

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Laboratório de Microbiologia Celular

**Análise da produção do Fator de Crescimento  
Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e seu efeito na  
geração de óxido nítrico em macrófagos  
estimulados com micobactérias**

Mestrado em Biologia Celular e Molecular – IOC – FIOCRUZ

Aluno: Leonardo Ribeiro Batista Silva  
Orientadora: Dra Maria Cristina Vidal Pessolani

Outubro 2009

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar me guardando e me ajudando a caminhar e seguir sempre em frente, pois o homem sem Deus não é absolutamente nada;

A Dra Maria Cristina Vidal Pessolani, por sempre acreditar no meu trabalho, por toda sua paciência e dedicação. Por me ensinar ciência e que ela deve ser feita com responsabilidade e honestidade sempre, além disso, por me ensinar a ser uma pessoa mais responsável, sendo um grande exemplo de profissionalismo a ser seguido;

À Luciana, que possibilitou a realização desse trabalho, sempre me incentivando e contribuindo intelectualmente para o seu desenvolvimento;

À Dra Katherine e Dr. Flavio Lara, que sempre esteve disposta a esclarecer minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso;

Aos meus grandíssimos amigos Julio e Carlos Adriano, que sempre me apoiaram com sua grande amizade e com seus conhecimentos, me ajudando diariamente desde a iniciação científica. (Obrigado meu amigos);

A todos meus colegas de laboratório pelo convívio alegre e pelo companheirismo: André (me ajudando sempre), Vitor (sempre tirando dúvidas pertinentes), Michele (pela amizade e descontração), Darlan (grande amigo), Lívia, Roberta, Viviane, Fernanda. (todos fazem parte da minha história);

À todos meus colegas da Hanseníase pelo apoio: Dr. Harrison, Dr. Milton Moraes, Dra. Euzenir Marjorie, Sidra, Rafael, Amanda, Luana, Alejandra, Cíntia, Chyntia Carolina, Lizânia, Valcemir, Solange, Paulo, Mara, Sr. Sales, Dr. Sergio, Ana Carolina, Jô, Danuza, Daniel, Sr. Roberto, Dr. Adalberto;

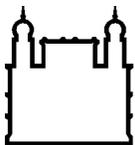
À Dra Maria das Graças Henriques pela revisão do meu trabalho;

Aos professores do curso de Pós-Graduação pelas excelentes aulas ministradas e pelo aprendizado;

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e funcionários do departamento de ensino;

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fundação Oswaldo Cruz pelo financiamento do projeto;

À minha Mãe, Antônia, que sempre me apoiou e incentivou para que eu prosseguisse meus estudos "tudo isso só foi possível graças a você mãe". Ao meu pai, Moab, que sempre esteve presente me ajudando e me dando suporte, e a minha querida irmãzinha Larissa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Leonardo Ribeiro Batista Silva*

**Análise da produção do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e seu efeito na produção de óxido nítrico em macrófagos tratados com micobactérias**

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

**Orientador (a):** Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Cristina Vidal Pessolani

**RIO DE JANEIRO**  
**Outubro 2009**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar me guardando e me ajudando a caminhar e seguir sempre em frente, pois o homem sem Deus não é absolutamente nada;

A Dra Maria Cristina Vidal Pessolani, por sempre acreditar no meu trabalho, por toda sua paciência e dedicação. Por me ensinar ciência e que ela deve ser feita com responsabilidade e honestidade sempre, além disso, por me ensinar a ser uma pessoa mais responsável, sendo um grande exemplo de profissionalismo a ser seguido;

À Luciana, que possibilitou a realização desse trabalho, sempre me incentivando e contribuindo intelectualmente para o seu desenvolvimento;

À Dra Katherine e Dr. Flavio Lara, que sempre esteve disposta a esclarecer minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso;

Aos meu grandíssimos amigos Julio e Carlos Adriano, que sempre me apoiaram com sua grande amizade e com seus conhecimentos, me ajudando diariamente desde a iniciação científica. (Obrigado meu amigos);

A todos meus colegas de laboratório pelo convívio alegre e pelo companheirismo: André (me ajudando sempre), Vitor (sempre tirando dúvidas pertinentes), Michele (pela amizade e descontração), Darlan (grande amigo), Lívia, Roberta, Viviane, Fernanda. (todos fazem parte da minha história);

À todos meus colegas da Hanseníase pelo apoio: Dr. Harrison, Dr. Milton Moraes, Dra. Euzenir Marjorie, Sidra, Rafael, Amanda, Luana, Alejandra, Cíntia, Chyntia Carolina, Lizânia, Valcemir, Solange, Paulo, Mara, Sr. Sales, Dr. Sergio, Ana Carolina, Jô, Danuza, Daniel, Sr. Roberto, Dr. Adalberto;

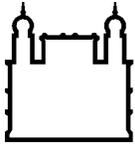
À Dra Maria das Graças Henriques pela revisão do meu trabalho;

Aos professores do curso de Pós-Graduação pelas excelentes aulas ministradas e pelo aprendizado;

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e funcionários do departamento de ensino;

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fundação Oswaldo Cruz pelo financiamento do projeto;

À minha Mãe, Antônia, que sempre me apoiou e incentivou para que eu prosseguisse meus estudos "tudo isso só foi possível graças a você mãe". Ao meu pai, Moab, que sempre esteve presente me ajudando e me dando suporte, e a minha querida irmãzinha Larissa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Leonardo Ribeiro Batista Silva*

**Análise da expressão do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I (IGF-I) e seu efeito na produção de óxido nítrico em macrófagos estimulados com micobactérias**

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

**Orientador (a):** Prof. Dra Maria Cristina Vidal Pessolani

**RIO DE JANEIRO**  
**Outubro 2009**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre estar me guardando e me ajudando a caminhar e seguir sempre em frente, pois o homem sem Deus não é absolutamente nada;

A Dra Maria Cristina Vidal Pessolani, por sempre acreditar no meu trabalho, por toda sua paciência e dedicação. Por me ensinar ciência e que ela deve ser feita com responsabilidade e honestidade sempre, além disso, por me ensinar a ser uma pessoa mais responsável, sendo um grande exemplo de profissionalismo a ser seguido;

À Luciana, que possibilitou a realização desse trabalho, sempre me incentivando e contribuindo intelectualmente para o seu desenvolvimento;

À Dra Katherine e Dr. Flavio Lara, que sempre esteve disposta a esclarecer minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso;

Aos meu grandíssimos amigos Julio e Carlos Adriano, que sempre me apoiaram com sua grande amizade e com seus conhecimentos, me ajudando diariamente desde a iniciação científica. (Obrigado meu amigos);

A todos meus colegas de laboratório pelo convívio alegre e pelo companheirismo: André (me ajudando sempre), Vitor (sempre tirando dúvidas pertinentes), Michele (pela amizade e descontração), Darlan (grande amigo), Lívia, Roberta, Viviane, Fernanda. (todos fazem parte da minha história);

À todos meus colegas da Hanseníase pelo apoio: Dr. Harrison, Dr. Milton Moraes, Dra. Euzenir Marjorie, Sidra, Rafael, Amanda, Luana, Alejandra, Cíntia, Chyntia Carolina, Lizânia, Valcemir, Solange, Paulo, Mara, Sr. Sales, Dr. Sergio, Ana Carolina, Jô, Danuza, Daniel, Sr. Roberto, Dr. Adalberto;

À Dra Maria das Graças Henriques pela revisão do meu trabalho;

Aos professores do curso de Pós-Graduação pelas excelentes aulas ministradas e pelo aprendizado;

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e funcionários do departamento de ensino;

Ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fundação Oswaldo Cruz pelo financiamento do projeto;

À minha Mãe, Antônia, que sempre me apoiou e incentivou para que eu prosseguisse meus estudos "tudo isso só foi possível graças a você mãe". Ao meu pai, Moab, que sempre esteve presente me ajudando e me dando suporte, e a minha querida irmãzinha Larissa.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BB	boderline boderline
BL	boderline lepromatoso
BSA	albumina de soro bovino
BT	boderline tuberculóide
cDNA	ácido desoxirribonucléico
COX	ciclooxigenase
DIC	contraste de interferência diferencial
D.O.	dendisade ótica
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato(N=A, C, G ou T)
EDTA	ácido etilenodioaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	glicosil 3` fosfato desidrogenase
HEPES	N-2-Hidroxietilpiperazina-N`-2-ácido etanosulfônico
IGF	fator de crescimento semelhante a insulina
IGFBP	proteína ligante a IGF
IGF-IR	receptor de IGF-I
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
KDa	KiloDalton
LAM	lipoarabinomanana
LL	lepra lepromatosa
LPS	lipopolissacarídeo
MB	multibacilar
MDT	multidrogaterapia
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MOI	multiplicidade de infecção

MS	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MTT	sal Metiltetrazóico
NO	óxido nítrico
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	paucibacilar
PBS	tampão salina fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
PGL-I	glicolípídeo fenólico I
PI 3-K	fosfatidilinositol 3 quinase
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões
q.s.p	quantidade suficiente para
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNI	reativos intermediários de nitrogênio
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
TBS	tampão tris-salina com tween
TEMED	N` tetra metil etileno diamina
TLR	receptores do tipo Toll
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
Tris	trishidroximetil aminometano
V	Volts
x g	velocidade de sedimentação em unidade gravitacional

## ABSTRACT

Mononuclear phagocytes are target cells for pathogenic mycobacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. These bacteria are able to subvert macrophage microbicidal mechanisms and survive and replicate within these cells. However, the molecular mechanisms involved in this deactivation remain incompletely understood. We have previously described that *M. leprae* induces the expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) – an hormone with anti- apoptotic and proliferation activities– in human Schwann cells. Recently it has been reported that IGF-I can inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and consequently nitric oxide (NO) production in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. Based on these data, we have investigated the potential involvement of IGF-I on macrophage deactivation observed during mycobacterial infection. For this purpose, RAW 264.7 murine macrophages were treated or not with *M. leprae* and the expression of IGF-I was monitored by quantitative RT-PCR and specific sandwich ELISA. Two other species of mycobacteria, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*, respectively, an attenuated strain of *M. bovis* and a nonpathogenic mycobacterium, were tested for comparison. *M. leprae* or BCG treatment, in contrast to *M. smegmatis*, positively regulated the expression of IGF-I by RAW cells when compared with control cultures. Furthermore, we also investigated the effect of IGF-I on mycobacterium-induced iNOS expression and NO production in RAW 264.7 macrophages. NO production was evaluated by determination of nitrite concentration in the culture media using the Griess reagent and iNOS expression was monitored by Western Blot. *M. leprae* was a weak stimulus for iNOS induction. In contrast, BCG and *M. smegmatis* induced iNOS expression and, as a consequence, significant levels of NO production in RAW macrophages. Interestingly, IGF-I pre-treated cells showed a significant reduction in nitrite production after infection with mycobacteria that correlated with the down regulation of iNOS expression. Moreover, IGF-I was able to partially reduce NO production induced by recombinant interferon-gamma. Taken together, these results suggest that IGF-I may contribute to mycobacterium persistent in the host by down modulating host innate response during infection.

## RESUMO

Fagócitos mononucleares são células alvo para micobactérias patogênicas como *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Essas micobactérias têm a capacidade de modular os mecanismos microbicidas dos macrófagos, sobreviver e replicar nessas células. Contudo o mecanismo molecular envolvido nesta desativação não é totalmente compreendido. Dados do nosso laboratório têm demonstrado que o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão do fator de crescimento semelhante a insulina I um hormônio com efeito anti-apoptótico e com atividade de proliferação – em Células de Schwann humanas. Recentemente, foi relatado que IGF-I é capaz de inibir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e conseqüentemente a produção de óxido nítrico em macrófagos induzido por *Leshimania amazonensis*. Baseado nestes dados, nós temos investigado o envolvimento do IGF-I na desativação dos macrófagos observada na infecção micobacteriana. Com este propósito, macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram estimulados ou não com *M. leprae* e a expressão de IGF-I foi monitorada através de RT-PCR quantitativo e ensaio imunoenzimático específico, ELISA. Duas outras espécies de micobactérias, *M. bovis* BCG e *M. smegmatis*, respectivamente, uma cepa atenuada de *M. bovis* e uma micobactéria não-patogênica, foram testadas para comparação. O estímulo com *M. leprae* ou BCG, em contraste com *M. smegmatis*, regulou positivamente a expressão de RNAm para IGF-I e aumento significativamente os níveis da proteína quando comparado com a cultura controle. Além disso, nós também investigamos o efeito do IGF-I na produção de NO e na expressão de iNOS induzida por micobactérias em macrófagos RAW 264.7. A produção de NO foi monitorada pela determinação da concentração de nitrito no sobrenadante em meio de cultura, utilizando reagente de Griess e a expressão de iNOS monitorada por Western Blot. *M. leprae* foi um fraco estímulo para indução de iNOS. Em contraste, BCG e *M. smegmatis* induziram a expressão e, como conseqüência, uma significativa produção de NO em macrófagos RAW. Interessantemente, células pré-tratadas com IGF-I mostraram uma significativa redução na produção de nitrito após a estímulo com micobactérias, o que correlacionou com uma regulação negativa da expressão de iNOS. Além disso, IGF-I foi capaz de reduzir parcialmente a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$  recombinante. Esses resultados sugerem que o IGF-I pode contribuir para a persistência micobacteriana no hospedeiro, modulando negativamente a resposta imune inata durante a infecção.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
ABSTRACT	vi
RESUMO	vii
SUMÁRIO	viii

### 1. INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase.....	01
1.2 O Gênero <i>Mycobacterium</i> .....	04
1.3 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	07
1.4 Fagócitos Mononucleares.....	08
1.5 Interação <i>M. leprae</i> com o Macrófago.....	10
1.6 Fator de Crescimento semelhante à Insulina I (IGF-1).....	13
1.7 Hipótese do trabalho.....	16

### 2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivo específico.....	17

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1 Obtenção e manutenção de macrófagos .....	18
3.2. Micobactérias.....	19
3.2.1. Obtenção de <i>Mycobacterium leprae</i> .....	19
3.2.2. Obtenção de <i>Mycobacterium bovis</i> BCG e <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	20
3.3. Marcação do <i>M. leprae</i> com Isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	21
3.4. Avaliação da morfologia celular e grau de associação do <i>M. leprae</i> aos macrófagos RAW 264.7.....	21
3.5. Avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal Metiltetrazólio(MTT).....	22
3.6. Isolamento de RNA total.....	22
3.7. Tratamento co DNase e síntese de cDNA.....	23
3.8. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	24
3.9. Obtenção de lisado total de macrófagos murino RAW 264.7.....	24

3.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) .....	25
3.11. “Western Blot” .....	25
3. 12. Dosagem de IGF-I.....	26
3.13. Dosagem de Nitrito.....	27
3.14. Dosagem de PGE <sub>2</sub> .....	27
3.15. Análise gráfica e estatística.....	28

#### **4. RESULTADOS**

4.1. Análise morfológica e grau da associação na interação de micobactérias com macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.....	29
4.2. <i>M. leprae</i> e BCG, mas não <i>M. smegmatis</i> induzem a produção de IGF-I em macrófagos RAW 264.7.....	31
4.3. Análise da produção de NO e expressão da enzima iNOS por macrófagos RAW 264.7 tratados com <i>M. leprae</i> , BCG e <i>M. smegmatis</i> .....	34
4.4. O pré-tratamento de macrófagos RAW 264.7 com IGF-I inibe a produção de NO e a indução da enzima iNOS em resposta às micobactérias.....	39
4.5. Análise do efeito do IGF-I sobre a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW.....	43
4.6. Análise do efeito de IGF-I na produção de NO em macrófagos murino primários tratados com <i>M. leprae</i> .....	44
4.7. Macrófagos RAW 264.7 tratados com <i>M.leprae</i> ou IGF-I induzem um aumento na produção de prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ).....	45

<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	46
---------------------------	----

<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	56
----------------------------	----

<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	57
------------------------------	----

<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	59
------------------------------	----



## 2-OBJETIVOS

### 2.1-Objetivo Geral

Estudar o papel do IGF-I na desativação funcional induzida pelo *Mycobacterium leprae* em macrófagos

### 2.2-Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente a interação de *M. leprae*, BCG e *M. smegmatis* com macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7
- Verificar se o *M. leprae* induz o aumento da expressão de RNAm IGF-I e da proteína em macrófagos murinos.
- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com *M. leprae*, BCG e *M. smegmatis* na presença e ausência de IGF-I.
- Avaliar a expressão da enzima iNOS em macrófagos estimulados com *M. leprae*, BCG e *M. smegmatis* na presença e ausência de IGF-I
- Investigar o efeito do IGF-I sobre a produção de óxido nítrico e expressão de iNOS induzida por IFN- $\gamma$  em macrófagos.
- Avaliar a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos estimulados com *M. leprae*, BCG e *M. smegmatis* na presença ou ausência de IGF-I.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção e Manutenção de Macrófagos**

Neste estudo foram utilizados macrófagos de camundongos de duas diferentes origens: i) linhagem RAW 264.7 e ii) macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6.

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foi obtida através da ATCC (American Tissue Collection) e gentilmente doada pelo Dr. Neil Reiner da University of British Columbia, BC, Canadá. Esta linhagem é estocada em alíquotas, no nitrogênio líquido, em solução contendo 10% de DMSO (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) e 90% soro fetal bovino (CULTILAB, Campinas, SP, Brasil). Para o início do cultivo, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, ressuspensas em 5 mL de meio RPMI 1640 comercial (LGC Biotecnologia, SP, Brasil) e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 nM de HEPES, 100 U/mL de Penicilina, 100 U/mL estreptomicina (Invitrogen, Rockville, MD, EUA), 1 mM Glutamax (LGC Biotecnologia), pH 7.4. As células foram centrifugadas a 500 x g por 10 min para retirada do DMSO e ressuspensas novamente em meio RPMI completo. As células foram mantidas em garrafas de cultura (NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca) de 25 cm<sup>2</sup>, à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos, a monocamada celular era lavada com PBS (Invitrogen) por duas vezes e as células removidas da garrafa de cultura com o auxílio de um “scraper”, em meio RPMI completo. A suspensão celular era contada em câmara de Neubauer e, aproximadamente, 4x10<sup>5</sup>, 8x10<sup>5</sup> ou 2x10<sup>6</sup> células eram transferidas para placa de cultura (Corning Life Sciences, NY, EUA) de 24, 12 ou 6 poços, respectivamente.

Macrófagos primários foram obtidos através da coleta de lavado peritoneal de camundongos isogênicos C57Bl/6, gentilmente doados pela Dr<sup>a</sup> Patrícia Bozza do Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz, (FIOCRUZ). A suspensão de células obtida do lavado peritoneal foi centrifugada a 500 x g por 10

min, a 4°C. O sobrenadante obtido foi descartado e as células ressuspensas e lavadas com PBS por duas vezes. Os macrófagos obtidos foram submetidos à contagem em câmara de Neubauer, e  $2,5 \times 10^4$  células por poço foram cultivados em placas de cultura de 12 poços incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por duas horas para permitir a adesão das células aos poços. Em seguida, o sobrenadante foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS com cálcio e cultivadas em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino à temperatura de 37°C e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>.

## **3.2 Micobactérias**

### **3.2.1 Obtenção de *Mycobacterium leprae***

Foram utilizadas duas diferentes fontes de *M. leprae* letalmente irradiados no presente estudo:

1) *M. leprae* proveniente de tecidos infectados de tatus, doado pelo Dr. Patrick 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). Resumidamente, esta metodologia consiste em irradiar tecidos infectados com 2,5 Mrads, homogeneizar em tampão PBS pH 7,2, em gelo por 3 min; centrifugar a 10.000 x g por 10 min, ressuspender em tampão contendo 0,135 M NaCl, 0,2 M Tris, 0,01 M MgSO<sub>4</sub>, filtrar a suspensão e centrifugar novamente a 10.000 x g por 10 min. O sedimento foi centrifugado em 8 mL de gradiente de Percoll a 50% por duas vezes. O *M. leprae* foi, então, ressuspensão em PBS e mantido a - 70°C até sua utilização.

2) *M. leprae* proveniente de 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. Os bacilos foram recuperados da pata dos camundongos aproximadamente

6 meses após inóculo, através de centrifugação em gradiente de Percoll de homogenados da pata do camundongo. A suspensão de bacilos foi tratada com hidróxido de sódio 0,1 M e mantida a 4°C em meio de cultura 7H12 (Difco Laboratories, MI, EUA).

A suspensão de bacilos recuperados foi quantificada utilizando o método de Shepard & McRae (1968). Neste método, retira-se uma pequena alíquota para preparação de esfregaços em lâmina de vidro (Fisherbrand, Pittsburg, PA, EUA) e coloração pelo método de Kynion fazendo diluições de 10 e 100 vezes ou sem diluição do material. Este foi fixado com formol-leite em vapor de formaldeído e calor. Os bacilos foram corados pelo método de Kynion utilizando fucsina básica por 5 min e lavados com água corrente. As lâminas foram, então, lavadas com solução álcool-ácida e, em seguida, com água novamente para a retirada de excesso do corante. Finalmente, os esfregaços foram corados com azul de metileno por 3 min e lavados com água. A contagem do número de bacilos foi realizada em microscópio óptico com lente de imersão de 1000X (Nikon Eclipse E400). Os bacilos foram, então, estocados a - 70°C até sua utilização.

Nos ensaios de dosagem de nitrito e expressão de óxido nítrico sintase induzível, foram utilizadas bactérias purificadas de camundongos nude infectados. Os demais ensaios foram realizados com *M. leprae* proveniente de tatus.

### **3.2.2 Obtenção de *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium bovis* BCG**

O *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 foi doado por Thomas Dick da Universidade de Singapura, sendo cultivado em meio Middlebrook 7H9 (Beckton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA).

O BCG (cepa Pasteur) foi doado pelo pesquisador Franco Menozzi do Instituto Pasteur, Lille, França (linhagem 1173P2 WHO, Estocolmo, Suécia; passagens 3 a 8) e cultivado também em meio 7H9.

Estas micobactérias foram cultivadas em meio 7H9 suplementado com 0,05 % de Tween 80 e 10 % de ADC (0,2 % de glicose, 0,5 % de albumina de soro bovino [BSA], 0,085 % de cloreto de sódio) sob agitação constante com barras magnéticas em incubadora à 37°C. O cultivo foi interrompido quando a cultura atingiu uma densidade óptica (600nm) igual a 1,0 em um espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro UV/visible), correspondente à fase exponencial de crescimento destas bactérias. O número de bacilos foi determinado através do método de Shepard e McRae (1968) e as alíquotas foram, então, congeladas a -70°C até o seu uso. Ambas micobactérias foram mortas através de tratamento a 100°C por 5 min para realização de todos os experimentos.

### **3.3 Coloração do *M. leprae* com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)**

Os bacilos foram corados com 0,1 mg/ml de FITC (Sigma) em tampão carbonato 100 mM, pH 9,6 por 1 hora à temperatura ambiente. A suspensão de micobactérias foi centrifugada a 14.000 x g em microcentrífuga (5415 Eppendorf) por 10 minutos, e o sedimento ressuspense em 1 mL de PBS, e o procedimento de lavagem foi repetido por mais 2 vezes para retirada de excesso de fluorocromo (Drevets *et al.*, 1991). As micobactérias foram, então, finalmente ressuspensas em PBS e a eficiência da marcação monitorada em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E400) com lente de imersão de 100x (aumento final 1000x). Uma alíquota foi separada para contagem do número de bacilos e as demais prontamente utilizadas ou estocadas a -70°C até o momento de uso.

### **3.4 Avaliação da morfologia celular e do grau de associação do *M. leprae* aos macrófagos RAW 264.7**

Para tal procedimento, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços e tratados ou não com 10ng/mL de IFN- $\gamma$  (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) ou *M. leprae*

previamente marcado com FITC nas proporções bactéria:célula 10:1 ou 50:1 por 48 horas. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos a 37°C. As células foram lavadas mais duas vezes com PBS e posteriormente, realizada a coloração nuclear com bis-benzemida por 5 min, seguida de uma última lavagem com PBS. Foi colocada uma gota de “anti-fading” (Merck, Darmstadt, Alemanha) em uma lâmina de vidro. As lamínulas foram, então, transferidas para a lâmina, de modo que ficassem voltadas para a lâmina. As lamínulas foram posteriormente imobilizadas com Entellan (Merck) e observadas por contraste de interferência diferencial (DIC) e sob excitação a 470 e 365nm ao microscópio de fluorescência Observer.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

### **3.5 Avaliação da viabilidade celular por reação enzimática de redução do sal Metiltetrazólio (MTT)**

Foram plaqueados cerca de  $4 \times 10^4$  macrófagos RAW 264.7 por poço em placa de 24 poços em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro e estimuladas ou não com *M. leprae*.

Após 24, 48 ou 72 h de cultivo a 37°C na estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, a quantificação da viabilidade celular foi realizada através da clivagem do sal de tetrazolium, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, T., 1983) onde, cada poço da cultura foi incubado com MTT (0,2 mg/mL - Sigma) por 4 horas a 37°C na estufa de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, 100 µL de SDS a 10% foi adicionado, as culturas homogeneizadas e a absorbância determinada em leitor de ELISA (BioTek ELX 800, BioSystems, Curitiba, PR, Brasil) a 590nm (conforme descrito por Syroid *et al.*, 1999). Os resultados apresentados foram expressos em valores de densidade ótica (D.O.), correspondentes à redução enzimática do MTT.

### **3.6 Isolamento de RNA total**

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em placas de 6 poços e após estímulo ou não com as diferentes micobactérias, os sobrenadantes foram coletados e, o RNA total das células foi extraído com 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante do reagente.

Seguindo as instruções do fabricante, o material foi homogeneizado em vórtex por alguns segundos antes da adição de 200  $\mu$ L de clorofórmio (Merck). Posteriormente as amostras foram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi, então, transferida para um novo tubo e misturada a 500  $\mu$ L de isopropanol (Merck). Após 10 min 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, com precipitação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado cuidadosamente com 1 mL de etanol 70% gelado. O sedimento final foi ressuspenso em água deionizada previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

O RNA total purificado foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Uniscience) e sua integridade avaliada através de eletroforese em gel de agarose, em condição desnaturante, a 1,2 % em presença de formaldeído.

### **3.7 Tratamento com DNase e Síntese do cDNA**

Com o objetivo de eliminar DNA genômico contaminante, RNA total purificado (5 $\mu$ g) de cada uma das amostras foi tratado com DNase I livre de RNase (Invitrogen) por 1 hora à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 1 $\mu$ l de EDTA (Invitrogen).

Cada amostra foi dividida em alíquotas de 5 $\mu$ l e utilizadas em reações de síntese de cDNA na presença ou ausência da enzima transcriptase reversa (Superscript III – Invitrogen), usando oligo dT como iniciadores para gerar “cDNA

good” e “cDNA mock”, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.8 Reação em cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real**

Todas as reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativo) foram realizadas utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems) com os pares de iniciadores específicos para as seqüências codificantes dos genes IGF-I (Mm 00439560) e GADPH (Mm 9999 9915) de camundongo.

O ensaio foi realizado em placas ópticas de 96 poços onde adicionou-se 12,5 mL de TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), 1,25 µL dos iniciadores (20x), 2 µL de cDNA e 9,25 µL de água em um volume final de 25 µL por poço. As amostras foram submetidas ao programa Prism Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems) no termociclador ABI Prism 7000. As temperaturas usadas foram: desnaturação inicial a 95°C/10 min, 40 ciclos de desnaturação de 95°C/15 seg, anelamento a, 60°C /1 min e extensão a 72 °C/1 min, e extensão final a 72°C/2 min.

A normalização da expressão relativa do IGF-I foi realizada através do controle constitutivo GADPH e os valores obtidos (Ct, “cycle threshold”) foram corrigidos e convertidos pela expressão relativa que é igual a  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ .

### **3.9 Obtenção de Lisado Total de Macrófagos**

Culturas de macrófagos RAW 264.7 em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino foram pré-incubadas ou não com 50 ng/mL de IGF-I recombinante por 30 minutos e, posteriormente, tratadas ou não com *M. leprae*, *M. bovis* BCG ou *M. smegmatis*; ou ativadas com IFN- $\gamma$ . Após 48 horas foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com tampão de lise RIPA (Current Protocols in Molecular Biology), contendo inibidores de proteases (Mini Complete

– Roche) por 15 minutos no gelo. Os extratos celulares foram passados em seringa de insulina 1 mL 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 Bicinconínico (kit BCA – Pierce, EUA), utilizando albumina bovina sérica (BSA) como proteína padrão. As amostras foram imediatamente aplicadas em gel de poliacrilamida ou estocadas a - 20°C até o momento de uso.

### **3.10 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)**

Neste procedimento utilizou-se 25 µg de proteínas diluídas em tampão de amostra e fervidas durante 5 minutos foram aplicadas em gel de 8,5% de poliacrilamida. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris 0,25M/Glicina 19,2M contendo 0,1%de SDS, utilizando-se cuba Might Small Transphor (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) sob amperagem de 25mA por aproximadamente 2 horas. O padrão de massa molecular (Pharmacia) utilizado é composto pelas seguintes proteínas: Miosina 212 kDa, Macroglobulina 170 kDa, β- Galactosidade 116 kDa, Transferrina 76 kDa e Ácido Glutâmico Desidrogenase 53 kDa.

### **3.11 “Western blot”**

As proteínas foram eletroforeticamente transferidas sob amperagem de 400mA por 1 hora a 4°C durante 1 hora para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra – Amersham Bioscience) em tampão de transferência e montado na cuba de transferência. O “sanduíche” contendo: esponja, papel de filtro, membrana de nitrocelulose, gel de poliacrilamida, papel de filtro e esponja foi colocado em mini cuba de transferência (Amersham). Logo após, a membrana foi corada com solução “amido black” para a confirmação da eficiência da

transferência e identificação do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi lavada com TBS-0,1%Tween (TBS-T) e bloqueada com solução de TBS-T/3% leite desnatado (Molico) por duas horas. Logo após a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo policlonal anti-iNOS2 (1:200; Santa Cruz, CA, EUA) ou anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ -Tubulina (1:200; Santa Cruz) diluídos em TBS-T/3% leite. Após esse período a membrana foi lavada duas vezes com TBS-T por 5 minutos e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluídos 1:40.000 e 1:30.000, respectivamente. A membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T e transferida para o cassete de revelação.

Para revelação o cassete foi levado à câmara escura e adicionado por sobre a membrana 200 $\mu$ l do substrato quimioluminescente ECL-Advance Western blotting Detection kit (Amersham). As membranas foram expostas a um filme fotográfico (Hyperfilm ECL; GE Healthcare), em câmara escura e a revelação foi feita utilizando-se procedimento convencional.

Os gráficos de análise densitométrica apresentados foram realizados utilizando o programa ImageJ. Os resultados foram gerados a partir do cálculo da razão entre valores de densitometria do perfil de bandas de expressão de  $\alpha$ -tubulina e iNOS e, expressos em unidades arbitrárias.

### **3.12 Dosagem de IGF-I**

A quantificação de IGF-I em sobrenadantes de culturas de macrófagos RAW 264.7 tratados ou não com as micobactérias por 48 h foi realizada pela técnica de ELISA de acordo com as instruções do kit fornecidas pelo fabricante (R&D Systems).

Resumidamente, placas de 96 poços pré-recobertas com anticorpo primário anti-IGF-I receberam 50  $\mu$ L de concentrações conhecidas de IGF-I recombinante – utilizado como proteína padrão para a geração da curva – ou 50  $\mu$ L amostra de sobrenadantes de culturas de células RAW 264.7 estimuladas conforme descrito

acima. A placa permaneceu incubada por 2 h a 4°C, seguida de 4 lavagens com tampão fornecido pelo kit. Logo após, foi adicionado o anticorpo secundário policlonal e realizada incubação de 1 h à 4°C. Os poços foram lavados mais 4 vezes e incubados com substrato por 30 min à temperatura ambiente, protegido da luz. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2N) e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 450 nm. Após a leitura os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão.

### **3.13 Dosagem de Nitrito**

A produção de óxido nítrico, em sobrenadantes de culturas de macrófagos RAW 264.7 e macrófagos primários – foi determinada pela dosagem de nitrito (NaNO<sub>2</sub>) utilizando o método de Griess (Green *et al.*, 1982). Este método consiste na adição de 100 µL da amostra ou da curva padrão para o desenvolvimento da reação colorimétrica.

Um volume de 100 µL de concentrações conhecidas de nitrito de sódio em concentrações que variam de 5µM a 100µM – para elaboração da curva padrão – ou amostras de sobrenadantes de culturas de macrófagos RAW 264.7 ou macrófagos primários foram adicionados à placas de 96 poços e misturados a 200 µL de reagente de Griess (Sigma) por 15 min, à temperatura ambiente. A leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro a 570nm e os resultados foram analisados com base na construção de curva padrão.

### **3.14 Dosagem de PGE<sub>2</sub>**

A quantificação de prostaglandina E<sub>2</sub> foi realizada através de ensaio imunoenzimático de competição, seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante do kit (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, USA).

As placas pré-recobertas com anti-IgG de camundongo produzida em carneiro receberam quantidades definidas de anticorpo monoclonal anti-PGE<sub>2</sub>, da amostra de sobrenadantes de culturas de macrófagos estimulados ou não, e de uma forma de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase. Esta PGE<sub>2</sub> conjugada compete pelos sítios de ligação de PGE<sub>2</sub> nos anticorpos monoclonais com PGE<sub>2</sub> da amostra experimental de forma a estabelecer um equilíbrio de ligações químicas tal que a ligação de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase será menor quanto maior for a concentração de PGE<sub>2</sub> da amostra experimental. A seguir foi dado ao sistema um reagente que contém substrato para a enzima acetilcolinesterase (acetiltiocolina) que, ao sofrer o processo enzimático pela acetilcolinesterase, gera tiocolina, que por sua vez se conjuga ao ácido 2-nitrobenzóico produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, que tem absorvância ótima a 412 nm.

A análise dos resultados foi feita de forma inversa à intensidade do sinal da absorvância, já que quanto maior a concentração de PGE<sub>2</sub> na amostra, menor será a ligação de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase e, portanto, menor a intensidade de absorvância. Os resultados de absorvância foram convertidos em concentrações de PGE<sub>2</sub> pela comparação dos dados gerados pela curva padrão, construída com concentrações conhecidas de PGE<sub>2</sub>.

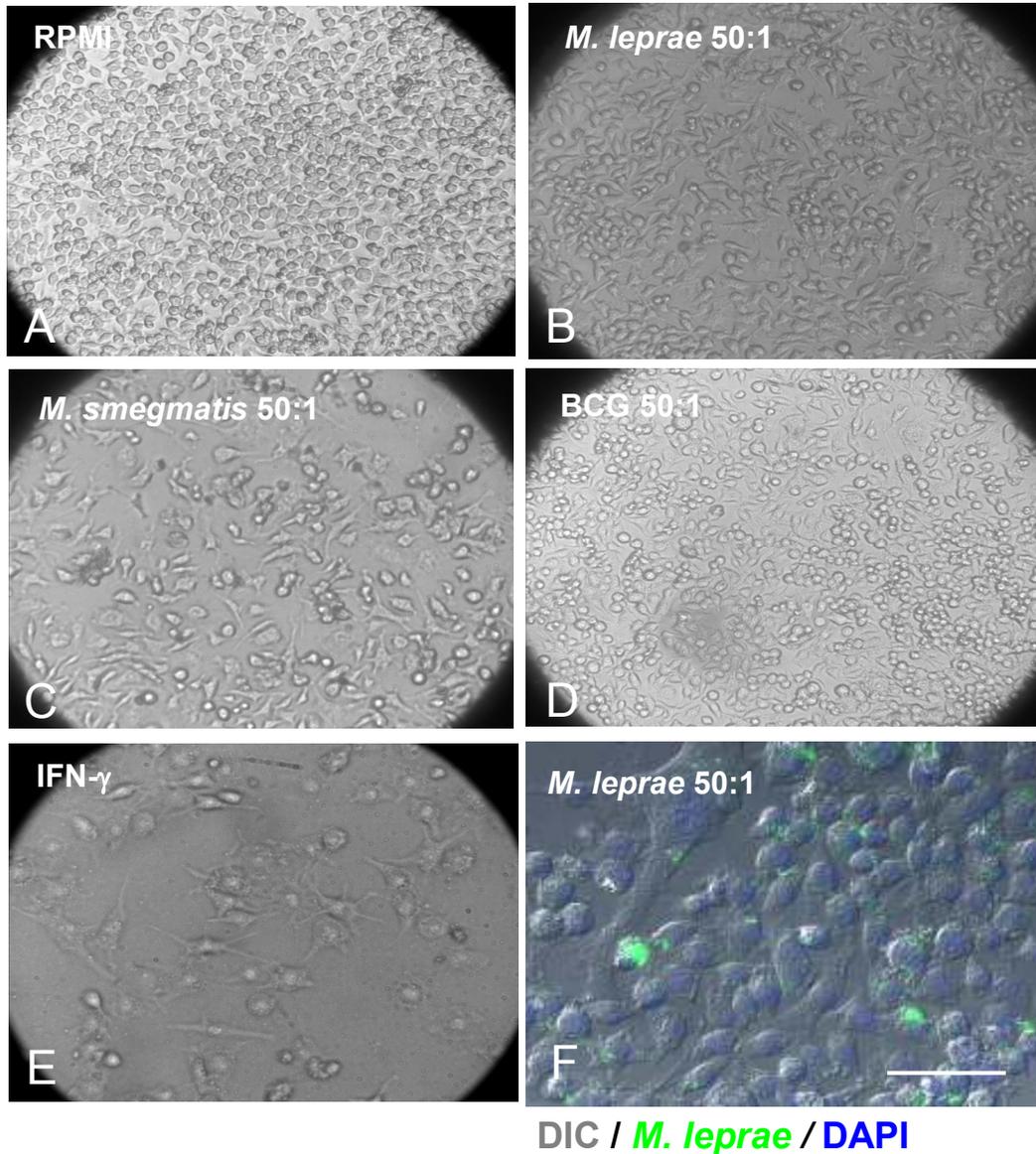
### **3.15 Análise gráfica e estatística**

Os resultados foram representados como média  $\pm$ E. P. M. (Erro padrão da média) e avaliados estatisticamente pelo teste "t student". Os valores foram considerados significativos quando o valor de  $p$  foi igual ou inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ). Para análise estatística dos resultados deste estudo, foi utilizado o programa GraphPad Prism vs 3.0.

## 4. Resultados

### 4.1 Análise morfológica e grau da associação na interação de micobactérias com macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7.

Neste estudo utilizamos a linhagem celular RAW 264.7, uma célula já bem caracterizada e de fácil manipulação e manutenção para os estudos *in vitro*. Primeiramente determinamos o grau de associação das micobactérias a estas células, assim como o aspecto morfológico dos macrófagos após estimulação. Três espécies de micobactérias com diferentes graus de virulência foram comparadas ao longo deste trabalho, a saber: o *M. leprae*, espécie virulenta, o *M. bovis* BCG, cepa de baixa virulência, e o *M. smegmatis*, espécie avirulenta. As micobactérias foram previamente corada com FITC e mortas pelo calor, as células foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas e estimuladas com as micobactérias numa proporção de 50 bactérias para uma célula, ou com IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) por 48 horas. As lamínulas foram observadas por microscopia de campo claro e contraste de interferência diferencial (DIC) para análise morfológica e grau de associação das bactérias aos macrófagos. Como mostrado na Figura 4, os macrófagos tratados com IFN- $\gamma$  apresentaram morfologia característica de célula ativada, promovendo uma mudança da célula antes arredondadas para uma forma achatada e espalhada. Contudo, nas culturas estimuladas com *M. leprae* apenas poucas células apresentavam esta morfologia, mostrando um aspecto bem semelhante às culturas controle não estimuladas. Já as células estimuladas com BCG e *M. smegmatis* mostraram uma morfologia mais aproximada às células ativadas com IFN- $\gamma$ . Esta diferença morfológica observada entre as células estimuladas com *M. leprae* e com as outras duas espécies de micobactérias não pôde ser atribuída a diferenças nos níveis de fagocitose entre elas, uma vez que nas três situações aproximadamente 100% das células apresentavam bactérias no seu interior (Figura 4).

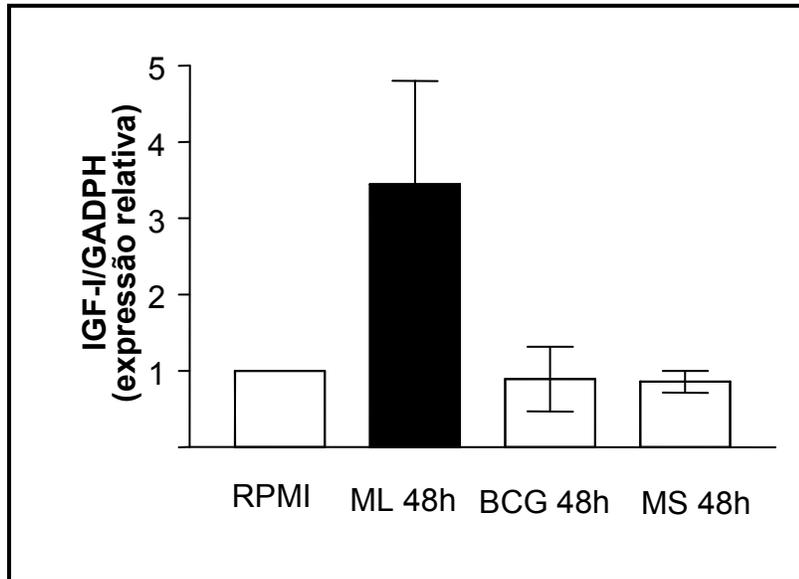


**Figura 4. Morfologia de macrófagos RAW 264.7 após incubação com Micobactérias.** Fotografias obtidas por microscopia de campo claro e contraste diferencial interferencial (DIC) de macrófagos RAW 264.7 submetidos por 48 h às seguintes condições experimentais: (A), Controle (RPMI), (B) tratados com *M. leprae*, (C) tratados com *M. smegmatis* (D) tratados com BCG (50.1), (E) IFN- $\gamma$  10ng/mL e (F) tratados com *M. leprae*-FITC (50.1). Barra (A-D)= 50  $\mu$ m

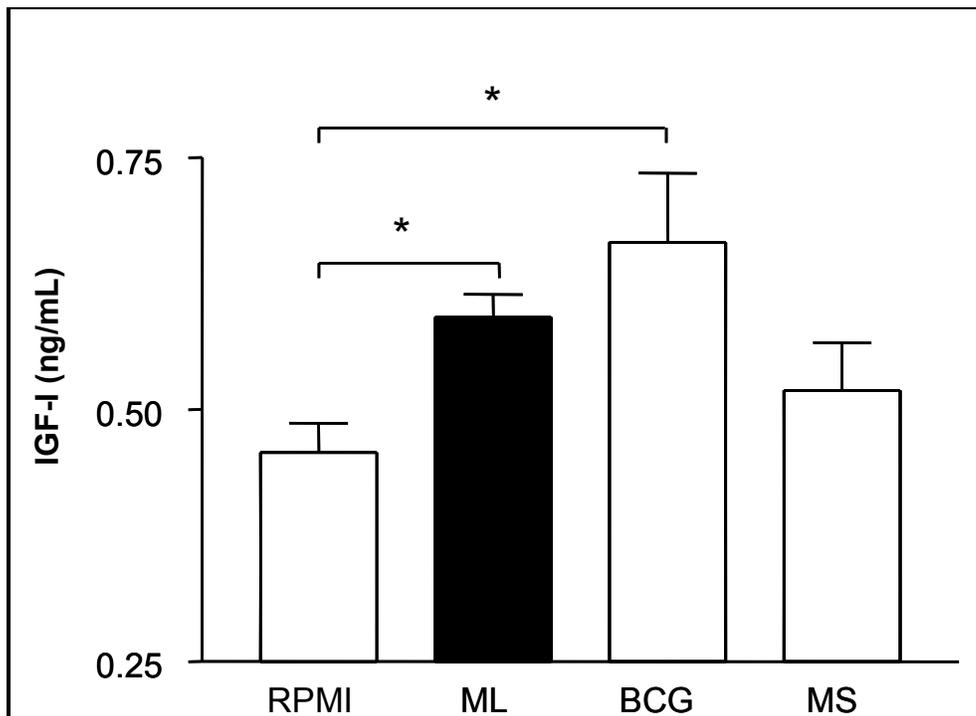
#### **4.2 *M. leprae* e BCG, mas não *M. smegmatis* induzem a expressão e produção de IGF-I em macrófagos RAW 264.7.**

Em seguida fomos investigar se o *M. leprae* era capaz de induzir IGF-I em macrófagos à semelhança do previamente observado em células de Schwann (Rodrigues et al., 2009). O estudo foi realizado com a linhagem celular RAW 264.7 e comparou-se o efeito do *M. leprae* com BCG e *M. smegmatis* (ver metodologia pág. 24). O RNA total foi extraído e purificado, e expressão de RNAm para IGF-I quantificada por PCR em tempo real utilizando iniciadores específicos. O RNAm para IGF-I em cada amostra foi calculado em relação ao RNAm do gene constitutivo GADPH. Os resultados mostrados na figura 5 sugerem um aumento de aproximadamente 3 vezes na proporção de RNAm de IGF-I nas células estimuladas com *M. leprae* em relação aos valores encontrados em células não estimuladas ou estimuladas com as outras micobactérias. Este resultado, contudo, não atingiu significância estatística devido ao valor elevado do erro padrão da média observado entre os diferentes experimentos realizados.

Numa etapa seguinte foi feita a quantificação do IGF-I secretado pelas células nos sobrenadantes das culturas através de ensaio imunoenzimático específico. Como mostra a Figura 6, foi possível observar um aumento significativo na produção de IGF-I nos macrófagos estimulados com *M. leprae* e BCG quando comparados às células não estimuladas. Contudo, esse aumento não foi observado nos macrófagos estimulados com *M. smegmatis*. Já os níveis de IGF produzidos por células estimuladas com BCG ou *M. leprae* não foram estatisticamente diferentes entre si. Estes resultados indicam que o *M. leprae* é capaz de induzir a produção de IGF-I em macrófagos, mas diferentemente do observado em células de Schwann, este efeito não é específico, sendo compartilhado com BCG. Já o *M. smegmatis*, uma espécie avirulenta, foi incapaz de induzir a produção IGF-I nas células RAW nas condições experimentais utilizadas.



**Figura 5. *M. leprae* aumenta a expressão de RNAm para IGF-I em macrófagos RAW 264.7.** Análise quantitativa da expressão do RNAm de IGF-I em macrófagos, realizada através de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR quantitativo), sob as seguintes condições de incubação: Meio padrão RPMI (controle), *M. leprae* 50:1 incubado por 48 horas, *M. bovis* BCG 50:1 incubado por 48 horas e *M. smegmatis* 50:1 incubado por 48 horas. O gráfico representa a média ± erro padrão de 4 experimentos independentes.

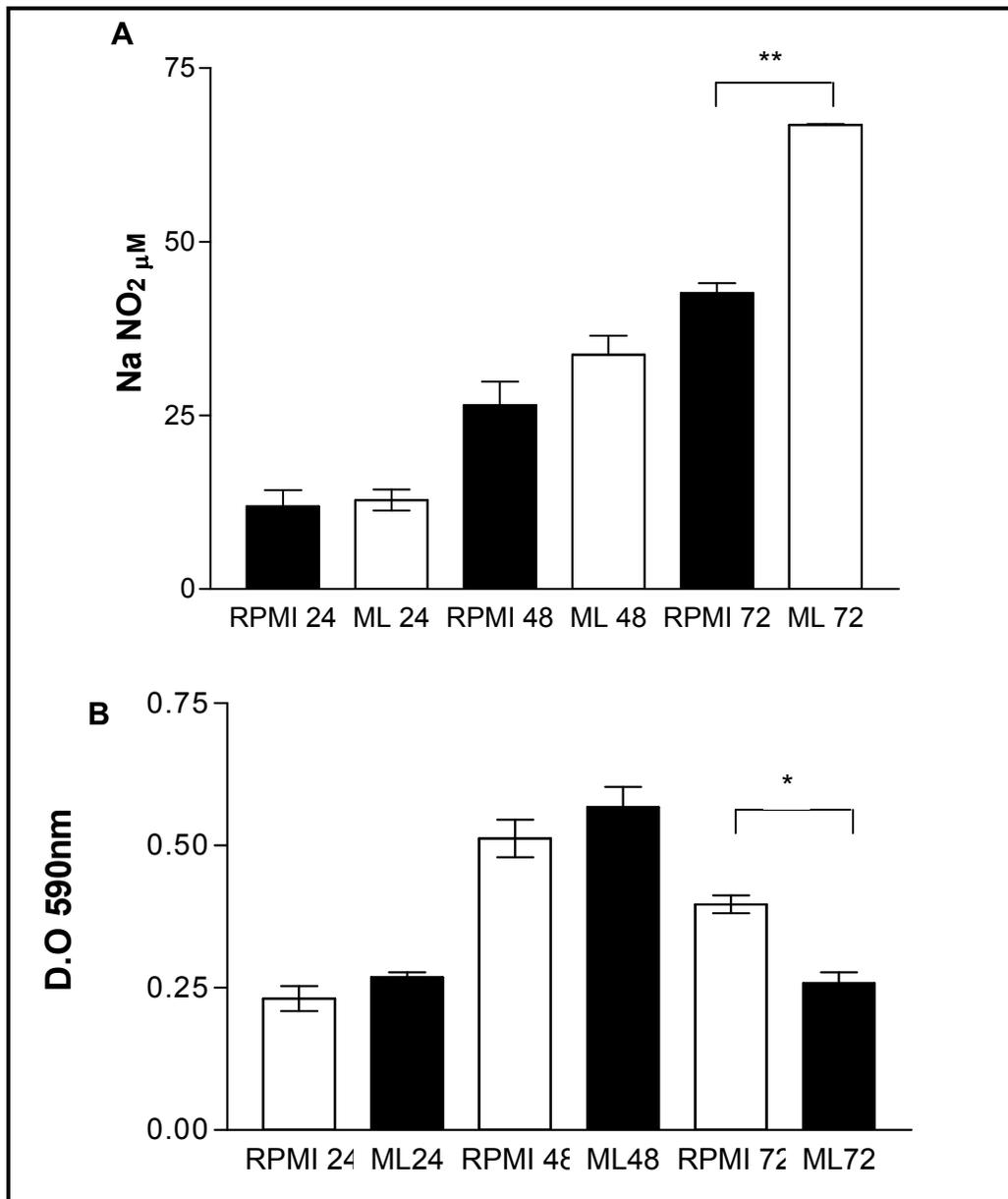


**Figura 6. *M. leprae* induz a produção de IGF-I em macrófagos RAW 264.7.** Histograma mostrando os valores de IGF-I quantificados por ensaio imunoenzimático (ELISA) nos sobrenadantes de macrófagos RAW 264.7 incubados por 48 horas com: meio RPMI (controle), *M. leprae* (ML) 50:1, *M. bovis* BCG 50:1 e *M. smegmatis* (MS) 50:1. Os dados representam a média ± erro padrão de 6 experimentos realizados em duplicata. Análise estatística: teste-t \*  $p < 0,05$ .

### **4.3 Análise da produção de NO e expressão da enzima iNOS por macrófagos RAW 264.7 tratados com *M. leprae*, BCG e *M. smegmatis*.**

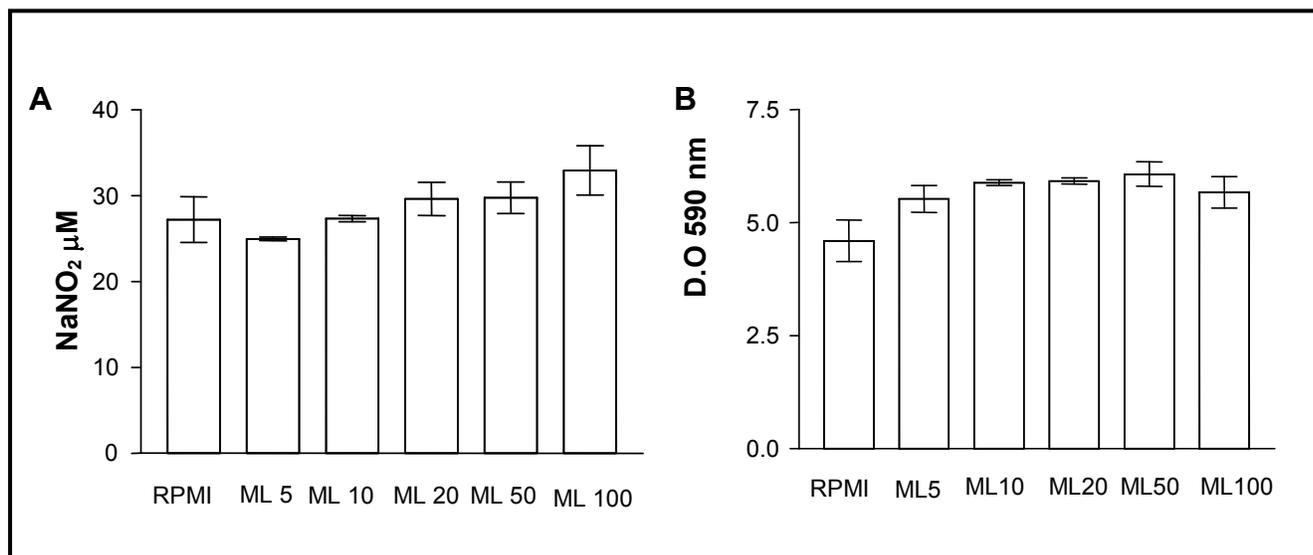
A produção de espécies reativas de nitrogênio constitui um dos mecanismos microbicidas mais efetivos contra a infecção por micobactérias. O NO, principal espécie reativa, é produzido pela forma induzida da enzima NOS presente em macrófagos ativados. Nesta etapa do trabalho buscamos investigar a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 estimulados com *M. leprae*, BCG e *M. smegmatis*. Para tal, culturas subconfluentes de macrófagos foram estimuladas com *M. leprae* em diferentes multiplicidades de infecção (MOI) e diferentes tempos. Após incubação, a produção de NO foi avaliada indiretamente através de dosagem de nitrito no sobrenadante e a viabilidade celular determinada através da capacidade de redução do sal MTT.

Inicialmente verificamos a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados com *M. leprae* em função do tempo. Para tal, os macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços e o sobrenadante foi recolhido após estimulação com *M. leprae* (MOI=50) por 24, 48 e 72 horas. Como mostrado na Figura 7 A, a produção de NO na cultura tratada com *M. leprae* apresentou um discreto aumento em relação ao controle não tratado. Contudo essa diferença foi estatisticamente significativa apenas no tempo de 72 horas. Ainda foi possível observar que no tempo de 72 horas houve uma evidente diminuição no número de células viáveis quando comparado ao tempo de 48 h, ficando este efeito mais evidente nas culturas estimuladas com *M. leprae* em relação às células controle (Figura 7B).



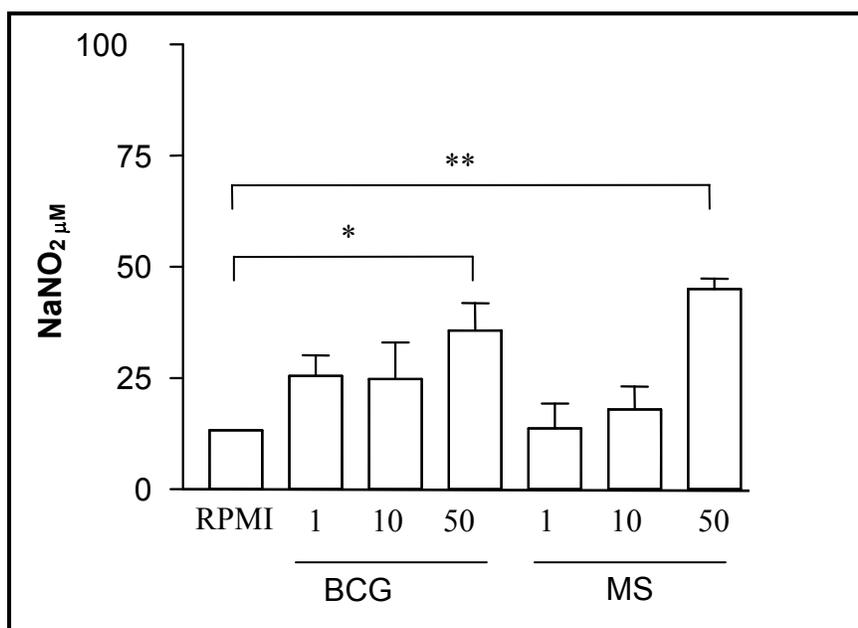
**Figura 7. Cinética temporal de produção de NO por macrófagos RAW 264.7 tratados com *M. leprae*.** (A) Histograma da análise quantitativa da produção de NaNO<sub>2</sub> (µM) por macrófagos incubados ou não com *M. leprae* (50:1) no curso temporal de 24h, 48h e 72h. (B) Histograma da análise quantitativa da viabilidade celular realizado através de redução de MTT. Análise estatística: *test-t* \* p< 0,05, \*\*p< 0,001. Os dados representam uma média ± erro padrão de 3 experimentos realizados em duplicatas.

Nos experimentos seguintes, fixamos o tempo de incubação em 48 h e ensaiamos doses crescentes da bactéria. Na Figura 8A, observamos que o *M. leprae* induziu uma discreta produção de NO, porém essa indução não foi estatisticamente significativa mesmo na dose de 100 bactérias para uma célula. A Figura 8B mostra que a viabilidade celular não é alterada, mesmo em altas doses do bacilo. Os resultados obtidos nesta serie de experimentos obtidos nos levaram a adotar o tempo de 48 h e MOI de 50 nos experimentos subseqüentes com *M. leprae*.



**Figura 8. *M. leprae* não induz produção significativa de NO em macrófagos RAW 264.7.** Histograma da análise quantitativa da produção de NaNO<sub>2</sub> (µM) por macrófagos incubados com *M. leprae* em doses crescentes por 48 h (A). Em (B) Histograma da análise quantitativa do ensaio de viabilidade celular por MTT. Não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais em A e B.. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

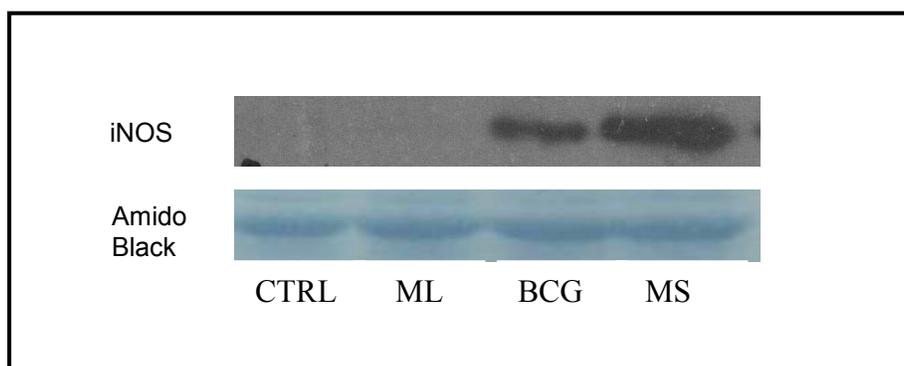
Diversos estudos indicam que micobactérias com baixa virulência como *M. smegmatis* e BCG induzem uma maior ativação dos macrófagos (Jordão et al, 2008). Numa etapa seguinte do nosso trabalho avaliamos, então, os níveis de produção de óxido nítrico induzidos por *M. smegmatis* ou BCG no nosso modelo de infecção. Os macrófagos RAW foram tratados com as micobactérias nas proporções de 1, 10 e 50 bactérias por célula por 48 horas, e o sobrenadante das culturas coletado para mensuração de nitrito. Como demonstrado na Figura 9, tanto BCG com *M. smegmatis* induziram a produção de níveis significativos de NO, obtendo-se níveis maiores quando o MOI de 50 foi utilizado.



**Figura 9. *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* aumentam a atividade microbicida de macrófagos RAW 264.7.** Histograma da análise quantitativa da produção de NaNO<sub>2</sub> (µM) por macrófagos tratados por 48 horas com meio padrão RPMI (controle), *M. bovis* BCG (1:1, 10:1 e 50:1), *M. smegmatis* (MS) (1:1, 10:1 e 50:1). Análise estatística: *test-t* \* p < 0,05, \*\*p < 0,001. Os dados representam a média ± erro padrão de 3 experimentos realizados em duplicatas.

Como a produção de NO por macrófagos está diretamente relacionada à expressão da forma induzida da NOS (iNOS) nestas células, numa etapa seguinte

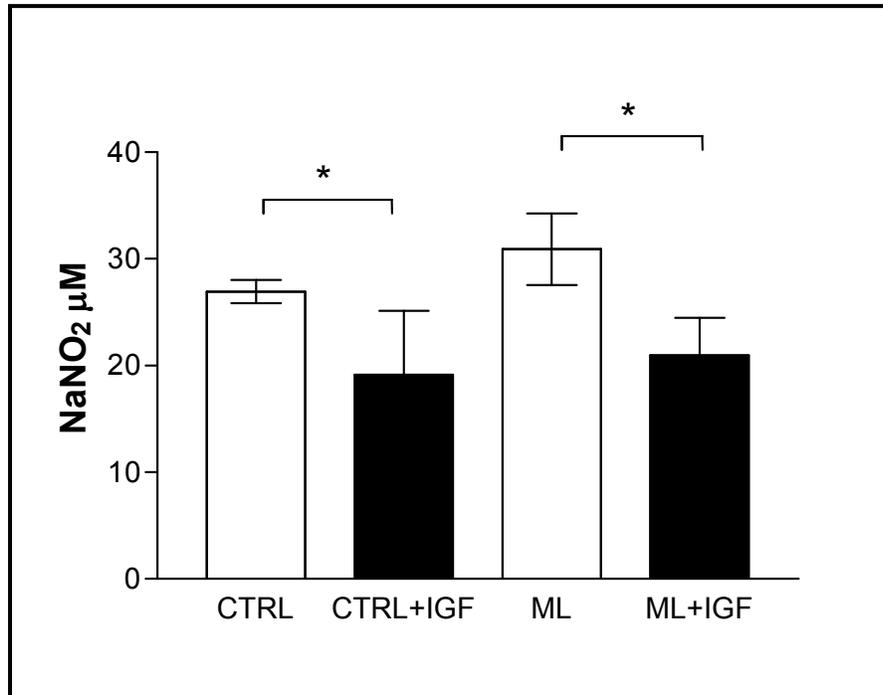
avaliamos a expressão desta enzima nos macrófagos tratados com as diferentes micobactérias. Para tal, as células foram cultivadas em placa de 6 poços e estimuladas com as diferentes micobactérias (MOI=50) por 48 h. As células foram em seguida lisadas com tampão RIPA e os extratos celulares obtidos foram clarificados através de centrifugação. Após determinação da concentração protéica, quantidades equivalentes de proteína das diferentes amostras foram fracionadas em gel de acrilamida a 8,5%, transferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas com anticorpo específico para iNOS. Os resultados obtidos estão representados na Figure 10, onde, diferente das células tratadas com *M. leprae*, claramente se observa o aumento da expressão de iNOS em células estimuladas com BCG e *M. smegmatis*. Estes resultados estão de acordo com os dados de produção de NO acima relatados. Em resumo, os resultados gerados nesta serie de experimentos mostraram comportamentos distintos entre as micobactérias estudadas quanto à capacidade das mesmas de induzir a expressão de iNOS e conseqüente produção de NO em macrófagos RAW, estando esta capacidade relacionada com o grau de virulência das mesmas.



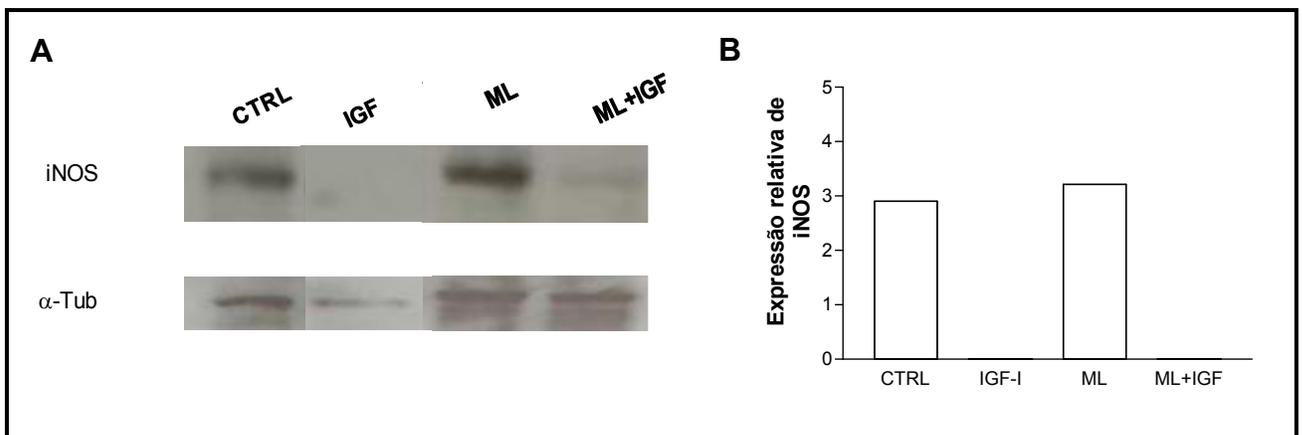
**Figura 10. BCG e *M. smegmatis*, mas não *M. leprae* induzem a expressão de iNOS em macrófagos RAW 264.7** Análise por Western Blot da expressão de iNOS por macrófagos tratados com *M. leprae* (ML), BCG ou *M. smegmatis* (MS) por 48 horas. A banda majoritária observada na coloração por amido black foi utilizada como controle de carregamento.

#### **4.4 O pré-tratamento de macrófagos RAW 264.7 com IGF-I inibe a produção de NO e a indução da enzima iNOS em resposta às micobactérias**

Uma vez comprovada a capacidade de micobactérias de induzir a produção de IGF-I por macrófagos, tornou-se relevante investigar um possível efeito inibitório deste hormônio na produção de NO induzida por estes microorganismos no nosso modelo de infecção *in vitro*. Para tal, as células RAW foram semeadas em poços de 6 ou 24 poços e pré-tratadas com IGF-I por 30 minutos antes da adição das micobactérias (MOI=50). Os sobrenadantes foram, coletados para dosagem de nitrito e as células lisadas para avaliação da expressão de iNOS por Western blot. A Figura 11 mostra os resultados de dosagem de nitrito obtidos nas culturas tratadas com *M. leprae*. Nesta figura é possível constatar que os níveis basais de produção de nitrito pela célula RAW são inibidos de forma significativa pelo IGF-I, e que isto ocorre mesmo na presença da bactéria. Estes resultados foram corroborados quando analisamos a expressão de iNOS nas mesmas células. Como podemos observar na Figura 12, a expressão de iNOS foi completamente reprimida na presença de IGF-I tanto nas células controle, como naquelas tratadas com *M. leprae*.

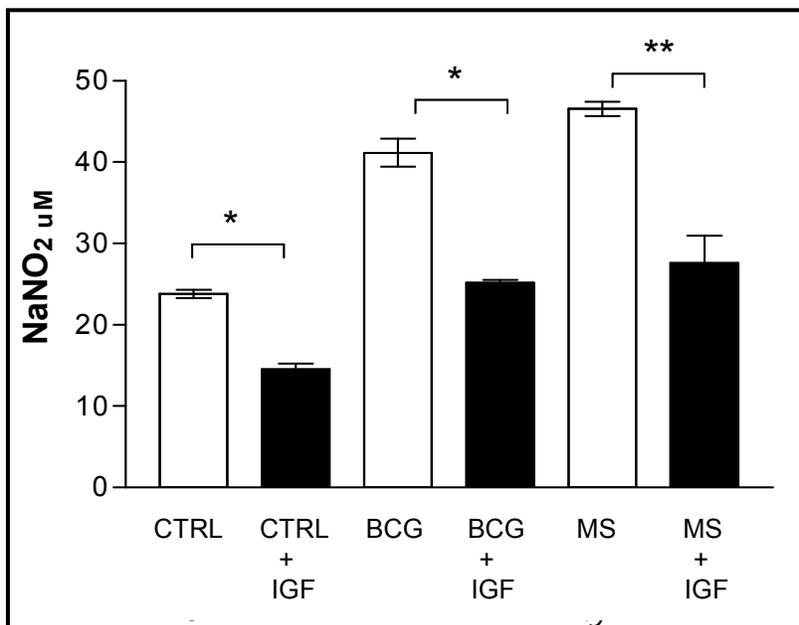


**Figura 11. IGF-I inibe a produção basal de NO por macrófagos RAW 264.7 tratados com *M. leprae*.** Histograma da análise quantitativa dos níveis de NaNO<sub>2</sub> (µM) por macrófagos pré-tratados ou não com IGF-I e incubados por 48 horas com meio padrão RPMI (controle), *M. leprae* 50:1 ou IFN-γ (10ng/mL). Análise estatística: *test-t* \* p < 0,05. Os dados representam a média ± erro padrão de 5 experimentos realizados em duplicatas.



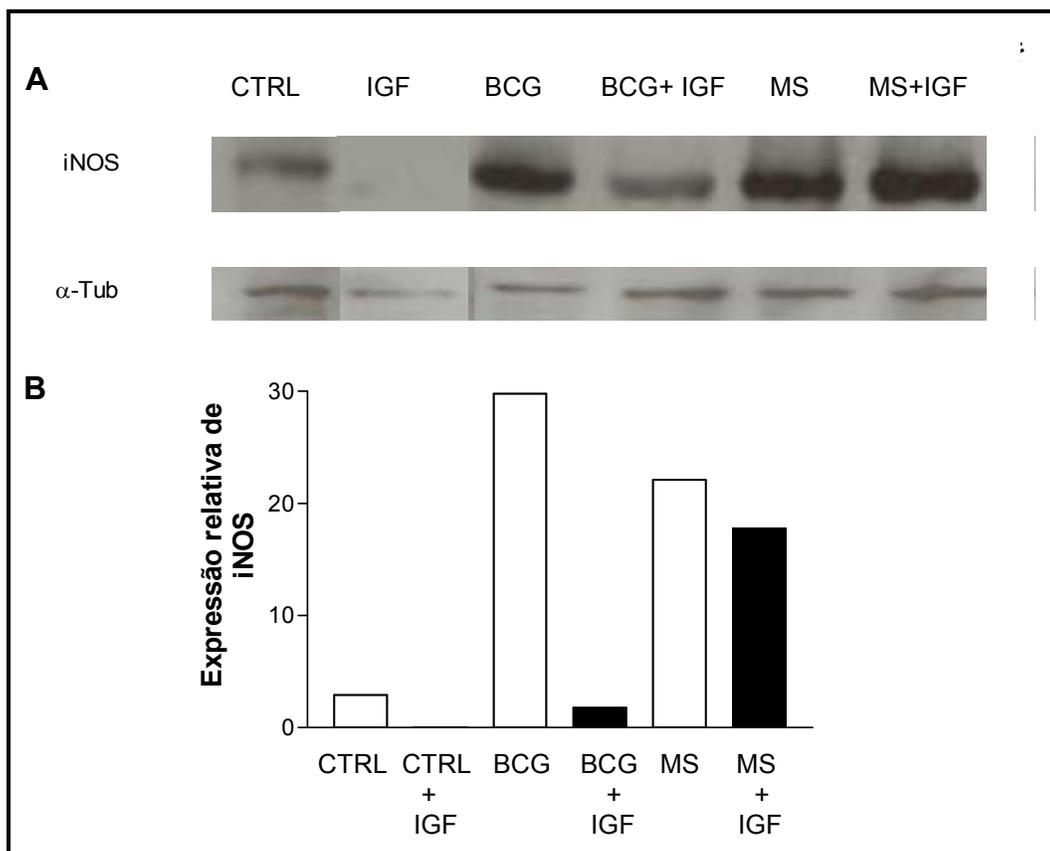
**Figura 12. IGF-I regula negativamente a expressão basal de iNOS em macrófagos RAW 264.7 tratados ou não com *M. leprae*.** (A) Análise por Western Blot da expressão de iNOS por macrófagos pré-tratados ou não com IGF-I e incubados por 48 horas com *M. leprae*. α-tubulina foi utilizada como controle de carregamento (B) Histograma da análise densitométrica da intensidade de expressão da bandas.

A seguir avaliamos a capacidade do IGF-I de modular a expressão de iNOS e conseqüente produção de NO induzida por BCG e *M. smegmatis* na célula RAW. A Figura 13 mostra que o pré-tratamento das células com IGF-I resulta num bloqueio da produção de NO em macrófagos estimulados com essas espécies de micobactérias.



**Figura 13. IGF-I bloqueia a produção de NO induzida por *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* em células RAW 264.7.** O gráfico em barras mostra os níveis de NaNO<sub>2</sub> (µM) em sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com IGF-I e incubados ou não com *M. bovis* BCG (50:1) ou *M. smegmatis* (50:1) por 48 horas. Análise estatística: Test-t \* p< 0,05, \*\* p<0.001. Os dados representam a média ± erro padrão um total de 4 experimentos realizados em duplicatas.

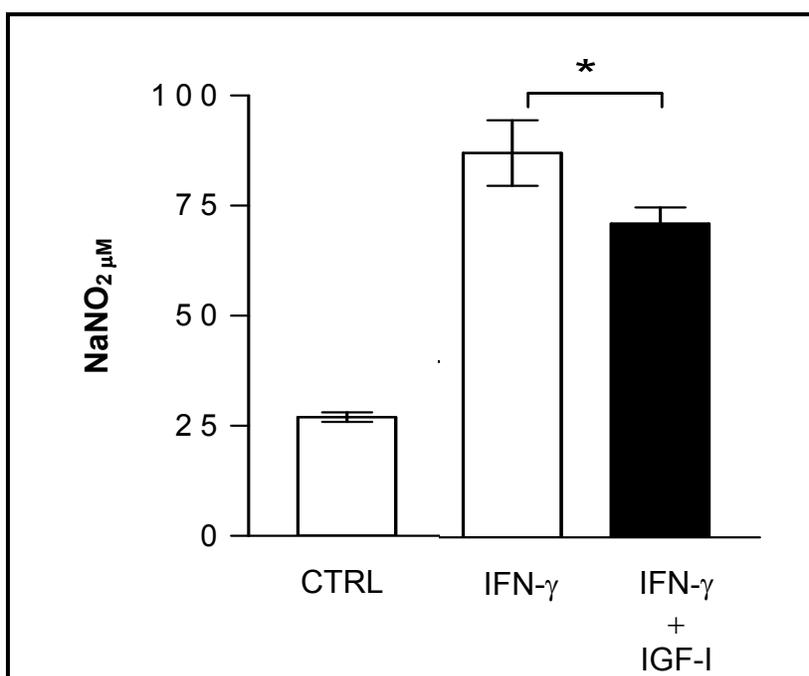
Para confirmar que a diminuição observada na produção de NO está relacionada com os níveis de expressão de iNOS, as células foram lisadas e as proteínas totais foram submetidas a Western Blot com anticorpo policlonal anti-iNOS. Na Figura 14 podemos observar que o pré-tratamento com IGF-I inibe parcialmente a indução da expressão de iNOS por *M. smegmatis* e *M. bovis* BCG em células RAW. As células pré-tratadas com IGF-I não expressaram níveis basais de iNOS, ao contrario das células que não receberam o hormônio, onde os níveis de iNOS se mostraram superiores, corroborando com os dados anteriores de produção de óxido nítrico por esses macrófagos. Estes dados indicam que o IGF-I é capaz de modular a expressão da enzima iNOS induzida por micobactérias em macrófagos RAW.



**Figura 14. IGF-I inibe a expressão de iNOS induzida por *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* em macrófagos RAW 264.7.** (A) Análise por Western Blot da expressão de iNOS por macrófagos pré-incubados ou não com IGF-I e tratados com *M. bovis* BCG ou *M. smegmatis* (MS).  $\alpha$ -tubulina foi utilizado como proteína de expressão constitutiva para o controle de carregamento no gel. (B) Gráfico de barras mostrando a densitométrica da intensidade das bandas. Os dados foram extraídos de 1 experimento representativo de um total de 3.

#### 4.5. Análise do efeito do IGF-I sobre a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$ em macrófagos RAW.

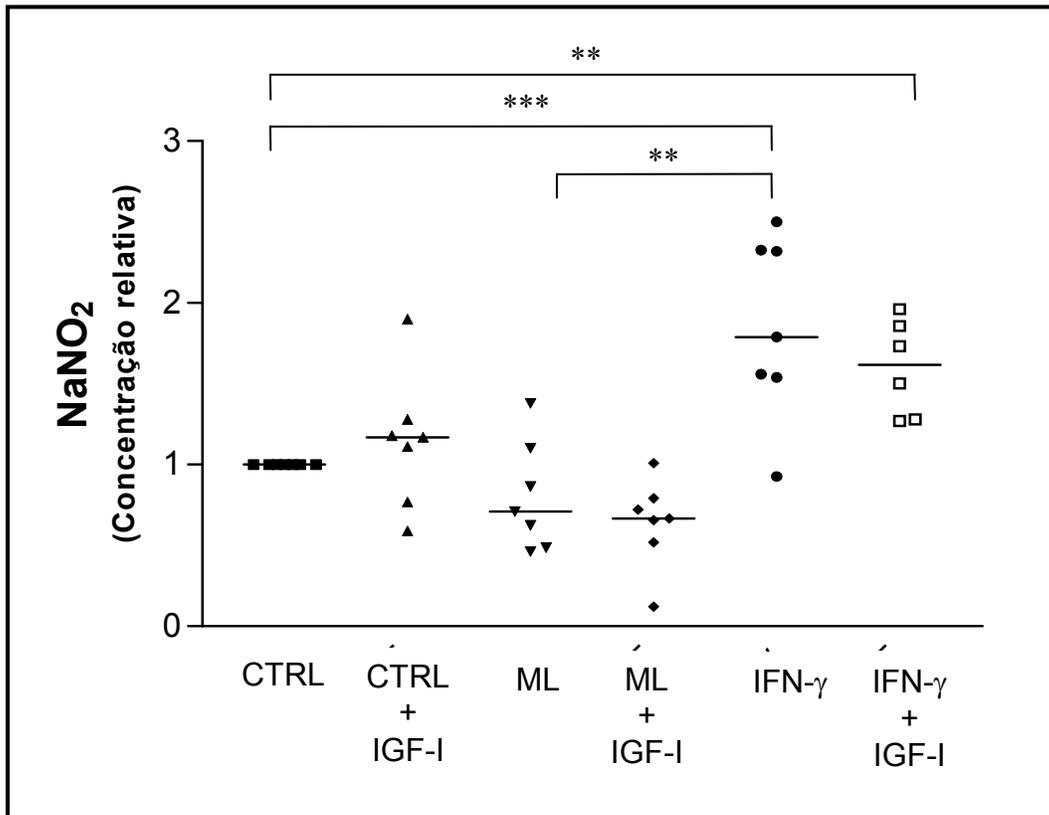
Considerando-se que IFN- $\gamma$  desempenha papel central na ativação de mecanismos microbicidas em macrófagos infectados com micobactérias com a conseqüente eliminação destes microorganismos. Fomos avaliar se IGF-I seria também capaz de modular negativamente a produção de óxido nítrico induzida por IFN- $\gamma$ . As células RAW foram pré-tratadas com IGF-I e estimuladas ou não com 10 ng/mL de IFN- $\gamma$  recombinante murino por 48 h. Os sobrenadantes foram coletados e os valores de nitrito observados mostrados na Figura 15. Como podemos observar, IGF-I foi capaz de inibir parcialmente a produção de NO por células RAW em resposta a IFN- $\gamma$ .



**Figura 15. IGF-I modula negativamente a produção de NO em macrófagos RAW 264.7 tratados com IFN- $\gamma$ .** O gráfico em barras mostra os níveis de NaNO<sub>2</sub> ( $\mu$ M) em sobrenadantes de macrófagos pré-tratados com IGF-I e incubados ou não com IFN- $\gamma$  10 ng/mL. Test-t \* p< 0,05, \*\* p<0.001. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de 4 experimentos realizados em duplicata.

#### **4.6 Análise do efeito de IGF-I na produção de NO em macrófagos murino primários tratados com *M. leprae*.**

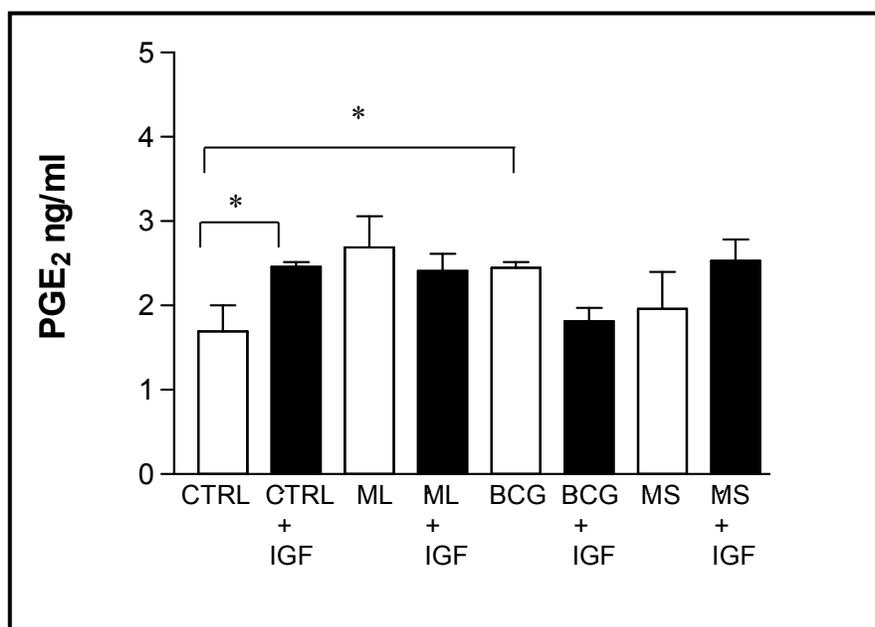
Nesta etapa do trabalho avaliamos o comportamento de macrófagos primários murinos no que se refere a produção de NO e modulação desta produção pelo IGF em células estimuladas com *M. leprae* ou IFN- $\gamma$ . Macrófagos peritoneais provenientes de camundongos C57/Bl6 foram cultivados em placa de 12 poços, pré-tratados ou não com IGF-I seguida de estimulação com *M. leprae* ou IFN- $\gamma$ . O sobrenadante foi então recolhido para estimativa da produção de NO e os valores obtidos estão representados na Figura 16. À semelhança do que foi observado em células RAW, o macrófago primário não produziu valores significativos de NO quando estimulados com *M. leprae*. Ao contrario, interessantemente, estes valores foram inferiores aos níveis basais observados nos sobrenadantes das células não estimuladas. O pré-tratamento das células com IGF-I foi contudo, incapaz de reduzir ainda mais estes valores. Já as células estimuladas com IFN- $\gamma$  produziram valores significativamente maiores de NO em relação ao controle e estes níveis mostraram uma tendência de decréscimo nas células pré-tratadas com IGF-I.



**Figura 16. Produção de NO por macrófagos primários murinos em resposta ao *M. leprae* e IFN- $\gamma$ .** Gráfico de dispersão de pontos (cada ponto representa um animal) mostrando os níveis relativos de  $\text{NaNO}_2$  ( $\mu\text{M}$ ) presentes em sobrenadantes de macrófagos pré-tratados ou não com IGF-I e incubados por 48 horas com *M. leprae* 50:1 ou IFN- $\gamma$  (10ng/mL). O valor da concentração de nitrito na cultura controle foi ajustado para 1 unidade. Test-t \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0.001$ . Cada ponto no gráfico representa um animal. .

#### 4.7 Macrófagos RAW 264.7 tratados com *M.leprae* ou IGF-I induzem um aumento na produção de prostaglandina E<sub>2</sub>.

A prostaglandina E<sub>2</sub>, derivada de ácido araquidônico, está relacionada a modulação de várias atividades dos macrófagos, e particularmente na produção de óxido nítrico. Nesta última etapa do trabalho nos perguntamos se, no nosso modelo, o IGF-I per se e as micobactérias induzem a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW. Para tal, as células foram estimuladas por 48 h e os sobrenadantes das culturas coletados para quantificação de PGE<sub>2</sub> por EIA específica. Na Figura 17 podemos observar que tanto IGF-I como BCG foram capazes de induzir PGE<sub>2</sub> de forma significativa. Os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos em resposta ao *M. leprae* chegaram ao limiar de significância (p=0,0664). Nestes experimentos também avaliamos se o pré-tratamento dos macrófagos com IGF-I, antes da estimulação com as micobactérias, alterava os valores de PGE<sub>2</sub> produzidos, contudo as diferenças observadas não foram significativas.



**Figura 17. IGF-I e micobactérias induzem a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW.** Gráfico mostrando os níveis de de PGE<sub>2</sub> em sobrenadantes de macrófagos pré-incubados ou não com IGF-I e tratados com *M. leprae* (50:1), *M. bovis* BCG (50:1), *M. smegmatis* (50:1) e IFN- $\gamma$  (10 ng/mL). Test-t \* p < 0,05. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão de um total de 3 experimentos realizados em duplicatas.

## 5.1 Discussão

Os macrófagos são células do sistema imune que desempenham papel fundamental na defesa contra microorganismos patogênicos. Estas células expressam um conjunto de receptores capazes de reconhecer estes microorganismos promovendo sua fagocitose e ativação de mecanismos microbicidas que podem levar à eliminação do patógeno (revisito por Gordon, *et al.*, 2007).

Dentre os principais mecanismos microbicidas dos macrófagos está a produção de NO catalizada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cuja importância na eliminação de micobactérias patogênicas foi demonstrada de forma consistente no modelo experimental murino (MacMicking *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2000 e Cooper *et al.*, 2002). A expressão desta enzima é classicamente induzida pela citocina IFN- $\gamma$ , produzida por linfócitos Th1 ativados em resposta a patógenos intracelulares como as micobacterias e que desempenham papel central no controle da infecção (revisito por Kaufmann, 2002).

As micobactérias patogênicas são capazes de subverter a função microbicida dos macrófagos e sobreviver e se multiplicar no interior destas células. Estas bactérias parecem se utilizar de vários mecanismos para colonizar com sucesso os macrófagos. As micobactérias são, por exemplo, capazes de inibir a fusão do fagossoma ao lisossoma, evitando assim a acidificação da vesícula contendo o patógeno e sua exposição a enzimas hidrolíticas, favorecendo sua sobrevivência (revisito por Rodhe *et al.*, 2007; Ehrt e Schnappinger, 2009). Os macrófagos infectados com *M. leprae* também se mostram funcionalmente alterados e incapazes de serem ativados por IFN- $\gamma$  (Sibley e Krahenbuhl, 1988). Contudo, os mecanismos moleculares responsáveis pela modulação negativa exercida pelo *M. leprae* sobre a função efetora dos macrófagos foram até hoje pouco esclarecidos. No presente trabalho levantamos a hipótese de que o IGF-I produzido pela célula infectada poderia, numa ação autócrina e parácrina, contribuir para a regulação negativa da ativação macrofágica favorecendo a infecção pelo *M. leprae*. Nosso trabalho buscou avaliar um possível efeito

imunomodulador do IGF-I focando no efeito deste hormônio sobre a geração de espécies reativas de nitrogênio produzido pelos macrófagos em resposta à infecção. Para atingir este objetivo, experimentos *in vitro* foram realizados utilizando como célula hospedeira a linhagem macrófaga murina RAW 264.7, um excelente modelo largamente empregado em estudos de produção de NO.

Inicialmente caracterizamos nosso modelo de infecção, observando o grau de associação e aspectos morfológicos da célula RAW estimulada com *M. leprae*. Ao longo de todo nosso trabalho os efeitos do *M. leprae* foram comparados com o de outras duas espécies de micobactérias, o BCG, uma cepa atenuada de *M. bovis*, e o *M. smegmatis*, uma micobactéria avirulenta incapaz de causar doença em humanos (Martino et al, 2005). Esta comparação foi realizada com a finalidade de tentar identificar características que se correlacionassem com a virulência da espécie estudada e que potencialmente contribuam, assim, para sua patogenia. Utilizando uma proporção de 50 bactérias por célula, aproximadamente todas as células da cultura apresentavam bactérias internalizadas com 48 horas de cultura. Uma análise morfológica das culturas após este tempo de incubação mostrou a capacidade de *M. smegmatis*, em maior grau, seguida pelo BCG e finalmente pelo *M. leprae* em ativar os macrófagos, corroborando dados da literatura que indicam que a fagocitose de micobactérias patogênicas se dá de forma mais silenciosa, induzindo uma ativação pelos macrófagos menos acentuada quando comparada com espécies avirulentas (Silver et al, 1998).

No primeiro segmento do nosso trabalho nos preocupamos em analisar se o *M. leprae* era capaz de induzir a secreção de IGF-I por macrófagos *in vitro*. Verificamos que o *M. leprae* é capaz de induzir a produção deste hormônio, observando-se um efeito semelhante quando as células foram estimuladas com BCG. Já *M. smegmatis* foi incapaz de induzir IGF-I nas condições utilizadas. Como já é descrito, a regulação gênica de IGF-I é classicamente regulada em macrófagos (Nagaoka et al, 1990), também avaliamos os níveis de RNAm para IGF-I após 48 h de tratamento das culturas com as micobactérias, observando uma tendência de aumento somente nas culturas estimuladas com *M. leprae*. Este resultado pode ser justificado pelo tempo tardio utilizado para análise da

expressão de RNAm. Talvez no tempo de 48 horas já não seja mais possível observar o aumento da expressão de IGF-I, em macrófagos tratados com BCG. Sendo assim, se faz necessária uma análise das taxas de transcrição em tempos mais precoces de estímulo com as micobactérias para obter resultados mais definitivos. Contudo, é importante destacar que o *M. smegmatis* foi incapaz de induzir a expressão de IGF-I nas condições analisadas, sugerindo que esse efeito só é característico de espécies patogênicas de micobactérias.

Previamente nosso grupo já havia demonstrado que o *M. leprae* é capaz de induzir a secreção de IGF-I em células de Schwann através de um aumento na taxa de transcrição gênica (Rodrigues et al, 2009). Contudo, diferente do que ocorreu nos macrófagos, nas células de Schwann, este efeito parece ser mais seletivo, observando-se esta indução unicamente nas células estimuladas com essa bactéria e não em células estimuladas com BCG. Nesse trabalho foi demonstrado que a indução de IGF-I pelo *M. leprae* em células de Schwann promove a sobrevivência da célula hospedeira diante de estímulos anti-apoptóticos como a remoção de soro, permitindo, assim, ao patógeno, preservar um nicho adequado para sua persistência no hospedeiro.

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, dados recentes do nosso grupo mostram expressão marcante de IGF-I em macrófagos com alta taxa de infecção presentes em lesões de pele de indivíduos com a forma lepromatosa da hanseníase (Rodrigues, L. dados não publicados). Este dado sugere que a capacidade do *M. leprae* de induzir IGF-I nos macrófagos RAW *in vitro* se reproduz *in vivo* durante o curso natural da hanseníase em humanos. Trabalhos realizados no início da década de noventa mostraram que macrófagos presentes em sítios inflamatórios constituem fontes importantes de IGF-I (Rom et al, 1988, Rom e Paakko, 1991). O IGF-I produzido pelos macrófagos teria importante papel no reparo tecidual em situações fisiológicas, assim como na fibrose observada em processos patológicos através do aumento da proliferação de fibroblastos e produção excessiva de colágeno pelos mesmos (Nagaoka, 1990; Wynes et al, 2003). Esse hormônio, também produzido por macrófagos, tem sido,

implicado na patogenia de doenças pulmonares intersticiais como a fibrose pulmonar idiopática (Homa et al, 1995).

Compreender o mecanismo utilizado pelas micobactérias para induzir IGF-I em macrófagos, incluindo a possível participação de mediadores inflamatórios, é uma questão relevante que merece ser explorada futuramente. Os mecanismos que regulam a expressão de IGF-I pelos macrófagos ainda são pouco conhecidos (Wynes, 2003). Dentre os fatores que estimulam a produção de IGF-I por macrófagos estão o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE-2 (Noble et al, 1993; Furnier et al, 1995). Todos estes mediadores são produzidos pelos macrófagos em resposta ao *M. leprae* (Sibley e Krahenbuhl, 1988; Suzuki et al, 1993) e poderiam, assim, estar envolvidos na indução de IGF-I por este microorganismo. Já os interferons (alfa/beta e gama) constituem fortes inibidores da expressão de IGF-I pelos macrófagos (Arkins et al, 1995 e Chacko et al, 2002).

Vendrame, et al 2005 demonstraram que em macrófagos pré-tratados com IGF-I e infectados com *L. amazonensis* houve um favorecimento no crescimento e desenvolvimento desse protozoário, estando esse fato diretamente relacionado com uma significativa diminuição da produção de óxido nítrico e de iNOS por essas células, provavelmente promovido pelo IGF-I. Baseados nestes dados, e no fato de que *M. leprae* tem a capacidade de induzir o aumento desse fator de crescimento em macrófagos, buscamos avaliar o papel do IGF-I na infecção micobacteriana. Passamos, então, a investigar se o IGF-I poderia modular negativamente a função dos macrófagos, avaliando o seu efeito na indução da enzima iNOS e conseqüente produção de NO em resposta à micobactérias. Para isso, inicialmente caracterizamos a produção de NO induzida pelas diferentes espécies de micobactérias no nosso modelo de infecção. Nossos resultados mostram que o *M. leprae*, mesmo na proporção de 100 bactérias por célula, não foi capaz de induzir significativamente a produção de NO em células estimuladas por 48 h. Isso se justifica pela ausência de indução da enzima iNOS por esta micobactéria. Só foi observada produção de NO pelos macrófagos RAW 264.7 após 72 h de estimulação com *M. leprae*. No entanto, verificamos também uma diminuição significativa do número de células viáveis neste tempo de incubação, o

que nos levou a optar pelo tempo de incubação de 48 horas nos ensaios subsequentes.

Já nas células estimuladas com BCG e *M. smegmatis* foi possível constatar um significativo aumento de iNOS assim como da produção de NO. Além disso, a viabilidade dos macrófagos no tempo de 48 horas também se mostrou favorável no estímulo com essas micobactérias (dados não mostrados). Estes dados estão de acordo com a literatura que indicam que BCG e *M. smegmatis* são capazes de ativar os mecanismos microbicidas dos macrófagos, induzindo um aumento significativo na produção de intermediários de nitrogênio e permitindo a fusão fagolisossomal (revisto por Ehrt e Schnappinger, 2009). Por outro lado, a baixa capacidade do *M. leprae* de induzir a produção de NO em células RAW já havia sido descrita em trabalho anterior (Park, et al 1994).

Passamos, então, a investigar o efeito da adição exógena de IGF-I sobre a produção de NO induzida pelas diferentes micobactérias nas condições experimentais estabelecidas. Foi possível constatar que a produção de NO caiu significativamente em macrófagos pré-tratados com IGF-I em todas as situações estudadas, inclusive nas células controle onde os a produção basal foi reduzida significativamente mesmo na presença de *M. leprae*. A redução na produção de NO teve uma correlação direta com a expressão da enzima iNOS que também se mostraram reduzidos nas células pré-tratadas com IGF-I. Interessantemente, nos macrófagos estimulados com BCG e *M. smegmatis* foi possível observar que o NO produzidos nas células pré-tratadas foram reduzidos praticamente ao basal, indicando que o IGF-I exógeno foi capaz de bloquear a geração de radicais livres em resposta às micobactérias.

Embora nosso conhecimento sobre a regulação recíproca entre a produção de NO e IGF-I em macrófagos ainda esteja insipiente, estudos recentes na lesão hepática durante o quadro de sépsis indicam uma inibição recíproca e direta entre ambos. Na sépsis provocada por bactérias Gram negativas, o lipopolissacarideo (LPS), ou endotoxina, é responsável pelas principais alterações fisiológicas observadas, dentre estas, um aumento nos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias e um concomitante decréscimo de IGF-I circulante, este último

essencialmente produzido pelos hepatócitos. Um estudo recente mostrou que a inibição da expressão de IGF-I por hepatócitos induzida por LPS é mediada principalmente pelo NO produzido em consequência da indução de iNOS pelo LPS (Priego et al, 2004; Priego et al, 2006). Por outro lado, estudos *in vivo* mostram que a administração de IGF-I em ratos desafiados com LPS e D-galactosamina inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias, assim como a expressão de iNOS no fígado, reduzindo a injúria tecidual (Hijikawa et al, 2008).

Macrófagos são ativados geralmente em resposta a citocinas, com destaque especial para IFN- $\gamma$  que desempenha um papel crítico na eliminação de patógenos intracelulares e controle das infecções causadas por micobactérias (revisito por Kaufmann, 2002). Numa etapa seguinte, fomos avaliar a capacidade do IGF-I de bloquear a produção de NO induzida por IFN- $\gamma$  em células RAW. Os nossos resultados mostram que o IGF-I foi capaz de inibir parcialmente esta produção, sugerindo que este hormônio é capaz de tornar os macrófagos menos sensíveis à ação de IFN- $\gamma$ . Dentro do nosso conhecimento, este é o primeiro relato indicando uma possível atenuação pelo IGF-I dos efeitos ativadores de IFN- $\gamma$  sobre macrófagos.

Já havia sido demonstrado previamente que IFN- $\gamma$  regula negativamente a expressão de IGF-I em macrófagos murinos agindo na sinalização intracelular dependente de STAT-1 (Arkins et al, 1995), mas não existe relato na literatura sobre possíveis efeitos negativos do IGF-I sobre o IFN- $\gamma$ . Também a interferência recíproca entre o IGF-I e citocinas inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  vem sendo descrita na literatura no contexto de diferentes tecidos incluindo o sistema nervoso central onde a produção de IGF-I está relacionada com a prevenção da injúria tecidual (Connor et al, 2008).

Prostanóides como PGE<sub>2</sub> possuem papel imunomodulador inibitório (Snyder et al, 1982). Dados da literatura evidenciam que altas concentrações de PGE<sub>2</sub> possuem um significativo efeito imunossupressor, promovendo uma diminuição na proliferação de linfócitos, diminuição da atividade de células “natural killer”, diminuição na expressão de MHC II e desativação de macrófagos (Philips et al, 1991; Goto et al, 1983; Edwards et al, 1986). PGE<sub>2</sub> é produzida

majoritariamente por macrófagos, e vários estudos têm evidenciado que este prostanóide age como um inibidor da atividade citolítica de macrófagos ativado com IFN- $\gamma$  ou LPS (Snyder et al, 1982). Dados recentes indicam que o PGE<sub>2</sub> é preferencialmente sintetizado em organelas denominadas de corpúsculos lipídicos (D'Avila et al, revisto por Bozza et al, 2009)

Sibley e Krahenbuhl, 1988 relataram a participação de PGE<sub>2</sub> como mediador da desativação funcional de macrófagos infectados com *M. leprae*. A capacidade de PGE<sub>2</sub> de induzir a síntese de IGF-I em macrófagos foi previamente observada (Furnier et al, 1995). Por sua vez, a indução de PGE<sub>2</sub> promovida por IGF-I havia sido descrita apenas em células tumorais de ovário (Cao et al, 2007).

Na última etapa do nosso trabalho avaliamos a capacidade de IGF-I induzir a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW, assim como um possível efeito aditivo do IGF-I na indução de PGE<sub>2</sub> observada em resposta às micobactérias. Nossos resultados mostraram um aumento significativo na produção de PGE<sub>2</sub> por células RAW tratadas com IGF-I, sugerindo que, à semelhança do observado em células tumorais (Cao et al, 2007), o IGF-I é capaz de modular positivamente a produção deste prostanóide em macrófagos. Da mesma forma, BCG e *M. leprae*, mas não *M. smegmatis*, induziram um aumento na produção de PGE<sub>2</sub>. Estes resultados estão de acordo com dados recentemente publicados indicando que BCG e *M. leprae*, mas não *M. smegmatis*, induzem a formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos (D'Avila et al, 2006; Mattos et al., 2009). Contudo, o pré-tratamento das células com IGF-I não alterou de forma significativa a produção de PGE<sub>2</sub> induzidos por BCG e *M. leprae*. Uma possível explicação para este resultado é que o IGF-I endógeno produzido em resposta a estas micobactérias já seria suficiente para estimular a produção de PGE<sub>2</sub> a valores máximos nas células infectadas. Experimentos futuros incluindo anticorpos neutralizantes contra IGF-I, assim como inibidores da biossíntese de PGE<sub>2</sub>, podem ajudar a esclarecer a possibilidade do IGF-I estar atuando via indução de PGE<sub>2</sub>, ou vice-versa, no bloqueio da produção de NO em macrófagos infectados com micobactérias.

Resumindo, os dados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que micobactérias patogênicas, ao contrario de espécies saprófitas, são capazes de induzir a produção de IGF-I em macrófagos infectados. Nossos resultados também permitem especular que o IGF-I produzido localmente pelos macrófagos infectados desempenhe um papel importante na patogenia destes microorganismos, regulando negativamente a resposta imune inata e favorecendo, assim, a persistência da infecção no hospedeiro.

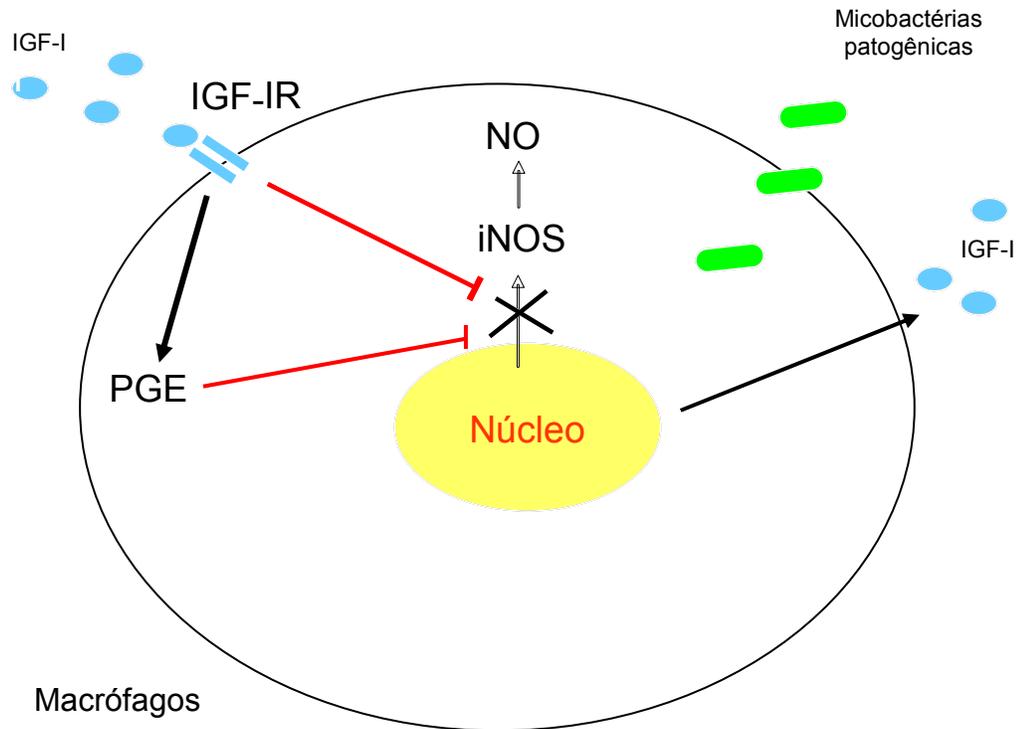
Esta hipótese é reforçada por dados recentemente gerados a partir da análise de diferentes aspectos das lesões de pele de pacientes com hanseníase. A abundância de macrófagos com aspecto espumoso (também denominados de células de Virchow) decorrente do acúmulo de lipídeos é uma característica marcante das lesões de pacientes com hanseníase lepromatosa (Virchow, 1863; Ridley, 1974). Um trabalho recente do nosso grupo mostrou que pelo menos parte destes lipídeos se encontra acumulado em corpúsculos lipídicos (Mattos et al., 2009) corroborando os dados de Kiszewski et al., 2003 que demonstraram significativa expressão de COX-2, enzima envolvida na biossíntese de eicosanóides, particularmente de PGE<sub>2</sub>, em lesões lepromatosas. Também, como já mencionado anteriormente, estes macrófagos expressam níveis marcantes de IGF-I (Rodrigues, L., dados não publicados).

O fenótipo dos macrófagos presentes na lesão lepromatosa aproxima-se, assim, daquele descrito para macrófagos chamados de M2. Esta via alternativa de ativação/diferenciação dos macrófagos é favorecida num microambiente onde TNF- $\alpha$  está presente e IFNs estão ausentes, o que leva à indução da produção de IGF-I pelo macrófago (revisado por Winston et al., 1999). Esta via é também favorecida pelas citocinas IL-4 e IL-13 que igualmente induzem a produção de IGF-I pelos macrófagos (revisado por Martinez et al., 2009), estando de acordo com o perfil de citocinas Th2 predominante nas lesões lepromatosas (revisado por Sieling e Modlin, 1994). Os macrófagos M2 são efetivos no controle de patógenos extracelulares, mas ineficazes contra patógenos intracelulares como as micobactérias, ao contrario dos macrófagos M1 que resultam da via clássica de ativação onde o IFN- $\gamma$  desempenha papel central. A via alternativa de ativação

diminui as propriedades microbicidas dos macrófagos, aumenta a produção de IL-10 e TGF- $\beta$ , favorece a endocitose de ligantes manosilados e antagoniza a resposta induzida por LPS e IFN- $\gamma$  (Wynes et al, 2003; revisto por Martinez et al., 2009).

Pouco ainda se conhece sobre o papel do IGF-I na fisiologia dos macrófagos, principalmente da sua função na resposta inflamatória em processos infecciosos. Contudo, no contexto de infecções micobacterianas este hormônio parece ser um componente com todos os pré-requisitos funcionais para a manutenção de um nicho favorável à moradia desses microorganismos. Além de fortalecer a idéia de que os macrófagos infectados com *M. leprae* caminham para a via alternativa de diferenciação, nossos dados sugerem que a capacidade do *M. leprae* de induzir IGF-I contribui para esta diferenciação. O esquema abaixo resume os possíveis mecanismos de participação do IGF na interação macrófago-micobacterias patogênicas. Micobactérias não patogênicas estimulam a expressão de iNOS e conseqüentemente a produção de NO, favorecendo a eliminação do patógeno pela célula hospedeira. Contudo micobactérias patogênicas tem a capacidade de modular essa resposta e sobreviver dentro do hospedeiro. Nosso trabalho demonstrou que *M. leprae* e BCG têm a capacidade de induzir a produção de IGF-I em macrófagos murinos, podendo agir nessas células de forma parácrina ou autócrina. Nossos dados também demonstraram que o IGF-I promoveu uma diminuição significativa da produção de NO e da expressão de iNOS em macrófagos estimulados com micobactérias, contudo o *M. leprae* não é capaz de induzir a produção de iNOS, promovendo um aumento significativo da produção de IGF-I em macrófagos murinos. Além disso, nesse trabalho foi demonstrado que IGF-I foi capaz de induzir o aumento na produção de PGE<sub>2</sub>, um mediador lipídico com papel antiinflamatório nas infecções micobacterianas e conhecido inibidor da expressão de iNOS. Assim, a regulação negativa de NO pelo IGF-I poderia ocorrer através do aumento da produção de PGE<sub>2</sub>. Além disso, nossos resultados também apontam para um papel inibitório do IGF-I sobre a produção de NO em resposta a antígenos micobacterianos e ao IFN- $\gamma$ . Finalmente, conforme descrito previamente, o IGF-I pode estimular a produção de IL-10 por

células T (Kooijman e Coppens, 2004), contribuindo para a manutenção de um perfil inflamatório Th2 e favorecendo a permanência do bacilo na célula hospedeira.



**Figura 18.** Esquema mostrando a indução de IGF-I por micobactérias patogênicas em macrófagos infectados e os possíveis efeitos anti-microbicidas deste hormônio através da inibição da expressão de iNOS e indução da produção de PGE-2.

## 6. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que:

1. *M. leprae* e BCG induzem a produção de IGF-I em macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7. O mesmo não foi observado em relação ao *M. smegmatis*, uma espécie de micobactéria avirulenta;
2. *M. bovis* BCG e *M. smegmatis* estimulam a produção de NO e a expressão de iNOS em macrófagos RAW, diferente do *M. leprae* que não foi capaz de induzir esse aumento tanto em macrófagos RAW quanto em macrófagos primários murinos;
3. O pré-tratamento de macrófagos RAW com IGF-I inibe a produção de NO e a indução da enzima iNOS em resposta ao BCG e *M. smegmatis*.
4. IGF-I foi capaz de inibir parcialmente a produção de NO em macrófagos tratados com IFN- $\gamma$ ;
5. IGF-I, à semelhança do *M. leprae* e BCG, estimulou a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos RAW 264.7.

Em conjunto, estes resultados sugerem a participação de IGF-I na resposta do hospedeiro à micobactérias, com potencial contribuição para a patogênia destes microorganismos através da inibição da geração de radicais reativos de nitrogênio e conseqüente favorecimento de sua sobrevivência e persistência no hospedeiro.

## 7. Perspectivas

Como próximas etapas para complementação deste trabalho pretendemos realizar os seguintes ensaios:

1. Bloqueio de receptor de IGF-I e análise da produção de óxido nítrico e da expressão de iNOS pelos macrófagos na infecção com *M. leprae*;
2. Análise do papel do receptor Toll-like 2 na resposta ao *M. leprae* (micobactérias) e na produção de IGF-1, uma vez que TLR2 é responsável pelo reconhecimento de antígenos micobacterianos;
3. Análise do efeito do IGF-I em macrófagos primários estimulados com BCG e *M. smegmatis*;
4. Avaliação das citocinas envolvidas no mecanismo de modulação da resposta microbicida, na presença ou ausência de IGF-I, preferencialmente IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ ;
5. Avaliação se ocorre aumento na sobrevivência e viabilidade do *M. smegmatis* em macrófagos pré-tratados com IGF-I;
6. Análise das vias de sinalização de IGF-I em macrófagos envolvidas na resposta a infecção por *M. leprae*. Possíveis vias: JAK/STAT1, MAPK (ERK1 e 2), AKT-PI3K, lembrando que IFN- $\gamma$  também utiliza via JAK/STAT na ativação macrofágica;

7. Análise comparativa da colocalização da enzima iNOS com *M. leprae* vivo e *M. leprae* morto por imunocitoquímica, e participação do IGF-I nesse mecanismo.

Relação do balanço de expressão Arginase X iNOS, pois competem pelo mesmo substrato, a L-arginina. Possível mecanismo de modulação pelo IGF na via de ativação alternativa de macrófagos.

## Bibliografia

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*, 7<sup>a</sup> edition. *Saunders Elsevier*.

Adams, L.B., Gillis, T.P., Hwang, D.H., Krahenbuhl, J.L. (1997). Effects of essential fatty acid deficiency on prostaglandin E2 production and cell-mediated immunity in a mouse model of leprosy. *Infect. Immun.* 65, 1152-1157.

Adams, L.B., Job. C.K., Krahenbuhl, J.L. (2000). Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* in mice. *Infect Immun.* 68(9):5462-5.

Arkins, S., Rebeiz, N., Brunke-Reese, D.L., Biragyn, A., Kelley, K.W. (1995). Interferon- $\gamma$  Inhibits Macrophage Insulin-Like Growth Factor-I Synthesis at the Transcriptional Level *Mol. Endocrinol.* 9, 350–360.

Brennan, P.J., Nikaido, H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.*;64:29-63.

Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T., Brennan, P.J., Bloom, B.R., Godowski, P.J., Modlin, R.L., (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 30:732-6.

Britton, W. J., Lockwood, D. O. N., (2004). Leprosy. *Lancet* 363:1209–1219.

Bozza, P.T., Magalhães, K.G., Weller, P.F. (2009). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1791(6):540-51. Epub 2009 Jan 21. Review.

Cao, F., Castrillo, A., Tontoz, P., Re, F., Byrne, G. I. (2007). *Chlamydia pneumoniae*-Induced Macrophage Foam Cell Formation is Mediated by Toll-Like Receptor 2. *Infect. Immun.* 75, 753-759.

Chacko, M. S., and Adamo, M. L. (2002). Double-Stranded RNA Decreases IGF-I Gene Expression in a Protein Kinase R-Dependent, but Type I Interferon Independent, Mechanism in C6 Rat Glioma Cells *Endocrinology* 143, 525–534

Cole, S. T., (1998). Comparative mycobacterial genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:567–571.

Cole, S.T., Elgmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honoré, 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., McLean, J., Muole, 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., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R. & Barrell, B.G. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 409, 1007-1011.

Connor, J.C.O. McCusker, R.H. Strle, K. Johnson, R.W. Dantzer, R. Kelley, K.W. (2008). Regulation of IGF-I function by proinflammatory cytokines: At the interface of immunology and endocrinology. *Cellular Immunology* 252: 1-2.

Cooper, A.M., Adams, L.B., Dalton, D.K., Appelberg, R., Ehlers, S. (2002). IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 10(5):221-6.

Coura, J. R. (2005). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Vol. 2 *Guanabara Koogan.* Pg 1383-1390.

D'Avila, H., Melo, R.C., Parreira, G.G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T. (2006). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces

TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis *in vivo*. *J Immunol.* 176(5):3087-97.

Davis, A.S. Vergne, I. Master, S.S. Kyei, G.B. Chua, J., Deretic, V. (2007). Mechanism of Inducible Nitric Oxide Synthase Exclusion from Mycobacterial Phagosomes. *PLoS Pathog* 3(12): e186. doi:10.1371/journal.ppat.0030186

Ding, A. H., Nathan, C. F. & Stuehr, D. J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immun.*, 141, 2407-2412.

Douglas, R.G., Shaw, J.H.F. (1989). Metabolic response to sepsis and trauma. *British Journal of Surgery* 76 115–122.

Denley, A., Cosgrove, L.J., Booker, G.W., Wallace, J.C., Forbes, B.E. (2005). Molecular Interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16(4-5):421-39.

Edwards, C.K., Hedegaard, H.B., Zlotnik, A. Gangadharam P.R., Johnston R.B. Jr, Pabst M.J., (1986). Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E<sub>2</sub> and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon- $\gamma$  *J Immunol*; 136: 1820–7.

Ehrt, S., Schnappinger, D., (2009). Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol.* 11(8):1170-8.

Fabrino, L.D., Bleck, C.K.E., Anes, E., Hasilik, A., Melo, R.C.N., Niederweis, M., Griffiths, G., Gutierrez, M.G. (2009). Porins facilitate nitric oxide-mediated killing of mycobacteria. *Microbes and Infection* xx 1-8.

Fournier, T., Riches, D.W., Wiston, B.W., Rose, D.M., Yong, S.K., Noble, P.W., Lake, F.R., Henson, P.M. (1995). Divergence in macrophage insulin-like growth factor-I (IGF-I) synthesis induced by TNF-alpha and prostaglandin E2. *J. Immunology*. 15;155(4):2123-33.

Fukutomi, Y. (2004). Functional changes of macrophages in Hansen's disease. generation. *Infect. Immun*. 51:514–520.

Gomes, C.M., Goto, H., Ribeiro Da Matta, V.L., Laurenti, M.D., Gidlund, M., Corbett, C.E. (2000). Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*. 81(4):249-55.

Gordon, S. (2007). The Macrophage: Past, present and future. *Eur. J. Immunol*. 37: S9-17.

Goto, T.R., Herberman, R.B., Maluish, A. (1983). Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol*; 130: 1350–5.

Goulart, I.M.B. Penna, G.O., Cunha, G. (2002). Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. vol.35 no.4

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L. Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126:131-138

Hagge, D.A., Ray, N.A., Krahenbuhl, J.L., Adams, L.B. (2004). An *in vitro* model for the lepromatous leprosy granuloma: fate of *Mycobacterium leprae* from target macrophages after interaction with normal and activated effector macrophages. *J. Immunol*. 172:7771–7779.

Heldwein, K.A., Fenton, M.J. (2002). The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes and Infection*. 4. 937–944

Hijikawa, T., Kaibori, M., Uchida, Y., Yamada, M., Matsui, K., Ozaki, T., Kamiyama, Y., Nishizawa, M., Okumura, T. (2008). Insulin-like growth factor 1 prevents liver injury through the inhibition of TNF-alpha and iNOS induction in D-galactosamine and LPS-treated rats. *Shock*. 29(6):740-7.

Homma, S., I. Nagaoka, I., Abe, H., Takahashi, K., Seyama, K., Nukiwa, T., Kira, S. (1995). Localization of platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor I in the fibrotic lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 152:2084.

Hunter, S.W., Fujiwara, T., Brennan, P.J. (1982). Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 257(24):15072-8.

Hwang, S.M., Chen, C.Y., Chen, S.S., Chen, J.C. (2000). Chitinous Materials Inhibit Nitric Oxide Production by Activated RAW 264.7 Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 229–233

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

Kaufmann, S.H. (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis*. 61 Suppl 2:ii54-8.

Kim, B. J., Lee, S. H. Lyu, M. Kim, S. J. Bai, G. H. Kim, S. J. Chae, G. T. Kim, E. C. Cha, C. Y. Kook, Y. H. (1999). Identification of Mycobacterial Species by

Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*) J. of Clinical Microbiology p. 1714–1720

Kiszewski, A.E.C, Becerril, E., Baquera, J., Ruiz-Maldonado, R., Hernandez Pando, R. (2003). Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br. J. Dermatol.* 148, 795-798.

Kirschning, C.J., Schumann, R.R. (2002). TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol Rev.* 270:121-44.

Kooijman, R., Coppens, A. (2004). Insulin-like growth factor-I stimulates IL-10 production in human T cells. *J. Of Leucocytes Biology.* 76 10.1189

Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E. (1971). Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 39(3):693-702.

Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M.T., Liu, P.T., Sharfstein, S.E., Graeber, T.G., Sieling, P.A., Liu, Y.J., Rea, T.H., Bloom, B.R., Modlin, R.L. (2005). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11:653–660.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity *Biochem. Biophys. Res. Commun*, doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.062

Laue, L., Pizzo P. A., Butler K., Cutler, G.B. Jr. (1990). Growth and neuroendocrine dysfunction in children with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Pediatr.* Oct;117(4):541-5.

Long, R., Ligth, B., Talbot, J.A. (1999). Mycobacteriocidal Action of Exogenous Nitric Oxide Antimicrobial agents and chemotherapy, 0066-4804/99/\$04.0010 p. 403–405

Liu, J., Tran, V., Leung, A.S., Alexander, D.C., Baoli, Z. (2009). BCG vaccines: Their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* 5:2, 70-78; February 2009

MacMicking, J., Qiao-wen Xie, Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunology* 15:323–50

Martinez, F.O., Helming, L., Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27:451–83

Martino, A., Sacchi, A., Volpe, E., Agrati, C., De Santis, R., Pucillo, L. P., Colizzi, V Vendeti, S., (2005). Non-Pathogenic *Mycobacterium smegmatis* Induces the Differentiation of Human Monocytes Directly into Fully Mature Dendritic Cells *Journal of Clinical Immunology, Vol. 25, No. 4* DOI: 10.1007/s10875-005-4188-x

Matsuoka, T., Narumya, S. (2008). The roles of prostanoids in infection and sickness behaviors. *J. Infec. Chemother.* 14(4):270-8

Mattos, K.A., D'Avila, H., Rodrigues, L.S., Oliveira, V.G.C., Sarno, E.N., Bozza, P.T., Pessolani, M.C.V. (2009). Lipid droplet formation in Leprosy: Toll-like Receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis (Submitted).

Mosmann, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 16;65(1-2):55-63.

Moura, A.C. M., Mariano, M. (1996). Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall are endowed with an anti-inflammatory property and inhibit macrophage function in vivo. *Immunology* 1996 89 613-618.

Mynarcik, D.C., Frost, R.A., Lang, C.H., DeCristofaro, K., McNurlan, M.A., Garlick, P.J., Steigbigel, R.T., Fuhrer, J., Ahnn, S., Gelato, M.C. (1999). Insulin-like growth factor system in patients with HIV infection: effect of exogenous growth hormone administration. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 22(1):49-55.

Nagaoka, I., Trapnell, B. C., Crystal, R.G. (1990). Regulation of insulin-like growth factor I gene expression in the human macrophage-like cell line U937. *J. of Clinical Invest.* 1990 Feb;85(2):448-55.

Neill, M.A., Klebanoff, S.J. (1988). The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J Exp Med.*167(1):30-42.

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

Noble, W.C. (1993). Gram-negative bacterial skin infections. *Semin Dermatol.* 12(4):336-41.

Park, S.D., Lee, J.S., Lee, B.S., Jun, C.D., Chung, H.T., Kim, J.G. (1994). Effects of *Mycobacterium leprae*, *M .leprae* Phenolic Glycolipid - 1 and Cytokines on the Nitric Oxide Generation of RAW 264.7 Macrophages. *Korean J Dermatol.* 1994 Apr;32(2):234-244.

Phipps, R.P., Stein, S.H., Roper, R.L. (1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today* 12:349–52.

Priego, T., Granado, M., Castellero, E., Martín, AI, Villanúa, M.A., López-Calderón, A. (2006). Nitric oxide production by hepatocytes contributes to the inhibitory effect of endotoxin on insulin-like growth factor I gene expression. *J Endocrinol.* 190(3):847-56.

Priego, T., Ibáñez de Cáceres, I., Martín, AI, Villanúa, M.A., López-Calderón, A. (2004). NO plays a role in LPS-induced decreases in circulating IGF-I and IGFBP-3 and their gene expression in the liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286(1):E506.

Ramasesh, N., Adams, L.B., Franzblau, S.G., Krahenbuhl, J.L. (1991). Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.* 59:2864–2869.

Remacle-Bonnet, M. M., Garrouste, F. L., Heller, S., Andre, F., Marvaldi, J. L., and Pommier, G. J. (2000). Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor alpha-induced mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappa B signaling pathways. *Cancer Res.* **60**, 2007–17.

Ridley, D. S. (1974). Histological classification and the immunological spectrum of leprosy *Bull World Health Organ.* **51**, 451-465.

Ridley, D.S., Jopling, W.H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Other Mycobact Dis.*;34(3):255-73.

Rohde, K., Yates, R.M., Purdy, G.E., Russell, D.G. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol Rev.* 219:37-54.

Rodrigues, L., Maeda, E., Elizabeth, M., Tempone, A.J., Lobato, L., Resende, V. T.R., Alves, L., Shaila, R., Ulisses, L., Pessolani, M.C.V. (2009). Mycobacterium leprae induces Insulin-Like Growth Factor and Promotes Survival of Schwann Cells upon serum withdrawal. (In press) *Cellular Microbiology*.

Rom, W.N., Basset, P., Fells, G.A., Nukiwa, T., Trapnell, B.C., Crystal, R.G. (1988). Alveolar Macrophages Release an Insulin-like Growth Factor I-Type Molecule. *The Journal of Clinical Investigation*, Inc. V. 82, 1685-1693

Rom, W.N., Paakko, P. (1991). Activated alveolar macrophages express the insulin-like growth factor-I receptor. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol.* 4(5):432-9.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. (1991) Serum levels, of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosyreactional states. *Clin Exp Immunol.* p;84(1):103-8.

Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A. (1991). Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* binds complement component C3 in serum and mediates phagocytosis by human monocytes. *J Exp Med.* 174(5):1031-8.

Schlesinger, L.S., Horwitz, M.A. (1994). A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun.* 62(1):280-9.

Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., Williams, D. L. (2006) The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 338-381.

Shepard, C.C., McRae, D.H. (1968). A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 36(1):78-82.

Sibley, L.D., S. G. Franzblau, S.G., Krahenbuhl, J.L. (1987). Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect. Immun.* 55:680–685.

Sibley, L.D., Krahenbuhl, J.L. (1988). Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 56(8):1912-9.

Sieling, P.A., Modlin, R.L. (1994). Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology.* 191(4-5):378-87. Review.

Snyder, D.S., Beller, D.I., Unanue, E.R. (1982). Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature*; 299: 163–5.

Suzuki K., Fukutomi, Y., Matsuoka, M., Torii, K., Hayashi, H., Takii, T., Oomoto, Y., Onozaki, K. (1993). Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with *Mycobacterium leprae* and *M. bovis* BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.*

Syroid, D.E., Zorick, T.S., Arbet-Engels, C., Kilpatrick, T.J., Eckhart, W., Lemke, G. (1999). A role for insulin-like growth factor-I in the regulation of Schwann cell survival. *J Neurosci.* 19(6):2059-68.

Truman, R.W., Krahenbuhl, J.L. (2001). Viable *Mycobacterium leprae* as a research reagent. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 69:1–12.

Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Venihaki, M., Margioris, A.N. (2006). Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(10):1654-61.

Underhill, D.M., Ozinsku, A., Smith, K.D., Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signals in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14459–14463.

Van der Veen, R.C. (2001). Nitric oxide and T helper cell immunity. *Int Immunopharmacol.* 1(8):1491-500.

Vendrame, C.M.V., Carvalho, M. D. T., Rios, F.J.O, Manuli, E.R., Petitto Assis, F., Goto, H. (2007). Effect of Insulin-like Growth Factor-I on *Leishmania amazonensis* Promastigote Arginase Activation and Reciprocal Inhibition of NOS2 Pathway in Macrophage *in vitro*. *Scandinavian Journal of Immunology.* 66, 287–29

Venters, H.D., Dantzer, R., Kelley, K.W. (2000). Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 917:210-20.

Virchow, R. (1863). *Die krankhaften Geschwülste*. August Hirschwald. Berlin, Germany. 208.

Vissa, V. D., and P. J. Brennan. (2001). The genome of mycobacterium leprae: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001;2(8):Reviews.

Wayne, L. G., and G. P. Kubica. (1986). The mycobacteria, p.1435-1457. *In* P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Winston, B.W., Krein, P.M., Mowat, C., Huang, Y. (1999). Cytokine-induced macrophage differentiation: a tale of 2 genes. *Clin Invest Med.* 22(6):236-55.

World Health Organization WHO Report (2009). Leprosy Today. Available from <http://www.who.int/lep/en/>

Wynes, M.W., Riches, D.W.H. (2003). Induction of Macrophage Insulin-Like Growth Factor-I Expression by the Th2 Cytokines IL-4 and IL-13<sup>1</sup> *J. Immunol.* 171, 3550–3559

Wynes, M.W., Riches, D.W.H (2005). Transcription of macrophage IGF-I exon 1 is positively regulated by the 5'-untranslated region and negatively regulated by the 5'-flanking region. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 288(6):L1089-98.

Young, D.B., Mehlert, A. (1989). Serology of mycobacteria: characterization of antigens recognized by monoclonal antibodies. *Rev Infect Dis.* 1989 11 Suppl 2:S431-5.