatura que atribuem características lipogênicas ao IGF-I, surgiu a hipótese de que o IGF-I induzido pelo *M. leprae* poderia estar associado ao aumento da formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção em macrófagos humanos.

Para testar essa hipótese, foram realizados ensaios em que neutralizamos o receptor de IGF do tipo 1 (IGF-1R) em MDMs utilizando um anticorpo específico para este receptor, seguido do estímulo com *M. leprae*. De maneira interessante, ao neutralizarmos essa via, observamos uma redução na formação de corpúsculos lipídicos induzida pelo *M. leprae* em cerca de 70%, fazendo com que a neutralização pareça ter uma quantidade de corpúsculos lipídicos semelhante ao controle experimental, sem o estímulo com *M. leprae* (figura 4.12).

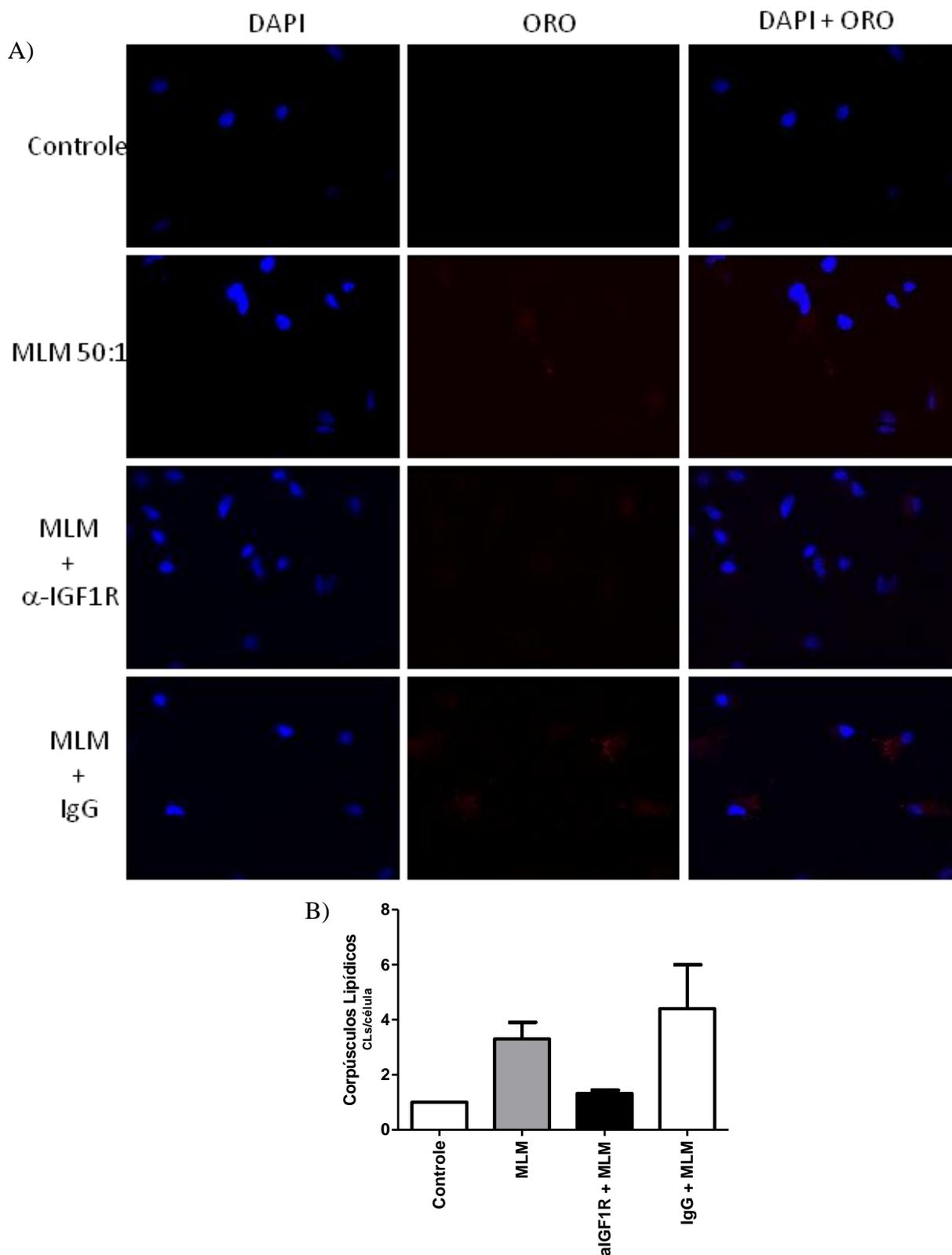


Figura 4.12: Participação do IGF-I na formação de corpúsculos lipídicos pelo *M. leprae* em macrófagos humanos (MDMs). (A) Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos primários humanos estimulados com *M. leprae* letalmente irradiado na proporção bactéria célula de 50:1 por 48 horas. As células foram fixadas, os núcleos corados com DAPI e os corpúsculos evidenciados com ORO. As imagens foram capturas em microscópio de fluorescência. (B) Quantificação de corpúsculos lipídicos em macrófagos primários humanos estimulados ou não com *M. leprae* letalmente irradiado após neutralização do receptor de IGF-I (IGF1R) ou IgG durante 48 horas. Foi realizada uma razão entre a quantidade de CLs/célula (N=2). Barra de escala: 50 μ m. As imagens representativas foram feitas com aumento de 2 vezes frente a imagem original (DAPI + ORO).

4.11 Envolvimento do IGF-I na sobrevivência do *M. leprae* em macrófagos humanos

Dados recentes da literatura demonstraram que a redução de corpúsculos lipídicos, associada à redução dos níveis de colesterol intracelular, foi capaz de reduzir a viabilidade do *M. leprae* em monócitos humanos (63). Surgiu, então, o questionamento se a neutralização da via de sinalização do IGF-I seria capaz de afetar a sobrevivência intracelular do *M. leprae*, visto que este hormônio, não somente foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, como é capaz de modular positivamente a expressão transcricional de enzimas responsáveis pela síntese de colesterol intracelular (69).

Para esta avaliação, foi utilizada a técnica de RNA de interferência (RNAi) para o receptor de IGF-I, o IGF1R. Devido à facilidade de transfecção, macrófagos derivados da linhagem THP-1 (MdTHP) foram utilizados nestes ensaios. Como podemos visualizar na figura 4.14A, o silenciamento do receptor IGF-1R foi eficiente, chegando a aproximadamente 75%, quando os níveis de RNAm de IGF1R nas células transfectadas com o RNAi IGF1R foram comparados com as células transfectadas com um RNAi controle.

Em seguida avaliamos o impacto da via de IGF-I sobre a viabilidade do *M. leprae*, determinando a viabilidade do bacilo por RT-PCR após 48 horas de infecção. A figura 4.13B mostra uma redução em cerca de 60% na viabilidade desta micobactéria nas células com a expressão reduzida de IGF1R.

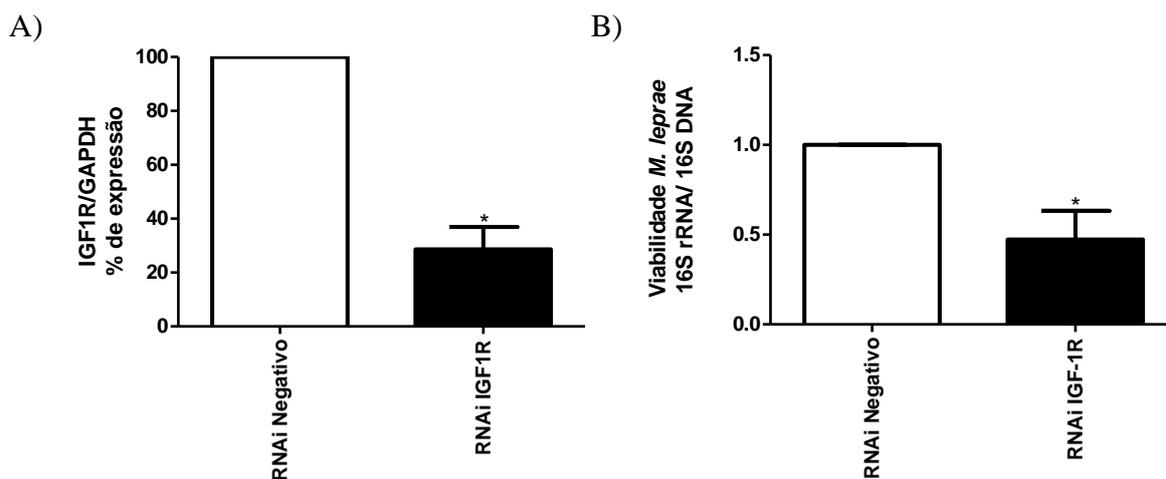


Figura 4.13: Avaliação do silenciamento de IGF1R sobre a viabilidade intracelular do *M. leprae* em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1 (MdTHP). (A) Expressão de RNAm para o receptor de IGF do tipo 1 em MdTHP transfectados com RNAi específico, ou com RNAi controle (N=3). Os níveis de RNAm de IGF1R foram determinados por RT-PCR quantitativo após 48 horas da transfecção com RNAi. (B) Viabilidade intracelular do *M. leprae* MdTHP, após infecção na MOI de 50:1 por 48 horas, avaliada por PCR (N=3). A viabilidade do *M. leprae* foi determinada pela razão entre a expressão de RNAm 16S e a expressão do DNA micobacteriano. *p<0,05.

4.12 IGF-I induzido pelo *M. leprae* inibe a expressão de catelicidina em macrófagos humanos

Dados do nosso grupo mostraram que o IGF-I é capaz de modular negativamente a via de iNOS/NO, principal via microbicida efetiva contra micobactérias em macrófagos murinos (11). Vale ressaltar que células humanas e murinas apresentam pequenas divergências entre os mecanismos imunológicos frente à infecções, em macrófagos humanos a via de produção de catelicidina dependente da vitamina D constitui um mecanismo microbicida fundamental contra micobactérias patogênicas (46). Baseado nestes dados, nesta etapa do trabalho testamos se o IGF-I induzido pelo *M. leprae* estaria modulando negativamente a produção de catelicidina em macrófagos humanos.

Com a neutralização da via de sinalização do IGF-I em macrófagos derivados da linhagem monocítica THP-1 com RNAi para o receptor IGF1R, houve um aumento em cerca de 3 vezes da expressão de catelicidina frente a infecção pelo *M. leprae*,

reforçando assim a hipótese de que o IGF-I apresenta um papel importante na modulação desta via essencial frente à infecção por micobactérias (figura 4.14).

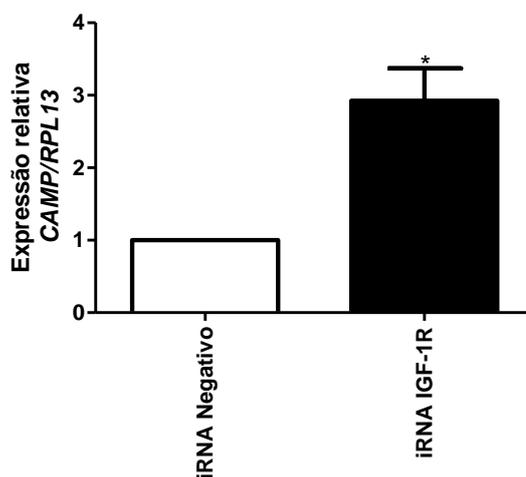


Figura 4.14: Avaliação do silenciamento IGF1R sobre a expressão de catelicidina frente à infecção pelo *M. leprae* em macrófagos humanos derivados da linhagem THP-1. Expressão de catelicidina determinados por RT-PCR quantitativo em MdTHP-1 transfectados com RNAi para o receptor de IGF do tipo 1, ou com RNAi controle, posteriormente infectados com *M. leprae* vivo (50:1) por 48 horas. (N=3). *p<0,05.

4.13 Seleção de SNPs no gene IGF-I que possam estar associados à Hanseníase – análise *in silico*

Os resultados apresentados até aqui, somados aos dados previamente obtidos por nosso grupo (11,82), indicam a participação do IGF-I na fisiopatogenia da hanseníase. Dessa forma, como última etapa deste trabalho, resolvemos avaliar a presença de SNPs no gene do IGF-I que pudessem influenciar o nível de expressão do gene e, assim, contribuir para uma maior resistência ou susceptibilidade genética à hanseníase. Para tal, iniciamos um estudo de genética de populações em que analisamos *in silico* a presença de SNPs no gene do IGF-I na população brasileira.

Nessa busca, foram identificados 193 SNPs no gene IGF-I presentes no banco de dados do EPIGEN. Dos 193 SNPs encontrados, 20 mostraram-se possíveis candidatos pelos resultados da anotação, ou seja, estavam presentes em regiões que poderiam estar

regulando a expressão gênica, como na região 3'UTR ou próximo ao gene (*nearGene*) (Tabela 4.1). Não foram encontrados SNPs que anteriormente haviam sido relacionados à regulação da expressão gênica no gene IGF-I nos bancos de dados consultados.

Tabela 2: Frequência dos SNPs selecionados pela análise *in silico*.

SNP	Classe Funcional	A1	A2	Bambuú	Salvador	Pelotas
rs17879774	near-gene-5	0	A	0	0	0
rs35767	near-gene-5	T	C	0,2257	0,3379	0,2206
rs5742612	near-gene-5	C	T	0,06223	0,05944	0,05758
rs6222	untranslated-3	T	C	0,02808	0,03293	0,02602
rs58690284	untranslated-3	A	G	0,002165	0,01128	0,001927
rs6220	untranslated-3	G	A	0,2951	0,3479	0,2987
rs3730192	untranslated-3	G	A	0,01351	0,01006	0,01261
rs17885397	untranslated-3	0	A	0	0	0
rs6219	untranslated-3	A	G	0,07087	0,07751	0,07884
rs3730205	untranslated-3	G	A	0,00486	0,01445	0,006437
rs6218	untranslated-3	G	A	0,03186	0,0261	0,02629
rs6217	untranslated-3	C	A	0,03189	0,02615	0,02603
rs6216	untranslated-3	C	A	0	0,001609	0
rs3730201	untranslated-3	G	T	0,00162	0,002008	0,002738
rs6215	untranslated-3	G	A	0,007584	0,01728	0,006034
rs5742707	untranslated-3	T	C	0,01136	0	0
rs3730204	untranslated-3	C	T	0,009804	0,006127	0,006764
rs190916416	untranslated-3	T	C	0,00054	0,001608	0,0006847
rs5742714	untranslated-3	C	G	0,08189	0,07742	0,07877
rs6214	untranslated-3	A	G	0,4568	0,4895	0,4235

Apenas os SNPs: rs35767, rs5742612, rs6220, rs6219, rs5742714 e rs6214 apresentaram frequência maior que 0,04 nas populações brasileiras (Tabela 4.1). A figura 4.15 representa a posição destes SNPs em relação ao gene IGF-I.

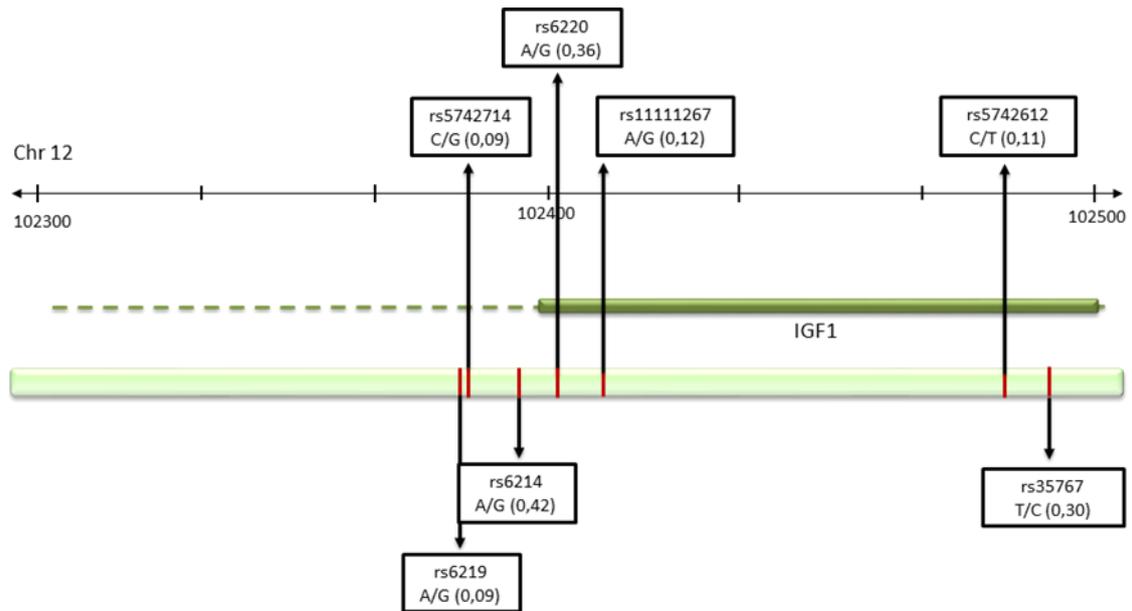


Figura 4.15: SNPs selecionados para o estudo de associação à hanseníase no gene IGF-I. Localização dos SNPs no gene IGF-I. Média da frequência alélica (MAF) Global: frequência do alelo minoritário (do inglês, “Minor Allele Frequency”) na população global (correspondente a 1094 indivíduos da fase 1 do 1000 Genomes).

A análise de desequilíbrio de ligação mostrou que o SNPs rs5742714 e rs6219 estão em desequilíbrio de ligação completo, logo não há a necessidade de genotipar ambos os SNPs, pois são passados juntos para a geração seguinte. Os demais se encontram em equilíbrio de ligação (Figura 4.16). Portanto, nossa análise revelou que poderiam ser genotipados um total de 5 SNPs do gene do IGF-I (rs35767, rs5742612, rs6219, rs5742714 e rs6214) na população brasileira para análise quanto à sua associação à resistência/susceptibilidade à hanseníase. Esta análise será realizada numa etapa posterior.

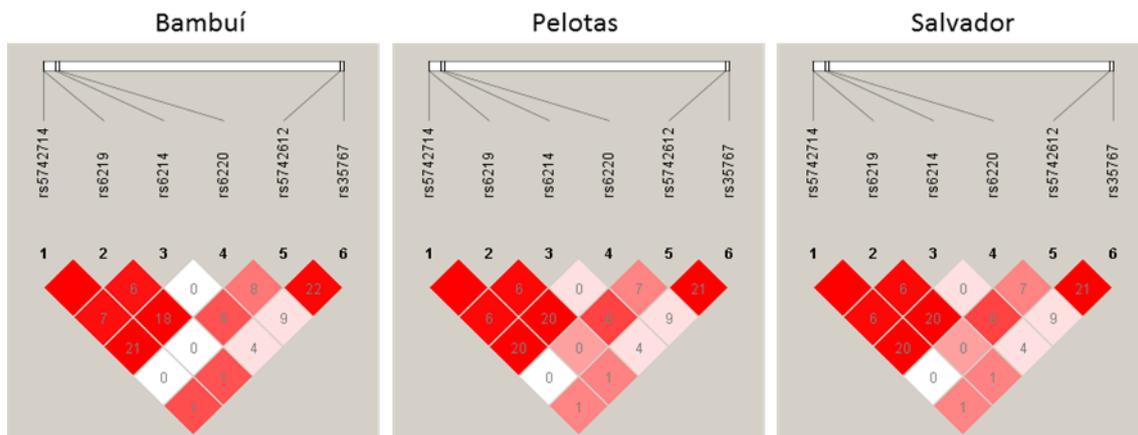


Figura 4.16 - Mapa de desequilíbrio de ligação (LD) dos SNPs nas populações de Bambuí, Pelotas e Salvador: Avaliação do desequilíbrio de ligação entre os SNPs candidatos ao estudo de associação à Hanseníase baseado em dados obtidos pelo Epigen. Os valores de LD são dados em r^2 , aonde $r^2 < 50$ é considerado um LD fraco, $50 < r^2 < 80$ é considerado um LD moderado e $r^2 > 80$ é considerado um LD forte.

5. Discussão

Nos últimos anos, o estudo das ações biológicas mediadas pelo fator de crescimento semelhante à insulina I, o IGF-I, vem ganhando destaque devido ao seu papel anti-inflamatório, imunomodulador, assim como sua participação no reparo tecidual (70). Sabe-se, por exemplo, que a sinalização através do receptor IGF-1R pode antagonizar efeitos neurodegenerativos provocados pela produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias como o TNF e, ainda contribuir para a diferenciação de neurônios (87). Mais recentemente, foi visto que o IGF-I foi capaz suprimir a resposta inflamatória através da alteração do fenótipo de monócitos, em modelo experimental de doença inflamatória intestinal (88).

Dados da literatura indicam, ainda, que o IGF-I favorece a infecção por *Leishmania amazonensis*, um patógeno intracelular que apresenta tropismo por macrófagos. Um estudo pioneiro, o grupo da Dra. Hiro Goto, da Universidade de São Paulo, demonstrou um aumento no tamanho das lesões da pata de camundongos infectados com formas promastigotas de *Leishmania* pré-tratadas com IGF-I, além de um aumento no número de parasitas (76,77). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que o IGF-I poderia atuar diretamente como um fator de crescimento para o parasita – uma vez que este expressa o receptor para IGF-I, além de exercer ação moduladora sobre macrófagos, evidenciada pelo aumento da expressão de arginase e consequente inibição da produção de óxido nítrico – um potente agente microbicida (79,81). Esses dados foram confirmados por Osório e colaboradores, onde, foi demonstrado que o IGF-I e a IL-4 aumentam a atividade de STAT-6, que por sua vez, induz um aumento na expressão de arginase favorecendo a sobrevivência e persistência da *Leishmania* em macrófagos (89). Ainda na infecção por *Leishmania*, Dalton e colaboradores (2010) demonstraram que ao inibir a ativação de receptores do tipo tirosina quinases durante a infecção, havia uma recuperação da resposta imunológica efetora e produção de óxido nítrico frente à infecção (90).

Levando em consideração as ações pleiotrópicas do IGF-I e seu papel na infecção por *Leishmania*, desde 2005 nosso grupo vem investigando o possível envolvimento deste fator de crescimento na patogênese da hanseníase. Inicialmente, tentando explicar a aparente ausência de toxicidade e morte celular em fragmentos de nervo de pacientes com a forma lepromatosa da doença (91), nosso grupo demonstrou

que o *M. leprae* é capaz de inibir a apoptose de células de Schwann humanas mantidas em condições livres de soro através da indução de IGF-I por estas células (82). Mais tarde, estudos na mesma linha visaram avaliar a capacidade do IGF-I em modular a resposta microbicida de macrófagos. Utilizando modelo murino, derivado da linhagem RAW 264.7, nosso grupo demonstrou que, à semelhança do que foi observado em células de Schwann, o *M. leprae* foi também capaz de induzir IGF-I em macrófagos e, ainda, a neutralização da via de sinalização de IGF-I não apenas restaurou a capacidade destas células em responder ao *M. leprae* através do aumento na produção de NO, como também reduziu a viabilidade do bacilo. Adicionalmente, IGF-I exógeno foi capaz de alterar a resposta microbicida de macrófagos murinos frente à micobactérias avirulentas como *M. bovis* BCG e *M. smegmatis*, de maneira a garantir a sobrevivência intracelular destas micobactérias (11). Estes estudos sugeriram um importante papel do IGF-I na patogênese da hanseníase, desvendando uma nova estratégia de sobrevivência e persistência do *M. leprae* na célula hospedeira.

Além das características anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras do IGF-I, a literatura vem apontando que este hormônio é capaz de regular positivamente uma gama de genes envolvidos no metabolismo lipídico, tais como aqueles que codificam as enzimas HMGCoA redutase (etapa limitante na biossíntese de colesterol) e ácido graxo sintase (FAS; enzima envolvida na biossíntese de ácidos graxos), além de receptores de LDL e fatores de transcrição como SREBP-1 e -2 em mioblastos – modulação esta favorável ao acúmulo de lipídeos intracelulares (69).

Em conjunto, os dados levantados até aqui nos motivaram, através do presente estudo, a compreender melhor o envolvimento do IGF-I na interação do *M. leprae* com macrófagos humanos, visto que estas células constituem verdadeiros nichos de sobrevivência e replicação do bacilo na pele de pacientes lepromatosos – constituindo esta uma característica histológica marcante nesta forma clínica da hanseníase (1).

Inicialmente, tentamos traçar um paralelo com dados recentemente publicados também pelo nosso grupo, os quais demonstraram a capacidade do *M. leprae* em modular o metabolismo lipídico da célula hospedeira através da indução de corpúsculos lipídicos (54,62). Assim, como uma primeira etapa do estudo, buscamos avaliar se o estímulo com IGF-I seria capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos. Foi realizada, então, uma cinética temporal de indução de corpúsculos lipídicos em monócitos primários humanos, utilizando como controle positivo o estímulo com *M. leprae* letalmente irradiado – devido, principalmente, à

dificuldade de obtenção de bacilos vivos e também como base de comparação aos estudos previamente publicados (54). De maneira interessante, verificamos que a adição de IGF-I exógeno às culturas foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos primários humanos de maneira tempo-dependente (figura 4.1), à semelhança do que nosso grupo observou previamente com o estímulo de *M. leprae* viável ou letalmente irradiado (54). A fim de reforçarmos este achado, avaliamos a expressão de ADRP, uma proteína estrutural dos corpúsculos lipídicos (58). Corroborando os dados anteriores, a expressão de ADRP foi regulada positivamente por IGF-I em culturas de monócitos primários humanos tanto a nível transcricional quanto proteico (figura 4.2).

Estudos anteriores já buscavam compreender os mecanismos de indução de corpúsculos lipídicos pelo *M. bovis* BCG em macrófagos, apontando a participação de TLR-2 (92). De maneira complementar, Almeida e colaboradores (93) demonstraram a necessidade do fator de transcrição PPAR- γ na indução destas organelas por esta micobactéria. No caso específico do *M. leprae*, nosso grupo demonstrou a participação dos receptores TLR-2 e -6 como um importante mecanismo de indução da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos (54,62). Foi verificada, ainda, por estudos *in vitro*, a capacidade do bacilo em induzir a captação e acúmulo de colesterol intracelular, além da expressão diferencial de receptores de LDL, enzimas e fatores de transcrição essenciais na biossíntese e captação de colesterol, em fragmentos de pele de pacientes com as formas polares da hanseníase (63). Em conjunto, estes estudos abriram uma nova visão sobre estratégias auxiliares no tratamento na hanseníase (64), às quais serão discutidas adiante.

Um possível mecanismo pelo qual o IGF-I poderia estar atuando na indução da formação de corpúsculos lipídicos em monócitos humanos seria através da indução da síntese “*de novo*” de ácidos graxos e colesterol. Liang e colaboradores (94) demonstraram a capacidade deste fator de crescimento levar à produção de mielina por células de Schwann em co-culturas com neurônios de gânglios da raiz dorsal de ratos. Além disso, conforme descrito na literatura, o IGF-I está envolvido na modulação transcricional de elementos envolvidos na síntese e acúmulo de lipídeos como a HMGCoA redutase e FAS (69). Dado isto, um próximo passo do nosso trabalho foi investigar se o IGF-I poderia estar modulando a transcrição destas enzimas em monócitos primários humanos.

Corroborando os dados publicados por Mattos e colaboradores (63), o estímulo de *M. leprae* irradiado foi capaz de induzir um aumento significativo na expressão de HMGCoA redutase em monócitos humanos e o IGF-I adicionado às culturas produziu efeito semelhante (figura 4.3A). Também investigamos a capacidade de IGF-I em induzir a expressão de FAS em monócitos primários humanos, assim como a capacidade de *M. leprae* em modular a expressão desta enzima. Como pode ser observado neste estudo, o *M. leprae* foi capaz de regular positivamente a expressão de FAS nestas células, dado este ainda não investigado anteriormente. Já o estímulo com IGF-I, embora tenha apresentado uma tendência de indução de aumento na expressão da enzima FAS, isto não foi estatisticamente significativo (figura 4.3B). Ensaio adicionais necessitam ser realizados a fim de melhor esclarecer este ponto do trabalho.

Após demonstrarmos a capacidade do IGF-I em modular positivamente a expressão de HMGCoA redutase, investigamos se estaria havendo um acúmulo de colesterol intracelular nesses monócitos estimulados com este fator de crescimento. Corroborando aos dados publicados por Mattos e colaboradores (63), o *M. leprae* foi capaz de induzir um aumento no acúmulo de colesterol intracelular após 24 horas de estímulo, além de manter uma tendência de aumento frente ao controle após 48 horas de estímulo. De maneira curiosa não conseguimos observar acúmulo de colesterol em monócitos estimulados com IGF-I (figura 4.5). Esperávamos que o estímulo de IGF-I fosse capaz de induzir o acúmulo de colesterol intracelular, visto que além de verificarmos uma maior expressão gênica da principal enzima da síntese de colesterol (HMGCoA redutase), observamos que o IGF-I foi incapaz reduzir a expressão dos transportadores reversos de colesterol, painel esse que teoricamente favoreceria o acúmulo. Alguns questionamentos surgiram a partir deste resultado. Um primeiro ponto estaria relacionado a algum desvio na via de biossíntese de colesterol, que levaria a formação de outro produto. Um segundo ponto que merece ser levado em consideração está relacionado ao dogma central da biologia molecular, onde nem todo transcrito é, de fato, traduzido, portanto poderia estar havendo uma regulação pós-transcricional impedindo a atividade desta enzima. O não acúmulo de colesterol na célula, a despeito da capacidade de IGF-I de induzir a biogênese de CLs, pode sugerir uma composição de lipídeos neutros preferencialmente de triacilglicerídeos nos CLs induzidos por IGF-I.

Tendo em vista que não foi observada uma ação do IGF-I sobre o acúmulo de colesterol em monócitos humanos (figura 4.5), investigamos um outro pilar

complementar a esse painel de acúmulo de colesterol, que são os transportadores reversos de colesterol ABCA1 e ABCG1 – os quais ainda não foram avaliados no contexto da infecção pelo *M. leprae*. De maneira interessante, o *M. leprae* se mostrou capaz de induzir um aumento na expressão de ambos esses transportadores, dado este que poderia estar relacionado a um mecanismo de equilíbrio em resposta ao exacerbado acúmulo de colesterol anteriormente descrito pela micobactéria. Já o IGF-I não se mostrou capaz de modular transcricionalmente a expressão de ABCA1 nem de ABCG1 (figura 4.4). A capacidade do IGF-I em modular a expressão desses transportadores reversos de colesterol já foi investigada em macrófagos derivados da linhagem THP-1, onde os autores verificaram que o IGF-I regula negativamente a expressão destes (95), dado este que estaria de acordo com a literatura em que é demonstrada uma regulação negativa da LxR pelo IGF-I, culminando numa menor expressão de ABCA1 e ABCG1.

Mattos e colaboradores (54) observaram uma correlação entre a indução de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE₂ durante a interação do *M. leprae* com monócitos humanos, apontando para os corpúsculos como sítios de produção deste mediador lipídico. Por outro lado, já havia sido descrito que o estímulo com IGF-I era capaz de induzir a expressão de cicloxigenases e de PGE₂ em células de linhagem de câncer de ovário (96). Visto que constatamos que o IGF-I induzia a biogênese de CLs em monócitos e macrófagos, no presente estudo investigamos se o estímulo com IGF-I também era acompanhado de produção de PGE₂ nestas células (figuras 4.6 e 4.11). Os resultados preliminares obtidos sugerem que, enquanto uma tendência de indução de PGE₂ pelo *M. leprae* foi observada nos dois tipos celulares, o IGF-I parece ser capaz de induzir PGE₂ somente em macrófagos. Contudo, novos experimentos são necessários para confirmar esta observação. Este resultado está de acordo com ensaios anteriores realizados com macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 que mostraram que o IGF-I era capaz de induzir um aumento da produção de PGE₂ nestas células (50). De fato, recentemente observamos que células RAW264.7, ao serem estimuladas com IGF-I, apresentam uma maior expressão de RNAm para COX-2 e PTGES₂, enzimas envolvidas na síntese de PGE₂ (dados não mostrados).

Análises de expressão gênica e por imunohistoquímica para a expressão de IGF-I em lesões de pele pacientes com as formas polares da hanseníase, previamente realizadas pelo nosso grupo, mostraram uma maior expressão de IGF-I na lesão de pacientes LL quando comparadas a lesão de pacientes com a forma BT. Além disso, foi verificado que a marcação para IGF-I localizou-se preferencialmente em macrófagos

espumosos, sugerindo assim que estas células sejam responsáveis pelo aumento na expressão de IGF-I na lesão, assim como reforçam a conexão entre IGF e o metabolismo lipídico (Silva *et al.*, manuscrito submetido).

Baseado nestes resultados, aspectos da modulação do metabolismo lipídico por IGF-I foram, também, avaliados em macrófagos humanos. Nesta etapa do trabalho, nos perguntamos inicialmente se o *M. leprae* modularia a expressão de IGF-I nestas células *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o *M. leprae* é capaz de induzir um aumento significativo na expressão de RNAm para IGF-I em macrófagos primários humanos, assim como em macrófagos derivados da linhagem THP-1 (figuras 4.7 e 4.8, respectivamente). De maneira curiosa, não conseguimos observar um aumento na síntese proteica de IGF-I a partir da análise de sobrenadantes por ELISA. Este fato se mostrou persistente em diversas dosagens realizadas. De fato, vale a pena mencionar que esta mesma dificuldade de detecção de IGF-I em sobrenadantes de cultura foi observada em diversos outros trabalhos que relataram a indução e/ou ativação da via de IGF-I, nos levando a considerar a hipótese de que seja uma grande dificuldade dosar este fator de crescimento. Uma maneira para contornar este impasse seria a realização de um ensaio de western blot para o IGF-I a partir do lisado das células, como demonstrado por Rong-Tie Ge e colaboradores (88). Uma possível explicação para este fato curioso seria o tempo curto de disponibilidade do IGF-I livre no sobrenadante. Acreditamos que este hormônio, dado sua atividade autócrina/parácrina, seja rapidamente consumido pelas células, mantendo-se sempre em níveis baixos no sobrenadante das culturas.

Nossos dados mostrando a indução de RNAm para IGF-I pelo *M. leprae* estão de acordo com aqueles previamente descritos pelo nosso grupo tanto em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 quanto em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* (50,82). Nestes dois trabalhos foi possível, ainda, detectar diferenças significativas da expressão de IGF-I a nível proteico. Também estão de acordo com a expressão acentuada de IGF-I observada nos macrófagos espumosos presentes nas lesões de pele de pacientes lepromatosos (Silva *et al.*, manuscrito submetido). Neste último caso, contudo, o microambiente da lesão lepromatosa rico em citocinas de caráter anti-inflamatório como IL-4 e IL-13, que reconhecidamente regulam positivamente a expressão de IGF-I, poderiam estar contribuindo para esta indução deste fator (97,98).

Macrófagos primários humanos estimulados com IGF-I recombinante revelaram, por ensaio utilizando microscopia fluorescente, que este fator de crescimento foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nestas células (figura 4.9). Reforçando esses dados, foi verificada uma maior expressão de ADRP por Western blot quando macrófagos primários humanos foram estimulados com IGF-I (figura 4.10). Após atestarmos a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão de IGF-I em macrófagos humanos, assim como a capacidade do IGF-I em induzir a formação de corpúsculos lipídicos em monócitos e macrófagos humanos, fomos avaliar se o IGF-I induzido pelo *M. leprae* estaria participando na biogênese de corpúsculos modulada pela micobactéria. Para isso, foram realizados experimentos utilizando anticorpo neutralizante para o receptor IGF-1R e posterior estimulação com *M. leprae* letalmente irradiado. Os nossos resultados sugerem que o pré-tratamento de macrófagos primários humanos com anticorpo neutralizante anti-IGF-1R (α -IGF-1R) reduz a formação de corpúsculos lipídicos induzidos pelo *M. leprae* (Figura 4.12). Experimentos adicionais serão realizados para confirmar esta observação.

Em culturas de monócitos infectados/estimulados pelo *M. leprae* foi previamente observado que tanto as células que haviam internalizado o *M. leprae* assim como aquelas que não haviam internalizado apresentavam biogênese aumentada de CLs, sugerindo, assim, a participação de fatores solúveis na biogênese de corpúsculos lipídicos (54). Estes dados foram, ainda, confirmados por ensaios utilizando meio condicionado proveniente de culturas de monócitos estimulados com *M. leprae*, os quais quando adicionados a culturas não infectadas mimetizaram o efeito da bactéria na indução de corpúsculos lipídicos. Estes dados reforçam a ideia de que o IGF-I, uma vez sendo induzido pela bactéria, poderia ser um candidato para a indução desta organela por meio de sua atividade parácrina. A adição de anticorpo neutralizante para IGF nos meios condicionados de monócitos/macrófagos poderiam confirmar esta hipótese em experimentos futuros.

Estudos atuais apontam a importância da modulação do metabolismo lipídico na célula hospedeira para a sobrevivência do *M. leprae*. Em um estudo *in vitro* foi demonstrado que a diminuição dos níveis de colesterol intracelular reduz significativamente a sobrevivência do *M. leprae* em macrófagos humanos (63). Posteriormente, Lobato e colaboradores (64) demonstraram em modelo experimental de camundongos infectados com *M. leprae* que o tratamento com estatinas, inibidores clássicos da HMGCoA redutase, era capaz de aumentar a capacidade microbicida da

rifampicina, ao mesmo tempo que diminuía a reação inflamatória no local da infecção. Mais tarde, ao tentar compreender a importância do colesterol na sobrevivência intracelular do *M. leprae*, foi demonstrado que o *M. leprae* não é capaz de utilizar o colesterol como fonte de carbono e energia, apontando para funções alternativas da via do mevalonato durante a infecção, como a modulação da resposta imune inata da célula hospedeira (99). Com isso, surgiu o questionamento se o IGF-I seria capaz de afetar a sobrevivência intracelular do *M. leprae*, visto que este hormônio não somente foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, como era capaz de modular positivamente a expressão transcricional da enzima HMGCoA redutase .

Utilizando a tecnologia de RNA de interferência (RNAi) para o receptor IGF-1R durante a infecção em macrófagos derivados da linhagem THP-1, verificamos que houve uma queda significativa na viabilidade do *M. leprae* (figura 4.13B). Vale ressaltar que a eficácia do silenciamento com RNAi para o receptor foi confirmada por RT-PCR quantitativo, onde foi verificado que este estava sendo menos expresso em cerca de 75% (figura 4.13A).

A partir deste dado, confirmamos a importância do IGF-I para a sobrevivência intracelular do *M. leprae*. Acreditamos que a morte do bacilo tenha ocorrido devido ao retorno da atividade efetora desses macrófagos. Dados do nosso grupo (11) demonstraram que o IGF-I é capaz de modular negativamente a via de iNOS/NO, principal via microbicida efetiva contra micobactérias em macrófagos murinos (11). Essa via de produção de NO é regulada pelo IFN- γ , o qual é reconhecido pelo receptor de IFN que, em consequência ativa a fosforilação de JAK/STAT formando um homodímero STAT-1/STAT-1, que por sua vez leva a expressão de iNOS e consequente produção de NO (100). Nosso grupo também avaliou o que estaria sendo regulado pelo *M. leprae* para evitar a produção de NO, e foi verificado que através da produção de IGF-I, o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão de SOCS3 cuja atividade inibe a produção de NO via IFN- γ (11). Além disso, o IFN- γ pode ativar a via de vitamina D através da IL-15. Em outras palavras, o IFN- γ induz a produção de IL-15 pelos macrófagos, que de maneira autócrina ativa a via de vitamina D e consequente produção de catelicidina – um potente peptídeo anti-microbiano (101). Um estudo realizado com *Mycobacterium tuberculosis* demonstrou que a via de produção de catelicidina, dependente da vitamina D, constitui um mecanismo microbicida fundamental contra micobactérias em macrófagos humanos (46).

Dado o exposto, avaliamos se o IGF-I induzido pelo *M. leprae* estaria modulando a expressão de catelicidina em macrófagos humanos. Conforme demonstrado na figura 4.14, a neutralização da via de sinalização de IGF-I – dada pela utilização de RNAi para o receptor IGF-1R – induziu um aumento na expressão de catelicidina frente à infecção pelo *M. leprae*. Hipotetizamos, desta forma, que a manutenção da viabilidade intracelular do *M. leprae* sustentada pela produção de IGF-I poderia estar de alguma forma vinculada à modulação da expressão de catelicidina, sendo este, um outro mecanismo da ação moduladora de IGF-I na célula hospedeira durante a infecção pelo *M. leprae*. Esse dado pode ser explicado, também, pelo aumento na produção de PGE₂ nesses macrófagos via IGF-I, visto que já foi descrito em inflamações agudas, como o câncer de mama, uma correlação inversa entre a via de vitamina D e o PGE₂. Neste contexto em específico foi encontrada uma alta expressão de COX-2 e produção de PGE₂ nesse sítio inflamatório, seguido de uma inibição da atividade da via de vitamina D (102). Além disso, já foi demonstrado que a ativação do receptor de vitamina D (VDR) é capaz de reduzir a produção de PGE₂ em fibroblastos humanos (103).

Conforme foi sendo realizada essa análise funcional da participação do IGF-I na infecção pelo *M. leprae*, foram surgindo diversos questionamentos e desdobramentos a cerca deste tema. Um ponto que nos chamou muita atenção foi em relação aos marcadores genéticos associados à hanseníase, tendo em vista que esse tipo de abordagem vem sendo amplamente estudado em diversas doenças. Com isso, surgiu a hipótese de que polimorfismos (SNP) no gene do IGF-I poderiam estar regulando a expressão basal em alguns indivíduos, e que estes SNPs poderiam, então, estar associados a uma maior susceptibilidade ou proteção à hanseníase, visto que nossos ensaios funcionais demonstraram a importância desse hormônio para a persistência do *M. leprae* na célula hospedeira.

Dado este questionamento, como abordagem final e complementar a este estudo, foi realizada uma busca *in silico* dos SNPs presentes no gene IGF-I na população brasileira, utilizando o banco de dados EPIGEN (104). Foram identificados 193 SNPs no gene IGF-I, porém após uma série de análises, esses SNPs foram filtrados e chegamos ao número de 6 SNPs com frequência expressiva na população brasileira que poderiam estar atuando na regulação da expressão deste gene. Também realizamos uma

busca por eQTLs nesses SNPs em dois diferentes bancos de dados, mas nenhum destes SNPs haviam sido caracterizados como eQTLs.

Esta análise, embora preliminar, se mostrou bem interessante, pois ao buscarmos na literatura artigos associados a estes SNPs em outras doenças ou desordens metabólicas, descobrimos que o SNP rs35767 já foi associado ao risco de osteoporose em um estudo de genética de populações na China (105,106), e ainda, foi associado ao risco em câncer de próstata também na população chinesa (107). Já os SNP rs5742612 e rs5742714, em um estudo preliminar realizado na população japonesa, quando associados à obesidade podem aumentar o risco no desenvolvimento de câncer de pâncreas (108).

O SNP rs6220 foi descrito como um facilitador para a ocorrência de câncer de próstata, visto que além de associar este polimorfismo à ocorrência deste tipo de câncer, os autores implicaram em uma maior produção de IGF-I, logo a presença deste SNP facilitaria o surgimento do câncer dado esse aumento de IGF-I circulante (109). Não existe nada descrito na literatura sobre o SNP rs6219. Já o SNP rs6214 foi associado à ocorrência de câncer de gastrointestinal (110) e ao desenvolvimento de acidente vascular encefálico (AVE) (111).

Mesmo não tendo encontrado nenhum polimorfismo anteriormente descrito sendo relacionado à resposta inflamatória, acreditamos que esses SNPs apresentam uma potencial funcionalidade na patogênese da hanseníase. Um próximo passo para elucidarmos se algum SNP estaria, de fato, associado à hanseníase será a realização da genotipagem de pacientes diagnosticados com hanseníase e de indivíduos saudáveis. Como uma perspectiva deste trabalho, iremos concluir as análises genéticas, e quem sabe identificar mais um marcador molecular para o adoecimento em hanseníase.

6. Conclusão

Com os resultados obtidos nesse trabalho, concluímos que o IGF-I é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos tanto em monócitos, quanto em macrófagos primários humanos. Buscando entender que alterações no metabolismo lipídico poderiam justificar a biogênese de CLs induzida pelo IGF-I, observamos aumento dos níveis de RNAm da enzima HMGCoA redutase, mas sem, contudo, observar qualquer alteração na expressão dos transportadores reversos ABCA1 e ABCG1 e nos níveis intracelulares de colesterol. Também não observamos alteração nos níveis de RNAm para FAS, indicando que efeitos do hormônio em outros pontos não investigados do metabolismo celular devem ser responsáveis pelo efeito lipídico observado. Dados iniciais apresentados neste trabalho também sugerem que o IGF-I tem um importante papel na indução de corpúsculos induzida pelo *M. leprae*. Finalmente, foi demonstrado que o IGF-I modula negativamente a expressão de catelicidina, produto da via microbicida dependente de vitamina D, favorecendo a sobrevivência do *M. leprae*. Em conjunto, nossos dados indicam a importância do IGF-I na persistência e sobrevivência do *M. leprae* em macrófagos humanos através da atenuação da resposta imune inata microbicida destas células e favorecimento do acúmulo de lipídeos, contribuindo para a formação de um microambiente favorável a este patógeno. Esperamos que os dados obtidos a partir do presente estudo possam impactar de maneira significativa na geração de novas estratégias de controle e tratamento da hanseníase.

7. Perspectivas

- Novos ensaios precisam ser realizados para avaliarmos a capacidade do IGF-I em induzir a síntese de PGE₂, tanto em monócitos primários quanto em macrófagos primários.
- Mais experimentos utilizando anticorpo neutralizante para o receptor de IGF-I seguido do estímulo com *M. leprae* deverão ser realizados para que possamos fechar o N experimental da microscopia que mostra uma queda na formação de corpúsculos lipídicos pelo *M. leprae* quando inibida a via de IGF-I.
- Ensaios para microscopia utilizando RNAi específico para o receptor IGF1R seguido da infecção pelo *M. leprae* serão realizados para que possamos confirmar o dado anteriormente obtido com a neutralização da via de sinalização mediada pelo IGF1R com anticorpo neutralizante.
- É de extrema importância que seja realizada a avaliação da expressão de ADRP em macrófagos derivados da linhagem THP-1 transfectados com RNAi para o receptor IGF1R seguido da infecção pelo *M. leprae*, visto que este dado reforçaria a nossa hipótese do envolvimento deste receptor para a indução de corpúsculos lipídicos pelo *M. leprae*.
- Avaliaremos, também, se o IGF-I seria capaz de modular a expressão de PPAR- γ .
- Com a análise in silico dos SNPs existentes no gene IGF-I surgiram possíveis alvos genéticos que poderiam estar associados ao adoecimento em hanseníase. Logo, serão desenhadas sondas específicas para cada SNPs para que possamos realizar um estudo de caso-controle a fim de, através de genotipagem, correlacionar ou não esses SNPs à doença. O mesmo tipo de análise será realizado para o receptor IGF-1R.

8. Referências

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. 2006;19(2):338–81.
2. Robbins G, Mushrif Tripathy V, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). PLoS One. 2009;4(5):1–8.
3. Situação Epidemiológica - Dados [Internet]. Ministério da Saúde. 2014 [cited 2016 Jan 1]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/705-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hanseniose/11298-situacao-epidemiologica-dados>
4. Ress RFW. The microbiology of leprosy. New York: Churchill Livingstone Inc; 1985.
5. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature [Internet]. 2001;409(6823):1007–11.
6. 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.
7. Katoch VM. Molecular techniques for leprosy: present applications and future perspectives. Indian J Lepr. 1999;71(1):45–59.
8. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc. 2001;69(1):1–12.
9. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. J Med Microbiol. 2005;54(3):235–42.
10. Patrocínio LG, Goulart IMB, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;44(3):311–6.

11. Ribeiro LS. Estudo do papel do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) na modulação funcional de macrófagos infectados pelo *Mycobacterium leprae*. Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz; 2014.
12. 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. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3154–9.
13. 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. *J Clin Microbiol*. 2009;47(7):2124–30.
14. 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):1–8.
15. Cardoso CC, Pereira AC, Sales C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptative immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*. 2011;6(5):533–49.
16. Neale DB. Genomics to tree breeding and forest health. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(6):539–44.
17. Collins F, Collins F, Brooks L, Brooks L, Chakravarti a, Chakravarti a. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Res [Internet]*. 1998;8(12):1229–31.
18. Rebbeck TR, Spitz M, Wu X. Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet*. 2004;5(8):589–97.
19. Mira MT, Alcais a, di Pietrantonio T, Thuc N V, Phuong MC, Abel L, et al. Segregation of HLA/TNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. *Genes Immun*. 2003;4:67–73.

20. Pereira a C, Brito-de-Souza VN, Cardoso CC, Dias-Baptista IMF, Parelli FPC, Venturini J, et al. Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes Immun.* 2009;10(2):174–80.
21. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: A genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. *J Infect Dis.* 2011;204(8):1256–63.
22. Pontillo A, Laurentino W, Crovella S, Pereira AC. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol [Internet]. Elsevier B.V.;* 2013;19:274–9.
23. Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med [Internet].* 2009;361(27):2609–18.
24. Sales C, Heloisa M, Vinicius S, Fava M, Elena L, Arnez A, et al. NOD2 and CCDC122 LACC1 genes are associated with leprosy susceptibility in Brazilians. *Hum Genet.* 2014;(133):1525–32.
25. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255–73.
26. Virchow R. *Die krankhaften Geschwülste.* Hirschwald. 1863;
27. Walker SL, Lockwood DNJ. The clinical and immunological features. *Oxford J.* 2006;103–21.
28. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004;75(02):163–89.
29. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, Sarno EN, Kushner P, Granelli-Piperno A, et al. Defective γ Interferon Production in leprosy. *J Exp Med.* 1978;147(09):1–6.
30. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ. Defining Protective Responses to Pathogens: Profiles in Leprosy Lesions IFN- γ . 1988;387(1984):277–9.

31. Sieling PA, Modlin RL. Cytokine Patterns at the Site of Mycobacterial Infection. *Immunobiology* [Internet]. Gustav Fischer Verlag · Stuttgart · Jena · New York; 1994;191(4-5):378–87.
32. Misra N, Murtaza a, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* [Internet]. 1995;86(1):97–103.
33. Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*. 2009;361(9):888–98.
34. Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4⁺ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(7):e2338.
35. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. CD4⁺CD25⁺ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy. *Mol Immunol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;56(4):513–20.
36. Saini C, Ramesh V, Nath I. Increase in TGF- β Secreting CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ T Regulatory Cells in Anergic Lepromatous Leprosy Patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(1):23.
37. Bobosha K, Wilson L, van Meijgaarden KE, Bekele Y, Zewdie M, van der Ploeg- van Schip JJ, et al. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):2–10.
38. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nat Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;17(1):9–17.
39. Abbas AK, H. Lichman A, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8^a edição. 2015. 552 p.

40. Varin A, A SG. Alternative activation of macrophages : Immune function and cellular biology. *Immunobiology* [Internet]. Elsevier; 2009;214(7):630–41.
41. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014;6(March):13.
42. Dyken SJ Van, Locksley RM. Interleukin-4- and Interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles is homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*. 2013;21(31):317–43.
43. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005;27(52):14299–307.
44. Kirschning CJ, Schumann RR. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2002;270:121–44.
45. Ribeiro-Resende VT, Ribeiro-Guimarães ML, Rodrigues Lemes RM, Nascimento ÍC, 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.
46. Fabri M, Stenger S, Shin D-M, Yuk J-M, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D Is Required for IFN- γ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. *Sci Transl Med*. 2011;3(104):104ra102–4ra102.
47. Sales J de S, Lara FA, Amadeu TP, Fulco TDO, Nery JA da C, Sampaio EP, et al. The role of indoleamine 2 , 3 -dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *J Transl Immunol*. 2011;251–63.
48. Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol*. 2012;42(11):2925–36.

49. Teles RMB, Kelly-scumpia KM, Sarno EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, et al. IL-27 Suppresses Antimicrobial Activity in Human Leprosy. *J Invest Dermatol* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2015;135(10):2410–7.
50. Ribeiro LS. Análise da produção do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) e seu efeito na geração de óxido nítrico em macrófagos estimulados com micobactérias. Fundação Oswaldo Cruz; 2009.
51. Chatterjee KR, Das Gupta NN. Electron microscopic observations on the morphology of *Mycobacterium leprae*. *Exp Cell Res*. 1959;18:521–7.
52. Kurup G, Mahadevan PR. Cholesterol metabolism of macrophages in relation to the presence of *Mycobacterium leprae*. *J Biosci*. 1982;4:307–16.
53. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2917–28.
54. Mattos KA, D’Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, 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(03):371–84.
55. David L, Krahenbuhl L. Defective Activation *Mycobacterium* of Granuloma Macrophages Nude Mice. *J Leukoc Biol*. 1988;66(43):60–6.
56. Gao Q, Goodman JM. The lipid droplet—a well-connected organelle. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2015;3(August):1–12. A
57. Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie*. 2005;87(1 SPEC. ISS.):45–9.
58. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2004;279(45):46835–42.

59. Farese R V., Walther TC. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*. 2009;139(5):855–60.
60. D’Avila H, Toledo DAM, Melo RCN. Lipid bodies: Inflammatory organelles implicated in host-trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators Inflamm*. 2012;2012.
61. 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 lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol*. 2006;176(5):3087–97.
62. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D’Avila H, Melo RCN, et al. 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.
63. Mattos KA, Oliveira VCG, Berredo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol*. 2014;16(6):797–815.
64. Lobato L, Rosa P, Ferreira J, Neumann A, da Silva M, do Nascimento D, et al. Statins Increase Rifampin Mycobactericidal Effect. *Antimicrob Agents Chemother [Internet]*. 2014;58(10):5766–74.
65. Morgan AE, Mooney KM, Wilkinson SJ, Pickles NA, Mc Auley MT. Cholesterol metabolism: A review of how ageing disrupts the biological mechanisms responsible for its regulation. *Ageing Res Rev [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;27:108–24.
66. Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Lipid Body Formation In Vivo: Innate Immunity Elicited Intracellular Loci Involved in Eicosanoid Metabolism. *J Immunol [Internet]*. 2002;169(11):6498–506.

67. D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol*. 2008;8(10):1308–15.
68. Tan JSY, Seow CJP, Goh VJ, Silver DL. Recent Advances in Understanding Proteins Involved in Lipid Droplet Formation, Growth and Fusion. *J Genet Genomics* [Internet]. Elsevier Limited and Science Press; 2014;1–9.
69. Bhasker CR, Friedmann T. Insulin-like growth factor-1 coordinately induces the expression of fatty acid and cholesterol biosynthetic genes in murine C2C12 myoblasts. *BMC Genomics*. 2008;9:535.
70. Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol*. 2011;48(1):1–9.
71. Le Roith D. The insulin-like growth factor system. *Exp Diabetes Res*. 2003;4(December):205–12.
72. Rajpathak SN, Gunter MJ, Wylie-Rosett J, Ho GYF, Kaplan RC, Muzumdar R, et al. The role of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2009;3(1):3–12.
73. Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev*. 2005;26(7):916–43.
74. Clemmons DR. Metabolic Actions of Insulin-Like Growth Factor-I in Normal Physiology and Diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2012;41(2):425–43.
75. Pollak MN. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Novartis Found Symp* [Internet]. 2004;262(July):84–107,265–8.
76. Goto H, Gomes CM, Corbett CE, Monteiro HP, Gidlund M. Insulin-like growth factor I is a growth-promoting factor for *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998;95(22):13211–6.

77. Gomes C, Goto H, Matta VLR da, Gidlund M, Corbett CEP. Insulin-like Growth Factor (IGF) -I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J.* 2000;81:249–55.
78. Gomes CM, Goto H, Magnanelli a C, Monteiro HP, Soares RP, Corbett CE, et al. Characterization of the receptor for insulin-like growth factor on *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol [Internet]*. 2001;99(4):190–7.
79. Vendrame CM V, Carvalho MDT, Rios FJO, Manuli ER, Goto H. Effect of Insulin-like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* Promastigote Arginase Activation and Reciprocal Inhibition of NOS2 Pathway in Macrophage In vitro. 2007;287–96.
80. Reis LC, Ramos-Sanchez EM, Goto H. The interactions and essential effects of intrinsic insulin-like growth factor-I on *Leishmania* (*Leishmania*) major growth within macrophages. *Parasite Immunol.* 2013;35(7-8):239–44.
81. Maria C, Vendrame V, Dias M, Carvalho T, Tempone AG, Goto H. Insulin-Like Growth Factor-I Induces Arginase Activity in *Leishmania amazonensis* Amastigote-Infected Macrophages through a Cytokine-Independent Mechanism. Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014.
82. Rodrigues LS, da Silva Maeda E, Moreira MEC, Tempone AJ, Lobato LS, Ribeiro-Resende VT, et al. *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell Microbiol.* 2010;12(1):42–54.
83. Paula A, Trombone F, Cristina S, Pedrini B, Diório SM, Faria A De, et al. Optimized Protocols for *Mycobacterium leprae* Strain Management : Frozen Stock Preservation and Maintenance in Athymic Nude Mice. 2014;(03):1–7.
84. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 2001;40(5):325–438.
85. Theodoulou FL, Kerr ID. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans [Internet]*. 2015;43(5):1033–40.

86. Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol* [Internet]. 2006;119(3):229–40.
87. Wang M, Tsai B, Brown JW, Meldrum DR. Insulin-like growth factor-1 in myocardial tissue: interaction with tumor necrosis factor. *Crit Care* [Internet]. 2003;7(6):417–9.
88. Ge R-T, Mo L-H, Wu R, Liu J-Q, Zhang H-P, Liu Z, et al. Insulin-like growth factor-1 endues monocytes with immune suppressive ability to inhibit inflammation in the intestine. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5:7735.
89. Osorio EY, Travi BL, da Cruz AM, Saldarriaga OA, Medina AA, Melby PC. Growth Factor and Th2 Cytokine Signaling Pathways Converge at STAT6 to Promote Arginase Expression in Progressive Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2014;10(6):11–4.
90. Dalton JE, Maroof A, Owens BMJ, Narang P, Johnson K, Brown N, et al. Inhibition of receptor tyrosine kinases restores immunocompetence and improves immune-dependent chemotherapy against experimental leishmaniasis in mice. *J Clin Invest*. 2010;120(4):1204–16.
91. Antia N, Shetty V. The periferal nerve in leprosy and other neuropathies. *Patology of nerve damage in leprosy*. Oxford Univ Press. 1997;79–137.
92. Almeida PE, Roque NR, Magalhães KG, Mattos KA, Teixeira L, Maya-Monteiro C, et al. Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by *Mycobacterium bovis* BCG infection. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;1841(1):97–107.
93. Almeida PE, Silva AR, Maya-Monteiro CM, Torocsik D, D’Avila H, Dezso B, et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol*. 2009;183(2):1337–45.

94. Liang G, Cline GW, Macica CM. IGF-1 Stimulates De Novo Fatty Acid Biosynthesis by Schwann Cells During Myelination. *Glia*. 2007;55(14):632–41.
95. Tang SL, Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Mo ZC, Lv YC, et al. PAPP-A negatively regulates ABCA1, ABCG1 and SR-B1 expression by inhibiting LXR through the IGF-I-mediated signaling pathway. *Atherosclerosis* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;222(2):344–54.
96. Cao Z, Liu L-Z, Dixon D a, Zheng JZ, Chandran B, Jiang B-H. Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. *Cell Signal* [Internet]. 2007;19(7):1542–53.
97. Bernardes Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: The complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):365–75.
98. Wynes MW, Frankel SK, Riches DWH. IL-4-induced macrophage-derived IGF-I protects myofibroblasts from apoptosis following growth factor withdrawal. *J Leukoc Biol*. 2004;76(5):1019–27.
99. Marques MAM, Berrêdo-pinho M, Rosa TL, Pujari V, Lemes RMR, Crick DC, et al. The Essential Role of Cholesterol Metabolism in the Intracellular Survival of *Mycobacterium leprae* Is Not Coupled to Central Carbon. 2015;197(23):3698–707.
100. Sikorski K, Czerwoniec A, Bujnicki JM, Wesoly J, Bluysen HAR. STAT1 as a novel therapeutic target in pro-atherogenic signal integration of IFN γ , TLR4 and IL-6 in vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;22(4):211–9.
101. Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Lee DJ, Komisopoulou E, et al. Type I Interferon Suppresses Type II Interferon-Triggered Human Anti-*Mycobacterium leprae* Responses. *Am Assoc Adv Sci*. 2013;339(6126):1448–53.

102. Thill M, Fischer D, Hoellen F, Kelling K, Dittmer C, Landt S, et al. Prostaglandin metabolising enzymes and PGE2 are inversely correlated with vitamin D receptor and 25(OH)2D3 in breast cancer. *Anticancer Res.* 2010;30(5):1673–9.
103. Liu X, Nelson A, Wang X, Farid M, Gunji Y, Ikari J, et al. Vitamin D modulates prostaglandin E2 synthesis and degradation in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014;50(1):40–50.
104. Kehdy FSG, Gouveia MH, Machado M, Magalhães WCS, Horimoto AR, Horta BL, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2015;112(28):8696–701.
105. Wei YK, Ma HL, Guo YZ, Yang BH, Pang WX. Association of the IGF-1 rs35767 and rs972936 polymorphisms with the risk of osteoporosis in a Chinese postmenopausal female population. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):14325–30.
106. Zhang W, Zhang LC, Chen H, Tang PF, Zhang LH. Association between polymorphisms in insulin-like growth factor-1 and risk of osteoporosis. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):7655–60.
107. Qian J, Zhou H, Chen J, Ding Q, Cao Q, Qin C, et al. Genetic polymorphisms in IGF-I and IGFBP-3 are associated with prostate cancer in the Chinese population. *PLoS One.* 2014;9(2):1–7.
108. Nakao M, Hosono S, Ito H, Watanabe M, Mizuno N, Yatabe Y, et al. Interaction between IGF-1 polymorphisms and overweight for the risk of pancreatic cancer in Japanese. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011;2(4):354–66.
109. Johansson M, McKay JD, Wiklund F, Rinaldi S, Verheus M, Van Gils CH, et al. Implications for prostate cancer of insulin-like growth factor-I (IGF-I) genetic variation and circulating IGF-I levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(12):4820–6.

110. Ong J, Salomon J, Te Morsche RHM, Roelofs HMJ, Witteman BJM, Dura P, et al. Polymorphisms in the insulin-like growth factor axis are associated with gastrointestinal cancer. *PLoS One*. 2014;9(3):1–7.
111. Kim HJ, Kim SK, Park HJ, Chung JH, Chun J, Yun DH, et al. Polymorphisms of IGFI contribute to the development of ischemic stroke. *Exp Ther Med*. 2012;3(1):93–8.

9. Anexos

9.1 Aprovação do comitê de ética



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

Rio de Janeiro, 01 de julho de 2009.

Carta: 060/09

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani e
- Dr. Ricardo Lourenço de Oliveira

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **504/09** intitulado **“Investigação das alterações do metabolismo lipídico e suas vias de sinalização em células hospedeiras em associação com o Mycobacterium leprae”** que foi **APROVADO**.

Conforme ofício (anexo ao e-mail) encaminhado ao CEP pela CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa precisamos de uma cópia em cd do seu protocolo para encaminhá-lo a aquele órgão para apreciação por se tratar de protocolo pertencente ao Grupo I.

Atenciosamente


Carla Dias Netto
Secretária Geral
CEP/Fiocruz

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz
Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705
Manguinhos - RJ. - CEP.: 21.040-360
Tels.: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815
e-mail: etica@fiocruz.br

10.Apêndices

10.1 Artigo: *Mycobacterium leprae*-induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages

Leonardo Ribeiro Batista Silva¹, Luciana Silva Rodrigues^{1*}, Aislan de Carvalho Vivarini², **Fabício da Mota Ramalho Costa**¹, Katherine Antunes de Mattos^{1&}, Maria Renata Sales Nogueira Costa³, Patricia Sammarco Rosa³, Thiago Gomes Toledo Pinto⁴, André Alves Dias¹, Danielle Fonseca Moura⁴, Euzenir Nunes Sarno⁴, Ulisses Gazos Lopes², Maria Cristina Vidal Pessolani^{1▲}.

Abstract:

Mycobacterium leprae (ML), the etiologic agent of leprosy, can subvert macrophage antimicrobial activity by mechanisms that remain only partially understood. In the present study, the participation of hormone insulin-like growth factor I (IGF-I) in this phenomenon was investigated. Macrophages from the dermal lesions of the disseminated multibacillary lepromatous form (LL) of leprosy expressed higher levels of IGF-I than those from the self-limited paucibacillary tuberculoid form (BT). Higher levels of IGF-I secretion by ML-infected macrophages were confirmed in *ex vivo* and *in vitro* studies. Of note, the dampening of IGF-I signaling reverted the capacity of ML-infected human and murine macrophages to produce antimicrobial molecules and promoted bacterial killing. Moreover, IGF-I was shown to inhibit the JAK/STAT1-dependent signaling pathways triggered by both mycobacteria and IFN- γ most probably through its capacity to induce the suppressor of citokine signaling-3 (SOCS3). Finally, these *in vitro* findings were corroborated by *in vivo* observations in which higher SOCS3 expression and lower phosphorylation of STAT1 levels were found in LL versus BT dermal lesions. Altogether, our data strongly suggest that IGF-I contributes to the maintenance of a functional program in infected macrophages that suits ML persistence in the host, reinforcing a key role for IGF-I in leprosy pathogenesis.

Manuscrito submetido para: Scientific Reports (Abril, 2016).

10.2 Artigo: Neutrophil CD64 expression as a potential biomarker for Erythema Nodosum Leprosum

Veronica Schmitz^{1*}, Rhana Berto da Silva Prata¹, Sheila Santos Brandão¹, Thaís Porto Amadeu², Luciana Silva Rodrigues², Mayara Abud Mendes¹, **Fabício Da Mota Ramalho Costa**¹, Alice de Miranda Machado¹, José Augusto da Costa Nery¹, Mariana de Andrea Hacker¹, Anna Maria Sales¹, Helen Ferreira¹, Mayara Garcia de Mattos Barbosa¹, Roberta Olmo Pinheiro¹, Euzenir Nunes Sarno¹

Abstract:

ENL is an immune reaction of Leprosy which aggravates the patient clinical condition. The management of ENL patient needs to be early and efficient to prevent disability and permanent nerve damage. Rational search for molecular targets during episodes of ENL is essential to better understand of disease mechanisms and may facilitate the search for new drugs and diagnostic tests. Previous studies have demonstrated that cytokines as IFN- γ and GM-CSF which are involved in the induction of CD64 expression are enhanced during ENL. In this study, we report that ENL lesions, which are rich in neutrophils, express CD64. The efficient treatment with thalidomide reduced CD64 expression in the lesions, and neutrophils infiltrate, as revealed by myeloperoxidase analyses. Furthermore, peripheral blood neutrophils of ENL patient display also abundant levels of surface CD64 which was indeed modulated by anti-reactional treatment. Circulating neutrophils of patient with severe ENL presents higher levels of surface CD64. Collectively, these data uncover that ENL neutrophils express CD64, presumably contributing to the immunopathogenesis.

Manuscrito em preparação.