

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Estudo do Efeito Anti-Apoptótico do
Mycobacterium leprae em Células de Schwann Humanas

Luciana Silva Rodrigues

Rio de Janeiro

Outubro de 2005

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

**Estudo do Efeito Anti-Apoptótico do *Mycobacterium leprae* em
Células de Schwann Humanas**

Luciana Silva Rodrigues

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
visando a obtenção do grau de Mestre
em Biologia Celular e Molecular.**

Orientação:

Maria Cristina Vidal Pessolani

Outubro de 2005

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Esta dissertação intitulada

**Estudo do Efeito Anti-Apoptótico do *Mycobacterium leprae* em
Células de Schwann Humanas**

Apresentada por Luciana Silva Rodrigues

Orientada por Maria Cristina Vidal Pessolani

Foi avaliada pela banca examinadora composta dos seguintes membros:

Dra. Euzenir Nunes Sarno (revisora e suplente)

Departamento de Micobacterioses – Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Andréa Henriques Pons

Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular – Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Cristina Maciel Plotkowski

Departamento de Microbiologia e Imunologia – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Dr. Neio Lúcio Fernandes Boéchat

Departamento de Clínica Médica – Universidade Federal do Rio de Janeiro

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues, Luciana Silva
Estudo do Efeito Anti-Apoptótico do *Mycobacterium leprae* em Células de Schwann Humanas.

Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 2005

xvi – 112 páginas

Dissertação: Mestrado em Biologia Celular e Molecular

1. *Mycobacterium leprae*
2. Células de Schwann
3. Sobrevivência
4. IGF-I
5. NF- κ B

I. Instituto Oswaldo Cruz – Dissertação de Mestrado

II. Título

Esta tese foi realizada no Laboratório de Microbiologia Celular do Departamento de Micobacterioses – Fundação Oswaldo Cruz, sob a orientação da Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.

“Maravilhar-se é o primeiro passo
para o descobrimento”.

Louis Pasteur

À minha doce filhinha Giovanna e ao meu querido marido Marcello,
por todo amor que nos une.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força renovada a cada dia e por Sua grandeza que se faz presente em cada momento de minha vida;

À Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani por toda sua dedicação, paciência e cuidado na realização deste trabalho. Pela confiança depositada, por mostrar-se sempre tão atenciosa e preocupada com a nossa formação e, sobretudo, por representar um dos maiores exemplos de profissionalismo;

À Dra. Mécia pelas horas e horas pacientes de estudo, além dos “deveres de casa” e incentivo durante o início deste curso;

Ao Dr. Antônio Jorge Tempone por estar sempre pronto para esclarecer as dúvidas em biologia molecular, pelo interesse neste trabalho e pela agradável convivência;

À Dra. Maria Elizabeth da Costa Moreira, do Instituto Nacional do Câncer (INCA), pelo apoio ao nosso trabalho, pelas conversas sempre tão informativas e pelas horas-extras de análise no citômetro. Ao João Luís (INCA) por toda ajuda durante os ensaios de citometria de fluxo;

Ao Dr. Geraldo Pereira pela ajuda com as análises de citometria de fluxo e transmissão de conhecimentos.

À Dra. Euzenir Nunes Sarno pela revisão deste trabalho;

Aos meus queridos amigos do laboratório pela amizade, cuidado e carinho especial durante minha gravidez: à Cristiana (pelas horas de estudo e por estar sempre pronta a ajudar), Elisa (por sua importante contribuição neste trabalho e pela amizade), Michelle Portugal (pelas conversas e apoio), à Michelle Lopes (nossa Mimizinha), Érika, Júlio, Renato, Lucinéia, Márcia, Elza, Adriano, Leonardo, Patrícia, Daniele, Luís Afonso (vocês foram muito companheiros e fazem parte desta minha história);

À todos os amigos do departamento pelo carinho e amizade: Harrison, Mara, Amanda, Marcinha, Adalgiza, Adalberto, Danuza, Íris, Mônica, Marcela, Milton, Viviane, Alejandra, Patrícia, Cíntia, Guilherme, Alexandre P.A., Valcemir, Sérgio, Alice, Rosane, Rosaninha, Tatiana Silva, Eliane, Jô, Maristela, Tatiana, Daniele, Paulo, Solange, Fidelton, Daniel;

Às minhas queridas amigas Marjorie e Adriana por estarem sempre presentes nesta minha caminhada, me apoiando e ajudando a ir sempre em frente.

Ao Sr. Paulo Sales por sua preocupação, apoio e carinho sempre tão presentes.

Ao Dr. Ulisses Gazos Lopes pelo interesse e colaboração com este trabalho e à Renata Pereira pelos experimentos realizados e pelas informações trocadas;

Aos meus professores do curso de pós-graduação pelos conhecimentos transmitidos;

À Coordenação da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e aos funcionários do departamento de ensino do IOC;

Ao IOC, pelo financiamento deste projeto;

À minha mãe, Rosana, pelo incentivo e pela “grande contribuição para a finalização deste trabalho”. Ao meu pai “Vavá” e aos meus queridos irmãos Fábio e Ana Lúcia;

Ao meu querido marido Marcello por todo amor e carinho. Pelas madrugadas acordadas ninando a Giovanna para que eu pudesse trabalhar ou descansar. Por me fazer sempre acreditar que tudo daria certo;

À minha princesa, Giovanna, pela inspiração e pela força que descobri quando a segurei pela primeira vez em meus braços e me tornei mãe.

LISTA DE ABREVIATURAS

BB	borderline borderline
BL	borderline lepromatoso
BSA	albumina de soro bovino
BT	borderline tuberculóide
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CS	célula de Schwann
D.O.	densidade ótica
DEPC	dietilpirocarbonato
DG	distroglicana
DMSO	dimetil sulfóxido
dNTP	desoxiribonucleotídeos trifosfato(N=A, C, G ou T)
DRG	gânglio de raiz dorsal
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
ENL	eritema nodoso leproso
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	glicosil 3' fosfato desidrogenase
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
Hlp	proteína semelhante à histona
IGF	fator de crescimento semelhante à Insulina
IGFBP	proteína ligante de IGF
IGF-IR	receptor de IGF-I
IkB	inibidor de NF-kB

IKK	IκB quinase
IMC	imunidade mediada por células
KDa	KiloDalton
LAM	lipoarabinomanana
LL	lepromatoso lepromatoso
LM	lipomanana
LPS	lipopolissacarídeo
MA	miliAmper
MB	multibacilar
MDT	multidrogaterapia
MTT	sal Metiltetrazólico
NF-κB	fator nuclear kappa B
NT-3	neurotrofina-3
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	paucibacilar
Pb	par (s) de base (s)
PB	paucibacilares
PBS	tampão salina fosfato
PCR	reação da polimerase em cadeia
PDGF-BB	fator de crescimento derivado de plaquetas
PDIM	ftiocerol dimicocerosato
PGL-I	glicolípido fenólico I
PI	iodeto de Propídeo
PI 3-k	fosfatidilinositol 3 quinase
PIMs	fosfatidilinositol manosídeos
PL	fosfolípido
PS	fosfatidilserina
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA _m	ácido ribonucléico mensageiro
RR	reação reversa
SDS	dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SNP	sistema nervoso periférico
TAE	tampão Tris-base acetato-EDTA
TBS	tampão Tris-salina
TBS/T	tampão Tris-salina com tween
TEMED	NNN'N' tetra metil etileno diamina

TH	células T auxiliares
TLR	receptor do tipo Toll
TMM	trealose monomicolato
TNF-R	receptor de TNF
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
Tris	trishidroximetil aminometano
U	Unidade
V	Volts
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

RESUMO

A Hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, apresenta como sintoma clínico mais relevante lesões no sistema nervoso periférico. As estratégias utilizadas pelo *M. leprae* para infectar e se multiplicar nas células de Schwann (CS) são, contudo, pouco conhecidas. Neste trabalho investigamos o efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre a célula hospedeira, à semelhança do observado na literatura com outros patógenos intracelulares obrigatórios. Para tal, CS humanas da linhagem ST88-14 foram tratadas ou não com a bactéria e incubadas em meio RPMI sem soro para induzir a apoptose. A viabilidade celular foi avaliada por três métodos: i) redução enzimática de Metiltetrazólio (MTT), ii) capacidade celular de exclusão do corante Azul de Tripán e iii) coloração vital com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo. Após 24-48h de incubação, as células tratadas com *M. leprae* apresentaram índices de sobrevivência de 70-100%, contrastando com as culturas não tratadas com a bactéria que apresentaram índice de sobrevivência entre 30-60%. *M. leprae* foi capaz de proteger as CS da morte de maneira dose-dependente. A redução de células entrando em apoptose pela presença do bacilo também foi observada através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial com o corante DiOC₆ por Citometria de Fluxo. Em seguida demonstramos que fatores solúveis secretados pela célula incubada com *M. leprae* estão envolvidos na proteção, visto que o meio condicionado proveniente de culturas tratadas também promoveu a sobrevivência de CS. Possíveis candidatos para estes fatores de sobrevivência seriam os Fatores de Crescimento semelhantes à Insulina, IGF-I e IGF-II. Confirmamos, então, a capacidade de *M. leprae* induzir a expressão de IGF-I e IGF-II em CS através da técnica de RT-PCR. Também demonstramos que IGF-I recombinante adicionado às culturas foi capaz de proteger as CS ST 88-14 de morte induzida por privação de soro. A ação do

IGF-I é possivelmente mediada pelo seu receptor IGF-IR, cuja expressão foi comprovada através de Western blot e Citometria de Fluxo. Finalmente, o pré-tratamento das CS com três inibidores distintos de NF- κ B - a talidomida, o peptídeo SN50 e a gliotoxina- neutralizou o efeito protetor do *M. leprae* sobre as CS. Nossos dados sugerem uma importante estratégia para colonização bem sucedida do nervo pelo *M. leprae*, baseada na manutenção da sobrevivência da célula hospedeira através da indução pelo patógeno da produção de IGF e ativação de NF- κ B na CS.

ABSTRACT

The lesions of the peripheral nervous are considered the most relevant symptoms of Leprosy, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. The strategies employed by *M. leprae* to infect and multiply inside Schwann cells (SC) are, however, poorly understood. In this study we investigated whether, similarly to other obligate intracellular pathogens, *M. leprae* promotes an anti-apoptotic effect on the host cell. Human SC lineage ST88-14 was treated or not with the bacteria and incubated in serum-free RPMI medium to induces apoptosis. The cell viability was monitored by three methods: i) cell capacity to reduce the methyltetrazolium salt (MTT); ii) Tripan blue exclusion and iii) cell staining with fluorescein diacetate and ethidium bromide. After 24-48h incubation, cells treated with *M. leprae* showed 70-100% of survival, contrasting with 30-60% in the untreated cultures. *M. leprae* anti-apoptotic effect was shown to be dose dependent. Reduction of cells undergoing apoptosis in cultures treated *with M. leprae* was also observed through DiOC₆ staining by flow cytometry, a method that monitors the mitochondrial membrane potential. In a next step the conditioned medium of cells treated with *M. leprae* was shown to mimic the anti-apoptotic effect of the bacteria, suggesting that soluble factors secreted by SC in response to *M. leprae* were involved in cell survival. One possible candidate for these soluble factors would be Insulin-Like Growth Factors, IGF-I and IGF-II. In fact, the capacity of *M. leprae* to induce the expression of IGF-I and IGF-II on SC was confirmed by RT-PCR. Also, when added to ST88-14 cells, recombinant IGF-I was able to protect the cells from apoptosis induced by serum withdrawn. IGF-I action is possibly mediated by the IGF-I receptor (IGF-IR), as ST88-14 cells were shown to express this receptor by Western blotting and FACS analysis. Finally, we showed that the pre-treatment of SC with one of the NF- κ B inhibitors, thalidomide, gliotoxin and SN50 completely abolished the

anti-apoptotic effect of *M. leprae*. Altogether, our results suggest a important strategy for the successful colonization of *M. leprae* in the nerve, based on the survival maintenance of the host cell through induction of IGF production and NF- κ B activation.

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
AGRADECIMENTOS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
SUMÁRIO	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
1.1	Hanseníase 01
.....	
1.1.1	Considerações Gerais 01
.....	
1.1.2	Situação Global da Hanseníase 03
.....	
1.1.3	O Dano Neural na Hanseníase 05
.....	
1.2	A Biologia do <i>Mycobacterium leprae</i> 07
.....	
1.3	A Célula de Schwann 10
.....	
1.4	Fatores de Crescimento Semelhante à Insulina (IGFs) 11
.....	
1.5	A Interação do <i>M. leprae</i> com a Célula de Schwann 13
.....	
1.6	Apoptose e Infecção 15
.....	
1.6.1	Vias Sinalizadoras de Apoptose 15
.....	
1.6.2	Modulação da Apoptose por Bactérias Intracelulares Facultativas 19

1.6.3 Modulação da Apoptose por Bactérias Intracelulares Obrigatórias	20
1.6.4 O Fator Transcricional NF- κ B	21
.....	
1.7 Influência do <i>M. leprae</i> na Sobrevivência e Proliferação de Células de Schwann	23
.....	
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Manutenção de Células de Schwann da Linhagem ST88-14	25
.....	
3.2 <i>Mycobacterium leprae</i>	26
.....	
3.3 Cultivo, tratamento com <i>M. leprae</i> e ensaios de viabilidade de células de Schwann ST88-14	27
.....	
3.3.1 Reação Enzimática de Redução do Sal Metiltetrazólio (MTT)	27
.....	
3.3.2 Ensaio de exclusão de azul de Tripán	27
.....	
3.3.3 Coloração com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo	28
.....	
3.4 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial	29
.....	
3.5 Coloração de núcleos com Bis-benzemida	29
.....	
3.6 Ensaios de viabilidade com meio condicionado	30
.....	
3.7 Extração e Purificação de RNA Total de Células de Schwann	31
.....	
3.8 Síntese de DNA complementar (cDNA)	31
.....	
3.9 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)	32
.....	
3.10 Eletroforese em Gel de Agarose	33
.....	
3.11 Obtenção de Lisado Total de Células de Schwann	33
.....	
3.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)	34
.....	
3.13 Western blot	34
.....	
3.14 Marcação Intracelular por Citometria de Fluxo	35
.....	
3.15 Ensaios de viabilidade na presença de inibidores do Fator Transcricional NF- κ B	36
.....	
3.16 Marcação do <i>M. leprae</i> com isotiocianato de fluoresceína (FITC)	37
.....	
3.17 Limpeza de lâminulas e tratamento com silane	37

.....	
3.18 Análise Gráfica e Estatística	38
.....	
3.19 Soluções	38
.....	
4. RESULTADOS	45
4.1 Sobrevivências de células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 após remoção de soro	45
.....	
4.2 Efeito do <i>M. leprae</i> na morte celular induzida por carência de soro em CS humanas ST88-14: análise através da redução enzimática do Sal Metiltetrazólio (MTT)	47
.....	
4.3 Proteção de morte de células de Schwann privadas de soro por <i>M. leprae</i> : análise através da exclusão de azul de Tripán	48
.....	
4.4 O efeito anti-apoptótico do <i>M. leprae</i> sobre as células de Schwann ST88-14 é dose-dependente	51
.....	
4.5 Análise morfológica de células de Schwann humanas ST88-14 tratadas com <i>M. leprae</i>	55
.....	
4.6 Análise do efeito anti-apoptótico do <i>M. leprae</i> em CS por Citometria de Fluxo	58
4.6.1 Comparação dos padrões de espalhamento luminoso de CS privadas de soro e tratadas ou não com <i>M. leprae</i>	58
.....	
4.6.2 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial de CS tratadas ou não com <i>M. leprae</i> e privadas de soro	60
.....	
4.7 Avaliação em microscopia de fluorescência da morfologia nuclear através da coloração com bis-benzemida	64
.....	
4.8 Meio condicionado de CS tratadas com <i>M. leprae</i> promove a sobrevivência de células privadas de soro	66
.....	
4.9 Indução em CS da expressão de RNAm para IGF-I e IGF-II por <i>M. leprae</i> ..	68
4.10 Expressão de IGF-IR em CS humanas ST88-14	71
.....	
4.11 Efeito anti-apoptótico de IGF-I em CS humanas ST88-14	73
.....	
4.12 Participação de NF- κ B na proteção de morte celular por <i>M. leprae</i>	75
.....	
5. DISCUSSÃO	78
6. CONCLUSÕES	89

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
8. ANEXO	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

1.1.1 Considerações Gerais

A hanseníase é uma doença causada pelo *Mycobacterium leprae* que afeta principalmente os nervos periféricos, a pele e a mucosa nasal. A rota de transmissão da hanseníase ainda não está definitivamente comprovada, mas acredita-se que seja através das vias respiratórias, embora não seja descartada a

possibilidade de infecção via lesões de pele. Os tecidos primeiramente infectados pelo *M. leprae* são sítios superficiais da pele e nervo devido à sua preferência por baixas temperaturas. Porém outros órgãos internos podem ser afetados quando a doença não é controlada. Apresenta um longo período de incubação e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois a dez anos após a infecção (Jopling, 1989). Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente à infecção pelo *M. leprae* e não apresente sintomas clinicamente detectáveis (Godal *et al.*, 1972).

O diagnóstico da hanseníase é clínico, baseado no aparecimento de manchas hipopigmentadas ou avermelhadas com alterações na sensibilidade, assim como na pesquisa de bacilos em esfregaço de linfa (baciloscopia) e exame histopatológico das lesões cutâneas. A hanseníase se manifesta segundo um espectro de formas clínicas resultante do grau de resposta imune celular desenvolvida por cada indivíduo contra o *M. leprae*. A classificação atualmente adotada de Ridley e Jopling (1966), combina critérios clínicos, bacteriológicos e, principalmente, imunológicos e histopatológicos, definindo as seguintes formas clínicas: tuberculóide tuberculóide (TT), “borderline”-tuberculóide (BT), “borderline-borderline” (BB), “borderline”-lepromatoso (BL), lepromatoso-lepromatoso (LL) e indeterminado (I) (Figura 1.1). As formas TT, BT e I são chamadas de formas paucibacilares (PB), devido ao limitado número de bacilos encontrados. Já as formas BB, BL e LL constituem as formas multibacilares (MB), apresentando uma elevada carga bacilar. A forma TT é considerada a forma mais benigna. Devido a uma eficiente resposta imune celular, as lesões apresentam granulomas bem formados e constituídos de macrófagos diferenciados em células epitelióides, com a rara presença de bacilos. No pólo lepromatoso encontram-se indivíduos que apresentam numerosos bacilos devido à deficiente resposta imune celular. Histologicamente as lesões caracterizam-se pela presença de um infiltrado inflamatório constituído predominantemente por macrófagos e raros linfócitos. A hanseníase comumente manifesta-se sob uma forma branda inicial, denominada de forma indeterminada. Os pacientes com a forma indeterminada podem evoluir para a forma tuberculóide, “borderline” ou lepromatosa, regredir ou permanecer como indeterminada por um longo período.

Formas Clínicas da Hanseníase

Indivíduos Sadios



Hanseníase Indeterminada

Figura 1.1: Formas clínicas da Hanseníase.

BB, “borderline-borderline”; BL, “borderline”-lepromatoso; BT, “borderline”-tuberculóide; LL, lepromatoso-lepromatoso; PB, paucibacilar; MB, multibacilar; TH1, linfócito T helper 1; TH2, linfócito T helper 2. Modelo adaptado de <http://svm369.vetmed.lsu.edu/LADAMS2.htm>

Durante o curso da doença os pacientes podem ainda sofrer com fenômenos imunológicos chamados de estados reacionais. As reações são episódios de inflamação aguda que se não tratados adequadamente podem ser extremamente graves, principalmente, pelas lesões neurais que estão associadas às lesões cutâneas. As reações são classificadas como reação reversa (RR) e eritema nodoso (ENL). A RR pode ser observada em pacientes paucibacilares ou multibacilares e em maior frequência nos pacientes em tratamento. É caracterizada pela aparência avermelhada e edemaciada de lesões de pele antigas e o surgimento de novas lesões devido ao aumento da imunidade mediada por células. O ENL ocorre principalmente em pacientes multibacilares e é clinicamente caracterizado pelo aparecimento de nódulos subcutâneos

eritematosos e dolorosos, febre, artralgia e perda de peso (Britton e Lockwood, 2004).

A dapsona foi o primeiro antibiótico efetivo contra o *M. leprae*. Porém devido às expressivas notificações de resistência do bacilo, em 1982 a Organização Mundial de Saúde (OMS) implantou o tratamento com a multidrogaterapia (MDT). O tratamento consiste na administração de um conjunto de drogas: clofazimina, dapsona e rifampicina. A OMS estabeleceu, ainda, a classificação operacional dos pacientes em paucibacilares e multibacilares para delimitar melhor os esquemas terapêuticos. Os pacientes PB e MB recebem tratamento de 6 meses e 12 a 24 meses, respectivamente (Britton e Lockwood, 2004).

1.1.2 Situação Global da Hanseníase

A MDT contribuiu significativamente para a diminuição da prevalência da hanseníase com cerca de 85% de cura em mais de 9 milhões de pacientes em todo o mundo (WHO, 1998). Mas, apesar do sucesso da implementação da MDT, a erradicação da doença parece algo distante em alguns países. O Brasil, por exemplo, atualmente ocupa o primeiro lugar em taxa de prevalência (4,52 a cada 10 mil habitantes), à frente da Índia (3,2/10 mil habitantes), e o segundo em números absolutos (79.908 casos em registro ativo) de acordo com o informe de saúde RADIS da Fundação Oswaldo Cruz (2004). Hoje há no mundo aproximadamente 500 mil pacientes de hanseníase e 20 milhões de ex-pacientes. Índia, Brasil, Madagascar, Moçambique, Nepal e Indonésia contribuem com 83% dos casos registrados e representam os países mais endêmicos do globo (Tabela 1.1). Destes, cerca de 64% ocorrem somente na Índia. Em nosso País, os estados das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste detêm o maior número de doentes. Em alguns municípios dos estados do Maranhão e do Pará, os índices são alarmantes, chegando a 50 casos para cada 10 mil habitantes.

A taxa de prevalência tem apresentado um satisfatório declínio desde a implementação da MDT em 1985, mas o número de novos casos tem se mantido alto. Em 2002, foram registrados 597.000 casos contra 719.000 novos casos em

2000. A OMS tem atribuído esta persistência a vários fatores, como os esforços na detecção de novos casos, a alta transmissão em certas áreas onde existam pacientes assintomáticos, porém transmissores da doença, ou ainda, uma reincidência de casos tratados. No Brasil ocorrem aproximadamente 50.000 novos casos a cada ano.

Tabela 1.1: Países mais endêmicos para a Hanseníase no mundo.

WHO, 2003.

Região	Casos registrados no final de 2002 (Taxa de prevalência a cada 10 mil habitantes)	Casos detectados durante 2002 (Taxa de prevalência a cada 100 mil habitantes)
Índia	344 377 (3.3)	473 658 (46.0)
Brasil	71 139 (4.1)	38 365 (22.3)
Madagascar	6 602 (4.0)	5 482 (33.4)
Moçambique	7 136 (3.6)	5 830 (29.1)
Nepal	7 291 (3.0)	13 830 (56.5)
Tanzânia	7 063 (2.1)	6 497 (19.0)
Total:	443 608 (3.4)	543 662 (41.9)

1.1.3 O Dano Neural na Hanseníase

A lesão do sistema nervoso periférico constitui o evento mais grave da Hanseníase impondo, ainda, grandes desafios no controle desta endemia. A Hanseníase constitui a principal causa de neuropatia periférica não traumática em todo o mundo. O dano ao nervo ocorre em todas as formas clínicas da doença, a despeito da cura bacteriológica conseguida com a MDT (Ganapati e Revankar, 1989). Esta, se não reconhecida e tratada a tempo, resulta em deformidades e incapacidades permanentes que tanto estigmatizaram a doença desde tempos remotos. O dano primário ao nervo provoca alterações das funções sensitivas, motoras e autonômicas. Estas alterações predis põem ao dano secundário, decorrente de trauma, pressão anormal e infecções (Van Brakel e Khawas, 1994).

Vinte e cinco por cento dos pacientes com hanseníase sofrem algum grau de incapacidade durante a evolução da doença e a metade destes permanecem com deformidades incapacitantes (OMS, 1998). Os dados acima mencionados ressaltam a importância de se estudar e melhor compreender os mecanismos que desencadeiam a lesão neural na hanseníase. Os dados gerados nestes estudos poderão auxiliar na definição de marcadores precoces de lesão neural promovida pelo *M. leprae*, assim como no desenvolvimento de novas ferramentas para a prevenção e tratamento da neuropatia hansênica.

Histologicamente, as lesões de pele de pacientes TT apresentam perda da integridade estrutural dos nervos, presença de granulomas com poucos bacilos nas CS e macrófagos. Assim, os nervos sensoriais e motores da pele são afetados levando à perda da sensibilidade. Já em pacientes LL existem poucas evidências de formação de granuloma e um menor envolvimento dos nervos da pele. Entretanto, ocorre um comprometimento mais profundo que leva à perda da função muscular e conseqüentemente, à paralisia. Altos títulos de *M. leprae* são encontrados no endoneuro, no interior de CS e macrófagos, e em menor grau no perineuro (revisado por Vissa e Brennan, 2002).

Embora os mecanismos patogênicos do dano ao nervo não sejam ainda bem compreendidos, diversos fatores estão possivelmente envolvidos tais como as alterações bioquímicas nas células de Schwann decorrentes da presença *per se* do bacilo, e a resposta imune local desencadeada pela liberação de mediadores imunoinflamatórios no nervo. Conforme será detalhado mais adiante, vários trabalhos vêm demonstrando que o *M. leprae* é capaz de alterar o metabolismo da célula de Schwann, interferindo assim, na relação funcional desta com o axônio. Reforçando a presença deste efeito direto do bacilo sobre o nervo, um estudo recente demonstrou que a desmielinização de CS durante a infecção pelo *M. leprae* pode ocorrer mesmo na ausência de células do sistema imune (Rambukkana *et al.*, 2002). Já a resposta imune específica mediada por células T contra antígenos de *M. leprae* tem sido associada com a patogênese das lesões nervosas nas formas tuberculóides (Merja *et al.*, 1999).

1.2 A Biologia do *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* é a única bactéria patogênica capaz de invadir os nervos periféricos no ser humano. Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório e apresenta um tropismo pelas CS e fagócitos mononucleares (Bloom, 1986; Kaplan e Cohn, 1986). Foi descoberto por Gerhard Henrik Armauer Hansen em 1873 como o primeiro agente causador de uma doença infecciosa.

O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente, ou seja, uma vez corado pela fucsina não se descora pela lavagem com álcool e ácido (Método de Ziehl-Neelsen). É uma bactéria de crescimento lento, fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias (Laboratory Techniques for Leprosy, WHO 1987).

Compartilha com outras micobactérias características como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos saturados de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em seu envelope celular, conforme pode ser observado na figura 1.2. Além disso, mais externamente, apresenta glicolipídios, com destaque para o glicolipídio-fenólico I (PGL-I) presente exclusivamente no *M. leprae*. O PGL-I foi descrito inicialmente em 1981 por Shirley Hunter e Patrick Brennan e desde então desperta interesse no que diz respeito à sua utilização como diagnóstico precoce da infecção (Hunter e

Brennan, 1981), bem como seu papel relevante na interação patógeno-célula hospedeira (Schlesinger e Horwitz, 1991).

Até os dias atuais o *M. leprae* não pode ser cultivado *in vitro*. Este fato compromete seriamente o estudo de sua biologia e os mecanismos pelo qual se utiliza para causar a infecção dos nervos periféricos. Em 1960, Shepard demonstrou que o coxim plantar de camundongos infectados com 10^3 a 10^4 bacilos promovia uma multiplicação limitada do *M. leprae* durante 9 a 12 meses. O tatu de nove bandas (*Dasypus novencinctus*) permite o crescimento do bacilo de forma disseminada durante 18 a 24 meses. Os órgãos mais afetados são o fígado e o baço, além do comprometimento da pele, medula óssea, linfonodos, pulmões e olhos (Kirchheimer e Storrs, 1971). Após sua descoberta, em 1971, como um hospedeiro naturalmente suscetível, consegue-se mais de 10^9 bacilos por grama de tecido e desde então, esta tem sido a origem da massa bacteriana utilizada para os estudos bioquímicos, imunológicos e de biologia molecular.

Outra fonte de *M. leprae* utilizada para estudos é derivada de camundongos congenitamente (nude) ou experimentalmente atímicos. Estes animais são extremamente susceptíveis à infecção pelo *M. leprae* – o qual requer um alto grau de imunodeficiência em hospedeiros experimentais. Não sobrevivem mais do que alguns meses após inoculação desta micobactéria. 2×10^7 bacilos inoculados no coxim plantar de camundongos nude permite a obtenção de $0,5$ a 1×10^{10} bacilos num período de, aproximadamente, 6 meses após o inóculo. Após purificação, os bacilos podem ser utilizados vivos por até uma semana ou letalmente irradiados (Truman & Krahenbuhl, 2001).

O sequenciamento do genoma do *M. leprae* foi recentemente concluído por Cole e colaboradores (Cole *et al.*, 2001) e gerou grande expectativa sobre o conhecimento de sua funcionalidade na patogenia da hanseníase. Apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* contêm genes que codificam para proteínas e o restante sendo constituído de 1.116 pseudogenes ou genes degenerados (genes que apresentam perda de regiões necessárias à sua transcrição e/ou tradução). Quando comparamos seu genoma ao do *Mycobacterium tuberculosis* verificamos uma perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar o seu longo tempo de geração e sua incapacidade de se multiplicar *in vitro*. Análises do genoma têm revelado defeitos em vias catabólicas, sua regulação e sistemas de

transporte, justificando assim, o fato do *M. leprae* ser um patógeno intracelular obrigatório (revisado por Vissa e Brennan, 2002).

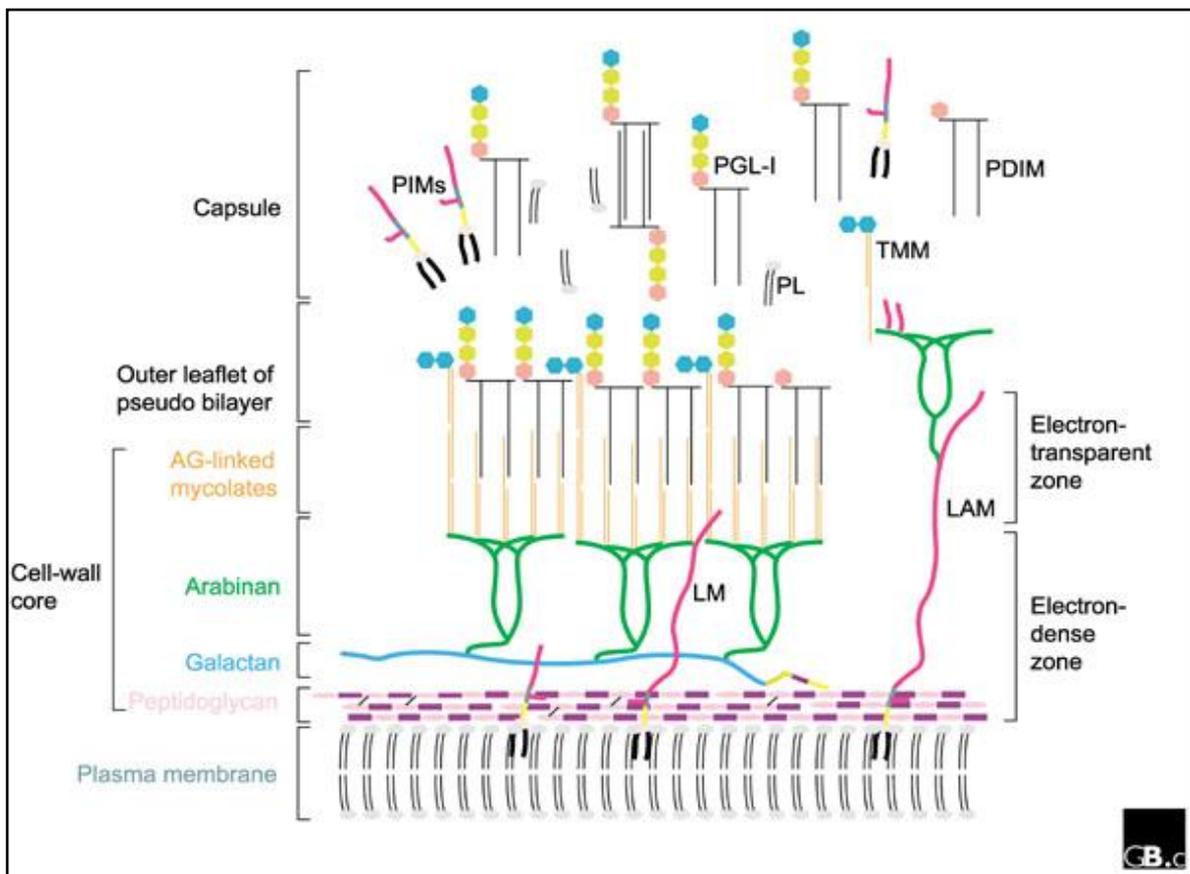


Figura 1.2: Modelo esquemático do envelope celular do *Mycobacterium leprae*. LM: lipomanana; LAM: lipoarabinomanana; TMM: trealose monomicolato; PIMs: fosfatidilinositol manosídeos; PDIM: ftiocerol dimicocerosato; PL: fosfolípido. (Vissa e Brennan, 2001).

1.3 A Célula de Schwann

A lesão neural observada na hanseníase se deve ao tropismo do *M. leprae* pelo sistema nervoso periférico. No nervo, o bacilo de Hansen é preferencialmente encontrado no interior de células de Schwann (CS) de fibras amielínicas (Antia e Shetty, 1997).

As CS se originam da crista neural e constituem as células gliais do sistema nervoso periférico onde desempenham importante papel na homeostasia tecidual. Por ação das neuregulinas secretadas pelos neurônios, as CS passam pelos estágios de CS precursora e CS imatura até chegar à CS diferenciada apresentando o fenótipo mielinizante ou não-mielinizante nos nervos maduros (revisto por Mirsky e Jessen, 1999). A formação de bainha de mielina pela CS é dependente da presença dos axônios e da lâmina basal que circunda a fibra nervosa (Bunge, 1993). Esta lâmina basal é composta principalmente por laminina-2, colágeno IV, heparan sulfato, entre outros componentes da matriz extracelular que são produzidos principalmente pela CS (revisto por Chernousov e Carey, 2000).

Além da produção da bainha de mielina e da lâmina basal, as CS possuem função primordial no processo de regeneração dos nervos periféricos, fornecendo substrato e fatores tróficos que irão permitir o apoio e o crescimento dos axônios

lesionados. Um aspecto crítico da biologia destas células que permite sua atuação nos processos de regeneração do nervo está na sua capacidade de sobreviverem mesmo na ausência do axônio (revisto por Misrky e Jessen, 1999). Meier e seus colaboradores (1999) mostraram que enquanto CS precursoras são dependentes de fatores neuronais para a manutenção de sua sobrevivência, as CS maduras são capazes de secretar fatores de crescimento que através da sua ação autócrina e parácrina promovem sua sobrevivência. Importantes componentes destes sinais de sobrevivência são os IGFs (fatores de crescimento semelhantes à Insulina), NT3 (neurotrofina-3) e PDGF-BB (fator de crescimento derivado de plaquetas).

1.4 Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina (IGFs)

A identificação de fatores tróficos importantes no controle da viabilidade das CS tem permitido a utilização terapêutica destes na regeneração dos nervos periféricos em situações de traumas físicos, químicos e/ou patológicos. Dentre estes, destaca-se o IGF-I, que além de sua ação sobre as CS, promove a sobrevivência e regeneração possibilitando seu emprego clínico em doenças neurológicas (Apfel, 1999). Outros relatos reforçam seu papel neuroprotetor *in vivo* em neuropatias onde a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias é observada (Venters *et al.*, 2000).

Os fatores de crescimento semelhantes à Insulina, IGF-I e IGF-II, são polipeptídeos ubiquitinados sintetizados e secretados por muitos tecidos que podem agir localmente como fatores autócrinos ou parácrinos ou, ainda, como fatores endócrinos circulantes no plasma agindo em sítios distantes. Cerca de 97% dos IGFs estão ligados a membros da família de seis proteínas – as IGFbps (“IGF-binding proteins”). Estas proteínas se ligam a IGF-I ou IGF-II com afinidade equivalente ou maior do que estes aos seus receptores. A formação deste complexo proporciona aos IGFs uma meia-vida prolongada no plasma e contribui para a formação de um reservatório destes hormônios para sua utilização nos tecidos. As IGFbps também contribuem para a inibição da ação dos IGFs quando estes se encontram em excesso no organismo, assim, a formação de complexos

biologicamente inativos não permite sua ligação aos receptores específicos nas células (revisado por Rechler e Clemmons, 1998).

As ações biológicas dos IGFs dependem da ativação de receptores específicos. Os receptores de IGFs, IGF-IR e IGF-IIR são estruturalmente e funcionalmente similares ao receptor de insulina. Ambos os receptores são glicoproteínas compostas de duas subunidades extracelulares (α) e duas subunidades transmembrana (β). A cadeia β do receptor de IGF é uma tirosina kinase que fosforila muitos substratos intracelulares desencadeando múltiplas vias de sinalização envolvidas na sobrevivência, crescimento e proliferação (revisado por Shu-Lian Li *et al.*, 1993). Embora IGF-I possa ligar-se ao receptor de IGF-II e ao receptor de insulina sob certas condições, sua ação mitogênica e anti-apoptótica é somente mediada por sua ligação ao IGF-IR (revisado por Rosen e Pollak, 1999).

A ação anti-apoptótica de IGF-I sobre as células de Schwann foi inicialmente descrita por Delaney e col. (1999). Os autores utilizaram como modelo células de Schwann isoladas de nervo ciático de ratos e verificaram que IGF-I promoveu a sobrevivência de CS cultivadas em meio sem soro por até três dias. Neste estudo, também evidenciaram que o hormônio IGF-I utiliza a via de sinalização PI 3-K (fosfatidilinositol 3-quinase) para prevenir a ativação de caspase-3, que ocorre rapidamente após a retirada de soro. Muitos processos celulares são regulados por esta via, como metabolismo e transporte de glicose, síntese de proteínas, mitose e diferenciação (Marte *et al.*, 1997), além de estar especialmente relacionada à inibição de apoptose (revisado por Butler *et al.*, 1998). Ainda em 1999, Syroid e col. utilizaram o mesmo modelo descrito por Delaney *et al.* (1999) para mostrar a participação de IGF-I na regulação da sobrevivência de CS mediada por seu receptor específico IGF-IR. Um componente integral da via PI 3-K é a proteína quinase B (PKB), também chamada de Akt (serine/threonine kinase), pode ser estimulada pelo IGF-IR. Estudos mostram que a prevenção de apoptose mediada por IGF-I é diminuída em células expressando um dominante negativo de Akt (Dudek *et al.*, 1997; Kulik e Weber, 1997).

1.5 A Interação do *M. leprae* com a Célula de Schwann

Para o entendimento da patogenia do *M. leprae* no nervo periférico, se faz necessário um estudo detalhado da interação do *M. leprae* com sua célula hospedeira, a CS. E nos momentos iniciais da infecção, a única ferramenta disponível consiste na utilização de modelos *in vitro* constituídos de culturas de CS purificadas ou co-culturas de CS e neurônios. Somente recentemente os mecanismos utilizados pelo *M. leprae* para infectar a CS, assim como os efeitos da infecção na morfologia e metabolismo da célula hospedeira, começaram a ser estudados. Sabe-se hoje, por exemplo, que para aderir e infectar as CS, o *M. leprae* se liga especificamente ao domínio globular da cadeia $\alpha 2$ da laminina-2, a isoforma mais abundante de laminina presente na lâmina basal que envolve a CS (Rambukkana *et al.*, 1997). Esta ligação parece ocorrer através de duas adesinas principais presentes na superfície do *M. leprae*: o glicolípido fenólico-I (Ng *et al.*, 2000) e a proteína LBP/Hlp (Shimoji *et al.*, 1999; Marques *et al.*, 2000). Complementando estes estudos, o complexo distroglicana (DG) foi identificado como um dos possíveis receptores de laminina-2 presentes na membrana da CS e envolvido na adesão bacteriana (Rambukkana *et al.*, 1998).

Uma vez no interior da célula hospedeira, os efeitos do *M. leprae* sobre a fisiologia da CS ainda são pouco conhecidos. Em nosso laboratório, Alves e colaboradores (2004), verificaram que a internalização do *M. leprae* na CS ST88-14 é dependente de vias de sinalização celular envolvidas no processo de

fagocitose. No mesmo trabalho, verificou-se a localização do bacilo vivo em vesículas não acidificadas na CS ST88-14 e macrófagos da linhagem RAW, contrastando com a localização preferencial dos bacilos irradiados em lisosomas. Estes resultados indicam que o patógeno é capaz de modular ativamente a via endocítica na CS, inibindo a fusão fagolisossomal e favorecendo sua sobrevivência.

Estudos mais recentes mostram que CS infetadas com *M. leprae* apresentam alterações tanto na morfologia quanto na expressão de moléculas de adesão celular (Hagge *et al.*, 2002). Um outro dado que indica uma modulação do metabolismo da CS pelo *M. leprae* é a observação recente em nosso laboratório mostrando uma modulação negativa da expressão do gene PHEX (gene regulador de fosfato com homologia a endopeptidases no cromossomo X) da célula hospedeira. Este gene está envolvido na regulação do metabolismo de fosfato e seu bloqueio pelo *M. leprae* pode estar associado a hipocalcemia observada nos pacientes com hanseníase (Tempone *et al*, manuscrito submetido à publicação).

1.6 Apoptose e Infecção

Um aspecto ainda pouco estudado no contexto da interação CS-*M. leprae* é a modulação de vias apoptóticas na célula hospedeira pela bactéria. Conforme será discutido mais adiante, esta modulação representa uma estratégia muito importante de sobrevivência para patógenos intracelulares na célula hospedeira. Os dados da literatura acumulados até hoje revelam que os microorganismos patogênicos desenvolveram a propriedade de modular as vias de apoptose como uma estratégia importante no estabelecimento da infecção. Os vírus, por exemplo, são patógenos intracelulares e a resposta natural das células infectadas é sofrer apoptose. Contudo, para driblar esta via de defesa do hospedeiro, os vírus desenvolveram mecanismos de bloqueio de apoptose. Já as bactérias, inicialmente descritas como indutoras de apoptose, possuem a capacidade de tanto ativar como inibir este processo.

Antes de discutir o mecanismo pelo qual as bactérias modulam a apoptose, vale à pena relembrar alguns aspectos importantes desta via de morte celular.

1.6.1 Vias Sinalizadoras de Apoptose

A palavra grega *apoptosis* significa “o ato de cair” em referência às folhas que caem das árvores no outono, e foi escolhida por Kerr e colaboradores (1972)

por sugerir “perdas necessárias”, indicando um papel crucial deste tipo de morte celular para a manutenção da homeostasia dos tecidos, além de participar da patogênese de certas doenças. Apoptose é, então, um mecanismo muito bem regulado de morte celular geneticamente programada que ocorre naturalmente.

A apoptose é essencial ao desenvolvimento embrionário, para a manutenção do número de células nos tecidos e contribui para a eliminação de linfócitos auto-reativos e de células infectadas. Este processo é altamente conservado evolutivamente, sendo bem caracterizado em nematodos como o *Caenorhabditis elegans* (Hengartner, 1998).

A seqüência de eventos celulares ocorridos durante a apoptose inclui alterações morfológicas e bioquímicas: inicialmente a ativação de caspases leva a alterações no potencial da membrana mitocondrial acompanhada do aumento intracelular de Ca^{++} e do pH. A permeabilidade da membrana externa da mitocôndria permite a liberação de proteínas para o citoplasma, incluindo citocromo c (Green e Reed, 1998) e outros fatores pró-apoptóticos. Logo, ocorre a perda da assimetria lipídica observada pela translocação de resíduos de fosfatidilserina (PS) para a camada externa da membrana plasmática. A exposição de PS tem um importante papel na opsonização dos corpos apoptóticos e subsequente fagocitose (revisto por Holdenrieder e Stieber, 2004). A ativação de endonucleases específicas leva à clivagem da cromatina em fragmentos de aproximadamente 200pb e finalmente, o processo culmina com a desintegração da célula em corpos apoptóticos que serão removidos através da fagocitose por outras células, sem que um processo inflamatório seja iniciado (revisto por Vermes *et al.*, 2000).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é através dos receptores da morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. Além dos receptores da morte, a apoptose pode também ser deflagrada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial, tais como lesão do DNA (via gene *p53*), alterações nas vias metabólicas (aumento do cálcio intracelular, redução do pH, estresse oxidativo), drogas, toxinas ou privação dos fatores de crescimento (revisto por Parolin e Reason, 2001).

Um ponto central durante a ativação da cascata de sinalização que envolve a apoptose, sem dúvida, é a participação das caspases. Estas são sintetizadas como precursores inativos sendo ativadas após clivagem proteolítica em resíduos de aspartato. Os sinais de ativação incluem a ligação de sinais de morte extracelulares a receptores de superfície ou a liberação de proteínas específicas da mitocôndria induzida pela ausência de fatores de crescimento (Figura 1.3).

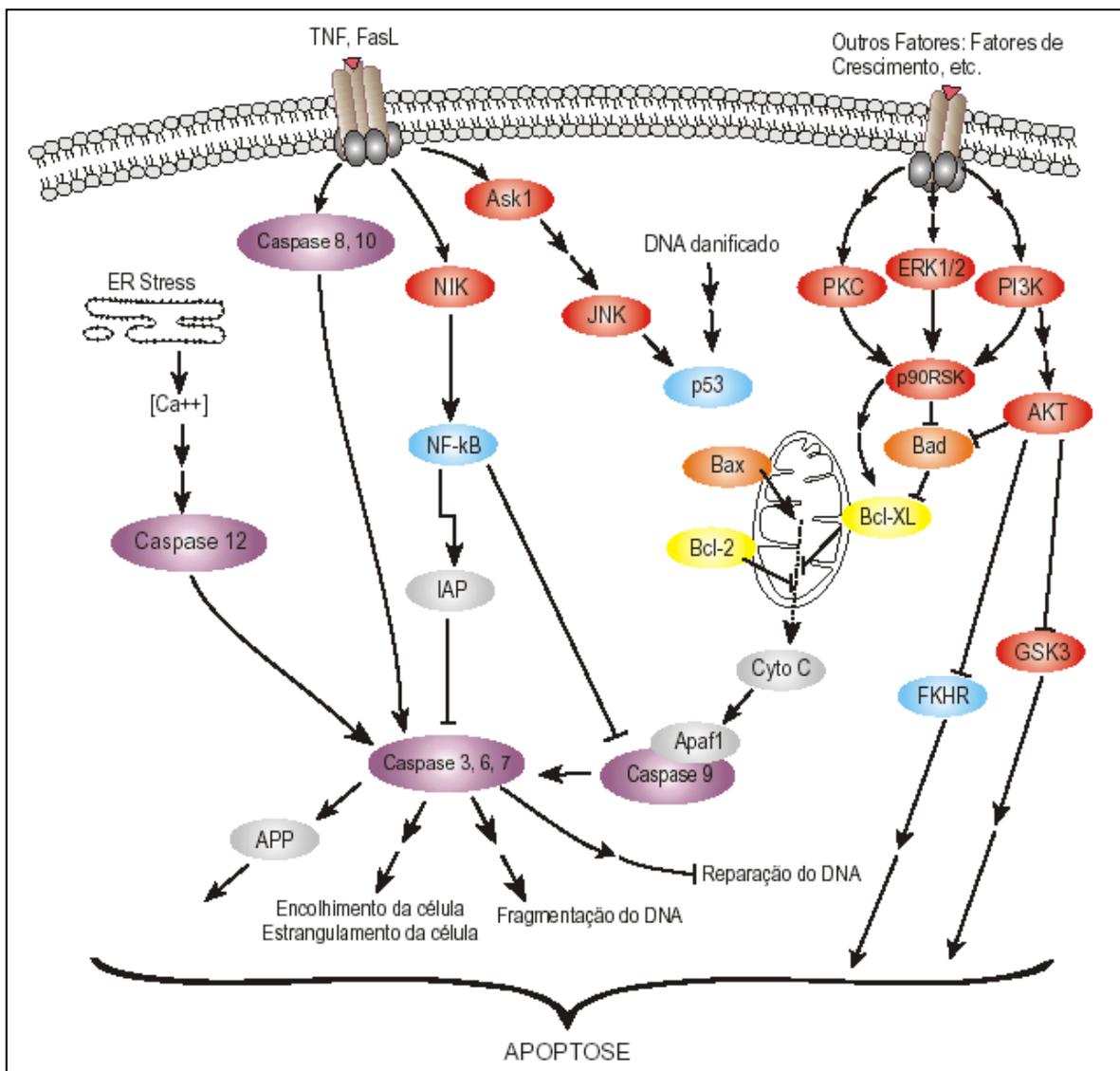


Figura 1.3: Vias sinalizadoras de apoptose.

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada pela ausência de fatores tróficos enquanto a via extrínseca é desencadeada pela ligação de “sinais de morte” extracelulares a receptores de superfície. Fonte: BioAgency: www.bioagency.com.br

Uma vez ativadas, as caspases podem clivar outras caspases resultando numa amplificação de uma rede que, efetivamente, levará a célula a um ponto irreversível no processo de morte celular denominado “point of no return” (Green, 1998; Wolf e Green, 1999). Particularmente, a caspase-3 tem um papel-chave em várias vias de transdução de sinal que levam à apoptose. Seu papel efetor contribui na clivagem de citoqueratina, exposição de PS (necessária para a fagocitose da célula apoptótica por macrófagos), inibição de genes responsáveis pela estabilidade, integridade e ao reparo do DNA e ativação de endonucleases que causam a característica fragmentação da cromatina (revisto por Holdenrieder e Stieber, 2004).

A morte celular por apoptose mediada pela ativação de caspases tem sido extensamente estudada e atualmente, três vias sinalizadoras de apoptose são aceitas de acordo com a caspase iniciadora ativada. São elas: a via dos receptores de morte, utilizando a caspase-8; a via mitocondrial, na qual a liberação de proteínas do interior da mitocôndria leva à ativação de caspase-9 e a via de estresse do retículo endoplasmático, atribuída à ativação de caspase-12 (revisto por Guimarães e Linden, 2004).

Muitos dos receptores de morte pertencem à família de genes do TNF (Fator de Necrose Tumoral), são eles: Fas (CD95 ou Apo-1), TNF-R1, DR3 (Apo-3), DR4 e DR5 (Apo-2). Os ligantes que ativam estes receptores são moléculas estruturalmente relacionadas, que pertencem à superfamília do TNF, tais como: FasL (ligante de Fas), TNF- α , linfotóxina α , Apo3L, Apo2L ou TRAIL (Ashkenazi e Dixit, 1998). Estes ligantes específicos induzem a trimerização do receptor e ocorre a associação de proteínas intracelulares aos domínios de morte, formando o DISC (“death-inducing signaling complex”). No caso dos receptores Fas/Apo1/CD95, a pró-caspase 8 se associa ao complexo formado e é ativada por autoclivagem. Logo após, caspases efetoras são ativadas, como caspases-3, -6 e -7 levando a célula à apoptose (Wallach *et al.*, 1999). Enquanto que o TNF-

R1 usa uma via intracelular alternativa como JNK/AP-1 e NF- κ B, que estão envolvidas na resposta imune, diferenciação e proliferação (Nagata,1997).

A via mitocondrial de indução de apoptose ocorre devido à ausência de fatores de crescimento essenciais à sobrevivência celular e acarreta a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria seguida pela liberação de citocromo c, Smac/Diablo, AIF (“apoptosis inducing factor”) e endonuclease G. O citocromo c é normalmente encontrado na face interna da membrana mitocondrial e está associado com cardiolipinas, exclusivamente encontradas na mitocôndria. Evidências sugerem que a dissociação de citocromo c das cardiolipinas é uma etapa crítica para a liberação de citocromo c para o citosol e a indução de apoptose (Orrenius, 2004). Após sua liberação, o citocromo c forma um complexo denominado apoptossomo, contendo Apaf-1 (“apoptosis protease-activing factor-1”), o iniciador pró-caspase-9 e o citocromo c. Este complexo leva à clivagem de pró-caspase-9 e inicia a cascata de caspases efetoras como pró-caspases–3, –6 e –7. A liberação de Smac/Diablo contribui para a inibição de IAPs (apoptotic proteins), impedindo a ativação de caspases pelo bloqueio da clivagem destas pró-enzimas. A translocação do AIF para o núcleo inicia a condensação da cromatina e, finalmente, à fragmentação do DNA (revisto por Martinvalet *et al.*, 2005).

São reconhecidos dois mecanismos que levam à permeabilização da membrana mitocondrial externa. O primeiro envolve a indução da abertura do poro de transição de permeabilidade (“permeability transition”, PT), seguida pela expansão da matriz mitocondrial devido à sua hiperosmolaridade. Ocorre, então, a ruptura da membrana mitocondrial externa e posterior liberação de citocromo c (Crompton, 1999; Gogvadze *et al.*, 2001). O segundo mecanismo envolve a participação de membros da família Bcl-2. A proteína Bcl-2 (“B-cell lymphoma/leukemia”) é encontrada na face citoplasmática da membrana externa da mitocôndria, no retículo endoplasmático e no envelope nuclear (revisto por Sorenson, 2004). Existem membros anti-apoptóticos como Bcl-2 e Bcl-X_L que inibem a liberação de proteínas indutoras de apoptose e membros com atividade pró-apoptótica, como Bax e Bak. Adicionalmente, a homo-oligomerização destas com as proteínas Bid e Bim têm um importante papel pró-apoptótico (revisto por Orrenius, 2004).

Além dos receptores de morte e da ausência de fatores de crescimento, agentes patogênicos também podem induzir o processo de morte celular por apoptose, bem como inibi-lo para seu próprio benefício (revisto por Knodler e Finlay, 2001) durante o processo infeccioso, conforme será discutido a seguir.

1.6.2 Modulação da Apoptose por Bactérias Intracelulares Facultativas

A adesão e posterior fagocitose de bactérias pode desencadear atividades antimicrobianas essenciais na resposta imune inata do indivíduo. Entretanto, mesmo fagócitos altamente especializados em destruir agentes bacterianos podem ser levados à apoptose. Inúmeras são as citações onde bactérias modulam a apoptose em macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, entre outros tipos celulares (revisto por DeLeo, 2004). Bactérias gram-negativas como *Yersinia enterocolítica* (Mills *et al.*, 1993) e *Legionella pneumophila* (Muller *et al.*, 1996) têm sido mostradas como indutoras de apoptose.

A *Legionella pneumophila* é uma bactéria intracelular facultativa que invade e se replica dentro de macrófagos alveolares, monócitos e células epiteliais alveolares e efetivamente bloqueia a maturação do fagossomo ao longo da via de endocítica (Kwaik, 1998). Entretanto este patógeno induz apoptose durante os estágios iniciais da infecção através de seu contato com receptores de morte na superfície de macrófagos e células epiteliais, e subsequentemente ativando caspase-3 (Gao e Kwaik, 1999). Estes dados traduzem uma interessante estratégia deste patógeno para invadir, proliferar e, eventualmente, escapar da célula hospedeira.

Shigella flexneri, agente causador da disenteria bacilar e *Salmonella typhimurium*, responsável por uma inflamação intestinal aguda muito semelhante à provocada por *Shigella*, utilizam mecanismos similares de indução de apoptose em macrófagos *in vivo* e *in vitro*. As moléculas IapB da *Shi. flexneri* e SipB da *Salmonella* spp. secretadas no citosol de macrófagos interagem com caspase-1 para desencadear apoptose (Hilbi *et al.*, 1998; Hersh *et al.*, 1999). Evidências indicam que a apoptose induzida pela *Salmonella* poderia contribuir para o escape da bactéria devido à extinção de nutrientes ou até mesmo pelo fim da

replicação bacteriana (Lundberg *et al.*, 1999), favorecendo sua disseminação. Sabe-se, também, que estas bactérias não induzem apoptose em células epiteliais (Lundberg *et al.*, 1999), entretanto, o mecanismo tecido-específico de indução de apoptose induzida por *Shigella* e *Salmonella* ainda não é bem compreendido.

A *Yersinia* induz apoptose *in vivo* e *in vitro* de várias células de mamíferos pela translocação da molécula YopJ para o interior da célula através do sistema de secreção do tipo III. Esta molécula se liga à proteínas quinase quinase mitógeno-ativada (MAPKK), reprimindo a ativação de NF- κ B (Mills *et al.*, 1993).

1.6.3 Modulação da Apoptose por Bactérias Intracelulares Obrigatórias

A indução e/ou inibição de apoptose por patógenos intracelulares obrigatórios tem um importante papel na patogenia de uma variedade de doenças infecciosas. Durante a infecção, a apoptose pode funcionar como um mecanismo protetor para o hospedeiro, evitando a disseminação do antígeno e eliminando-o sem suscitar processos inflamatórios que causam dano ao tecido. Por outro lado, a morte da célula hospedeira resulta na impossibilidade de sobrevivência do agente invasor, por isso a modulação de diferentes vias que resultam na apoptose confere uma excelente estratégia de sobrevivência ao patógeno.

Na literatura encontramos diversos exemplos de bactérias intracelulares obrigatórias, incluindo *Rickettsia rickettsii* (Clifton *et al.*, 1998), *Chlamydia trachomatis* (Fan *et al.*, 1998), *Chlamydia psittaci* (Coutinho-Silva *et al.*, 2001) e *Chlamydia pneumoniae* (Rajalingam *et al.*, 2001) que ativamente bloqueiam a apoptose em suas células hospedeiras.

Diferentemente da indução da apoptose por *Yersinia* através da inibição de NF- κ B, dados da literatura indicam a participação deste fator transcricional sendo essencial para o bloqueio da apoptose em células endoteliais infectadas por *R. rickettsii* (Clifton *et al.*, 1998).

O gênero *Chlamydia*, por sua vez possui um duplo papel na apoptose, pois ora induz a apoptose, ora inibi este processo e isto constitui uma estratégia utilizada em diferentes estágios da infecção (Fan *et al.*, 1998; Ojcius *et al.*, 1998). Este gênero possui três espécies que são patogênicas para o ser humano: *C.*

trachomatis, *C. psittaci* e *C. pneumoniae*; todas estas com potencial de infecção crônica e aguda em diferentes tecidos (revisto por Fischer *et al.*, 2001). Este patógeno intracelular obrigatório requer de 2 a 3 dias para sua replicação e dispersão para as células adjacentes (revisto por Gao e Kwaik, 2000) e por isso necessita de um ambiente favorável no hospedeiro. Assim, a ação anti-apoptótica exercida por esta bactéria durante o início da infecção contribui para a manutenção de atividades metabólicas da célula infectada. Este patógeno utiliza diferentes mecanismos para inibir a apoptose da célula hospedeira, dentre eles podemos citar a ativação de NF- κ B via receptor do tipo *Toll-Like*, indução de proteínas anti-apoptóticas como IAP (“inhibitors of apoptosis protein”) e Bcl-2 (revisto por Byrne and Ojcius, 2004).

Sabe-se que a virulência das micobactérias está intimamente relacionada à sua capacidade de interferir na maquinaria da célula hospedeira e sobreviver dentro do fagossomo, como uma alternativa para garantir sua disseminação. Vários trabalhos descrevem a capacidade de *M. tuberculosis* (Malik *et al.*, 2003; Maiti *et al.*, 2001) e moléculas relacionadas como LAM (Vergne *et al.*, 2003) e fosfatidilinositol (Fratti *et al.*, 2003), em prevenir a maturação do fagossomo.

Em 2003, Hernandez e colaboradores demonstraram a indução de apoptose em macrófagos infectados com *M. leprae*. Ainda neste trabalho, os autores demonstraram a expressão de RNA mensageiro para os genes Bax e Bak, que estão diretamente envolvidos na regulação da apoptose.

1.6.4 O Fator Transcricional NF- κ B

As vias de sinalização iniciadas a partir da ligação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) aos diferentes receptores do tipo *Toll-like* (TLRs) culmina com a ativação de NF- κ B (revisto por Naumann, 2000). Este fator transcricional tem sido descrito por seu papel na expressão de genes que estão envolvidos na resposta inflamatória através da sinalização por TLR, entretanto sua ativação também está relacionada à resistência a apoptose. Patógenos como *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Helicobacter*, *M. tuberculosis*

ativam NF- κ B levando à modulação de mecanismos pró e/ou anti-apoptóticos na célula hospedeira (revisto por Gao and Kwaik, 2000).

Rel ou NF- κ B compreende uma família de fatores de transcrição relacionados estruturalmente e encontrada em eucariotos. Está envolvida no controle da expressão de um grande número de genes que controlam processos essenciais como respostas imunes e inflamatórias, crescimento celular e apoptose (Burstein and Duckett, 2003). O fator de transcrição NF- κ B é um heterodímero, composto de duas subunidades. O heterodímero primeiramente descrito e mais abundante em vários tipos celulares consiste de uma subunidade de 50kDa (p50-NF κ B1) e outra de 65kDa (p65;RelA), o qual se encontra no citoplasma associado a uma proteína inibitória de sua atividade, a I κ B (Mercúrio e Manning, 1999). A atividade dos complexos Rel/NF- κ B é regulada pela interação com os membros da família de inibidores I κ B, os quais interagem com a seqüência de localização nuclear, localizada na porção carboxi-terminal do domínio RHD (“Rel homology domain”) das subunidades de NF- κ B, inibindo a translocação do fator de transcrição do citoplasma para o núcleo (Baeuerle, 1998).

NF- κ B é ativado por diversos estímulos, incluindo citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1, ésteres de forbol, toxinas bacterianas como LPS, vírus, radiação e uma variedade de mitógenos (Karin and Ben-Neriah, 1999). Estes estímulos ativam o complexo I κ B quinase, levando à fosforilação de I κ B. Após fosforilação, I κ B sofre degradação dependente de ubiquitinação pelo proteassoma 26S, resultando no desligamento e subsequente translocação do complexo p50/RelA para o núcleo (May and Ghosh, 1998).

Recentemente, Pereira e col. (2005) demonstraram a participação do fator transcricional NF- κ B na resposta de CS à infecção por *M. leprae*. Neste trabalho mostraram a translocação de NF- κ B após tratamento com *M. leprae* e o predomínio de repressão transcricional em CS ST88-14. Entretanto, apesar destes autores mostrarem claramente a translocação de NF- κ B para núcleo em CS tratadas com *M. leprae*, os efeitos moleculares e fisiológicos na célula desta translocação não foram definidos.

1.7 Influência do *M. leprae* na Sobrevivência e Proliferação de Células de Schwann

Dados da literatura sugerem uma relação harmoniosa entre o *M. leprae* e a CS. Por isso, é amplamente aceito que uma vez dentro da CS o bacilo se multiplique lentamente durante anos. Mukherjee e Antia (1985) obtiveram significativa multiplicação do *M. leprae* sem evidências de toxicidade celular em culturas de gânglios de raiz dorsal (DRG) de camundongos neonatos.

Mais recentemente, em 2002, Rambukanna e colaboradores demonstraram que o *M. leprae* promove desmielinização contato-dependente na ausência de células do sistema imune sem causar morte das CS. Ao contrário, diante este efeito direto do *M. leprae*, as CS proliferam significativamente tanto *in vitro* quanto *in vivo* aumentando o número de CS amielínicas, que constituem as células hospedeiras preferenciais do bacilo. O fato das CS mielinizantes serem extremamente resistentes à invasão pelo *M. leprae* reforçam a hipótese de que o processo de desmielinização por esta micobactéria constitui uma interessante estratégia de sobrevivência. Os dados mencionados sugerem que pelo menos no início da infecção, quando o infiltrado inflamatório ainda é escasso no nervo, pode existir uma relação harmoniosa entre o *M. leprae* e a célula hospedeira, permitindo assim a manutenção de um nicho favorável para sua sobrevivência e proliferação.

A interação do bacilo de Hansen com a CS durante a fase inicial da infecção constitui uma etapa crucial para o estabelecimento e disseminação da

doença. Desse modo, a compreensão das estratégias utilizadas pelo *M. leprae* para a colonização bem sucedida do nervo periférico pode ser utilizada no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle desta doença.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Investigar o efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre a célula de Schwann e o possível papel dos hormônios IGF-I e IGF-II nesta proteção.

Objetivos específicos:

- Estabelecer um modelo de indução de morte celular por carência de soro em células de Schwann humanas da linhagem ST88-14;
- Avaliar o efeito protetor do *M. leprae* induzido por carência de soro em células da linhagem ST88-14;
- Caracterizar morfológicamente a linhagem ST88-14 em meio sem soro e incubadas com *M. leprae*;
- Analisar parâmetros indicativos de morte celular por apoptose induzida por privação de soro em culturas da linhagem ST88-14 na presença de *M. leprae*;
- Avaliar a capacidade do meio condicionado de culturas da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae* de prevenir a morte celular;
- Verificar a capacidade de *M. leprae* induzir a expressão de RNAm para IGF-I e IGF-II na linhagem ST88-14;

- Demonstrar a expressão do receptor de IGF-I na linhagem de células de Schwann ST88-14;
- Avaliar o efeito protetor do IGF-I sobre a morte celular induzida por carência de soro em CS ST88-14;
- Verificar se o efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre as CS ST88-14 é mediado pela ativação de NF-κB.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção de Células de Schwann da Linhagem ST88-14

A linhagem de células de Schwann ST88-14 foi isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I e doada pelo Dr. Jonathan A. Fletcher do Departamento de Patologia do Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA. Esta linhagem é estocada em alíquotas, no nitrogênio líquido, em solução contendo 90% de soro fetal bovino (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil) e 10% de DMSO (Sigma).

Para o início de cultivo, as células eram descongeladas em banho-maria a 37°C, ressuspensas em um volume de 10mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina, 1 mM de L-Glutamax (Invitrogen), pH 7,4. As células eram centrifugadas a 500 x g por 10 min para a retirada do crioprotetor DMSO e, então, ressuspensas novamente em meio RPMI completo com soro. As culturas eram mantidas em garrafas de cultura (NUNC) de 25 cm² até obter uma confluência de aproximadamente 70% em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

Por serem células aderentes, seu repique era feito retirando-se o sobrenadante da cultura, lavando a monocamada com PBS e adicionando-se 0,125% de tripsina, 0,2% de EDTA (Invitrogen) por até 2 min em estufa a 37°C. Logo após, adicionava-se meio RPMI completo com soro e a suspensão celular centrifugada por 10 min a 500 x g. Posteriormente as células eram ressuspensas em meio RPMI completo com 10% de soro, contadas em câmara de Neubauer e

aproximadamente $3,5 \times 10^5$ células eram transferidas para uma nova garrafa de cultura. Após a sexta passagem, as culturas eram desprezadas e nova alíquota estoque da linhagem era descongelada e o cultivo reiniciado.

3.2 *Mycobacterium leprae*

Para o estudo da interação do *M. leprae* com as células de Schwann foram utilizadas duas fontes diferentes de micobactérias letalmente irradiadas, conforme descrito a seguir:

1) *M. leprae* proveniente de tecidos infectados de tatus foi doado pelo Dr. Patrick J. Brennan do Departamento de Microbiologia da Colorado State University, Fort Collins, CO, EUA. Estes bacilos foram obtidos através de purificação de tecidos de fígado e baço de animais infectados utilizando o método de Draper (Hunter et al., 1982).

2) *M. leprae* proveniente do coxim plantar de camundongos atímicos (nude) infectados foi gentilmente cedido pelo Dr. James Krahenbuhl, do National Hansen's Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Baton Rouge, LA, EUA.

Para a realização dos ensaios de interação do *M. leprae* com a célula de Schwann na presença de inibidores de NF- κ B foram utilizadas bactérias purificadas de camundongos nu/nu. Os demais ensaios foram realizados com *M. leprae* proveniente de tatus.

O número de bacilos recuperados foi determinado utilizando o método de Shepard e McRae (1968). Para tal, retira-se uma pequena alíquota para preparação de esfregaços em lâminas de vidro, para coloração pelo Método de Kynion fazendo diluições de 10 e 100 vezes ou sem diluição do material. Os esfregaços eram fixados com formol-leite em vapor de formaldeído e calor. Os bacilos eram corados pelo método de Kynion utilizando fucsina básica por 5 min, lavando-se com água corrente, lavados ligeiramente com solução álcool-ácida e lavados novamente com água para a retirada de excesso do corante. Finalmente, os esfregaços eram corados com azul de metileno por 3 min e lavados com água

para a retirada do excesso do corante. A contagem do número de bacilos foi realizada em microscópio óptico com lente de imersão de 1000x (Nikon Eclipse E400). Os bacilos eram, então, estocados a -20°C até sua utilização.

3.3 Cultivo, tratamento com *M. leprae* e ensaios de viabilidade de células de Schwann ST88-14

3.3.1 Reação Enzimática de Redução do Sal Metiltetrazólio (MTT)

Cerca de 2×10^4 CS ST88-14 por poço foram plaqueadas em microplaca de 96 poços (NUNC – fundo chato) com 50 μL de meio RPMI completo suplementado com 10% de soro e tratadas ou não com *M. leprae*. Posteriormente a microplacaplaca foi centrifugada à temperatura ambiente por 10 min a 400 x g. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO_2 e após atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril contendo CaCl_2 para posterior adição de meio RPMI sem soro e retorno das culturas à estufa.

Para a avaliação da viabilidade celular nos tempos zero, 24 e 48 horas após a retirada de soro, cada poço da cultura foi incubado com 10 μL de MTT (1,0 mg/mL - Sigma) por 4 horas a 37°C na estufa de 5% de CO_2 . Após este período, 100 μL de SDS a 10% foi adicionado, as culturas homogeneizadas e a absorbância determinada em leitor de ELISA a 590nm (Syroid *et al.*, 1999). Os resultados apresentados foram expressos em valores de densidade ótica (D.O.), correspondentes à redução enzimática do MTT e, transformados em porcentagem de sobrevivência celular, onde as médias da leitura do tempo zero corresponderam a 100% de viabilidade celular.

3.3.2 Ensaio de exclusão de azul de Tripan

Foram plaqueadas 3×10^4 CS ST88-14 por poço em placa de 24 poços num volume de 500 μL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após um período de 6 horas incubadas a 37°C em estufa de 5% de CO_2 , as células foram

tratadas ou não com *M. leprae* e a placa centrifugada a 400 x g por 10 min à temperatura ambiente e devolvida à estufa. Após incubação por cerca de 18 horas, o meio foi removido e os poços lavados por duas vezes com PBS estéril contendo CaCl₂ e o meio RPMI sem soro adicionado às culturas. As culturas foram mantidas a 37° C em estufa de 5% de CO₂ e foram feitas contagens do número total de células vivas e mortas nos tempos zero, 24 e 48 horas. Para a realização deste ensaio, o meio contendo as células não aderentes foi transferido para microtubos e as células aderentes foram removidas utilizando tripsina a 0,125%, diluída em PBS. Em seguida as células descoladas da placa foram reunidas às células não aderentes e centrifugadas a 325 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente em microcentrífuga. As células foram, então, ressuspensas em 20 µL de PBS e tratadas com 20 µL de azul de Tripán a 0,2% para a imediata contagem do número de células viáveis e mortas em câmara de Neubauer.

Para a representação dos resultados a porcentagem de sobrevivência das células em cada condição foi determinada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de sobrevivência} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células viáveis em 24 ou 48h}}{\text{n}^{\circ} \text{ de células viáveis no tempo zero}} \times 100$$

3.3.3 Coloração com Diacetato de Fluoresceína e Brometo de Etídeo

Utilizamos a coloração por diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo para a determinação de células viáveis (coradas em verde) e mortas (coradas em vermelho) em ensaio de sobrevivência idêntico ao modelo descrito no item anterior. Para tal, nos tempos zero, 24 e 48 horas, as células tratadas ou não com *M. leprae* foram lavadas com PBS estéril acrescido de CaCl₂ e coradas com 500 µL da solução contendo 2 µg/mL de diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo a 4 µg/mL por 5 min. Logo após, as imagens das culturas foram geradas através de observações ao microscópio de fluorescência invertido Nikon TE 300 diretamente na placa de 24 poços.

3.4 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial

Para tal procedimento, cerca de $1,5 \times 10^5$ células ST88-14 eram cultivadas em placas de 6 poços num volume de 2,0 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB. As culturas eram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 6h antes do tratamento com *M. leprae* na proporção bactéria:célula de 50:1. Após adição das bactérias, as placas eram centrifugadas a 400 x g por 10 min à temperatura ambiente e levadas à estufa por 18h. Os poços foram, então, lavados duas vezes com PBS estéril contendo CaCl₂ e meio RPMI fresco sem sorofoi adicionado aos poços.

Para a análise de indução de apoptose, as células eram retiradas da placa, nos tempos zero, 2, 4 e 6 h após a retirada de soro, com 500 µL de tripsina diluída em PBS e centrifugadas a 500 x g à temperatura ambiente por 10 min. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1,0 mL de PBS e incubadas com 10nM de iodeto de 3,3-dihexyloxacarbo-cianina (DiOC₆ – Molecular Probes), um corante lipofílico incorporado pela matriz mitocondrial (Petit *et al.*, 1995), por 15 min à temperatura ambiente, protegido da luz (Lecoeur *et al.*, 2001). Logo depois as células foram novamente lavadas, centrifugadas para a retirada de fluorocromos livres, ressuspensas em 500µL de PBS e mantidas a 4°C até o momento da leitura. Iodeto de propídeo (PI) a 0,7 µg/mL foi adicionado aos tubos em cada condição 5 minutos antes da leitura (Faria, 2004). Foram adquiridos 10.000 eventos nos canais FL-1 e FL-3 para DiOC₆ e PI, respectivamente, em FACScan (Becton & Dickinson) e analisados pelo programa WinMDI.

3.5 Coloração de núcleos com Bis-benzemida

Com a finalidade de investigar a morfologia nuclear cerca de 3×10^4 células ST88-14 por poço foram plaqueadas em placa de 24 poços sobre lamínulas de

vidro (Fisherbrand, Pittsburg, E.U.A) tratadas com silane a 4%. As culturas foram mantidas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 6 h. Em seguida algumas culturas foram tratadas com *M. leprae* previamente marcado com FITC na proporção bactéria:célula de 50:1, as placas foram centrifugadas a 400 x g por 10 min à temperatura ambiente e permaneceram por mais 18 h na estufa. Logo após, as células foram lavadas com PBS contendo CaCl₂ e meio RPMI sem soro adicionado aos poços. Nos tempos zero e 48 h após a retirada de soro, o sobrenadante das culturas foi removido e os poços lavados com PBS contendo CaCl₂ e fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 10 min. As lamínulas foram transferidas para uma placa-molde de cera para a lavagem com PBS e posterior coloração com solução de bis-benzemida por 5 min e uma última lavagem com PBS (Chuenkova *et al.*, 2001). Colocou-se uma gota de “anti-fading” (Merck) em uma lâmina de vidro. As lamínulas foram, então, transferidas para lâminas, de modo que ficassem voltadas para a lâmina. As lamínulas foram posteriormente imobilizadas utilizando uma gota de Entellan sobre outra lamínula que foi colocada sobre a lâmina com a cultura. Posteriormente as lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência.

3.6 Ensaio de Viabilidade com Meio Condicionado

Ensaio de viabilidade celular foram realizados e avaliados conforme descrito no item 3.3.2. O sobrenadante (meio condicionado) das culturas tratadas ou não com *M. leprae* na proporção bactéria:célula de 50:1 foi coletado após 24 e 48 h de incubação em meio sem soro, em microtubos e centrifugados a 325 x g por 10 min à temperatura ambiente em microcentrífuga. O meio condicionado foi recolhido e transferido para novos microtubos e mantidos a 4°C até sua utilização em novas culturas.

Novas placas foram preparadas com 3x10⁴ células ST88-14 por poço e mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO₂ por 24 horas. Os poços foram lavados duas vezes com PBS contendo CaCl₂ e adicionado meio condicionado de culturas tratadas ou não com *M. leprae*.

A viabilidade das culturas foi analisada através da coloração por azul de Tripán por até 48 h após a adição do meio condicionado. Culturas controles (incubadas em meio RPMI fresco sem soro) foram adicionadas aos experimentos e avaliadas pela mesma metodologia.

3.7 Extração e Purificação de RNA Total de Células de Schwann

Extraíu-se o RNA total de células ST88-14 cultivadas em meio RPMI complementado com 10% de SFB em placa de 6 poços e tratadas ou não com *M. leprae* na proporção bactéria:célula de 10:1, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do reagente utilizado (Trizol - Invitrogen).

Após a retirada do sobrenadante das culturas, as células aderidas foram lavadas duas vezes com PBS e, então, lisadas pela adição de 200 μ L do reagente Trizol. O material era imediatamente processado, ou estocado a -70° C.

Para a purificação do RNA total foram adicionados 200 μ L de clorofórmio para cada 1,0 mL do reagente Trizol. Posteriormente as amostras foram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, observou-se o aparecimento de fases com densidades distintas, sendo recolhida, então, a fase aquosa (superior) e transferida para um novo tubo. À estas amostras foram adicionados 500 μ L de isopropanol. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente o sobrenadante foi desprezado e as amostras foram novamente centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e foram realizadas lavagens com 1,0 mL de etanol gelado a 75% do precipitado através de centrifugações a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Em seguida, ressuspendeu-se o precipitado em 20 μ L de água deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

Após a purificação, o RNA total das células foi quantificado em espectrofotômetro Ultraspec 2100 Pro (Amersham, Biosciences) e sua integridade avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1,2 % na presença de formaldeído.

3.8 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total (5 μ g) de cada uma das amostras foi tratado com Dnase I livre de Rnase (Invitrogen) por 1 hora à temperatura ambiente com o objetivo de evitar contaminações com DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

As amostras foram ressuspensas em 10 μ L de água deionizada tratada com DEPC. Cada amostra foi dividida em duas alíquotas de 5 μ L cada e utilizadas em reações de síntese de cDNA na presença ou ausência da enzima transcriptase reversa (Superscript II – Invitrogen), usando oligo dT como iniciadores para gerar, respectivamente, e “cDNA good” e “cDNA mock” . As reações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante.

3.9 Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas utilizando-se como DNA molde os diferentes cDNAs sintetizados conforme descrito no item anterior.

A enzima utilizada nas reações de PCR foi a Taq DNA polimerase, recombinante (Invitrogen). As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L sob as seguintes condições: 2,5 μ L do tampão 10X da Taq polimerase, 200 mM de trifosfatos de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo utilizado, 2 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), 1 unidade (U) da enzima Taq polimerase e, como molde, utilizou-se 1 μ L de cada uma das reações de síntese de cDNA descritas no item 3.9.

A reação de PCR foi realizada em uma máquina PTC-100 (M.S. RESEARCH). O programa de ciclagem das reações de amplificação foi realizado da seguinte forma: 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 1min e 72°C por 1min e uma etapa final de extensão de 72°C por 7min.

Tabela 3.2: Seqüência de oligonucleotídeos utilizados e tamanho aproximado dos fragmentos esperados após a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

Produto amplificado	Seqüência dos iniciadores	Tamanho esperado do produto (pb)
GAPDH	5' GGGAAACTGTGGCGTGAT 3' 5' AAAGGTGGAGGAGTGGGT 3'	309
IGF-I	5' CAGCAGTCTTCCAACCC 3' 5' GGCGCTGGGCACGGACAG 3'	425
IGF-II	5' ACCGCCCCAGTGAGACCCT 3' 5' TTTGGCCTCCCTGAACG 3'	383

3.10 Eletroforese em Gel de Agarose

As reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, em TAE 1x e visualizadas sob luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

Os fragmentos amplificados foram submetidos à análise densitométrica (Alpha DigiDOC TM, Alpha Innotech Corporation) pelo programa KODAK 1D 3.6. Os gráficos apresentados foram feitos a partir do cálculo da razão entre valores de densitometria dos genes IGF-I, IGF-II e GAPDH e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

3.11 Obtenção de Lisado Total de Células de Schwann

Culturas confluentes de CS humanas ST88-14 em meio RPMI complementado 10% de SFB cultivadas em garrafas de 25 cm² foram lavadas duas vezes com PBS estéril e lisadas com 200 µL de tampão de lise (RIPA)

(Current Protocols in Molecular Biology) contendo inibidores de proteases por 15 min no gelo. Os extratos celulares foram passados em seringa de 1,0mL para a quebra do DNA e centrifugados a 14.000 x g por 15 min a 4°C. Em seguida, o material precipitado foi descartado e as proteínas contidas no sobrenadante foram dosadas com ácido Bicinonínico (Kit BCA – PIERCE, E.U.A), utilizando a albumina bovina sérica (BSA) como proteína padrão. As amostras foram imediatamente aplicadas em gel de poliacrilamida ou estocadas a – 20°C.

3.12 Eletroforese em Gel de Poliacrilamina na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

Para tal procedimento, 50 µg de proteína diluídas em tampão de amostra e fervidas durante 10 min foram aplicadas em gel de 8,5% de poliacrilamida. O padrão de massa molecular (Amershan, Uppsala, Suécia) utilizado é composto pelas seguintes proteínas: Fosforilase (94 kDa), Albumina de soro bovino (67 kDa), Ovalbumina (43 kDa), Anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina soybean (20,1 kDa) e Lactalbumina- α (14,4 kDa).

A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris/Glicina com 0,1% de SDS, utilizando-se a cuba Mighty Small II SE250/SE260 (Amershan) sob amperagem constante de 20 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2 horas.

3.13 Western blot

Após a eletroforese, o gel e a membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foram equilibrados em tampão de transferência e montados no suporte da cuba de transferência. O sanduíche montado (esponja, papel de filtro, gel, membrana de nitrocelulose, papel de filtro e esponja) foi colocado na cuba e em seguida, o tampão de transferência. A transferência foi realizada na mini cuba de transferência (Bio-Rad) utilizando corrente de 100V durante 1 hora.

Após a transferência, a membrana foi corada com solução amido black para a identificação do padrão de massa molecular e descorada por três lavagens de 5 min com TBS/T. Em seguida, a membrana foi bloqueada com solução de leite 3% (p/v) em TBS/T (TBS/T/leite) por 2 horas. Logo após a membrana foi incubada por 1 hora com 1 µg/mL do anticorpo primário IGF-IR-α (Santa Cruz) diluído em TBS/T/leite. Após este período, a membrana foi lavada três vezes com TBS/T por 10 min e, então, incubadas por 40 min com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma) diluído 1:12.000 em TBS/T/leite. A membrana foi lavada três vezes com TBS/T por 10 minutos e transferida para um cassete de revelação.

A revelação foi realizada adicionando-se sobre à membrana 1,0 mL de substrato quimioluminescente (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amershan). Um pedaço de filme (Hyperfilm ECL, Amershan) foi colocado sobre a membrana, no escuro, por 3 min e, então, o filme foi revelado utilizando-se procedimento convencional.

3.14 Marcação Intracelular por Citometria de Fluxo

Culturas confluentes de CS ST88-14 em meio RPMI contendo 10% de soro cultivadas em garrafas de 25 cm² foram tripsinizadas e centrifugadas a 500 x g por 10 min a 4°C. As células precipitadas foram lavadas duas vezes com PBS sob centrifugações a 500 x g por 10 min a 4°C. Os procedimentos de marcação intracelular foram realizados de acordo com protocolo recomendado pela empresa R&D Systems.

Cerca de 4 x 10⁵ células foram distribuídas em microtubos e fixadas em paraformaldeído a 4% por 10 min à temperatura ambiente sob agitação. Logo em seguida as células foram lavadas mais uma vez em PBS por centrifugação a 600 x g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, o PBS foi descartado e as células foram incubadas com soro AB humano (1:2) por 1 minuto, à temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e, então, ressuspensas em 2,0 mL da solução de permeabilização contendo 0,1% de saponina. Após nova

centrifugação, parte da solução de permeabilização foi retirada, permanecendo apenas 200 μ L desta solução nos tubos para posterior incubação com os anticorpos primários anti-IGF-IR- β (Santa Cruz, E.U.A) ou anti-S-100 (DAKOCytomation) por 30 min à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas com a solução de permeabilização e incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Após nova lavagem com solução de permeabilização, as células foram ressuspensas em PBS e centrifugadas mais uma vez. Finalmente, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% e submetidas à aquisição de 10.000 eventos em FACSCalibur (Becton & Dickison) em canal de fluorescência FL-1.

3.15 Ensaios de viabilidade celular na presença de inibidores do fator transcricional NF- κ B

Cerca de 3×10^4 CS ST88-14 foram cultivadas em 500 μ L de meio RPMI contendo 10% de SFB em placa de 24 poços e mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Após 6 horas, os inibidores – em concentrações adequadas de maneira a assegurar sua especificidade – descritos na tabela 3.1 ou DMSO (veículo) e SN50m (peptídeo análogo ao SN50, mas não ativo) foram adicionados por 15 min antes do tratamento com *M. leprae* na proporção bactéria:célula de 50:1. Nestes ensaios foram utilizadas bactérias letalmente irradiadas, provenientes de camundongos nude. Após centrifugação a 400 x g por 10 min à temperatura ambiente, as placas retornaram à estufa e, no dia seguinte, o soro foi retirado pela lavagem dos poços com PBS contendo CaCl₂ e adicionou-se meio RPMI sem soro. As culturas foram mantidas na estufa por até 48h após a remoção de soro.

A viabilidade celular foi avaliada por azul de Tripán, conforme previamente descrito, nos tempos zero, 24 e 48 horas após a retirada de soro.

Tabela 3.3: Inibidores farmacológicos que agem sobre a via de NF- κ B e que foram utilizados neste trabalho.

Inibidor	Concentração	Referência
Talidomida (Calbiochem)	25 µg/mL	Pereira <i>et al.</i> , 2005
Gliotoxina (Sigma)	0,2 µg/mL	Ward <i>et al.</i> , 1999
SN50 (Calbiochem)	9 mM	Shou <i>et al.</i> , 2002

3.16 Marcação do *M. leprae* com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)

Os bacilos utilizados nos experimentos que verificaram a morfologia do núcleo de CS foram marcados com 0,1 mg/mL de FITC incubados por 1 hora em PBS à temperatura ambiente. A suspensão de micobactérias foi centrifugada a 14000 x g em microcentrífuga, e o sedimento foi ressuspensão em 1,5 mL de PBS e centrifugado mais uma vez. Este procedimento foi repetido novamente para a retirada de fluorocromo livre (Drevets *et al.*, 1991). As micobactérias marcadas foram, então, ressuspensas em PBS. A eficiência da marcação foi verificada através da observação em microscópio de fluorescência. As micobactérias marcadas foram aliqüotadas e estocadas no freezer -70°C até a sua utilização, sendo uma alíquota separada para determinação da concentração do número de bacilos.

3.17 Limpeza de lamínulas e tratamento com Silane

As lamínulas (Fisherbrand, Pittsbur, PA, EUA) foram colocadas em placas de vidro comum sobre um pedaço de gaze, embaladas, esterilizadas em autoclave e, então, colocadas em solução de silane a 4% (aminopropyltriethoxysilane) (Sigma) em etanol absoluto (v/v) por 4 min. Em seguida, foram transferidas para etanol absoluto por 2 min por duas vezes. Logo após, foram lavadas com água destilada estéril duas vezes por 2 minutos e, então, acondicionadas em embalagens estéreis e colocadas na estufa a 37° C por

24 horas para a secagem. As lamínulas foram estocadas em recipiente seco e estéril até o momento do uso.

3.18 Análise Gráfica e Estatística

Os ensaios eram realizados em duplicatas ou triplicatas e a média de cada experimento era calculada, além de seu desvio padrão e os valores eram plotados em gráficos de barras utilizando o programa MicroCal Origin.

Foi utilizado o teste t para a comparação das médias dos experimentos e determinação das diferenças estatísticas considerando as diferenças significativas para valores de $p < 0,05$.

3.19 Soluções

Meio RPMI 1640 (Invitrogen, E.U.A)

1x	Meio RPMI 1640 (desidratado)
10 mM	HEPES
1 mM	Glutamax
100 U/mL	Penicilina
100 U/mL	Estreptomicina
1 L	Água deionizada (q.s.p)

Esta solução era esterilizada por filtração em membrana de $0,22\mu\text{m}$ de porosidade e estocada a 4°C . No momento de sua utilização adicionava-se 10% (v/v) de soro fetal bovino.

Salina tamponada com Fosfato (PBS)

136 mM	NaCl
2 mM	KCl
10 mM	Na_2HPO_4

1 mM KH_2PO_4

O pH era ajustado para 7,2 e, em seguida, a solução era esterilizada por filtração e estocada a 4°C.

Tripsina/EDTA (1x)

0,125% Tripsina

0,2% EDTA

Esta solução era aliqotada e estocada a -20°C.

Silane (4%)

2 mL Aminopropyltietroxylane

48 mL Etanol absoluto

Solução preparada para uso imediato, podendo ser estocada por até cinco dias.

Soluções para coloração

Coloração de Kynion

4,0 g Fucsina básica

20 mL Etanol 95%

Dissolver o corante sob agitação lenta e adicionar:

100 mL Água deionizada

8 mL Fenol liquefeito

Filtrar em papel de filtro e estocar à temperatura ambiente.

Azul de Tripan (0,2%)

100 mg Azul de Tripan

50 mL NaCl 0,9%

Solução mantida à temperatura ambiente

Bis-Benzemida (1,25 mg/mL)

25 mg Bis-Benzemida

20 mL PBS

Solução alíquotada e estocada a -20°C .

Brometo de Etídeo (0,5mg/mL)

50 mg Brometo de etídeo

100 mL Água deionizada

Solução alíquotada e estocada a -20°C .

Diacetato de Fluoresceína (5mg/mL)

100 mg Diacetato de fluoresceína

20 mL Acetona

Solução alíquotada e estocada a -20°C , protegida da luz.

Isotiocianato de Fluoresceína (FITC – 1mg/mL)

Solução alíquotada e estocada a -20°C , protegida da luz.

Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Tampão de Lise de Proteínas (RIPA)

50 mM Tris-HCl pH 7,5

1% Nonidet p40

0,25% Deoxicolato de Sódio

0,1% SDS

1 mM NaF
1 mM Ortovanadato de Sódio
1 comprimido Complete Mini com EDTA (mistura de inibidores de protease)

Gel de Corrida (contendo 8,5% de acrilamida)

2,32 mL Água deionizada
1,26 mL Tris-HCl 1,5M pH 8,8
1,42 mL Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0,8%
50 µL SDS 10%
25 µL Persulfato de amônia 10%
2,5 µL TEMED

Gel de empilhamento (contendo 4% de acrilamida)

1,22 mL Água deionizada
500 µL Tris-HCl 0,5M pH 6,8
260 µL Acrilamida 30% / Bis-acrilamida 0,8%
20 µL SDS 10%
14 µL Persulfato de amônia 10%
2,8 µL TEMED

Tampão de Corrida Tris/Glicina contendo SDS

25 mM Tris
192 mM Glicina
0,1% SDS

Tampão de amostra de Proteínas (6x)

250 µL Azul de Bromofenol 0,05%

7 mL	Tris-HCl 0,5M pH 6,8
3 mL	Glicerol
1 g	SDS
0,93 g	DTT
10 mL	Água deionizada (q.s.p)

Soluções para “Western blot”

Solução Amido Black

0,1%	Amido Black
10%	Metanol
2%	Ácido Acético
100 mL	Água deionizada (q.s.p)

Tampão de Transferência

25 mM	Tris
192 mM	Glicina
20% (v/v)	Metanol

Salina Tamponada com Tris-HCl (TBS)

150 mM	NaCl
10mM	Tris-HCl pH 8,0

TBS/Tween (TBS/T)

150 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl pH 8,0
0,05%	Twenn 20

Solução de Bloqueio (TBS/T/leite)

5%	Leite desnatado
150 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl pH 8,0
0,05%	Twenn 20

Soluções para eletroforese em gel de agarose

Tampão de Amostra de DNA

0,25%	Azul de Bromofenol
0,25%	Xileno Cianol
0,25%	Orange G
30%	Glicerol

Tris-Acetato EDTA (TAE)

4 mM	Tris-acetato
1 mM	EDTA

Soluções para Citometria de Fluxo

Solução de Fixação

4%	Paraformaldeído
1x (v/v)	PBS

Solução estocada a 4°C por até 2 semanas.

Solução de Permeabilização

0,1% Saponina
0,05% Azida Sódica
1x (v/v) Hanks (HBSS) líquido
Solução estocada a 4°C, por até 1 mês.

Iodeto de Propídeo (PI – 100mg/mL)

100 mg PI
1 mL Água deionizada
Solução alíquotada e estocada a 4°C, protegida da luz.

4. RESULTADOS

4.1 Curva de sobrevivência de células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 após remoção de soro

Em nosso estudo utilizamos a linhagem de células de Schwann humanas ST88-14 devido à sua facilidade de obtenção e manutenção quando comparadas à obtenção de culturas primárias. Estas células já haviam sido previamente utilizadas no nosso laboratório como modelo *in vitro* para o estudo da interação de *M. leprae* com sua célula hospedeira, mostrando bom grau de infecção (aproximadamente 50%) e mecanismo de adesão bacteriana semelhante ao observado em culturas primárias de CS (Shimoji e col., 1999; Marques e col., 2000; Alves e col., 2004).

Adotamos um modelo clássico de indução de apoptose através da diminuição de fatores tróficos do meio pela remoção do soro. Inicialmente, determinamos a curva de sobrevivência das células ST 88-14 em meio sem soro.

Para tal, culturas com 80% de confluência mantidas em microplacas de 96 poços foram privadas de soro por até 48h e a viabilidade da cultura avaliada pela redução enzimática do MTT nos tempos de 24 e 48h. Como mostra a figura 4.4, a cultura apresentou uma viabilidade de 66% \pm 7,2% após 24h, caindo para 42% \pm 2,5% quando mantida na ausência de soro num período de 48h.

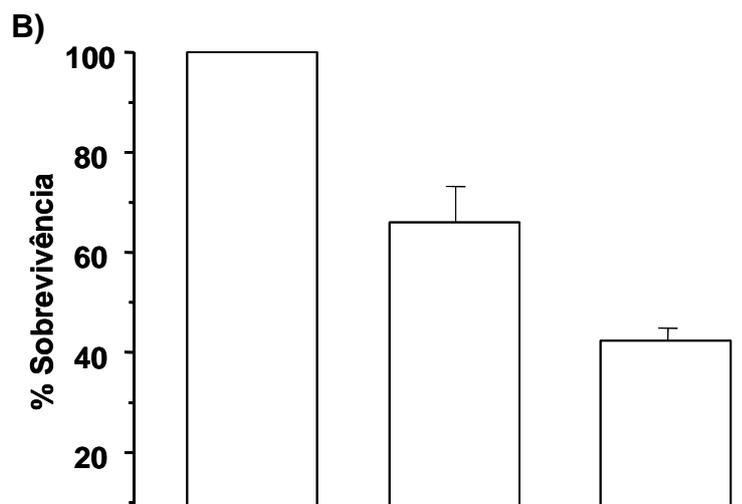
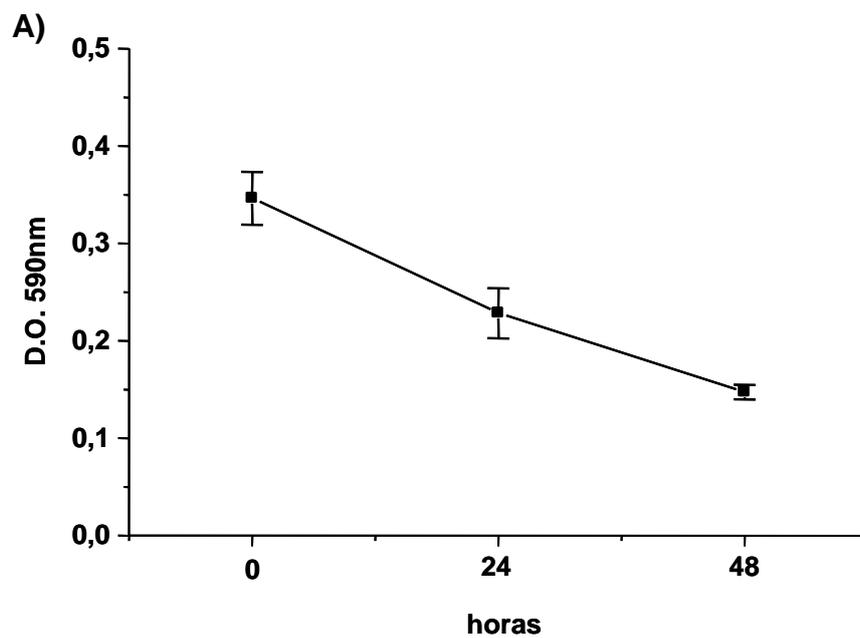


Figura 4.4: Curva de sobrevivência de células ST88-14 após remoção de SFB. 2×10^4 células por poço foram cultivadas em placa de 96 poços com 50 μ L de meio RPMI com 10% de SFB e incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após este período o meio foi removido e substituído por novo meio RPMI sem soro. As culturas foram mantidas na estufa por até 48h e a viabilidade celular foi avaliada pela redução enzimática de MTT. Os resultados estão expressos como média ($X \pm SD$) de triplicatas de um experimento representativo. Dois experimentos foram realizados com resultados semelhantes.

4.2 Efeito do *M. leprae* na morte celular induzida por privação de soro em CS humanas ST88-14: análise através da redução enzimática do Sal Metiltetrazólio (MTT)

Estabelecidas as condições de indução de morte celular, passamos a investigar o efeito do *M. leprae* na sobrevivência da célula hospedeira. Inicialmente realizamos ensaios em microplaca de 96 poços e monitoramos a sobrevivência da cultura através da redução enzimática de MTT. Para isso, após plaqueadas, as células eram incubadas ou não com o bacilo na relação bactéria-célula 5:1 por períodos de até 48h em meio RPMI completo. Após este tempo de incubação, as bactérias não aderidas e/ou internalizadas eram removidas e adicionava-se meio sem soro aos poços analisando a viabilidade das culturas por um período adicional de até 48 horas.

Como mostra a figura 4.5, nas culturas controle – não tratadas com *M. leprae* – observamos 58% $\pm 2\%$ e 41,6% $\pm 2,5\%$ de sobrevivência após 24 e 48h de privação de soro, respectivamente. Interessantemente, as culturas onde *M. leprae* foi adicionado mostraram-se mais resistentes à morte celular, com um

índice de sobrevivência de cerca de 118,3% \pm 4% e 69% \pm 5% após 24 e 48h da remoção de soro, respectivamente.

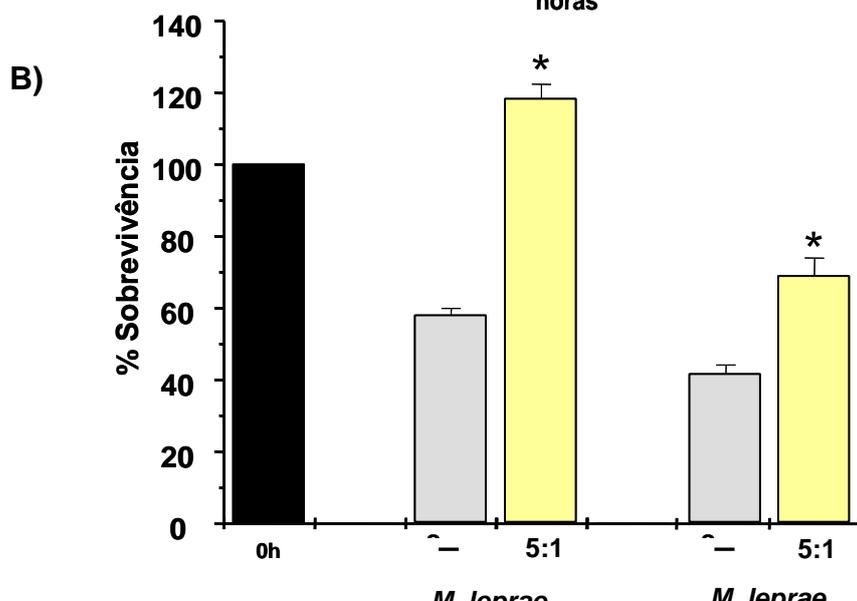
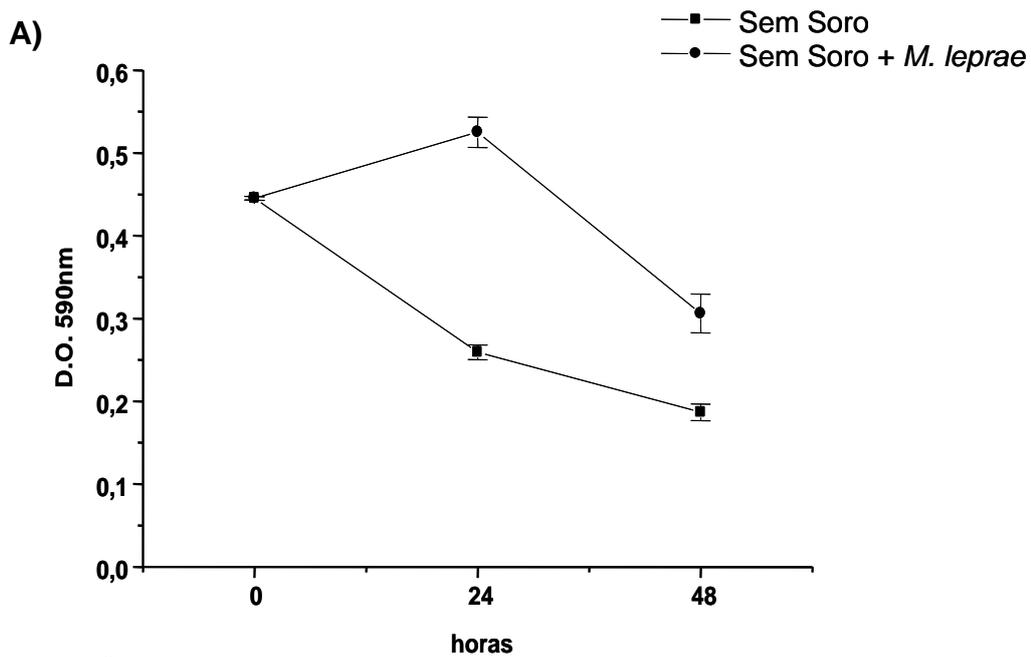


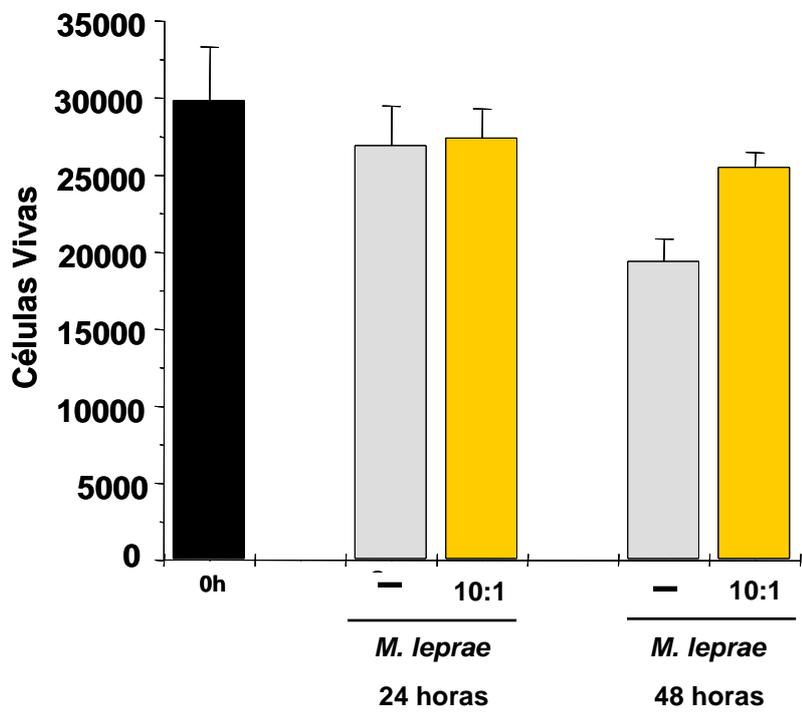
Figura 4.5: Efeito do *M. leprae* na morte celular induzida por carência de soro em CS humanas ST88-14. 2×10^4 CS por poço foram cultivadas em placa de 96 poços em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. *M. leprae* foi adicionado na proporção bactéria-célula 5:1 e as culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 18h. Após esse tempo, o meio foi removido e substituído por meio sem soro e as culturas incubadas por até 48h. A sobrevivência das culturas foi determinada pela reação enzimática de redução de MTT e os resultados estão expressos como médias (X±SD) de triplicatas de um experimento representativo. Dois experimentos foram realizados com resultados semelhantes. (*) Diferenças estatisticamente significativas para os valores das culturas tratadas com *M. leprae* quando comparadas com as não-tratadas calculadas através do teste t, com $p < 0,05$.

4.3 Proteção da morte de células de Schwann privadas de soro por *M. leprae*: análise através da exclusão de azul de Tripán

Para confirmação dos resultados obtidos anteriormente, realizamos novos ensaios determinando agora a viabilidade celular através da capacidade de exclusão do corante azul de Tripán. Para isso, CS ST88-14 foram cultivadas em placas de 24 poços em meio RPMI com soro e *M. leprae* (10:1) foi adicionado às culturas por um período de 18h. No dia seguinte, o meio foi removido e substituído por meio RPMI sem soro por até 2 dias. O número de células não coradas pelo azul de Tripán (células vivas), assim como o de células azuis (células mortas) foi, então, determinado através de contagem em câmara de Neubauer, tanto no sobrenadante (células que perderam a adesão), como na população celular aderida ao plástico após tripsinização.

O número total de células vivas, células mortas e a porcentagem de sobrevivência destas culturas está representado nas figuras 4.6 A, B e C, respectivamente. Como mostra a figura 4.6C, cerca de $66\% \pm 12,5\%$ das células permaneceram viáveis após 48h de careciamento, contrastando com $86\% \pm 10\%$ de viabilidade das culturas incubadas com *M. leprae* pelo mesmo período.

A)



B)



c)

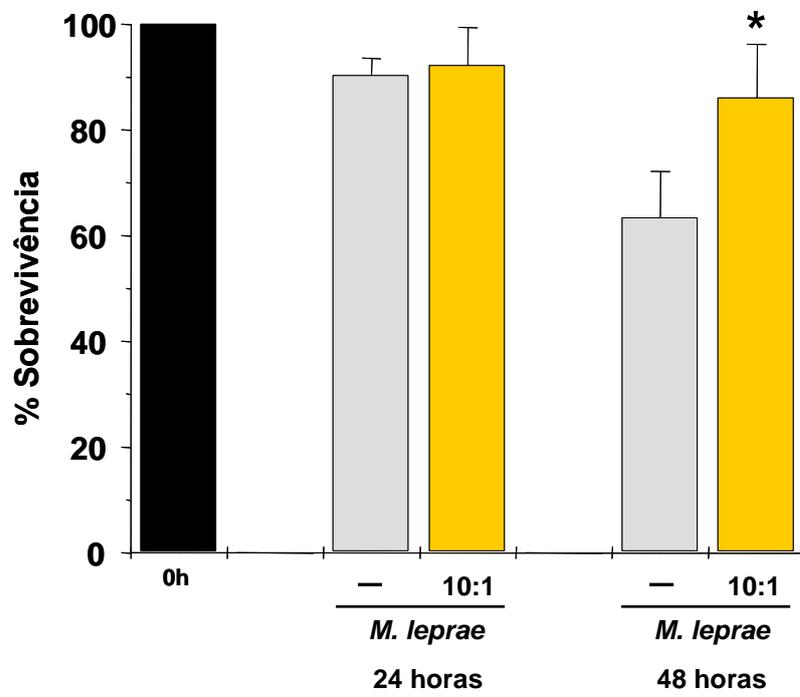


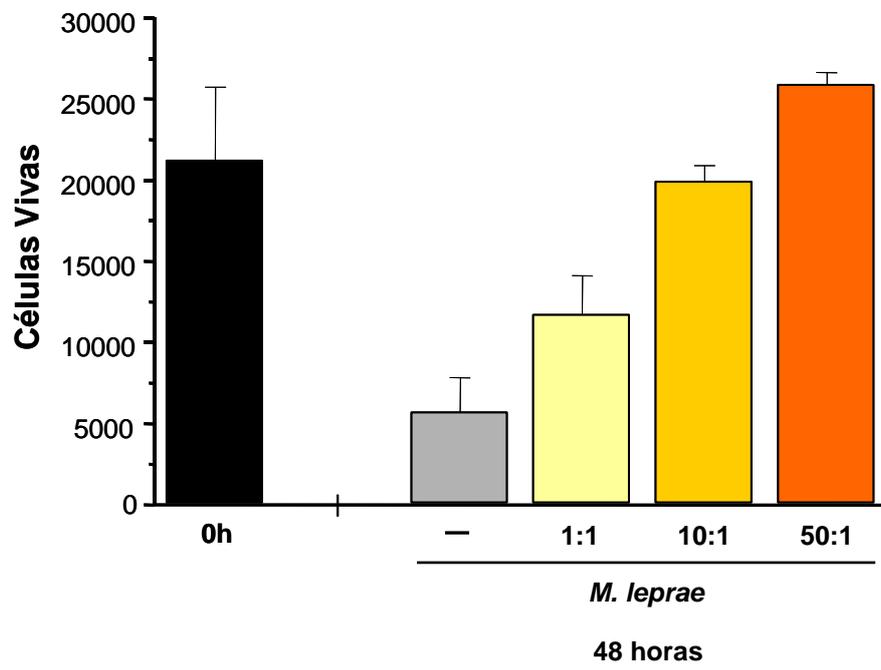
Figura 4.6: Efeito protetor do *M. leprae* em células de Schwann privadas de soro. 3×10^4 CS ST88-14 por poço foram cultivadas em meio RPMI com 10% de SFB em placa de 24 poços por 6 horas quando, então, *M. leprae* foi adicionado na proporção bactéria-célula 10:1. A placa foi mantida em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por mais 18h. Após este período, o meio foi removido e substituído por meio sem soro e as culturas incubadas por um tempo adicional de 24 ou 48h. O número total de células vivas (A) e mortas (B) nos sobrenadantes das culturas e na população de células aderidas foi obtido através da coloração com azul de Tripán. A porcentagem de sobrevivência foi calculada em (C). Os valores representam a média ($X \pm SD$) de três experimentos diferentes realizados em duplicatas. (*) Diferença estatisticamente significativa entre os valores das culturas tratadas com *M. leprae* quando comparadas com as não-tratadas calculada através do teste t, com $p < 0,05$.

4.4 O efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre as células de Schwann ST88-14 é dose-dependente

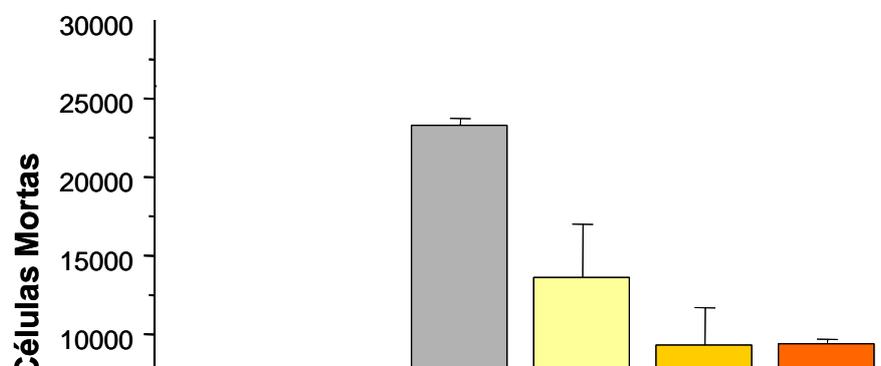
O passo seguinte foi determinar se o efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre a CS era dependente da relação bactéria:célula utilizada. Nesta etapa, assim como em experimentos subseqüentes, passamos a adotar o método de exclusão do azul de Tripán para avaliação da viabilidade das culturas.

Conforme podemos observar na figura 4.7, o efeito protetor do *M. leprae* mostrou ser dose-dependente. As culturas não tratadas apresentaram um grau de sobrevivência de $26\% \pm 9,8\%$ em 48h de privação de soro. Já as culturas tratadas com *M. leprae* apresentaram um grau crescente de proteção correlacionado com a relação bactéria:célula utilizada. Assim, os valores de porcentagem de sobrevivência na proporção bactéria:célula 1:1, 10:1 e 50:1 foram, respectivamente, $54,6\% \pm 11,2\%$, $93\% \pm 4,6\%$ e $120,7\% \pm 3,8\%$. Passamos, então, a utilizar a relação 50:1 em experimentos subseqüentes, visando otimizar o efeito protetor observado.

A)



B)



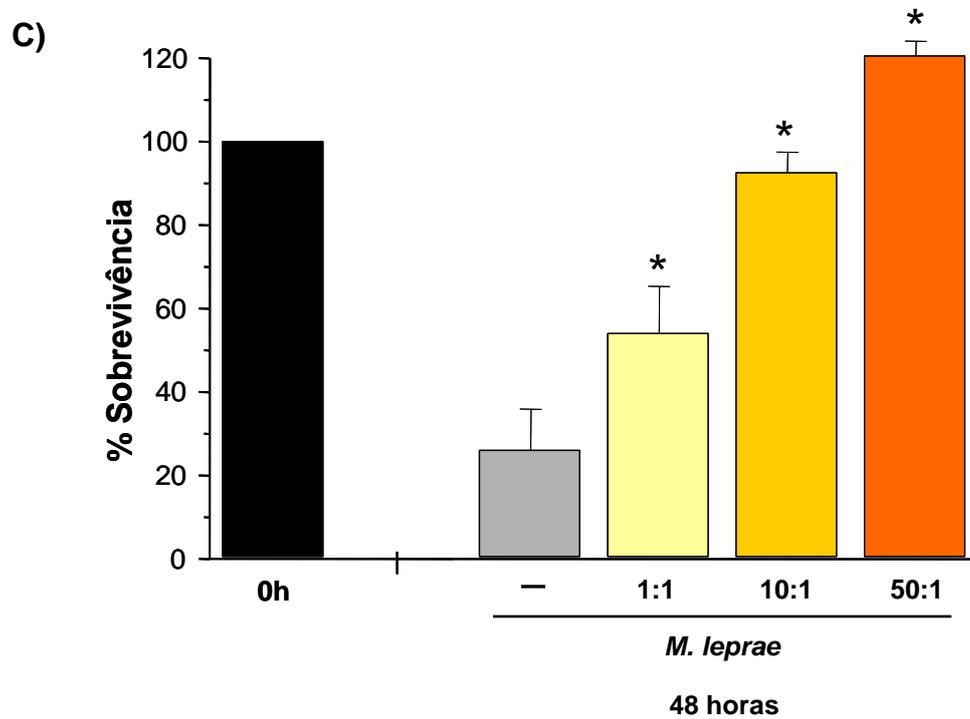


Figura 4.7: O efeito anti-apoptótico do *M. leprae* na célula de Schwann é dose-dependente.
A, B e C representam o resultado de um mesmo experimento após 48 horas de incubação das CS

ST88-14 na ausência de soro. Os dados mostram contagens de células vivas (A) e mortas (B) por azul de Tripán. Em (C) os resultados estão expressos em % de sobrevivência. Os valores foram expressos como médias ($X \pm SD$) de um experimento realizado em duplicata. Quatro outros experimentos foram realizados com resultados similares. (*) Diferenças estatisticamente significativas para os valores das culturas tratadas com *M. leprae* quando comparadas com as não-tratadas calculadas através do teste t, com $p < 0,05$.

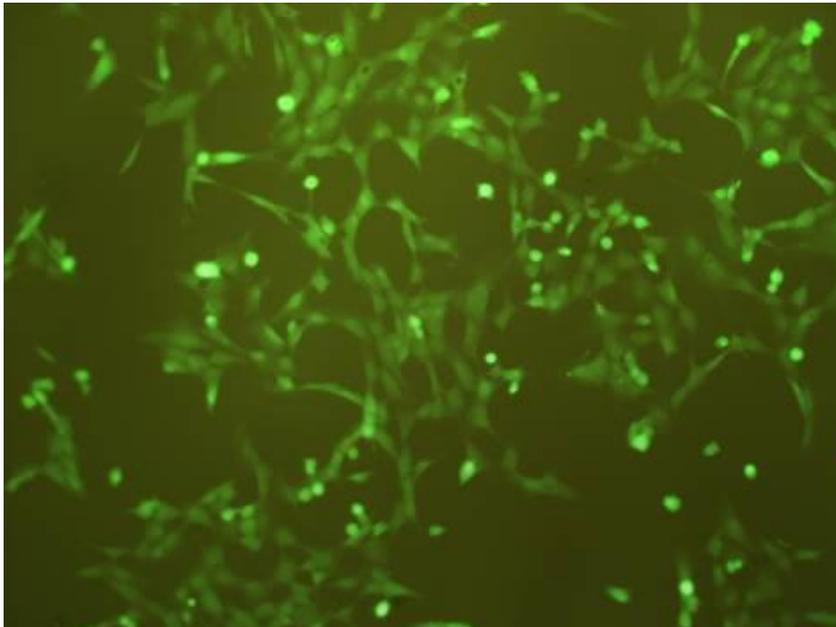
4.5 Análise morfológica de células de Schwann humanas ST88-14 tratadas com *M. leprae*

O efeito de proteção promovido pelo *M. leprae* nas CS ST88-14, foi também observado após coloração das culturas com diacetato de fluoresceína (células vivas coradas em verde) e brometo de etídeo (células mortas em vermelho) e visualização ao microscópio invertido de fluorescência. Nestes experimentos alguns poços foram submetidos a contagens de células viáveis e mortas utilizando azul de Tripán, conforme anteriormente detalhado, para efeitos comparativos.

A figura 4.8 mostra imagens de campos representativos das culturas no tempo zero – correspondente ao aspecto da cultura antes da retirada do SFB – e culturas privadas de soro e tratadas ou não com *M. leprae* na proporção bactéria:célula de 50:1. Podemos verificar que as células mantidas em meio com soro (tempo zero) apresentavam-se aderidas ao substrato e com morfologia distendida, bi ou multipolar, aspecto característico destas células. Já nas culturas desprovidas de soro uma grande quantidade de células encontrava-se em suspensão, com morfologia arredondada e coradas pelo brometo de etídeo (células mortas) e por isso não puderam ser visualizadas nesta imagem. Um

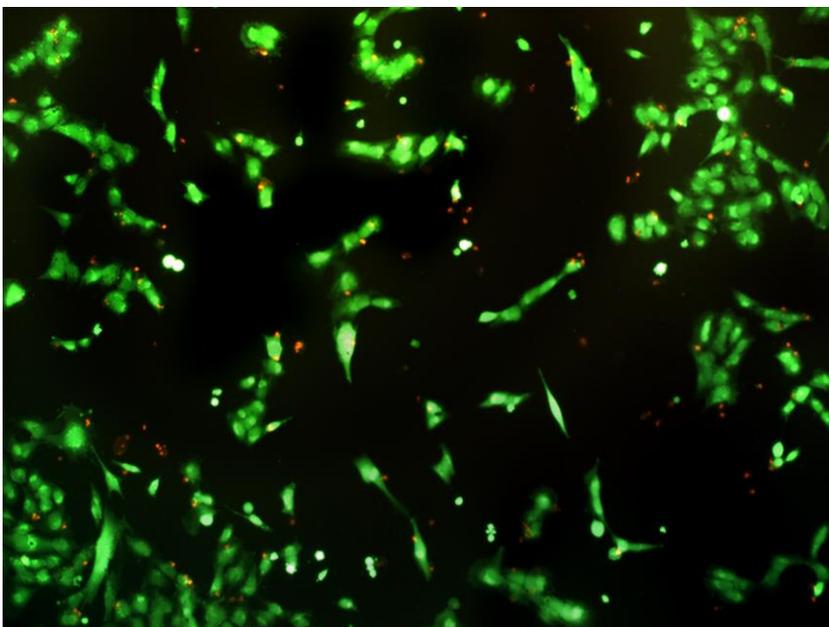
número reduzido de células permaneciam aderidas à placa, e uma grande parte destas, coradas em verde, mostravam-se arredondadas, com morfologia alterada. Já nas culturas tratadas com *M. leprae* e privadas de soro, o número de células mortas em suspensão era menor, com boa parte das células ainda aderidas ao substrato, mas já com alguma alteração morfológica. A quantificação da viabilidade pelo azul de Tripán em poços não corados com o diacetato de fluoresceína/brometo de etídeo confirmou a maior viabilidade das culturas tratadas com *M. leprae* (Fig. 4.8D).

A)



Tempo Zero

B)



Sem Soro

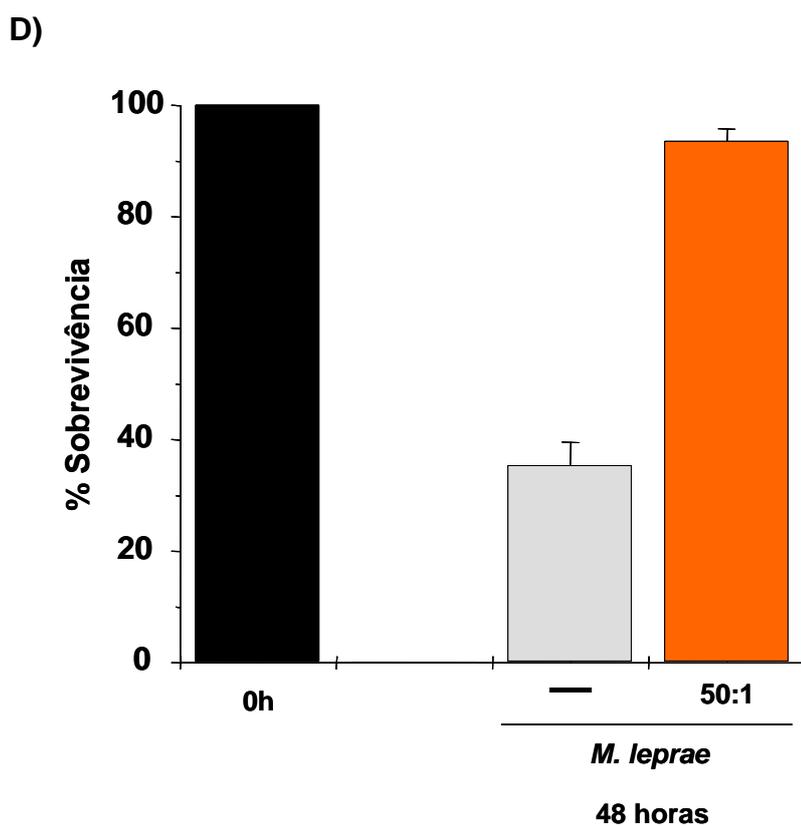
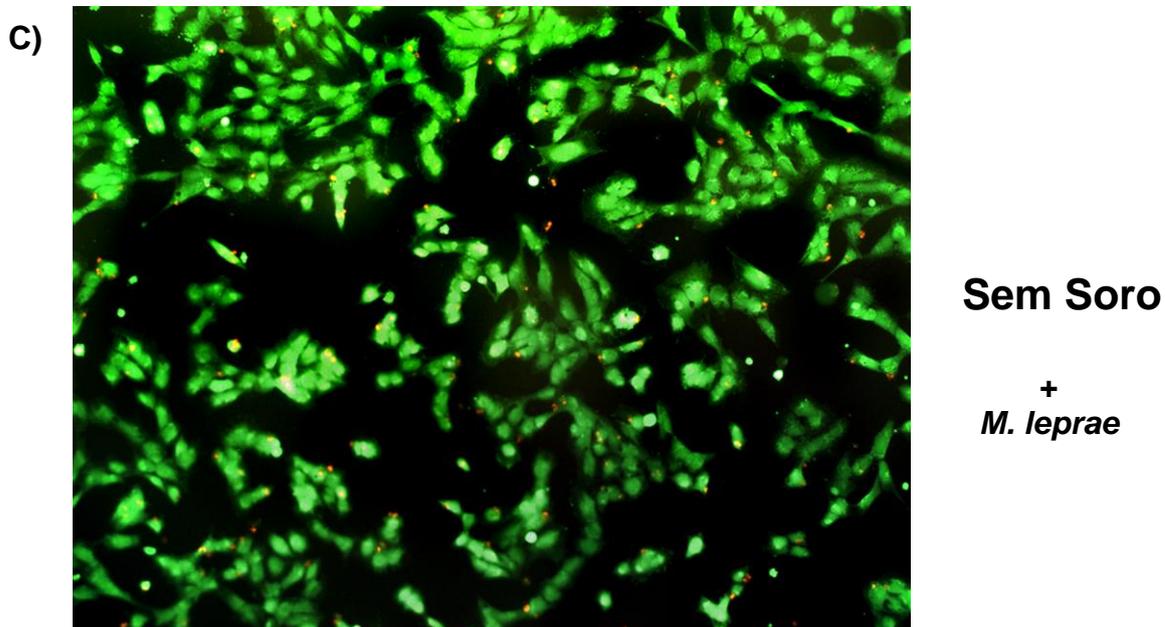


Figura 4.8: Morfologia em microscopia de fluorescência de células de Schwann incubadas ou não com *M. leprae* e privadas de soro. 3×10^4 CS ST88-14 foram cultivadas sobre lamínulas e tratadas ou não com *M. leprae* (50:1) por 18h. As células foram, então, mantidas em meio sem

soro por 48 horas, coradas com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo e analisadas ao microscópio de fluorescência (aumento de 20x) (A, B, C). Em (D), o percentual de viabilidade foi determinado por contagens com azul de Tripán. Os resultados estão expressos como média ($X \pm SD$) de um experimento representativo realizado em duplicatas. Outros dois experimentos foram realizados com resultados similares.

4.6 Análise do efeito anti-apoptótico do *M. leprae* em CS ST88-14 por Citometria de Fluxo

4.6.1 Comparação dos padrões de espalhamento luminoso de CS privadas de soro e tratadas ou não com *M. leprae*

Além dos marcadores convencionais utilizados para identificar a apoptose, em muitos casos pode-se utilizar o padrão de espalhamento luminoso das células quando analisadas por Citometria de Fluxo. Tais parâmetros revelam o tamanho e a granulosidade celular – FSC (“Forward Scatter”) e SSC (“Side Scatter”), respectivamente – os quais encontram-se alterados após indução de apoptose. Durante os estágios iniciais de apoptose as células perdem seu volume normal enquanto a membrana plasmática ainda permanece intacta. Como consequência desta mudança no volume celular, o FSC diminui e o SSC pode aumentar ou permanecer inalterado (revisado por Vermes *et al.*, 2000). Isso ocorre devido à formação de corpos apoptóticos que são detectados como partículas com baixas propriedades luminosas.

Para melhor monitorar as mudanças morfológicas induzidas pela privação de soro e/ou tratamento com *M. leprae*, CS foram analisadas em gráficos de espalhamento luminoso utilizando o programa WinMDI. Em todos os gráficos da

figura 4.9 observa-se claramente a presença de duas populações celulares: as células apoptóticas em estágio tardio, constituída de células com menor volume celular (área à esquerda), e as células viáveis e/ou em fase precoce de apoptose (área à direita). As culturas no tempo zero, tratadas ou não com *M. leprae* apresentaram padrões FSC x SSC similares (Figura 4.9A, B). Já nas culturas incubadas por 4 horas em meio sem soro, grande parte das células pré-tratadas com *M. leprae* mantiveram os padrões FSC x SSC comparáveis aos apresentados nas culturas controle (tempo zero), diferindo das culturas não tratadas com a bactéria onde a proporção de células apoptóticas tardias aumentou consideravelmente (Figura 4.9C, D).

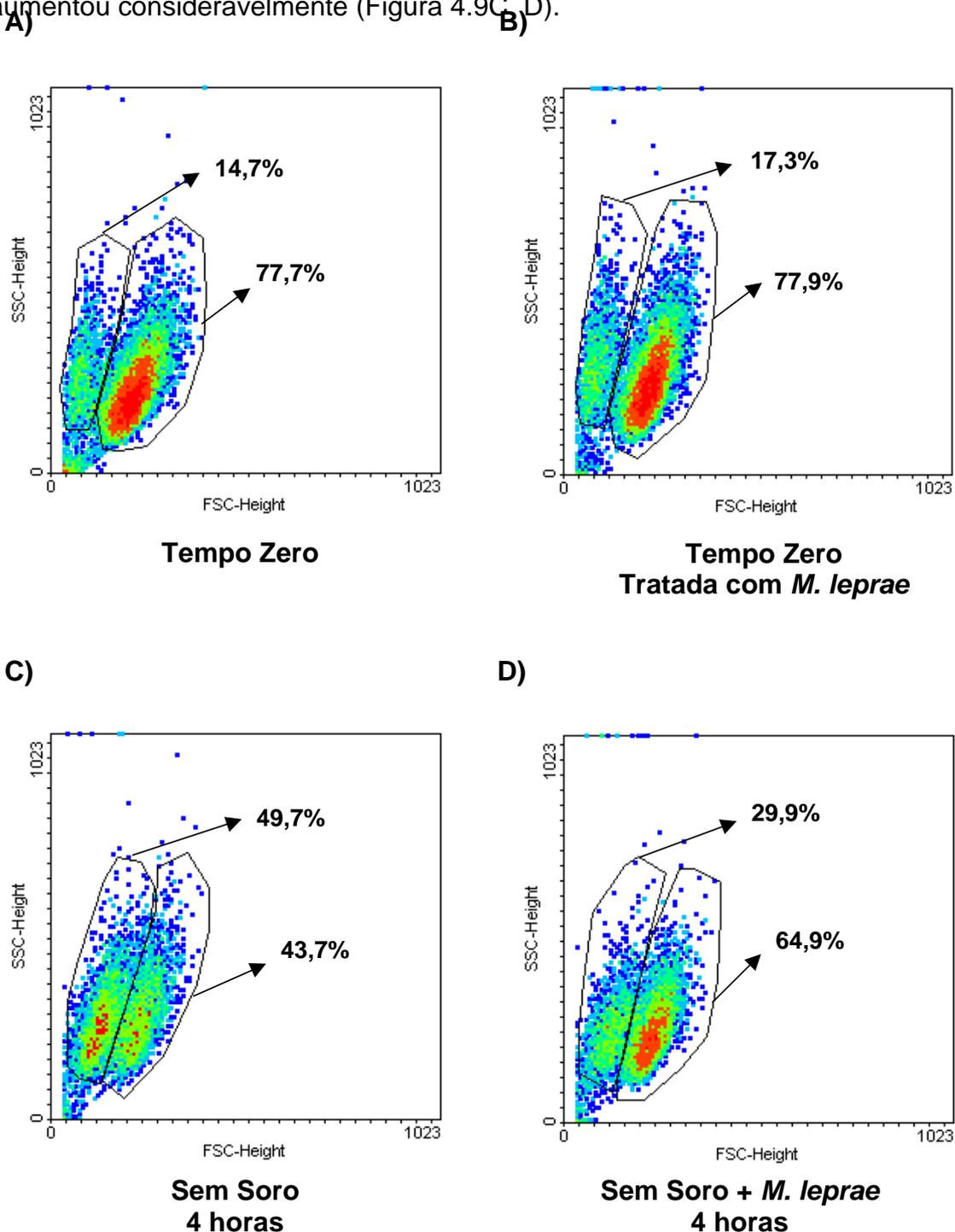


Figura 4.9: Análise de espalhamento luminoso por Citometria de Fluxo. Gráficos de densidade representando os parâmetros FSC X SSC de culturas de CS ST88-14. $1,5 \times 10^5$ CS foram cultivadas em placa de 6 poços em meio RPMI com 10% de SFB. Após 6h de incubação a 37°C em estufa de 5% de CO_2 foram tratadas ou não com *M. leprae* (50:1) por 18h. Passado este período os poços foram lavados e meio RPMI sem soro foi adicionado às culturas por 4h. A figura mostra dados de um experimento representativo. Outros três experimentos foram realizados obtendo-se resultados semelhantes.

4.6.2 Avaliação do potencial da membrana mitocondrial de CS tratadas ou não com *M. leprae* e privadas de soro.

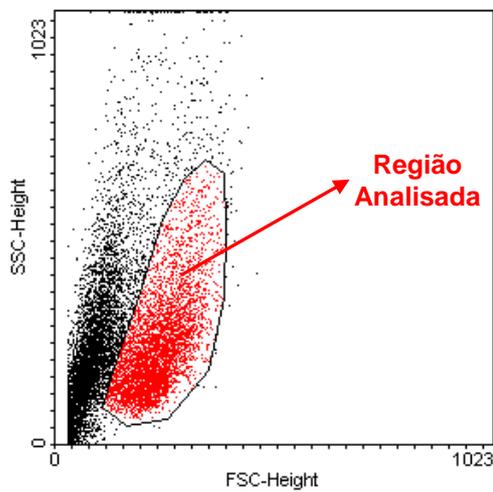
A apoptose distingue-se da necrose por eventos únicos que incluem permeabilização da membrana mitocondrial e posterior liberação de fatores indutores de apoptose (revisito por Vermes *et al.*, 2000). Para avaliar o potencial da membrana mitocondrial de CS tratadas ou não com *M. leprae* e privadas de soro, utilizamos o corante lipofílico iodeto de 3,3-dihexyloxacarbocianina (DiOC_6) para a análise da indução de apoptose através de Citometria de Fluxo.

As CS ST88-14 foram cultivadas e tratadas ou não com *M. leprae*, conforme descrito na figura 4.9, permanecendo por até 6h em meio sem soro. Passado este período, as células foram retiradas da placa e coradas com DiOC_6 por 15 minutos à temperatura ambiente e submetidas à análise em citômetro de fluxo.

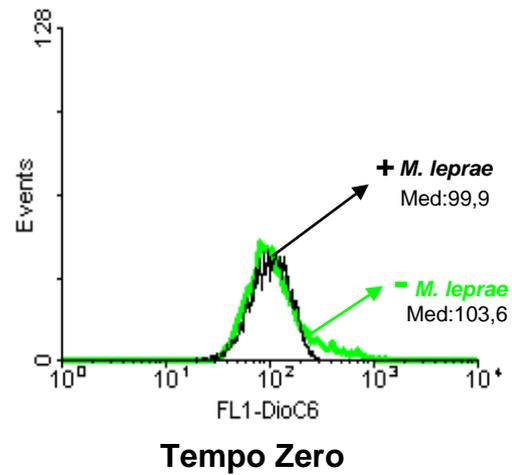
Os resultados obtidos são mostrados nos histogramas da figura 4.10. A região de análise pode ser visualizada na figura 4.10A. Restringimos nossa análise para esta população de células já que a segunda população exibe característica de células em uma fase mais tardia de apoptose, como a diminuição do volume celular e coloração por iodeto de propídeo (dado não mostrado). Nas culturas correspondentes ao tempo zero e tratadas com *M. leprae*, as células apresentaram bom potencial de sua membrana mitocondrial, caracterizado por sua intensa marcação com o corante DiOC_6 (Figura 4.10B). Durante a incubação de 6h em meio sem soro as células foram gradativamente

perdendo a intensidade de fluorescência pela perda da polarização da membrana mitocondrial. Interessantemente, as células incubadas com *M. leprae* na proporção 50:1 mantiveram o padrão de marcação com DiOC₆, comparável às células mantidas em meio com 10% de SFB (Fig. 4.10C, D).

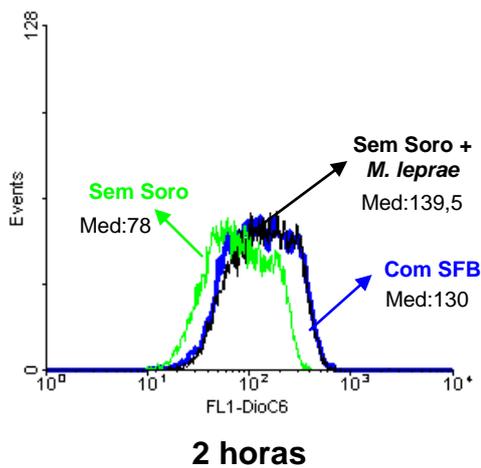
A)



B)



C)



D)

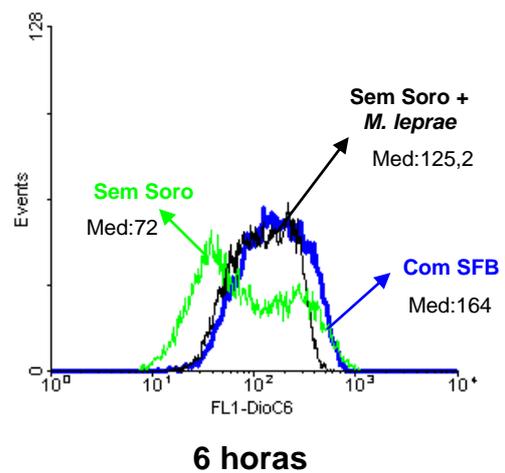
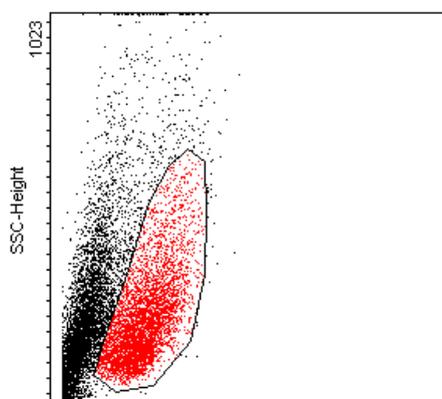


Figura 4.10: Avaliação da permeabilidade da membrana mitocondrial de CS tratadas com *M. leprae*. $1,5 \times 10^5$ CS ST88-14 por poço foram cultivadas em placa de 6 poços e tratadas ou não com *M. leprae* (50:1). Após 18h, os poços foram lavados com PBS e adicionado meio sem soro. Alguns poços não tratados com *M. leprae* foram mantidos em meio com 10% de SFB (azul). As células foram coradas com DiOC₆ nos tempos de zero, 2 e 6h após a troca do meio. (A) Gráfico bidimensional de pontos mostrando o padrão FSC x SSC da população de células analisadas. (B) Histograma de culturas no tempo zero tratadas (preto) ou não (verde) com a bactéria. (C, D) Culturas acompanhadas por 2 e 6 horas após a lavagem dos poços e adição de novo meio RPMI sem soro, respectivamente. As células foram detectadas por canal FL-1. Estes dados são representativos de três experimentos. Med, mediana da intensidade média de fluorescência.

Em outra análise mostrada na figura 4.11, coramos as mesmas células com a combinação DiOC₆ e iodeto de propídeo (PI) que permite a discriminação entre células viáveis, células em estágio precoce de apoptose e células em estágio mais avançado de apoptose. Células em estágio tardio de apoptose e necrose secundária perdem a integridade da membrana plasmática, sendo permeáveis ao corante iodeto de propídeo que se incorpora ao DNA. Após coloração com DiOC₆, PI era, então, adicionado 5 minutos antes da leitura em citômetro de fluxo. Nesta análise, ficou igualmente evidente que as células incubadas previamente com *M. leprae* (50:1) conseguiram manter a intensidade da coloração por DiOC₆. Como esperado, as células da região analisada não se coraram com PI, compreendendo esta região o somatório de células viáveis e em estágio inicial de apoptose. Estes resultados reforçam a idéia de que a presença da bactéria torna as CS mais resistentes à apoptose induzida pela privação de soro.

A)



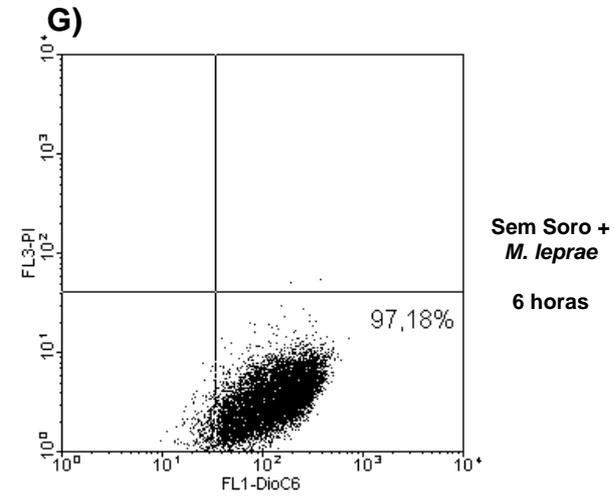
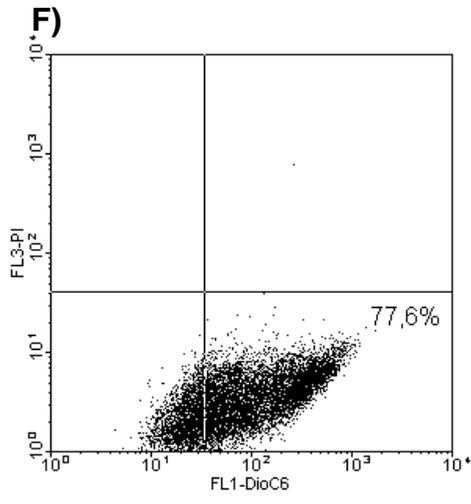
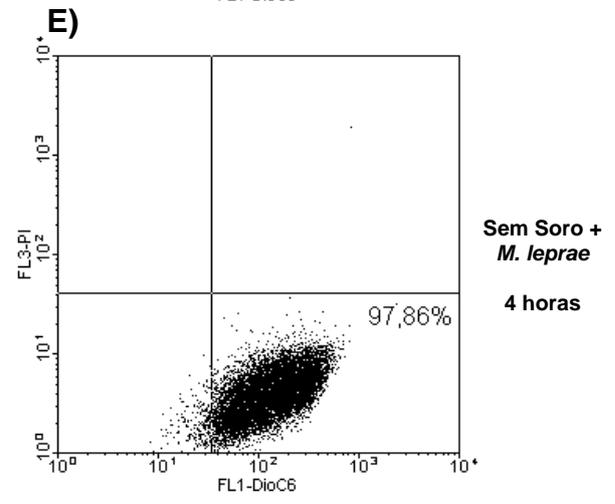
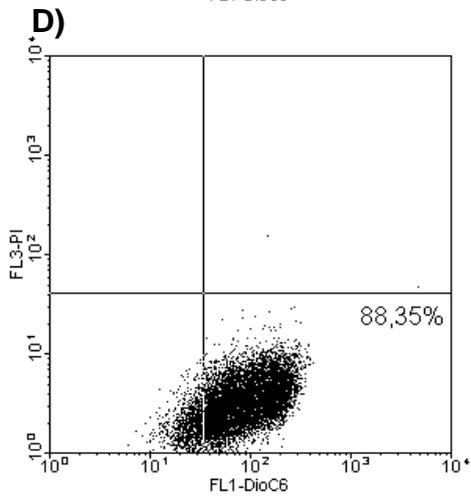
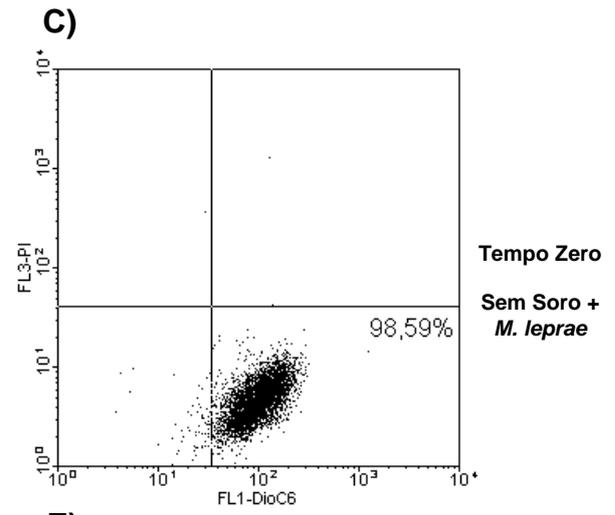
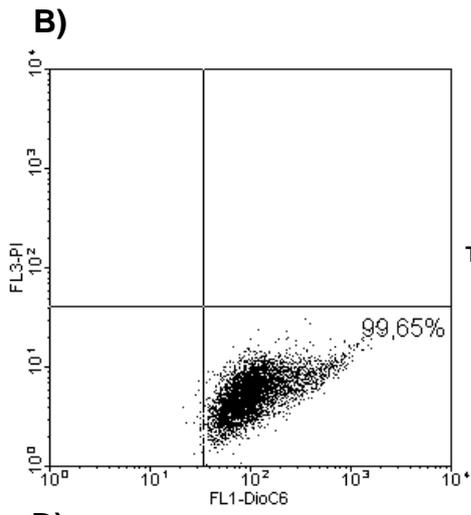
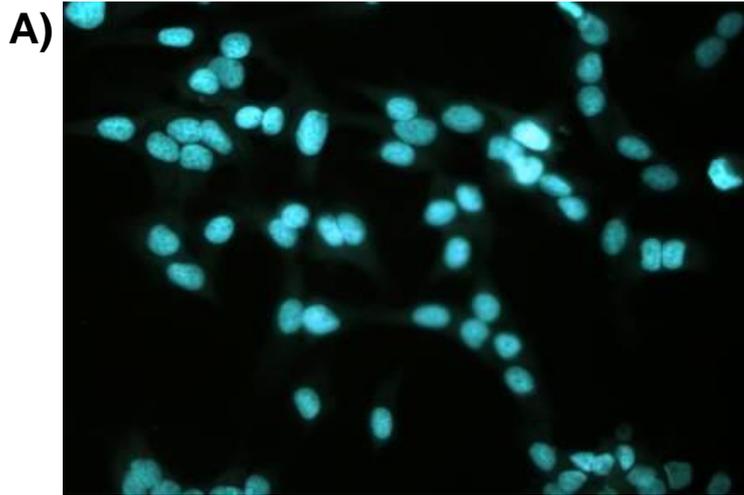


Figura 4.11: Análise do efeito anti-apoptótico do *M. leprae* através de coloração por DiOC₆ e PI. CS humanas foram tratadas conforme descrito anteriormente. A suspensão celular foi incubada por 15 minutos com DiOC₆ e PI foi adicionado 5 minutos antes da leitura. (A) Padrão de espalhamento luminoso mostrando a população analisada. (B, C) Gráficos de culturas no tempo zero. (D-G) Culturas privadas de soro por 4 e 6h e tratadas ou não com *M. leprae* 50:1 As amostras foram detectadas pelos canais de fluorescência FL-1 (DiOC₆) e FL-3 (PI) em citômetro de fluxo. Dados representativos de três experimentos independentes.

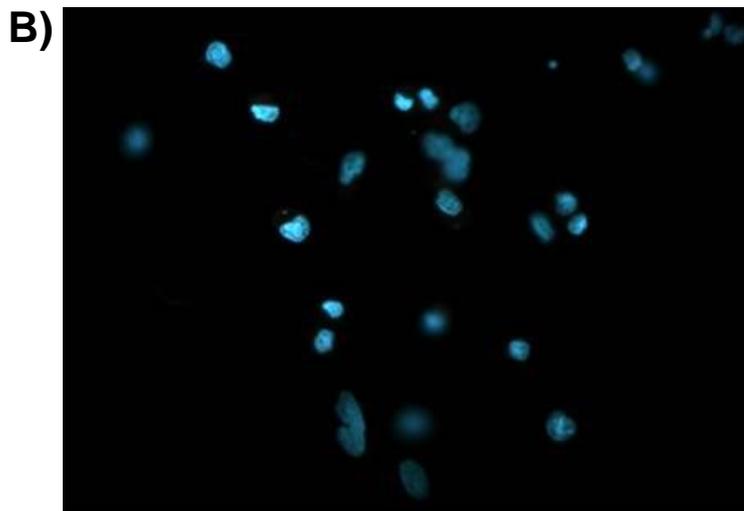
4.7 Avaliação em microscopia de fluorescência da morfologia nuclear através de coloração com bis-benzemida

Uma etapa tardia da morte celular programada consiste na condensação da cromatina seguida de fragmentação nuclear. Sendo assim a morfologia nuclear constitui um bom parâmetro para a identificação de células em processo de apoptose. Nesta etapa do trabalho células ST88-14 - plaqueadas e tratadas ou não com *M. leprae* conforme descrito anteriormente - tiveram seu núcleo corado por bis-benzemida e a morfologia observada ao microscópio de fluorescência.

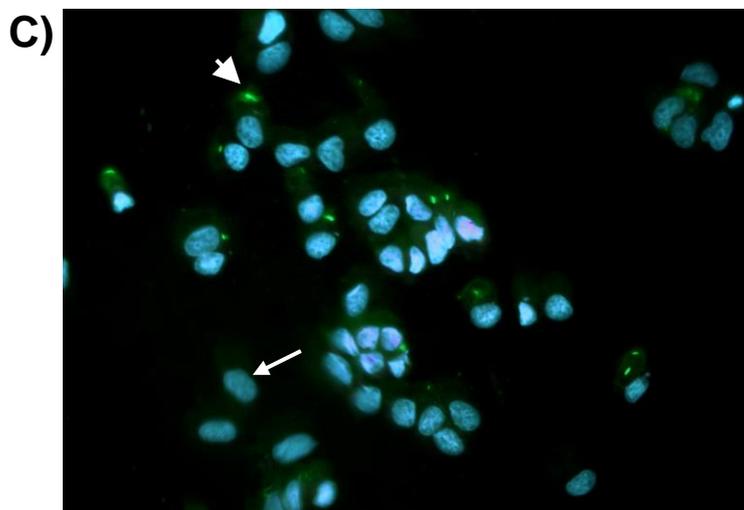
A figura 4.12 mostra imagens de campos representativos de culturas no tempo zero e culturas tratadas ou não com *M. leprae* e mantidas em meio sem soro por 48h. Em 4.12A pode-se observar a morfologia nuclear arredondada, característica de células vivas, enquanto que em 4.12B os núcleos mostram-se menores e alterados caracterizando a condensação da cromatina encontrada em células em apoptose. Quando observamos a imagem da cultura tratada com a bactéria (Fig. 4.12C), percebemos que a morfologia dos núcleos foi preservada, indicando maior sobrevivência das células. Interessantemente, células que internalizaram ou não o *M. leprae* apresentaram núcleo com morfologia preservada, sugerindo que a secreção pelas CS de algum fator solúvel, induzida pela fagocitose do *M. leprae*, poderia estar contribuindo para a manutenção da sobrevivência das células adjacentes.



Tempo Zero



Sem Soro
48 horas



Sem Soro
+
M. leprae

Figura 4.12: Morfologia nuclear de células de Schwann tratadas ou não com *M. leprae* e privadas de soro. 3×10^4 CS ST88-14 foram cultivadas em poços com lamínulas de placas de 24 poços em meio RPMI com 10% e mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO₂ por 6h. Logo após, as culturas foram tratadas ou não com *M. leprae* (ponta de seta) previamente marcado com FITC (verde) e novamente mantidas na estufa por um período de 18h antes da lavagem dos poços. Os núcleos (seta) foram, então, corados com bis-benzemida (azul) após 48h da retirada do soro. (A) cultura no tempo zero; (B) células sem soro e (C) células tratadas em meio sem soro. Aumento de 20x.

4.8 Meio condicionado de CS tratadas com *M. leprae* promove a sobrevivência de células privadas de soro

CS podem sustentar sua sobrevivência através da secreção de fatores como IGFs, PDGF-BB e NT-3, que agem de maneira autócrina e parácrina, bloqueando a morte celular (Meier *et al.*, 1999). Nesta etapa do trabalho investigamos a possível participação de fatores solúveis secretados por CS na sobrevivência promovida pelo *M. leprae*. Realizamos ensaios de sobrevivência nas mesmas condições descritas anteriormente para a avaliação da viabilidade celular por azul de Tripán. Os sobrenadantes (meio condicionado) das culturas tratadas ou não com *M. leprae* por 24 e 48 horas privadas de soro, foram coletados e estocados a 4°C em microtubos. Novas culturas foram, então, preparadas e os meios condicionados (MC) de 24 e 48 horas adicionados ao invés do meio RPMI sem soro. As culturas foram mantidas por até 48h sob monitoramento da indução de morte celular por azul de Tripán.

Os dados de sobrevivência da cultura utilizada para gerar os meios condicionados estão representados na figura 4.13A, onde verificamos a proteção das CS incubadas com *M. leprae* frente à indução de apoptose. O meio condicionado coletado tanto em 24h quanto em 48h de culturas não tratadas com *M. leprae* não foi capaz de promover a sobrevivência das CS e a sobrevivência destas culturas pôde ser comparada às culturas controle (Fig. 4.13A). Já o meio condicionado de 24, mas não o de 48 horas de culturas tratadas com *M. leprae* demonstraram efeito protetor de morte celular (Fig. 4.13B). Nossos resultados sugerem que a secreção de fatores de crescimento por CS estaria envolvida

nesta proteção, visto que o meio condicionado de culturas tratadas com *M. leprae* também promoveu a sobrevivência destas células.

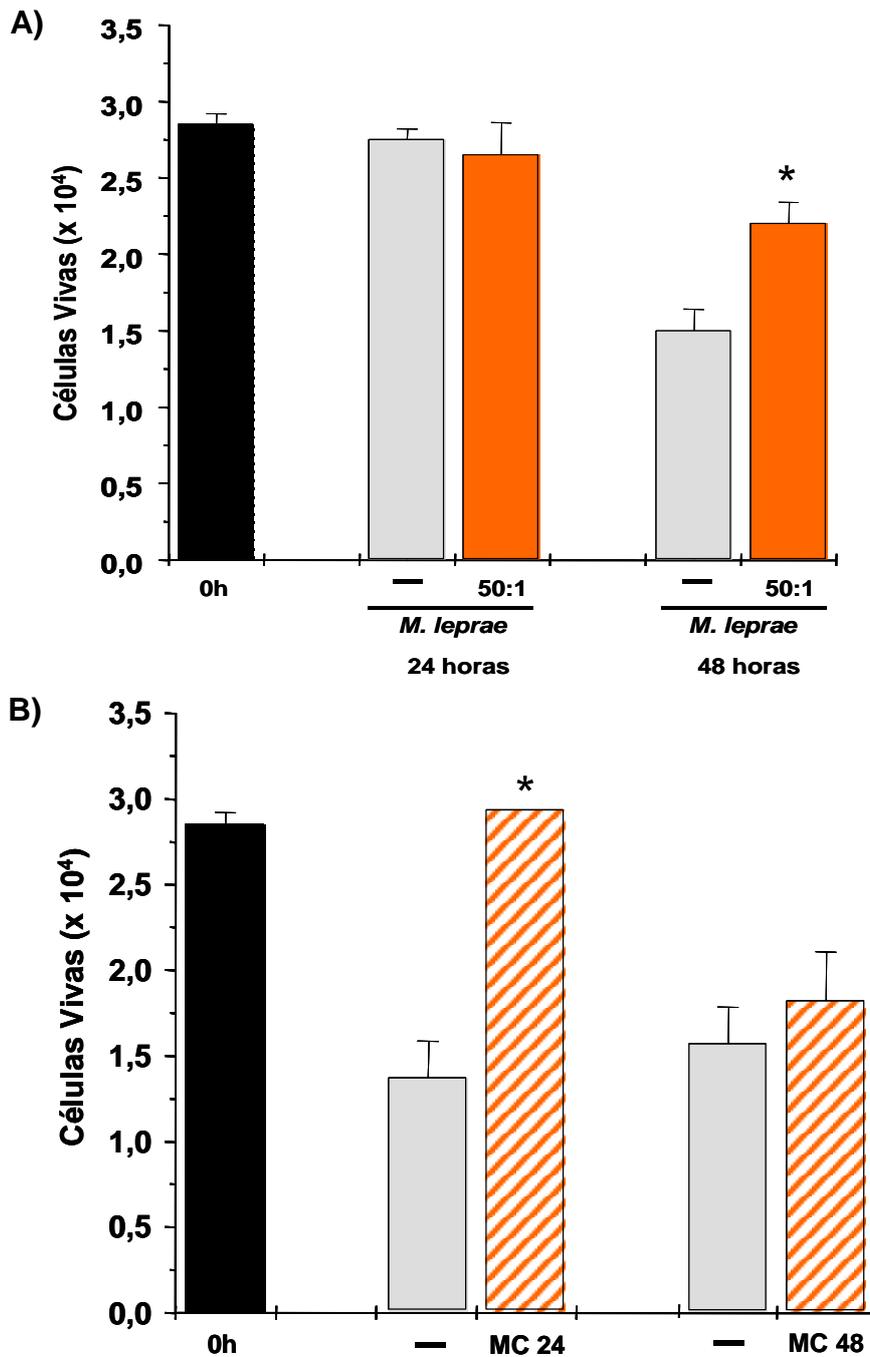


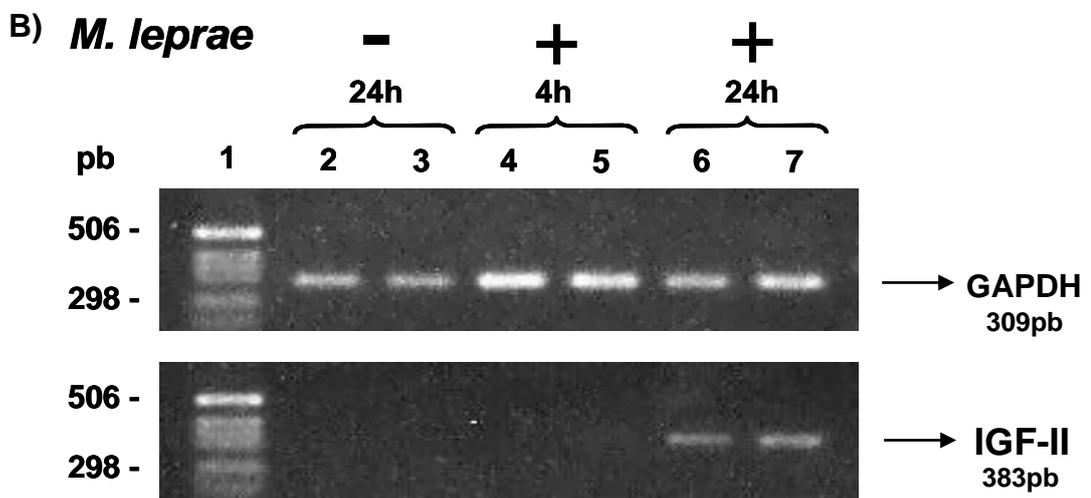
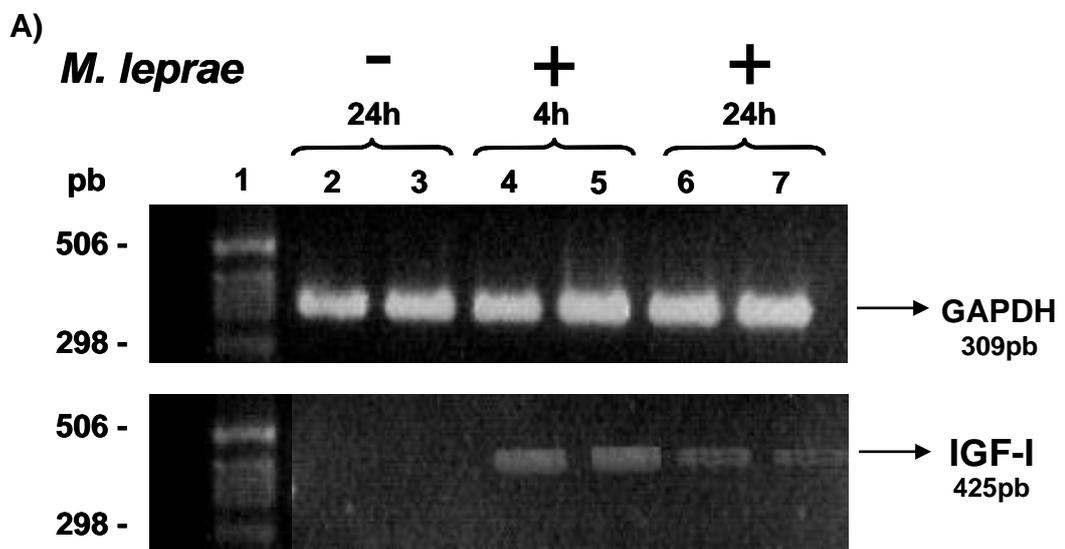
Figura 4.13: Efeito anti-apoptótico induzido por meio condicionado de culturas de CS incubadas com *M. leprae*. (A) Cultura para obtenção de meio condicionado de culturas tratadas

ou não com *M.leprae* na proporção 50:1. Os sobrenadantes foram recolhidos após 24 e 48h de privação de soro e transferidos para novas culturas contendo cerca de trinta mil CS para avaliação da sobrevivência após 48 horas de incubação através da coloração por azul de Tripán. (B) Efeito dos Meios condicionados de 24h (MC24) e 48h (MC48). Os dados representam a média ($X \pm SD$) de duplicatas de um experimento representativo. Outros três experimentos foram realizados e mostraram resultados similares. (*) Diferenças estatisticamente significativas para os valores das culturas tratadas com *M. leprae* quando comparadas com as não-tratadas calculadas através do teste t, com $p < 0,05$.

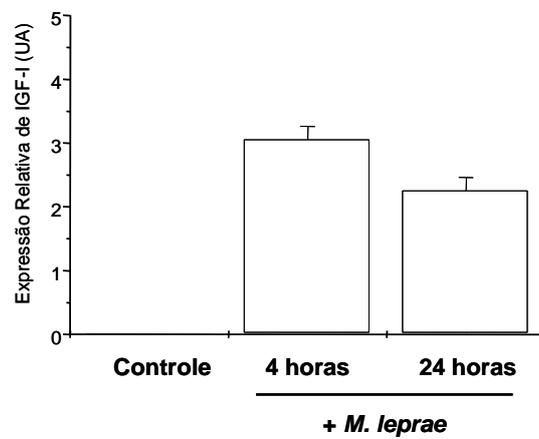
4.9 Indução em CS da expressão de RNAm para IGF-I e IGF-II por *M. leprae*

Tendo em vista os resultados anteriores e dados da literatura (Meier *et al.*, 1999, Syroid *et al.*, 1999 e Delaney *et al.*, 2001) apontando o papel neuroprotetor de IGF-I e IGF-II, consideramos que estes seriam possíveis candidatos para a ação protetora da bactéria nas CS. Para avaliar esta hipótese resolvemos investigar a capacidade de *M. leprae* em induzir a expressão de RNAm para IGF-I e IGF-II em CS ST88-14. Para atingir este objetivo, CS foram cultivadas em placas de 6 poços em meio RPMI contendo 10% de soro e tratadas ou não com *M. leprae* na proporção 10:1. Após períodos de 4 e 24 horas de incubação, os poços foram lavados e as células lisadas com reagente Trizol. O RNA total foi isolado e submetido ao tratamento com a enzima transcriptase reversa para a síntese de DNA complementar. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e visualizadas sob luz ultravioleta após coloração com brometo de etídeo.

Observando a figura 4.14A verificamos que o tratamento com *M. leprae* induziu a expressão de IGF-I em CS nos períodos de 4 e 24 horas. Já a expressão de RNAm para IGF-II só pôde ser observada após 24h de tratamento com a micobactéria (Fig. 4.14B). Não foram observadas amplificações para ambos os genes nas reações controle (células não tratadas com *M. leprae*).



C)



D)

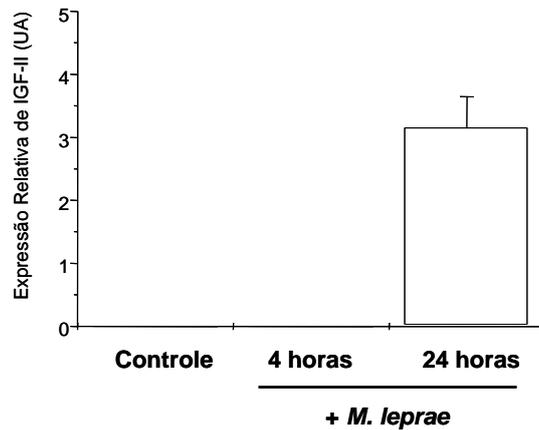


Figura 4.14: *M. leprae* induz a expressão de RNAm para IGF-I e IGF-II em CS humanas ST88-14. Foram utilizados DNA complementares obtidos a partir de RNA total de CS ST88-14 incubadas ou não com *M. leprae* 10:1 em meio RPMI contendo 10% de SFB. (A, B) produtos de amplificação para IGF-I e IGF-II, respectivamente, obtidos em gel de agarose 2%, TAE 1X e corados com brometo de etídio. (1) Marcador 1000pb ladder; (2-7) amplificação do gene gliceraldeído 3-fosfato

desidrogenase (GAPDH) expresso de forma constitutiva (gel superior) e para o gene para IGF-I (A) e IGF-II (B); (2, 3) culturas controle; (4, 5) culturas tratadas com *M. leprae* por 4 horas; (6, 7) culturas tratadas com *M. leprae* por 24 horas. (C, D) Análise densitométrica dos géis. UA, unidades arbitrárias.

4.10 Expressão de IGF-IR em CS humanas ST88-14

A atividade biológica de IGF-I requer a ligação a um receptor transmembrana específico, o IGF-IR. Com o objetivo de verificar a expressão deste receptor, células ST88-14 foram lisadas com tampão RIPA. As proteínas do lisado celular foram fracionadas em SDS-PAGE 8,5% e transferidas para membrana de nitrocelulose que foi, então, incubada com anticorpo específico para o receptor IGF-IR. A figura 4.15A mostra o resultado do “western blot” realizado, indicando a presença de uma banda de ~94 kDa, correspondente à subunidade beta do IGF-IR no lisado de células ST88-14.

Utilizamos, ainda, outra metodologia para verificar a expressão deste receptor nas células ST88-14. Células ST88-14 foram tripsinizadas e incubadas com anticorpo anti-IGF-IR β para a marcação intracelular da cadeia β do receptor de IGF-I e submetidas à análise por Citometria de Fluxo. Utilizamos como marcador específico para CS o anticorpo anti-S-100. A figura 4.15B mostra a expressão de IGF-IR em todas as células ST88-14 analisadas.

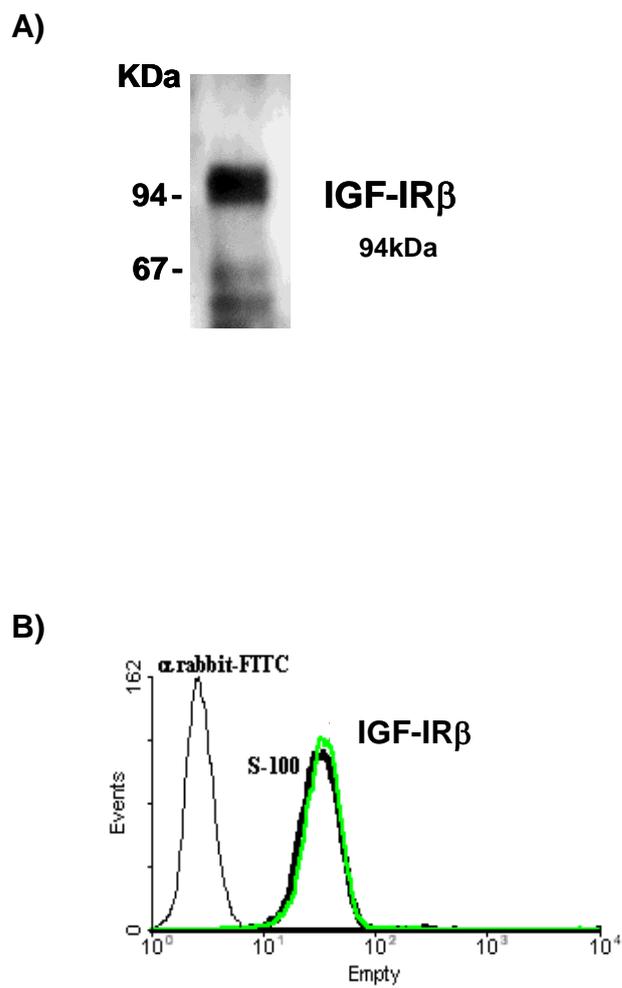


Figura 4.15: Expressão de IGF-IR em CS humanas ST88-14. Culturas de CS humanas ST88-14 foram crescidas em meio contendo 10% de soro. (A) Lisado total de CS (50µg de proteínas) foi fracionado em gel de 8,5% de acrilamida e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi revelada com anticorpo anti-IGF-IRβ utilizando substrato quimioluminescente. (B)

Análise por Citometria de Fluxo com marcação intracelular para a cadeia β de IGF-IR (verde) e S-100 (preto).

4.11 Efeito anti-apoptótico de IGF-I em CS humanas ST88-14

A ligação do IGF-I ao seu receptor induz a ativação de vias de sinalização, incluindo a de fosfatidil inositol 3-quinase (PI 3-K) que está relacionada à inibição de apoptose (revisto por Butler *et al.*, 1998). Sendo assim, resolvemos investigar a funcionalidade do receptor de IGF-I expresso em CS ST88-14 através da indução de apoptose pela remoção de soro. Foram realizados ensaios de sobrevivência, onde culturas de CS em meio RPMI com 10% de soro foram mantidas a 37°C em estufa de 5% de CO₂ por 24h e após este período os poços foram lavados e adicionado novo meio RPMI sem soro acrescido de doses crescentes de IGF-I recombinante. As culturas foram incubadas a 37°C por mais 48h e a viabilidade monitorada pela coloração com Azul de Tripán.

Através deste ensaio demonstramos que IGF-I foi capaz de proteger CS ST88-14 de morte quando adicionado em culturas sem soro, de maneira dose-dependente (Fig. 4.16).

A)

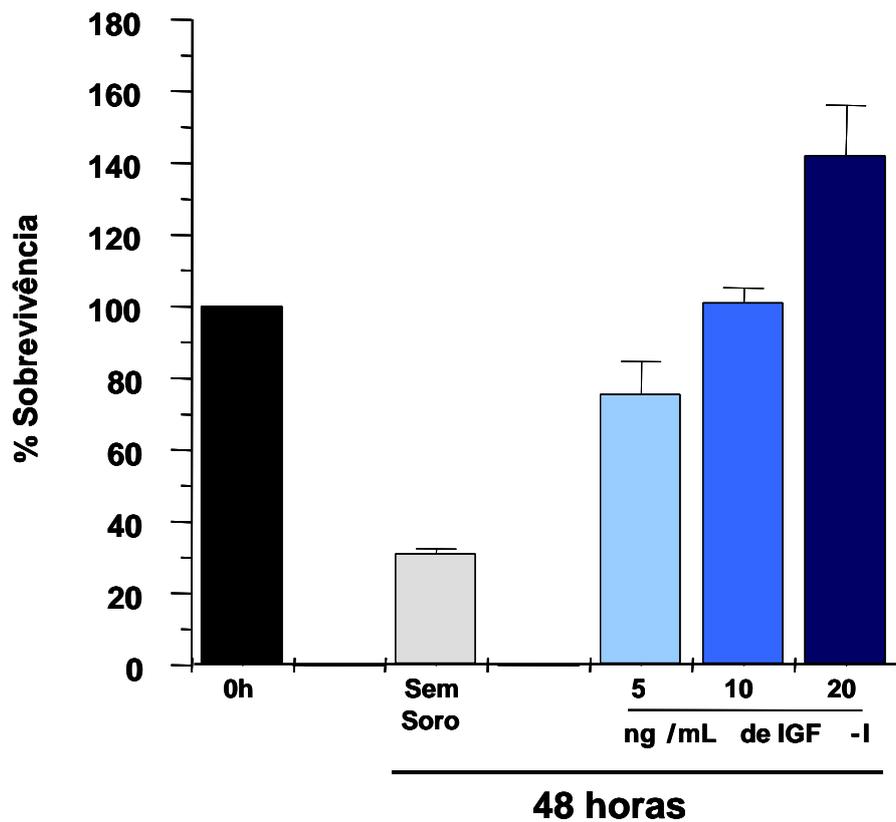


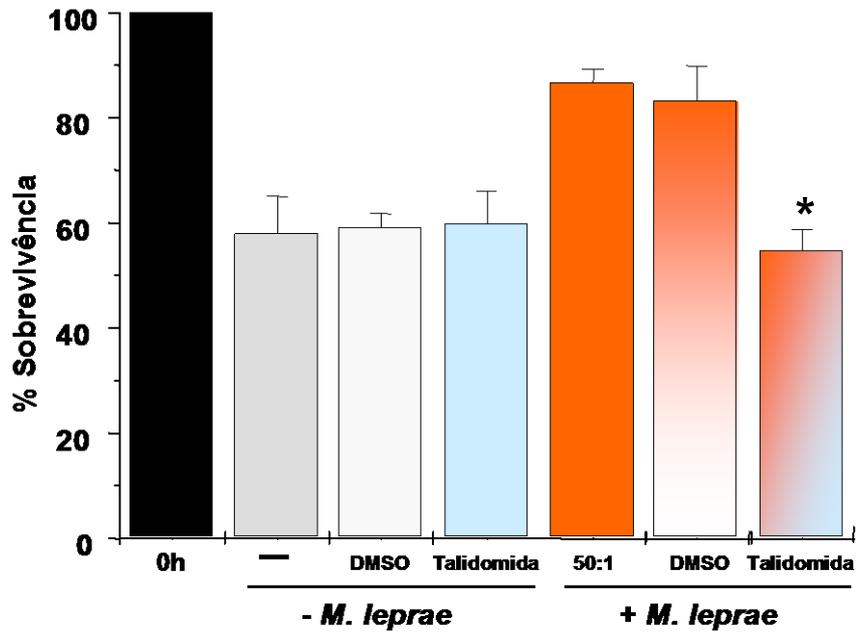
Figura 4.16: IGF-I previne a morte de CS mantidas em meio sem soro. Cerca de 3×10^4 CS ST88-14 por poço foram plaqueadas em meio contendo 10% de soro em placa de 24 poços. No dia seguinte, o meio foi removido e os poços foram lavados com PBS. Meio RPMI sem soro contendo ou não IGF-I (5-20 ng/mL) foi adicionado e a viabilidade das culturas monitorada após 48h. A média ($X \pm SD$) do percentual de sobrevivência foi calculada à partir da contagem de células viáveis em 48h através da coloração com azul de Tripán.

4.12 Participação de NF- κ B na proteção de morte celular por *M. leprae*

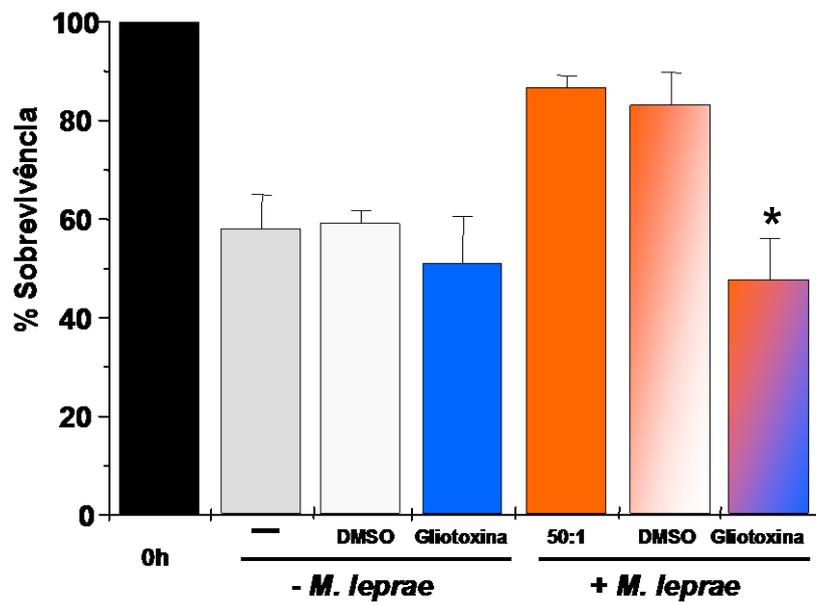
Vários patógenos inibem a morte celular das células do hospedeiro através da ativação do fator transcricional NF- κ B, uma via anti-apoptótica clássica (revisto por Gao e Kwai, 2000).

Com o objetivo de investigar o envolvimento deste fator transcricional no efeito anti-apoptótico do *M. leprae* na CS, numa etapa seguinte deste trabalho realizamos ensaios de sobrevivência na presença de conhecidos inibidores de NF- κ B. Utilizamos as mesmas condições de tratamento para indução de apoptose já descritas na figura 4.6, contudo, em alguns poços o *M. leprae* era adicionado juntamente com uma das seguintes drogas: talidomida, gliotoxina ou SN50. A figura 4.17 mostra que o pré-tratamento das culturas com Talidomida (Fig. 4.17A) resultou na neutralização do efeito protetor do *M. leprae* sobre as CS. Este efeito não foi observado quando o veículo da droga (DMSO) foi adicionado aos poços-controle. Resultados semelhantes foram vistos utilizando Gliotoxina como inibidor (Fig. 4.17B). A figura 4.17C mostra que após tratamento com SN50 as culturas atingem níveis de morte celular comparáveis às culturas não tratadas com *M. leprae*. Já a utilização do peptídeo-homólogo não ativo SN50m não alterou a capacidade de *M. leprae* em manter a sobrevivência das células.

A



B)



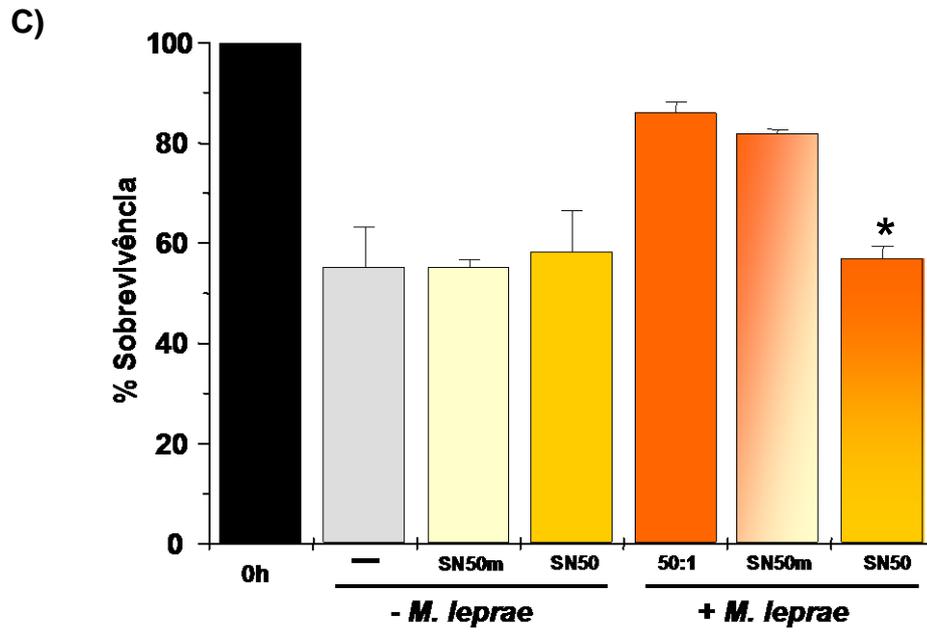


Figura 4.17: O efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre as CS é bloqueado por inibidores de NF- κ B. Células ST88-14 foram pré-tratadas com os inibidores Talidomida (A), Gliotoxina (B) e SN50 (C) por 15 min antes da adição de *M. leprae* na proporção 50:1. Após 48h em meio sem soro, a viabilidade celular foi avaliada pela coloração com azul de Tripán e o percentual de sobrevivência calculado a partir da média ($X \pm SD$) de três experimentos independentes. (*) Diferenças estatisticamente significativas para valores obtidos nas culturas tratadas com *M. leprae* e com inibidor em relação às tratadas com *M. leprae* na ausência de inibidor determinadas através do teste t, com $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

A capacidade de microorganismos patogênicos de modular as vias de apoptose nas células do hospedeiro tem se revelado como um mecanismo bastante difundido utilizado para o estabelecimento bem sucedido da infecção (revisto por Gao e Kwaik, 2000). O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório e seu tropismo pelas CS causa inflamação, fibrose, desmielinização e degeneração dos nervos periféricos. Contudo, os mecanismos de patogenia do bacilo no nervo são ainda pouco conhecidos. No presente trabalho investigamos o efeito anti-apoptótico do *M. leprae* na célula de Schwann, com o intuito de contribuir para a definição dos mecanismos adotados por esta bactéria para a colonização bem sucedida do nervo periférico.

O caráter crônico da hanseníase, aliado à ausência de um modelo experimental que mimetize a infecção no homem, impõe a utilização de modelos *in vitro* de culturas de CS purificadas ou co-culturas de CS-neurônios para investigar a interação patógeno-célula hospedeira nos estágios iniciais da infecção. Neste trabalho utilizamos a linhagem de CS humana ST88-14 devido às dificuldades de obtenção e manutenção de culturas primárias. Apesar de serem isoladas de um tumor maligno nos nervos periféricos (Fletcher *et al.*, 1991), justificamos nossa escolha pelo fato de serem células de fácil cultivo e por apresentarem similaridades com culturas primárias. Além disso, apresentam uma boa taxa de associação após apenas 2 horas de incubação com *M. leprae* (Alves, 2003) e o mecanismo de adesão bacteriana a estas células se assemelha ao descrito em culturas primárias (Marques *et al.*, 2000).

Inicialmente nos preocupamos em padronizar um modelo de apoptose nas células ST88-14. Como a privação de fatores de crescimento do meio através da retirada de soro é classicamente utilizada em estudos de indução de morte celular por apoptose em CS (Delaney *et al.*, 1999; Syroid *et al.*, 1999; Chuenkova *et al.*, 2001), utilizamos este protocolo nas culturas de CS ST88-14. Avaliamos a

viabilidade celular através da capacidade das células viáveis de reduzir o sal metiltetrazólio (MTT). A avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de redução enzimática do MTT é feita por quantificação colorimétrica de um produto formado (formazan) a partir da ação de desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas sobre o substrato exógeno (Mosmann, 1983; Berridge e Tan, 1993). Esta metodologia tem sido utilizada em diversos sistemas celulares e se mostrou eficiente em condições experimentais, conforme descrito por Syroid e col. (1999) e Valente e col. (2000). A curva de sobrevivência das células ST88-14 privadas de soro por 48 horas mostraram um percentual de células vivas de 30 a 60%, comparável aos resultados previamente obtidos com culturas de CS primárias de nervo ciático de ratos (Campana *et al.*, 1999).

Uma vez estabelecido o nosso modelo de indução de apoptose *in vitro*, partimos para uma próxima etapa do trabalho, onde comparamos o grau de sobrevivência de culturas de CS ST88-14 pré-tratadas ou não por 18 horas com *M. leprae*. Para a avaliação da viabilidade, inicialmente repetimos o ensaio de redução do MTT. Nossos resultados mostraram que as células ST88-14 pré-tratadas com *M. leprae* mantinham capacidade integral de redução de MTT após 24 horas de privação de soro, contrastando com as culturas não-tratadas com *M. leprae*. O efeito do *M. leprae* era, contudo, transitório, uma vez que com 48 horas de incubação as culturas tratadas com a bactéria apresentavam baixo índice de redução de MTT semelhante às culturas não tratadas com *M. leprae*.

Em sistemas *in vitro* o processo de apoptose celular evolui para um estágio terminal denominado de necrose, caracterizado pela perda da seletividade da membrana celular. Uma metodologia clássica de avaliação desta perda se baseia na propriedade das células de excluir o corante vital azul de Tripan. A quantificação de células em apoptose secundária foi, então, determinada em culturas pré-tratadas ou não com *M. leprae* e privadas de soro por 48 horas. Os resultados obtidos ratificaram aqueles gerados com MTT, confirmando um efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre as células ST88-14. Além disso, essa proteção mostrou ser dependente da concentração de bacilos utilizada. Variando esta concentração de 1 a 50 bactérias por célula, observamos um efeito crescente nos índices de sobrevivência com os valores próximos a 100% na relação 50:1.

A proteção fornecida pelo *M. leprae* a CS foi também observada através da coloração com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo seguida de análise nas culturas em microscópio de fluorescência invertido. Neste ensaio, a atividade de enzimas esterases, abundantes no citoplasma das células, é avaliada pela capacidade de hidrólise do corante lipofílico diacetato de fluoresceína que fluoresce unicamente após hidrólise. As células vivas se coram, assim, em verde, enquanto que as mortas são contracoradas com brometo de etídeo que penetra rapidamente nestas células, caracterizando a perda de seletividade na sua membrana plasmática. Além de confirmar uma menor taxa de morte nas culturas pré-tratadas com *M. leprae*, a aplicação desta metodologia permitiu também monitorar mudanças na morfologia das células que reforçaram ainda mais o dado do efeito protetor fornecido pela bactéria à CS.

O efeito protetor do *M. leprae* sobre as CS ficou também evidente quando analisamos um marcador precoce de células apoptóticas. Todos os métodos até o momento empregados no nosso estudo medem parâmetros que ocorrem em estágios tardios da morte celular. Visando complementar estes resultados, avaliamos numa etapa seguinte do trabalho a perda de potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), descrita como um evento inicial que ocorre durante a apoptose. Alterações na mitocôndria, como a queda no potencial da membrana desta organela, têm sido consideradas determinantes na cascata de sinalização que culmina na ativação de caspases (revisto por Orrenius, 2004). A avaliação do $\Delta\psi_m$ tem também sido utilizada para indicar a indução de apoptose em linhagem de macrófagos murinos infectados com diferentes cepas de uma outra micobactéria, o *M. tuberculosis* (Abarca-Rojano *et al.*, 2003). O $\Delta\psi_m$ nas CS foi determinado no nosso trabalho por citometria de fluxo utilizando metodologia clássica baseada na coloração com o corante mitocondrial lipofílico DiOC₆. Enquanto as células ST88-14 não tratadas com *M. leprae* mostraram perda de potencial da membrana mitocondrial já com duas horas de privação de soro, as células pré-tratadas com *M. leprae* mantiveram o $\Delta\psi_m$ inalterado, mesmo após 6 horas na ausência de soro, apresentando um perfil comparável às células mantidas em meio com 10% de SFB.

Já os experimentos de coloração dos núcleos de CS com Bis-Benzemida em culturas de CS tratadas com bactérias previamente marcadas com FITC

permitiram avaliar a morfologia nuclear de células que haviam fagocitado ou não as bactérias. As culturas não-tratadas com *M. leprae* revelaram a morfologia alterada, característica da condensação da cromatina ocorrida durante a apoptose. Ao contrário, as culturas tratadas com *M. leprae* e mantidas também em meio sem soro pelo mesmo período, preservaram a morfologia do núcleo, indicando o bem-estar da cultura. As imagens obtidas permitiram visualizar um dado muito relevante. Mesmo as células que não internalizaram a micobactéria mantinham a morfologia nuclear, sugerindo que a secreção pelas CS de algum fator solúvel, induzida pela fagocitose do *M. leprae*, poderia estar contribuindo para a manutenção da sobrevivência de células adjacentes.

Passamos, então, a investigar os mecanismos utilizados pelo *M. leprae* para modular as vias apoptóticas da CS. Inicialmente geramos meio condicionado de CS tratadas com *M. leprae* e observamos que à semelhança da incubação com a bactéria, este meio promovia a sobrevivência de culturas tratadas com a mesma. Estes experimentos confirmaram a presença de fatores solúveis no meio de cultura das células tratadas que promoviam a sobrevivência.

Estes dados nos levaram a buscar possíveis candidatos para este efeito. Dentre os potenciais candidatos para o efeito protetor do *M. leprae* estariam o IGF-I e o IGF-II, que têm sido apontados como fatores neurotróficos em diversos trabalhos (Cheng *et al.*, 2001; Delaney *et al.*, 2001; Delaney *et al.*, 1999; Meier *et al.*, 1999). Dados na literatura já haviam comprovado a capacidade de CS de promoverem sua própria sobrevivência através da secreção de fatores de crescimento, dentre eles IGF-I e IGF-II, pelo estabelecimento de um circuito autócrino e parácrino (Meier *et al.*, 1999). Em 1999, Delaney e colaboradores descreveram o efeito anti-apoptótico do IGF-I mediado pela inibição da ativação de caspase-3. Eles utilizaram CS provenientes de nervo ciático de ratos de 3 dias e induziram a apoptose pela retirada de soro do meio por até 72 horas. O tratamento das culturas com IGF-I foi, contudo, capaz de proteger, significativamente, as CS de apoptose. Realizamos experimentos similares com a CS ST88-14 e a incubação com 5-20 ng/mL de IGF-I recombinante protegeu de maneira dose-dependente a apoptose de células incubadas em meio sem soro. Um resultado relevante foi demonstrar por RT-PCR que o tratamento com *M. leprae* induz a expressão de IGF-I e IGF-II em células ST88-14. Todos estes

dados sugerem a indução pelo *M. leprae* dos hormônios IGF-I e IGF-II como provável estratégia para inibir vias apoptóticas na CS de forma a garantir sua sobrevivência.

Os resultados obtidos com IGF-I recombinante também indicaram que as células ST88-14 expressam o receptor funcional para o IGF-I, o IGF-IR, dado que foi confirmado por western blot e citometria de fluxo. A expressão de IGF-IR foi observada em CS embrionárias e adultas por Cheng e colaboradores em 1996, e desde então seu papel na transdução de sinais de sobrevivência mediados por IGF-I tem sido elucidados. Apesar de IGF-I também poder se ligar ao receptor de insulina e ao IGF-IIR, dados da literatura apontam o IGF-IR como principal desencadeador da resposta anti-apoptótica mediada por IGF-I (Jones e Clemons, 1995). A ligação de IGF-I ao seu receptor ativa duas vias de sinalização na célula que levam, respectivamente, à ativação de MAP quinases e de PI 3-K (Campana *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2001), estando esta última via especialmente implicada na inibição de apoptose (revisito por Butler *et al.*, 1998).

Finalmente, a ativação de NF- κ B em células ST88-14 tratadas com *M. leprae* observada por Pereira e col. (2005), aliada à atividade anti-apoptótica comumente associada a esta via (revisito por Hacker e colaboradores, 2005), nos levaram a investigar a participação deste fator transcricional no efeito protetor do *M. leprae* sobre as CS evidenciado em nosso estudo. O pré-tratamento das CS com três inibidores distintos de NF- κ B, a talidomida, o peptídeo SN50 e a gliotoxina neutralizou o efeito protetor do *M. leprae* sobre as CS cultivadas em meio sem soro por 48 horas. Estes dados indicam o envolvimento do NF- κ B na atividade anti-apoptótica promovida pelo *M. leprae* em CS.

O efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre a CS observado em nosso trabalho complementa os resultados recentemente obtidos por Rambukkana e Tapinos (2005). Estes autores verificaram a indução pela bactéria da proliferação de CS primárias humanas infectadas por até 30 dias. Além disso, nenhum sinal apoptótico ou citotóxico foi evidenciado nestas culturas. Os efeitos não tóxicos do *M. leprae* já haviam sido previamente observados em trabalhos anteriores (Antia e Mukherje, 1985; Hagge *et al.*, 2002; Rambukkana *et al.*, 2002).

Inúmeros fatores certamente influenciam a capacidade das bactérias patogênicas de induzirem ou inibirem as vias apoptóticas. Dentre estes fatores, o

estilo de vida do microorganismo no hospedeiro representa um importante aspecto a ser levado em conta. Assim, bactérias extracelulares, bactérias intracelulares facultativas e bactérias intracelulares obrigatórias interagem em graus diferentes e com diferentes exigências com as células do hospedeiro provocando efeitos diversos nas vias de apoptose que irão, em última análise favorecer o estabelecimento da infecção. No caso das bactérias intracelulares obrigatórias, efeitos preferencialmente anti-apoptóticos têm sido relatados sobre a célula hospedeira, devido à sua restrita necessidade de replicação intracelular. A preservação da vida da célula hospedeira se torna para estes patógenos, um aspecto crítico para sua própria sobrevivência, multiplicação e persistência no hospedeiro.

A capacidade do *M. leprae* de modular as vias apoptóticas da célula hospedeira vem se somar aos efeitos previamente descritos de outras bactérias intracelulares nestas vias (revisto por Gao e Kwai, 2003 e Hacker *et al.*, 2005). A modulação das vias apoptóticas por microorganismos se dá comumente pela interferência em vias de sinalização que de alguma forma regulam o delicado equilíbrio entre fatores apoptóticos e anti-apoptóticos no interior da célula, alterando assim a susceptibilidade da célula aos inúmeros sinais apoptóticos que pode receber.

As bactérias ativam um conjunto complexo de vias de sinalização nas células do hospedeiro que varia dependendo do tipo celular e do estado fisiológico da célula. Muitos destes sinais são mediados pelos receptores tipo *Toll* (TLR). Os TLR constituem os principais receptores celulares que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (revisto por Iwasaki and Medzhitov, 2004). O estudo da ativação destes receptores tem tornado possível estabelecer os mecanismos de resposta da célula hospedeira frente a diversas infecções. Muitas espécies de bactérias e produtos bacterianos atuam através destes receptores, ora induzindo ora inibindo a morte celular.

Especialmente duas vias de sinalização ativadas por TLR tem efeito anti-apoptótico: as vias que levam a ativação de NF- κ B e a via de PI-3K (revisto por Hacker *et al.*, 2005). A ativação da via clássica de NF- κ B induz o aumento da expressão de quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão e mediadores inflamatórios secundários. Além desta função, o NF- κ B tem um papel claro na

inibição de apoptose. Algumas proteínas com importante papel na resistência a apoptose, como Bcl-X_L, Bfl-1/A1 e c-FLIP são reguladas por NF-κB, contudo o mecanismo preciso de como protege de apoptose não está muito claro na maioria das circunstâncias (revisto por Karin and Lin, 2002; Bonizzi and Karin, 2004). A ativação de NF-κB e conseqüente efeito anti-apoptótico tem sido descrito no contexto da infecção por vários agentes infecciosos. Um exemplo é o caso da bactéria intracelular *R. rickettsii*, que claramente protege sua célula hospedeira, a célula endotelial, de morte por apoptose via ativação de NF-κB. Quando este fator transcricional é bloqueado, as células tornam-se susceptíveis à apoptose, sugerindo que genes regulados por NF-κB sejam necessários para inibir a apoptose induzida pela bactéria (Clifton *et al.*, 1998).

Uma segunda via anti-apoptótica é aquela mediada por PI 3-K/Akt. Esta via pode ser ativada através da sinalização por TLR ou por vias independentes de TLR. Como mencionado anteriormente, a ativação de PI 3-K/Akt também é utilizada pelo IGF-I para mediar seu efeito anti-apoptótico (Campana *et al.*, 1999). Os mecanismos utilizados por esta via para proteger contra apoptose inclui a fosforilação de Bad, a indução de fatores de transcrição e conseqüente mudança na expressão gênica e através de “cross talk” com a via de NF-κB (revisto por Datta *et al.*, 1999). A utilização da via de PI 3-K/Akt por patógenos na modulação da sobrevivência da célula hospedeira pode ser exemplificada pelo trabalho recente de Chuenkova e colaboradores (2001). O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário intracelular obrigatório com capacidade de invadir diversos tecidos, incluindo as CS dos nervos periféricos. Estes autores demonstraram que CS eram resgatadas significativamente da apoptose induzida por privação de soro pela infecção com o *T. cruzi* por meio da sinalização através de PI 3-K/Akt.

Espécies do gênero *Chlamydia* constituem um exemplo intrigante de manipulação das vias apoptóticas por microorganismos patogênicos. Estas bactérias são importantes patógenos intracelulares obrigatórios responsáveis pela infecção de milhões de pessoas anualmente. As clamídias podem infectar uma gama de células diferentes no organismo. À semelhança de outros microorganismos, as clamídias expressam ligantes para os TLR (especialmente TLR2 e TLR4) que podem tanto ativar sinais apoptóticos como anti-apoptóticos,

como a ativação de NF- κ B. Contudo, além da interferência nas vias de sinalização celular, estas bactérias desenvolveram estratégias diretas de inibição da apoptose, independente do reconhecimento por receptores celulares. A necessidade do desenvolvimento por estas bactérias, à semelhança de outros patógenos intracelulares como os vírus, de mecanismos potentes de inibição de apoptose tem sugerido que as células, quando infectadas, percebem a presença do patógeno e respondem naturalmente a esta infecção sofrendo apoptose. De fato, a indução de apoptose por estas bactérias também tem sido demonstrada em certas circunstâncias, o que a princípio poderia ser considerado uma contradição (revisto por Hacker *et al.*, 2005).

Provavelmente a capacidade de inibir ativamente vias apoptóticas na célula hospedeira representa uma importante estratégia de patogenia para patógenos intracelulares obrigatórios. Como estes agentes infecciosos não podem se replicar fora do ambiente intracelular, a apoptose da célula hospedeira colocaria um fim na infecção e dessa forma representaria um mecanismo de defesa anti-microbiano efetivo. O mecanismo de inibição direta da apoptose desenvolvido pelas clamídias se soma à via anti-apoptótica dependente de NF- κ B também ativada por estas bactérias, e se baseia na degradação, após infecção, de todos os membros das sub-famílias pró-apoptóticas de Bcl-2. Esta degradação parece ser mediada pela proteína denominada CPAF que é injetada pela bactéria no citoplasma da célula através de um sistema tipo III de secreção (Byrne and Ojcius, 2004; Hacker *et al.*, 2005).

Os resultados deste trabalho sugerem que, à semelhança das clamídias, o *M. leprae* poderia ativar vias anti-apoptóticas da célula hospedeira utilizando dois mecanismos. Segundo nossos dados, o reconhecimento do *M. leprae* ou componentes da bactéria pela CS induz a expressão de IGF-I e IGF-II. A secreção destes fatores agiria de maneira autócrina e/ou parácrina através do IGF-IR, ativando a via anti-apoptótica de PI 3-K/Akt. Em paralelo, esta micobactéria também ativaria a via anti-apoptótica de NF- κ B, garantindo a sobrevivência da CS na ausência de soro (Figura 5.18). A ativação de NF- κ B, por sua vez, poderia resultar de um “cross talk” com a via de PI 3-K através da fosforilação por Akt da I κ B quinase (Ozes *et al.*, 1999; Romashkova e Makarov, 1999), ou através de uma via independente ativada, por exemplo, pela ligação de

componentes do *M. leprae* aos TLRs da CS. Esta hipótese está embasada nos seguintes achados: 1) *M. leprae* inibiu a morte celular por apoptose de CS ST88-14 privadas de soro; 2) Meio condicionado de CS previamente tratadas com *M. leprae* mimetizou o efeito anti-apoptótico promovido pela bactéria em si; 3) O tratamento de CS com *M. leprae* induziu a expressão de RNA mensageiro para IGF-I e IGF-II; 4) IGF-I recombinante teve efeito protetor sobre CS cultivadas em meio sem soro; 5) CS ST88-14 expressam IGF-IR; 6) Inibidores da ativação de NF- κ B foram capazes de bloquear a ação anti-apoptótica do *M. leprae* em culturas de CS privadas de soro.

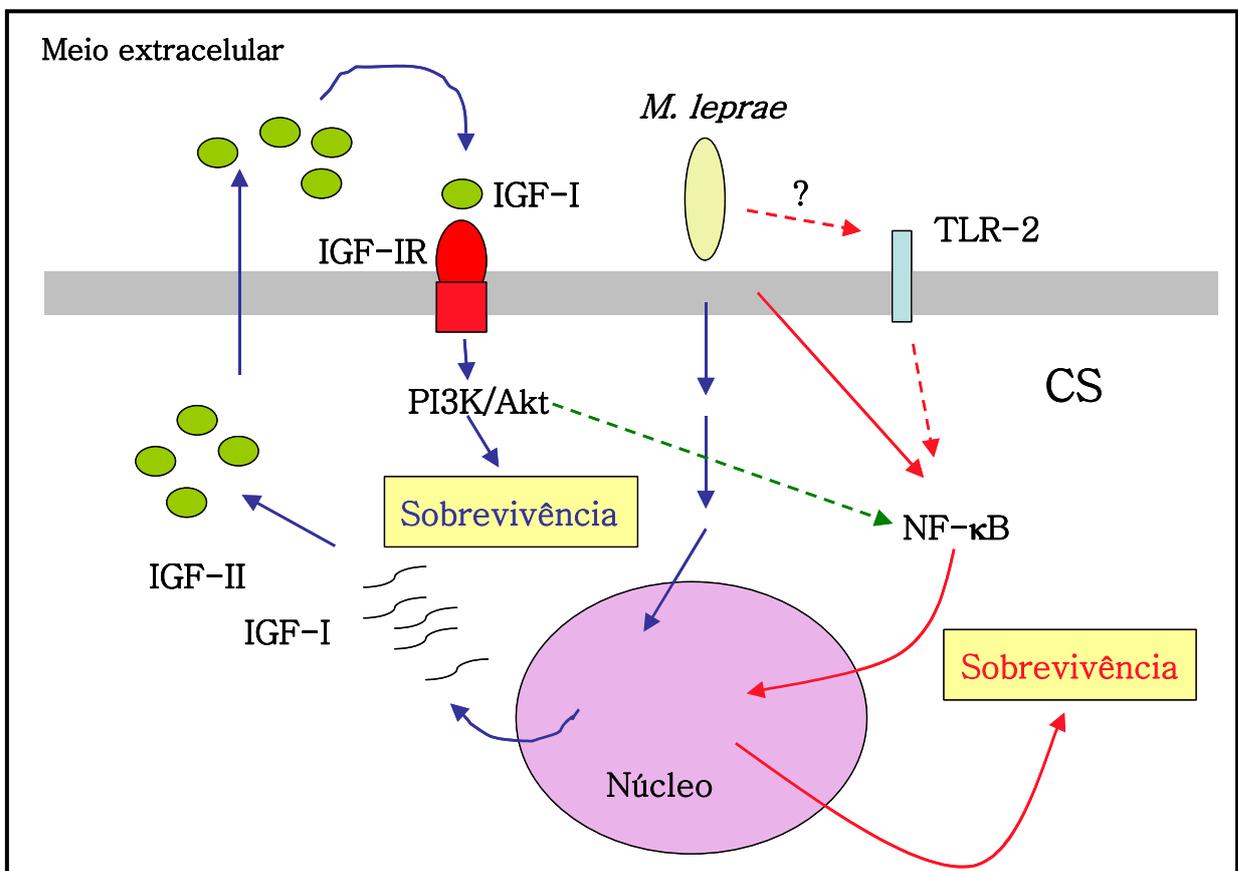


Figura 5.18: Possível mecanismo utilizado pelo *M. leprae* para proteger CS de morte. Duas vias, representadas por setas em vermelho e azul, respectivamente, poderiam estar atuando nas CS infectadas pelo *M. leprae* modulando positivamente sua sobrevivência. A indução da expressão de RNAm para IGF-I e IGF-II pela bactéria, por uma via ainda desconhecida, levaria à produção e secreção destas proteínas, às quais poderiam se ligar aos seus respectivos receptores. Estes, por sua vez, podem ativar vias de sinalização envolvidas na manutenção da

sobrevivência, como PI 3-K/Akt. Por outro lado, *M. leprae* também ativaria o fator transcricional NF- κ B que, classicamente, promove a sobrevivência da célula por diversos mecanismos. Uma possível via da ativação do NF- κ B pelo *M. leprae* seria através do reconhecimento de moléculas da sua parede celular por TLR-2 ou através de um “cross talk” com a via PI 3-K/Akt (seta verde).

A ativação de vias anti-apoptóticas pelo *M. leprae* pode representar uma forma de garantir um nicho apropriado para sua sobrevivência e proliferação no nervo periférico. Em particular, a indução da expressão dos IGFs teria implicações bastante interessantes em vista das suas propriedades neuroprotetoras em condições de produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (Venters et al., 2000). Dentre as citocinas com papel relevante na hanseníase, destaca-se o TNF- α , cuja produção durante episódios de reação reversa (RR) em pacientes com hanseníase está fortemente relacionado ao caráter neurodegenerativo da doença (Sarno et al., 1991). Na literatura, encontramos alguns trabalhos mostrando o efeito apoptótico do TNF- α sendo bloqueado por IGF-I (Wu et al., 1996; Remacle-Bonnet et al., 2000).

Relatos recentes da literatura indicam o envolvimento de TLR-2 no reconhecimento de *M. leprae* por fagócitos mononucleares, sendo a lipoproteína de 19 kDa identificada como um ligante deste receptor (Krutzik et al., 2003). A expressão de TLR-2 foi demonstrada em CS, sugerindo que este receptor também participa do reconhecimento do *M. leprae* por estas células (Oliveira e col., 2003). Estes autores também demonstraram que a sinalização via TLR-2, ativada pela lipoproteína de 19 kDa, induz tanto a produção de citocinas (IL-1 e IL-8) como também a apoptose nas células CS ST88-14. Ainda neste trabalho, os autores demonstraram a presença de CS apoptóticas em lesão de pele de pacientes com hanseníase, sugerindo que a sinalização via TLR-2 pode contribuir para o dano neural observado na hanseníase. Mais recentemente Oliveira e colaboradores (Oliveira et al., 2005) demonstraram que *M. leprae* promovia apoptose em cerca de 10-15% das células CS ST88-14.

Embora os resultados acima mencionados possam parecer contraditórios aos efeitos anti-apoptóticos descritos no presente estudo, a propriedade do *M. leprae* de induzir apoptose nestes trabalhos reforça a existência de mecanismos desenvolvidos por este patógeno para ativar vias anti-apoptóticas como forma de

garantir a sobrevivência da célula hospedeira e sua própria sobrevivência. Como mencionado anteriormente, múltiplos sinais externos e/ou internos são capazes de regular o balanço delicado entre fatores apoptóticos e anti-apoptóticos no interior da célula. Assim, o resultado final do encontro entre as células do hospedeiro e o *M. leprae* e/ou seus componentes é um processo muito contextual, podendo alterar-se durante o curso de uma infecção crônica entre promoção de sobrevivência ou aumento de susceptibilidade à morte em função, por exemplo, do surgimento de uma resposta imuno-inflamatória local.

Como perspectivas para a continuidade deste estudo, as seguintes etapas de investigação estão previstas:

- utilização de anticorpos neutralizantes contra os hormônios IGF-I e IGF-II, além de IGF-IR, com o objetivo de esclarecer se a inibição da apoptose pelo *M. leprae* é dependente desta via.
- comprovação do envolvimento da via de sinalização PI 3-K/Akt na sobrevivência mediada pelo *M. leprae* através da utilização de inibidores específicos e grau de fosforilação de Akt;
- avaliação do envolvimento de TLR-2 no efeito anti-apoptótico observado;
- comprovação dos efeitos anti-apoptóticos de *M. leprae* em culturas primárias de CS humanas;
- comparação dos efeitos de prevenção de morte de CS por *M. leprae* vivo e *M. leprae* letalmente irradiado;
- identificação de componentes bacterianos que mimetizam o efeito observado neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados podemos concluir que:

1. Ensaios de indução de morte celular demonstraram que a linhagem de célula de Schwann humana ST88-14 tem índices de sobrevivência entre 30-60% após 24 e 48 horas sem soro;
2. Células ST88-14 previamente tratadas com *M. leprae* se mostraram mais resistentes à morte, com índices de sobrevivência de 70-100% após 24 e 48 horas de remoção de soro;
3. *M. leprae* promoveu de maneira dose-dependente a sobrevivência da linhagem ST88-14 incubada em meio sem soro;
4. Meio condicionado proveniente de culturas da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae* promoveu a sobrevivência de células não tratadas com *M. leprae* e privadas de soro. Este dado sugere que fatores solúveis secretados pela CS em resposta ao *M. leprae* seriam responsáveis pelo efeito protetor observado;
5. *M. leprae* induziu a expressão de RNAm para os genes IGF-I e IGF-II em células ST88-14;
6. A linhagem ST88-14 expressa o receptor de IGF-I (IGF-IR) e ensaios de sobrevivência demonstraram que IGF-I promoveu a sobrevivência da linhagem ST88-14 incubada em meio sem soro;
7. Ensaios utilizando inibidores de NF- κ B demonstraram a participação deste fator de transcrição na proteção de morte da linhagem ST88-14 mediada pela incubação com *M. leprae*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA-ROJANO, E., ROSAS-MEDINA, P., ZAMUDIO-CORTÉZ, P., MONDRAGÓN-FLORES, R., SÁNCHEZ-GARCIA, F.J. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* virulence correlates with mitochondrial cytochrome c release in infected macrophages. **Scandin. J. Immunol.** 58:419-427.

ALVES, L. 2003. Estudo sobre sistemas de sinalização celular envolvidos na interação entre o *Mycobacterium leprae* e a célula de Schwann. Tese de mestrado em Biologia Celular e Molecular apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz.

ALVES L., DE MENDONÇA LIMA L., DA SILVA MAEDA E., CARVALHO, L., HOLY J., SARNO E.N., PESSOLANI M.C., BARKER L.P. 2004. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiol. Lett.** 238:429-437.

ANTIA, N.H. & SHETTY, V.P. 1997. The peripheral nerve in leprosy and other neuropathies. Pathology of nerve damage in leprosy. **In Oxford University Press.** p. 79-137.

APFEL, S.C. 1999. Neurotrophic factors in peripheral neuropathies therapeutic implications. **Brain Pathol.** 9:393-413.

ASHKENAZI, A. AND DIXIT, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. **Science.** 281:1305-1308.

AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.O., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 2. p. 10.16.8.

BAUERLE, P.A. 1998. I κ B-NF- κ B structure: at the interface of inflammation control. **Cell.** 95:729-731.

BERRIDGE, M.V. AND TAN, A.S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch. Biochem. Biophys.** 303:474-482.

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

BONIZZI, G. AND KARIN, M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate adaptive immunity. **Trends Immunol.** 25:280-288.

BRITTON, W.J. AND LOCKWOOD, D.N.J. 2004. Leprosy. **The Lancet.** 363:1209-1219.

BUNGE, R.P. 1993. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. **Current Opinion in Neurobiol.** 3:805-809.

BURSTEIN, E., AND DUCKETT, C.S. 2003. Dying for NF- κ B? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. **Curr. Opin. Cell Biol.** 15:732-737.

BUTLER, A.A., YAKAR, S., GEWOLB, I.H., KARAS, M., OKUBO, Y., LeROITH, D. 1998. Insulin-Like Growth Factor-I Receptor signal transduction: at the interface between physiology and cell biology. **Comparative Biochem. Physiol. Part B.** 121:19-26.

BYRNE, G.I. AND OJCIUS, D.M. 2004. *Chlamydia* and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen. **Nature reviews.** 2:802-808.

CAMPANA, W.M., DARIN, S.J., O'BRIEN, J.S. 1999. Phosphatidylinositol 3-Kinase and AKT Protein Kinase Mediate IGF-I and Prosaptide-Induced Survival in Schwann Cells. **J. Neurosci. Res.** 57:332-341.

CHENG H-L, RANDOLPH, A., YEE, D., DELAFONTAINE, P., TENNEKOON, G., FELDMAN, E.L. 1996. Characterization of insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor and binding proteins in transected nerves and cultured Schwann cells. **J. Neurochem.** 66:525-536.

CHENG, H.L., RUSSEL, J.W., FELDMAN, E.L. 1999. IGF-I promotes Peripheral Nervous system Myelination. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 883:124-130.

CHENG, H.L., STEINWAY, M.L., XIN, X., FELDMAN, E.L. 2001 Insulin-like growth factor-1 and Bcl-XL inhibit c-jun N-terminal kinase activation and rescue Schwann cells from apoptosis. **J. Neurochem.** 76:935-943.

CHERNOUSOV, M.A., CAREY, D.J. 2000. Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors (review). **Histol. Histopathol.** 15:593-601.

CHUENKOVA, M.V., F.B. FURNARI, W.K. CAVENEE AND M.A. PEREIRA. 2001. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: A potent and specific survival factor for human

Schwann cells by means phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling. **PNAS**. 98:9936-9941.

CLIFTON, D.R., R.A. GOSS, S.K. SAHNI, D. VAN ANTWERP, R.B. BAGGS, V.J. MARDER, D.J. SILVERMAN AND L.A. SPORN. 1998. NF- κ B-dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95:4646-4651.

COLE, S.T., EIGLEMEIR, J., PARKHILL, K.D., JAMES, N.R., THOMSON, P.R., WHEELER, P.R., HONORE, N., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., MUNGALL, K., BASHAM, D., BROWN, D., CHILLINGWORTH, T., CONNOR, R., DAVIES, R.M., DEVLIN, K., DUTHOY, S., FELTWELL, T., FRASER, A., HAMLIN, N., HOLROYD, S., HORNSBY, T., JAGELS, K., LACROIX, C., MACLEAN, J., MOULE, S., MURPHY, L., OLIVER, K., QUAIL, M.A., RAJANDREAM, M.A., RUTHERFORD, K.M., RUTTER, S., SEEGER, K., SIMON, S., SIMMONDS, M., SKELTON, J., SQUARES, R., STEVENS, K., TAYLOR, K., WHITEHEAD, S., WOODWARD, J.R., BARRELL, B.G. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. 409:1007-1011.

COLSTON, M. J. AND HILSON, G.R.F. 1976. Growth *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. **Nature**. 262:399-401.

COUTINHO-SILVA, R., J.L. PERFETTINI, P.M. PERSECHINI, A. DAUTRY-VARSAT AND D.M. OJCIUS. 2001. Modulation of P2Z/P2X(7) receptor activity in macrophages infected with *Chlamydia psittaci*. **Am. J. Physiol.** 280:C81-C89.

DATTA, S.R., BRUNET, A., GREENBERG, M.E. 1999. Cellular survival: a play in three acts. **Genes Dev.** 13:2905-2927.

DELANEY, C.L., CHENG, H.L., FELDMAN, E.L. 1999. Insuline-Like Growth Factor-I Prevents Caspase-Mediated Apoptosis in Schwann Cells. **J. Neurobiol.** 41:540-548.

DELANEY, C.L., RUSSEL, J.W., CHENG, H.L., FELDMAN, E.L. 2001. Insuline-Like Growth Factor-I and Over-Expression of Bcl-kL Prevent Glucose-Mediated Apoptosis in Schwann Cells. **J. Neuropath.** 60:147-160.

DeLEO, F.R. 2004. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. **Apoptosis.** 9:399-413.

DREVETS, D.A., CAMPBELL, P.A. 1991. Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. **J. Immunol. Methods.** 142:31-38.

DUDEK, H., DATTA, S.R., FRANKE, T.F. et al. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. **Science.** 27:661-665.

FAN, T., H. LU, H. HU, L. SHI, G.A. MACCLARTY, D.M. NANCE, A. H. GREENBERG AND G. ZHONG. 1998. Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. **J. Exp. Med.** 187:487-496.

FARIA, P.M.B. 2004. Modulação do fosfolípido fosfatidilserina na superfície de formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: papel modulador da via metabólica de poliaminas. Monografia. Instituto de Ciências Biológicas e Ambientais. Universidade Santa Úrsula.

FIOCRUZ. 2004. RADIS. Comunicação em Saúde. **Ediouro Gráfica e Editora S.A.** Nº27. p. 8-12.

FISCHER, S.F., SCHWARZ, C., VIER, J., HACKER, G. 2001. Characterization of antiapoptotic activities of Chlamydia pneumoniae in human cells. **Infec. Immun.** 69:7121-7129.

FLETCHER, J.A., KOZAKEWICH, H.P., HOFFER, F.A., LAGE, J.M., WEIDNER, N., TEPPER, R., PINKUS, G.S. 1991. Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft-tissue tumors. **New England J. Med.** 324:436-442.

FRATTI, R.A., CHUA, J., VERGNE, I., DERETIC, V. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. **PNAS.** 100:5437-5442.

GANAPATI, R., AND REVANKAR, C.R. 1989. Clinical aspects of leprosy. In: The biology of the mycobacteria. **Academic Press Limited**, London. Vol. 3. p. 327-358.

GAO, L.Y. & KWAIK, Y.A. 1999. Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by *Legionella pneumophila* and its role in cytopathogenicity. **Infect. Immun.** 67:862-870.

GAO, L.Y. & KWAIK, Y.A. 2000. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens (reviews). **Trends in Microbiology.** 8:306-313.

GODAL, T., M. LOFGREN & K. NEGASSI. 1972. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 40:243-50.

GREEN, D.R. 1998. Apoptotic pathways: The roads to ruin. **Cell.** 94:695.

GREEN, D.R. AND REED, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. **Science.** 281:1309-1312.

HÄCKER, G., KIRSCHNEK, S. AND FISHER, S.F. 2005. Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. **Medical Microbiol. and Immunol.** [Epub ahead of print]

HAGGE, D.A., OBY ROBINSON, S., SCOLLARD, D., MCCORMICK, G., WILLIAMS, D.L. 2002. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. **J. Infect. Dis.** 186:1283-1296.

HEGARTNER, M. 1998. Death by crowd control. **Science.** 281:1298-1299.

HERNANDEZ, M.O., NEVES JR, I., SALES, J.S., CARVALHO, D.S., SARNO, E.N., SAMPAIO, E.P. 2003. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae in vitro*: a possible role for tumour necrosis factor- α . **Immunol.** 109:156-164.

HERSH, D., MONACK, D.M., SMITH, M.R., GHORI, N., FALKOW, S., ZYCHLINSKY, A. 1999. The *Salmonella* invasion SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96:2396-2401.

HILBI, H., MOSS, J.E., HERSH, D. et al. 1998. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to I κ B. **J. Biol. Chem.** 273: 32895-32900.

HOLDENRIEDER, S. AND STIEBER, P. 2004. Apoptotic markers in cancer. **Clin. Biochem.** 37:605-617.

HUNTER, S.W. & BRENNAN, P.J. 1981. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly is involved in immunogenicity and pathogenicity. **J. Bacteriol.** 147:728-735.

HUNTER, S.W., FUJIWARA, T. AND BRENNAN, P.J. 1982. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **J. Biol. Chem.** 257:15072.

IWASAKI, A. AND MEDZHITOV, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.** 5:987-995.

JONES, J.I. AND CLEMONS, D.R. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocr. Rev.** 1:3-34.

KAPLAN, G. AND Z.A. COHN. 1986. The immunobiology of leprosy. **Int. Rev. Exp. Pathol.** 28:45-78.

KARIN, M. AND BEN-NERIAH, Y. 1999. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. **Ann. Rev. Immunol.** 12:621-628.

KARIN, M. AND LIN, A. 2002. NF- κ B at the crossroads of life and the death. **Nat. Immunol.** 3:221-227.

KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H. AND CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.** 26:239-257.

KIRCHHEIMER, W. F. & STORRS, E. E. 1971. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novencinctus*, Linn.) as a model for the leprosy. **Int. J. Lepr.** 39:693-703.

KNODLER, L.A. AND FINLAY, B.B. 2001. *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? **Microbes and Infection.** 3:1321-1326.

KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, LIU PT, COLE ST, GODOWSKI PJ, MAEDA Y, SARNO EN, NORGARD MV, BRENNAN PJ, AKIRA S, REA TH, MODLIN RL. 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med.** 9:525-532.

KULIK, G. KLIPPEL, A., WEBER, M.J. 1997. Antiapoptotic signaling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. **Mol. Cell. Biol.** 17:1595-1606.

KWAIK, Y.A. 1998. Fatal attraction of mammalian cells to *Legionella pneumophila*. **Mol. Microbiol.** 30:689-696.

LECOEUR, H., FEVRIER, M., GARCIA, S., RIVIERE, Y., GOUGEON, M.L. 2001. A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. **J. Immunol. Meth.** 253:177-187.

LUDWIG, T., EGGENSCHWILER, J., FISHER, P., D'ERCOLE, A.J., DAVENPORT, M.L. AND EFSTRATIADIS, A. 1996. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. **Dev. Biol.** 177:517-535.

LUNDBERG, U., VINATZER, U., BERDINIK, D., VON-GABAIN, A., BACCARINI, M. 1999. Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 gene. **J. Bacteriol.** 181:3433-3437.

MAITI, D., BHATTACHARYYA, A. AND BASU, J. 2001. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **J. Biol. Chem.** 276:329-333.

MALIK, Z.A., THOMPSON, C.R., HASHIMI, S., PORTER, B., IYER, S.S., KUSNER, D.J. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine Kinase. **J. Immunol.** 170:2811-2815.

MARQUES, M.A., MAHAPATRA, S., NANDAN, D., DICK, T., SARNO, E.N., BRENNAN, P.J. AND PESSOLANI, M.C.V. 2000. Bacterial and host-derived cationic proteins bind α 2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. **Microbes & Infection.** 2:1407-1471.

MARTE, B.M., DOWNWARD, J., DEPREZ, J. et al. 1997. PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other kinases of the insulin signalling cascade. **Trends. Biochem. Sci.** 22:355-358.

MARTENS, J.S., REINER, N.E., HERRERA-VELIT, P., STEINBRECHER, U.P. 1998. Phosphatidylinositol 3-Kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.** 273:4915-20.

MARTINVALET, D., ZHU, P., LIBERMAN, J. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. **Immunity.** 22:355-370.

MAY, M.J. AND GOSH, S. 1998. Signal transduction through NF- κ B. **Immunol. Today.** 19:80-88.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P., JANEWAY, C.JR. 1997. A HUMAN HOMOLOGUE OF THE Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature.** 388:394-397.

MEIER, C., PARMANTIER, E., BRENNAN, A., MIRSKI, R. D JESSEN, K.R. 1999. Developing Schwann Cells Acquire the Ability to Survive without Axons by Establishing an Autocrine Circuit Involving Insulin-Like Growth Factor, Neurotrophin-3, and Platelet-Derived Growth Factor-BB. **J. Neurosci.** 19:3847-3859.

MERCURIO, F. AND MANNING, A.M. 1999. Multiple signals converging on NF- κ B. **Curr. Opin. Cell Biol.** 11:226-232.

MERJA, S.N., NINNE, P.E., BUCCI, T. SYROID, D., BARTLETT, P.F., KILPATRICK, T.J. 1999. Nerve Growth Factor Signaling through p75 Induces Apoptosis in Schwann Cells via a Bcl-2-Independent Pathway. **J Neurosc.** 19:4828-4838.

MILLS, S.D., A. BOLAND, M.P., SORY, P. VAN DER SMISSEN, C. DERBOURCH, B.B. FINLAY AND G.R. CORNELIS. 1993. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis in macrophages by a process requiring functional type III secretion and

translocation mechanisms and involving YopP, presumably acting as an effector protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 94:12638-12643.

MIRSKY, R., JESSEN, K.R. 1996. Schwann cell development, differentiation and myelination. **Current Opinion in Neurobiology.** 6:89-96.

MIRSKY, R., JESSEN, K.R. 1999. The Neurobiology of Schwann Cells. In: Symposium: Peripheral Neuropathies. **Brain Pathology.** 9:293-311.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.** 65:55-63.

MUKHERJEE, R. AND ANTIA, N.H. 1985. Intracellular Multiplication of Leprosy-Derived Mycobacteria in Schwann Cells of Dorsal Root Ganglion Cultures. **J. Clin. Microbiol.** 21:808-814.

MULLER, A., J. HACKER AND B.C. BRAND. 1996. Evidence for apoptosis of human macrophage-like HL-60 cells by *Legionella pneumophila* infection. **Infect. Immun.** 64:4900-4906.

NAGATA, S. 1997. Apoptosis by death factor. **Cell.** 88:355-365.

NAUMANN, M. 2000. Nuclear factor- κ B activation and innate immune response in microbial pathogen infection. **Biochem. Pharmacol.** 60:1109-1114.

NG, V., G. ZANAZZI, R. TIMPL, J. TALTS, J.L. SALZER, P.J. BRENNAN AND A. RAMBUKKANA. 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell.** 103:511-529.

OJICIUS, D.M., SOUQUE, R., PERFETTINI, J.L., DAUTRY-VARSAT, A. 1998. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. **J. Immunol.** 161:4220-4226.

OLIVEIRA, R.B., OCHOA, M.T., SIELING, P.A., REA, T.H., RAMBUKKANA, A., SARNO, E.N., MODLIN, R.L. 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. **Infect Immun.** 71: 1427-1433.

OLIVEIRA, R.B., SAMPAIO, E.P., AERESTRUP, F., TELES, R.M., SILVA, T. P., OLIVEIRA, A.L., ANTAS, P.R., SARNO, E.N. 2005. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 64: 882-890.

ORRENIUS, S. 2004. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicology Letters.** 149:19-23.

OZES, O.N., MAYO, L.D., GUSTIN, J.A., PFEFFER, S.R., PFEFFER, L.M., DONNER, D.B. 1999. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Aktserine-threonine kinase. **Nature.** 401:82-85.

PAIK, G. 1980. Reagents, stains and miscellaneous tests producers. *In* Manual of Clinical Microbiology. **Ed. ASM.** Washington, DC. p. 1023.

PEREIRA, R.M., CALEGARI-SILVA, T.C., HERNANDEZ, M.O., SALIBA, A.M., REDNER P., PESSOLANI, M.C.V., SARNO, E.N., SAMPAIO, E.P., LOPES, U.G. 2005. *Mycobacterium leprae* induces NF-kappaB-dependent transcription repression in human Schwann cells. **Biochem. And Biophys. Res. Commun.** 16:335(1):20-26.

PETIT, P.X.,LECOEUR, H., , F., DAUGUET, C., MIGNOTTE, B., GOUGEON, M.L. 1995. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexametasone-induced thymocyte apoptosis. **J. Cell Biol.** 130,157.

RAJALINGAM, K., H. AL-YOUNES, A. MULLER, T.F. MEYER, A.J. SZCZEPEK AND T. RUDEL. 2001. Epithelial cells infected with *Chlamydomphila pneumoniae*

(*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. **Infect. Immun.** 69:7880-7888.

RAMBUKKANA, A. 2000. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system. **Trends Microbiol.** 8:23-28.

RAMBUKKANA, A., H. YAMADA, G. ZANAZZI, T. MATHUS, J. L. SALZER, P. D. YURCHENCO, K. P. CAMPEBELL & V. A. FISCHETTI.1998. Role of a-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. **Science.** 282:2076-2081.

RAMBUKKANA, A., J.L. SALZER, P.D. YURCHENCO & E.I. TUOMANEN. 1997. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the lamin- α 2 chain. **Cell.** 88:811-821.

RAMBUKKANA, A., ZANAZZI, G., TAPINOS, N., SALZER, J.L. 2002. Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. **Science.** 296:927-931.

RECHLER, M.M. AND CLEMMONS, D.R. 1998. Regulatory Actions of Insulin-Like Growth Factor-binding Proteins. **TEM.** 9:176-183.

REMANCLE-BONNET, M.M., GARROUSTE, F.L., HELLER, S., ANDRE, F., MARVALDI, J.L., PROMMIER,G.J. 2000. Insulin-like growth factor_I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis alpha-induced mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB signaling pathways. **Cancer Res.** 60:2007-2017.

RIDLEY, D.S., AND W.H. JOPLING. 1966. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 34:255-273.

ROMASHKOVA, J.A. AND MAKAROV, S.S. 1999. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. **Nature.** 401:86-90

ROSEN, C.J. AND POLLAK, M. 1999. Circulating IGF-I: New Perspectives for a New Century. **TEM.** 10:136-141.

RUSSEL, J.W., CHENG, H.L., GOLOVOY, D. 2000. Insuline-Like Growth Factor-I Promotes Myelination of Peripheral Sensory Axons. **J. Neuropath** 59(7)575-584.

SARNO, E.N., GRAU, G.E., VIEIRA, L.M.M., NERY, J.A. 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 β during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.** 84:103-108.

SCHLESINGER, L.S. AND HORWITZ, M.A. 1991. Phenolic Glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* binds complement C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. **J. Exp. Med.** 174:1031-1038.

SHEPARD, C.C. 1960. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into footpads of mice. **J. Exp. Med.** 112:445-454.

SHEPARD, C.C. AND MacRAE, D.H. 1968. A method for coating acid-fast bacteria. **Int. J. Lep.** 36:78-82.

SHIMOJI, Y., V. NG, K. MATSUMURA, V. A. FISCHETTI & A. RAMBUKKANA. 1999. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96:9857-9862.

SHOU, Y., LI, N., BOROWITZ, J.L., ISOM, G.E. 2002. NF- κ B-mediated up-regulation of Bcl-XS and Bax contributes to cytochrome c release in cyanide-induced apoptosis. **J. Neurochem.** 81:842-852.

SHU-LIAN LI, JUN KATO, I. BENJAMIN PAZ, JUNKO KASUYA AND YOKO FUJITA-YAMAGUCHI. 1993. Two new monoclonal antibodies against the α

subunit of the human Insulin-Like Growth Factor-I Receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 196:92-98.

SYROID, D.E., ZORICK, T.S., ALBERT-ENGELS, C., KILPATRICK, T.J., ECKHART, W., LEMKE, G. 1999. A Role for Insuline-Like Growth Factor-I in the Regulaton of Schwann Cell Survival. **J. Neurosci.** 19:2059-2068.

TAPINOS, N. & RAMBUKKANA, A. 2005. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. **PNAS.** 102:9188-9193.

TEMPONE A.J., ESQUENAZI, D., SILVA, T. P., ILLARRAMENDI, X., NERY, J.A.C., BOIÇA, S., MONTEIRO, A.M.V., BOASQUEVISQUE, E.M., SILVA, F.C., PEREIRA, G.M.B., SARNO, E.N., BRENNAN, P.J., PESSOLANI, M.C.V. 2005. Down modulation of PHEX expression by *Mycobacterium leprae*: a possible link with leprosy bone lesions. **In Press**

TRUMAN, R.W. AND J.L. KRAHENBUHL. 2001. Viable *M. leprae* as a research reagent. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.** 69:1-12.

VALENTE, E., ASSIS, M.C., ALVIM, I.M.P., PEREIRA, G.M.B., PLOTKOWSKI, M.C. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in human endothelial cells. **Microbiol. Pathogen.** 29:345-356.

VAN BRAKEL, W.H. AND KHAWAS I.B. 1994. Nerves damage in leprosy: an epidemiological and clinical study of 396 patients in West Nepal – part 1. Definitions, methods and frequencies. **Lepr Rev.** 65:204-221.

VENTERS, H.D., DANTZER, R., KELLY, K.W. 2000. A New Concept in Neurodegeneration: TNF- α is a Silencer of Survival Signals. **T. Neurosci.** 23:175-180.

VERGNE, I., CHUA, J., DERETIC, V. 2003. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca^{2+} /calmodulin-PI 3-K hVPS34 cascade. **J. Exp. Med.** 4:653-659.

VERMES, I., HAANEN, C., REUTELINGSPERGER. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. **J. Immunol. Meth.** 243:167-190.

VISSA, V.D. & BRENNANN, P.J. 2001. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterium gene set. **Genome Biology.** 2: 1023-1028.

VISSA, V.D. & BRENNANN, P.J. 2002. Impact of the *Mycobacterium leprae* genome sequence on leprosy research. Genomics of G-C Rich Gram-positive Bacteria. p. 85-117. **Caister Academic Press, Wymondham, U.K.**

WAGNER, R. AND MYERS, R.R. 1996. Schwann cells produce Tumor Necrosis Factor Alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neuroscience.** 73(3): 625-629.

WALLACH, D., VARFOLOMEEV, E.E., MALININ, N.L., GOLTSEV, Y.V., KAVALENKO, A.V., BOLDIN, M.P. 1999. Tumor necrosis factor and Fas signaling mechanism. **Annu. Rev. Immunol.** 17:331-367.

WARD,C., CHILVERS, E.R., LAWSON, M.F., PRYDE, J.G., FUJIHARA, S., FARROW,S.N., HASLETT, C. AND ROSSI, A. G. 1999. NF- κ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis *in vitro*. **J. Biol. Chem.** 274:4309-4318.

WHO, 1987. Laboratory Techniques for Leprosy. p. 62

WHO, 1999. Action Programme for the Elimination of Leprosy. Current global situation of leprosy. **Weekly Epidemiol. Rec.** 74:313-320.

WHO, 2000. Global leprosy Situation. **Weekly Epidemiol. Rec.** Genova, Suíça. 75:225-232.

WHO. 1998. Expert Committee on Leprosy. Seventh report. World Health Organization, Geneve.1-43.

WHU, Y., TEWARI, M., CUI, S., RUBIN, R. 1996. Activation of the insulin-like growth factor-I receptor inhibitstumor necrosis factor-induced cell death. **J. Cell. Physiol.** 168:499-509.

WILSON, M., MCNAB, R. AND HENDERSON, B. 2002. Bacterial Disease mechanisms. An introduction to cellular microbiology. **In Cambridge University Press.** p. 563-574.

WOLF, B.B. AND GREEN, D.R. 1999. Suicidal tendencies apoptotic cell death by caspase family proteinase. **J. Biol. Chem.** 274:20049.

Endereços da internet apresentados nesta dissertação:

<http://svm369.vetmed.lsu.edu/LADAMS2.htm>

www.bioagency.com.br

www.who.int

8. ANEXO

Tabelas de dados de experimentos representados como gráficos nas figuras

Figura 4.4: Curva de sobrevivência de células ST88-14 após remoção de SFB

- Ensaio de Redução enzimática de MTT - D.O. 590nm

	Condição	1	2	3	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	0,340	0,376	0,323	0,346	0,02706
24h	Sem Soro	0,2	0,235	0,25	0,228	0,02566
48h	Sem Soro	0,147	0,155	0,14	0,147	0,00751

- Ensaio de Redução enzimática de MTT – Percentual de Sobrevivência

	Condição	1	2	3	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	100	100	100	100	0
24h	Sem Soro	58	68	72	66	7,2111
48h	Sem Soro	42	45	40	42	2,51661

Figura 4.5: Efeito do *M. leprae* na morte celular induzida por carência de soro em CS humanas ST88-14

- Ensaio de Redução enzimática de MTT - D.O. 590nm

	Condição	1	2	3	Média	Desvio Padrão
--	----------	---	---	---	-------	---------------

0h	10% SFB	0,447	0,446	0,438	0,443	0,00493
24h	Sem Soro	0,268	0,25	0,26	0,259	0,00902
	<i>M. leprae</i> 5:1	0,546	0,515	0,514	0,525	0,01819
48h	Sem Soro	0,165	0,176	0,188	0,186	0,0115
	<i>M. leprae</i> 5:1	0,305	0,283	0,33	0,306	0,02352

□ Ensaio de Redução enzimática de MTT – Percentual de Sobrevivência

	Condição	1	2	3	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	100	100	98	99	1,1547
24h	Sem Soro	60	56	58	58	2
	<i>M. leprae</i> 5:1	123	116	116	118,3	4,04145
48h	Sem Soro	37	39	42	41,6	2,51661
	<i>M. leprae</i> 5:1	69	64	74	69	5

Figura 4.6: Efeito protetor do *M. leprae* em células de Schwann privadas de soro

□ Ensaio de Viabilidade por Azul de Tripán

Experimento 01:

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	26100	26500	26300	282,84271
24h	Sem Soro	24400	23600	24000	565,68542
	<i>M. leprae</i> 10:1	25800	24800	25300	707,10678
48h	Sem Soro	21400	19800	20600	1131,37085
	<i>M. leprae</i> 10:1	25400	26000	25700	424,26407

Células Mortas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	1300	1400	1350	70,71068
24h	Sem Soro	8200	8600	8400	282,84271
	<i>M. leprae</i> 10:1	5400	6800	6100	989,94949
48h	Sem Soro	11400	14600	13000	2262,7417
	<i>M. leprae</i> 10:1	13800	12200	13000	1131,37085

%	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
---	----------	---	---	-------	---------------

Sobrevivência					
0h	10% SFB	100	100	100	0
24h	Sem Soro	93,5	89	91,2	3,18198
	<i>M. leprae</i> 10:1	98,8	93,6	96,2	3,67696
48h	Sem Soro	82	74,7	78,4	5,16188
	<i>M. leprae</i> 10:1	97,3	98,1	97,7	0,56569

Experimento 02:

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	32500	34000	33250	1060,66017
24h	Sem Soro	28750	28900	28825	106,06602
	<i>M. leprae</i> 10:1	27980	27800	27890	127,27922
48h	Sem Soro	17000	18500	17750	1060,66017
	<i>M. leprae</i> 10:1	25900	26800	26350	636,3961

Células Mortas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	850	1100	975	176,7767
24h	Sem Soro	6000	7500	6750	1060,66017
	<i>M. leprae</i> 10:1	5680	6100	5890	296,98485
48h	Sem Soro	16000	15000	15500	707,10678
	<i>M. leprae</i> 10:1	8500	7350	7925	813,1728

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	10% SFB	100	100	100	0
24h	Sem Soro	86,4	86,9	86,6	0,35355
	<i>M. leprae</i> 10:1	84,1	83,6	83,8	0,35355
48h	Sem Soro	51,1	55,6	53,3	3,18198
	<i>M. leprae</i> 10:1	77,8	80,6	79,2	1,9799

Experimento 03:

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	31000	29000	30000	1414,21356
24h	Sem SFB	27650	28200	27925	388,90873
	<i>M. leprae</i> 10:1	28754	29100	28927	244,65895
48h	Sem SFB	18200	21500	19850	2333,45238

	<i>M. leprae</i> 10:1	23400	25500	24450	1484,92424
--	-----------------------	-------	-------	-------	------------

Células Mortas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	850	980	915	91,92388
24h	Sem SFB	5980	6900	6440	650,53824
	<i>M. leprae</i> 10:1	5400	5740	5570	240,41631
48h	Sem SFB	15500	17000	16250	1060,66017
	<i>M. leprae</i> 10:1	9100	8400	8750	494,97475

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
24h	Sem SFB	92,1	94	93	1,3435
	<i>M. leprae</i> 10:1	95,8	97	96,4	0,84853
48h	Sem SFB	60,6	71,6	66,1	7,77817
	<i>M. leprae</i> 10:1	78	85	81,5	4,94975

Figura 4.7: O efeito anti-apoptótico do *M. leprae* na célula de Schwann é dose-dependente

□ Ensaio de Viabilidade por Azul de Tripán

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	24000	18800	21400	3676,95526
24h	Sem SFB	28600	21400	25000	5091,16882
	<i>M. leprae</i> 1:1	31000	27000	29000	2828,42712
	<i>M. leprae</i> 10:1	30800	30800	30800	0
	<i>M. leprae</i> 50:1	30200	27200	28700	2121,32034
48h	Sem SFB	7200	4200	5700	2121,32034
	<i>M. leprae</i> 1:1	10000	13400	11700	2404,16306
	<i>M. leprae</i> 10:1	19200	20600	19900	989,94949
	<i>M. leprae</i> 50:1	26400	25300	25850	777,81746

Células Mortas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	1200	400	800	565,68542
24h	Sem SFB	5200	6000	5200	565,68542
	<i>M. leprae</i> 1:1	4400	5000	4400	424,26407

	<i>M. leprae</i> 10:1	3800	3200	3800	424,26407
	<i>M. leprae</i> 50:1	1800	2600	1800	565,68542
48h	Sem SFB	23600	23000	23300	424,26407
	<i>M. leprae</i> 1:1	11200	16000	13600	3394,11255
	<i>M. leprae</i> 10:1	7600	11000	9300	2404,16306
	<i>M. leprae</i> 50:1	9200	9600	9400	282,84271

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
24h	Sem SFB	100	133,6	116,8	23,75879
	<i>M. leprae</i> 1:1	145	126	135,5	13,43503
	<i>M. leprae</i> 10:1	144	143,9	143,9	0,07071
	<i>M. leprae</i> 50:1	141	127	134	9,89949
48h	Sem SFB	33,6	19,6	26,6	9,89949
	<i>M. leprae</i> 1:1	62,6	46,7	54,6	11,243
	<i>M. leprae</i> 10:1	96,3	89,7	93	4,6669
	<i>M. leprae</i> 50:1	123,4	118	120,7	3,81838

Figura 4.8: Morfologia em microscopia de fluorescência de células de Schwann incubadas com *M. leprae* e privadas de soro

□ Ensaio de Viabilidade por Azul de Tripán

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	31000	32000	31500	707,10678
24h	Sem SFB	26000	21000	23500	3535,53391
	<i>M. leprae</i> 50:1	28000	29000	28500	707,10678
48h	Sem SFB	8300	12100	10200	2687,00577
	<i>M. leprae</i> 50:1	28000	30000	29000	1414,21356

Células Mortas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	800	600	700	141,42136
24h	Sem SFB	3000	6000	4500	2121,32034
	<i>M. leprae</i> 50:1	1500	1000	1250	353,55339
48h	Sem SFB	23000	17000	20000	4242,64069

	<i>M. leprae</i> 50:1	5000	6000	5500	707,10678
--	-----------------------	------	------	------	-----------

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
24h	Sem SFB	82,5	66,6	74,5	11,243
	<i>M. leprae</i> 50:1	88,8	92	90,4	2,26274
48h	Sem SFB	26,3	38,4	32,3	8,55599
	<i>M. leprae</i> 50:1	88,8	95,2	92	4,52548

Figura 4.13: Efeito anti-apoptótico induzido por meio condicionado de culturas de CS incubadas com *M. leprae*

- Ensaio de Viabilidade por Azul de Tripán

Figura 4.13A:

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	29000	28000	28500	707,10678
24h	Sem SFB	27000	28000	27500	707,10678
	<i>M. leprae</i> 50:1	28000	25000	26500	2121,32034
48h	Sem SFB	14000	16000	15000	1414,21356
	<i>M. leprae</i> 50:1	23000	21000	22000	1414,21356

Figura 4.13B:

Células Vivas	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	29000	28000	28500	707,10678
MC 24h	Sem SFB	15000	12000	13500	2121,32034
	<i>M. leprae</i> 50:1	29000	29000	29000	0
MC 48h	Sem SFB	17000	14000	15500	2121,32034
	<i>M. leprae</i> 50:1	20000	16000	18000	2828,42712

Figura 4.16: IGF-I previne a morte de CS mantidas em meio sem soro

□ Ensaio de Viabilidade por Azul de Tripán

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
24h	Sem SFB	95	88	91,5	4,94975
	5ng/mL de IGF-I	92	104	98	8,48528
	10ng/mL de IGF-I	117	139	128	15,55635
	20ng/mL de IGF-I	120	120	120	0
48h	Sem SFB	30	32	31	1,41421
	5ng/mL de IGF-I	82	69	75,5	9,19239
	10ng/mL de IGF-I	98	104	101	4,24264
	20ng/mL de IGF-I	132	152	142	14,14214

Figura 4.17: O efeito anti-apoptótico do *M. leprae* sobre as CS é bloqueado por inibidores de NF- κ B.

□ Ensaio de Viabilidade por Azul de Tripán)

Experimento 01:

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
48h	Sem SFB	57	64	60,5	4,94975
	DMSO	56	60	58	2,82843
	Talidomida	60	50	55	7,07107
	<i>M. leprae</i>	95	73	84	15,55635
	<i>M. leprae</i> + DMSO	69	82	75,5	9,19239
	<i>M. leprae</i> + Talidomida	53	60	56,5	4,94975
	DMSO	48	37	42,5	7,77817

	Gliotoxina	44	47	45,5	2,12132
	<i>M. leprae</i> + Gliotoxina	57	47	52	7,07107
	SN50m	55	57	56	1,41421
	SN50	53	50	51,5	2,12132
	<i>M. leprae</i> + SN50m	89	73	81	11,31371
	<i>M. leprae</i> + SN50	63	46	54,5	12,02082

Experimento 02:

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
48h	Sem SFB	53	50	51,5	2,12132
	DMSO	49	50	49,5	0,70711
	Talidomida	46	50	48	2,82843
	M. leprae	83	80	81,5	2,12132
	<i>M. leprae</i> + DMSO	69	82	75,5	9,19239
	<i>M. leprae</i> + Talidomida	49	50	49,5	0,70711
	DMSO	56	60	58	2,82843
	Gliotoxina	43	47	45	2,82843
	<i>M. leprae</i> + Gliotoxina	33	43	38	7,07107
	SN50m	57	50	53,5	4,94975
	SN50	64	63	63,5	0,70711
	<i>M. leprae</i> + SN50m	85	79	82	4,24264
	<i>M. leprae</i> + SN50	57	60	58,5	2,12132

Experimento 03:

% Sobrevivência	Condição	1	2	Média	Desvio Padrão
0h	SFB	100	100	100	0
48h	Sem SFB	70	58	64	8,48528
	DMSO	60	63	61,5	2,12132
	Talidomida	65	68	66,5	2,12132
	M. leprae	86	88	87	1,41421
	<i>M. leprae</i> + DMSO	83	86	84,5	2,12132
	<i>M. leprae</i> + Talidomida	45	68	56,5	16,26346
	DMSO	60	63	61,5	2,12132
	Gliotoxina	53	70	61,5	12,02082
	<i>M. leprae</i> + Gliotoxina	50	53	51,5	2,12132

SN50m	55	57	56	1,41421
SN50	53	50	51,5	2,12132
<i>M. leprae</i> + SN50m	89	73	81	11,31371
<i>M. leprae</i> + SN50	63	46	54,5	12,02082