

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Parasitária

MYCOBACTERIUM LEPRAE E O EFEITO DO TNF- $\alpha$  NA  
ATIVACÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN HUMANAS

PRISCILA RIBEIRO ANDRADE

Rio de Janeiro  
2010

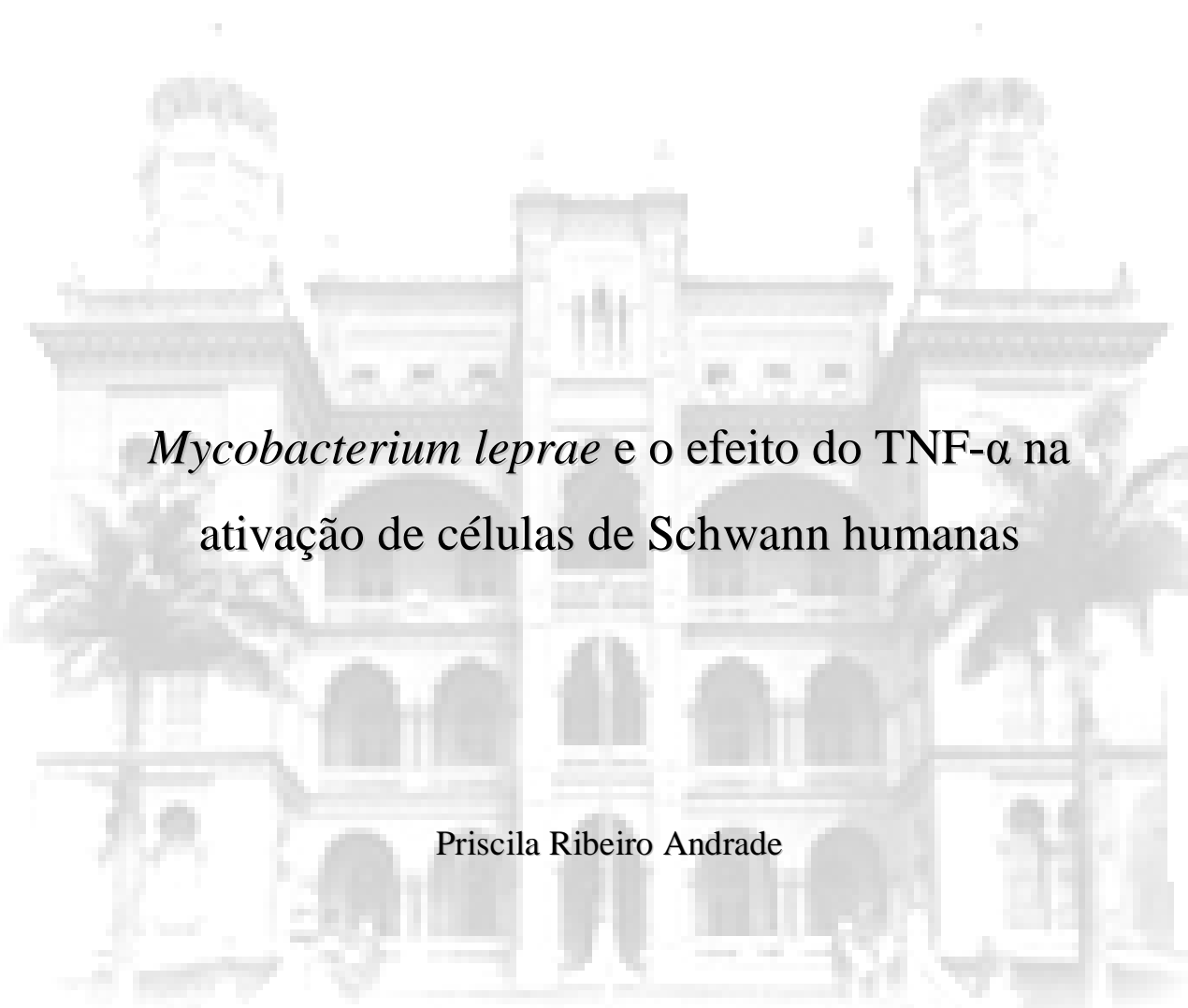
TESE MBP-IOC

P.R ANDRADE

2010

# Instituto Oswaldo Cruz

Mestrado em Biologia Parasitária

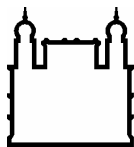


*Mycobacterium leprae* e o efeito do TNF- $\alpha$  na  
ativação de células de Schwann humanas

Priscila Ribeiro Andrade

Rio de Janeiro

2010



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz  
Pós Graduação em Biologia Parasitária

Priscila Ribeiro Andrade

*Mycobacterium leprae* e o efeito do TNF- $\alpha$  na ativação de células de  
Schwann humanas

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

**Orientadora:** Dra. Euzenir Nunes Sarno

Rio de Janeiro  
2010

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

A553

Andrade, Priscila Ribeiro.

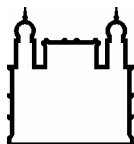
*Mycobacterium leprae* e o efeito do TNF- $\alpha$  na ativação de células de Schwann humanas / Priscila Ribeiro Andrade. – Rio de Janeiro, 2010.  
xxi , 81 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2010.

Bibliografia: f. 70-81

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Célula de Schwann. 3. TNF- $\alpha$ . 4. Lesão neural. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

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

Instituto Oswaldo Cruz

Pós Graduação em Biologia Parasitária

**Autora: Priscila Ribeiro Andrade**

*Mycobacterium leprae* e o efeito do TNF $\alpha$  na ativação de  
células de Schwann humanas

**Orientadora:** Dra. Euzenir Nunes Sarno

**Aprovada em:** 30/03/2010

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Miriam Cláudia de Souza Pereira (Presidente)**

Laboratório de Ultra-Estrutura Celular – Fundação Oswaldo Cruz

**Prof. Dra. Andréa Monte Alto Costa**

Laboratório de Reparo Tecidual - Universidade do Estado do Rio de Janeiro

**Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro (Revisora)**

Laboratório de Hanseníase – Fundação Oswaldo Cruz

**Prof. Dra. Susana Corte Real**

Laboratório de Biologia Estrutural - Fundação Oswaldo Cruz

**Prof. Dra Leila Chimelli**

Laboratório de Anatomia Patológica – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro  
2010

Á minha querida família:  
Meus pais Telma e Ayrton,  
Minha irmã Luisa,  
Meus irmãos André e Cosme,  
Meus avós Délia e Enéias,  
A Tainná e ao Pacco  
Em memória a minha avó Irma

## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e conforto nos momentos difíceis e minha fonte de esperança de dias melhores;

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram em mim;

Á minha irmã, minha melhor amiga;

Aos meus queridos irmãos André e Cosme, por enriquecerem minha vida;

Aos meus avós que sempre nos ajudaram nos momentos de necessidade;

Ao Pacco e Tainná por colocarem um sorriso no meu rosto todos os dias.

Amo muito todos vocês!

Á Dra Euzenir pela grande oportunidade e pela confiança que depositou em mim. Muito obrigada pelo seu apoio e pelo aprendizado que me proporcionou;

Á Tércia pelo prazer da sua convivência e pelo auxílio imprescindível durante o início do desenvolvimento desse trabalho;

Á Carol pela amizade e pelo apoio durante esses dois anos;

Ao Paulo, Thaís e Roberta pelo prazer da convivência e pela solicitude com que me ajudam;

Ao Rafael, Bruno Andrade, Ana Paula e Cintia pela amizade e alegria que fazem da sala 21 um local de trabalho super prazeroso;

Aos companheiros de laboratório da Hanseníase: Ariane, Danielle, Andressa, Paula, Bruno, Tatiana Silva, Tatiana Fulco, Daniel Serra, Daniel Pedrosa, Eliane, Rose, Sheila, Jô e Verônica.

Aos funcionários do laboratório de Hanseníase: Augusto, Daniel, Roberto, Cristiane, Helen, Paulo, e Solange.

A secretaria e coordenação da pós-graduação de Biologia Parasitária;

A minha orientadora de iniciação científica Dra Jacyara Macedo da UERJ cujas lições contribuíram para essa conquista;

Ás minhas ex-companheiras do laboratório de Biologia Molecular da UERJ. Tenho muitas saudades!

Enfim, gostaria de dedicar esse trabalho a todas essas pessoas que fizeram parte desta importante etapa da minha vida. Aos que me ajudaram não só nos aspectos práticos dessa

jornada, mas também àqueles que contribuíram para o meu crescimento pessoal. Se a cada dia de nossas vidas aprendemos alguma lição, por menor que seja, aproveito essa oportunidade para agradecer aos meus diversos professores.



Não te queixes da luta  
à qual nada se isenta.  
Tudo vive à procura  
De mais alta ascensão.  
A semente que brota,  
O verme que se arrasta...  
O pássaro do ninho,  
As estrelas do céu...  
Com o homem, não poderia  
Ser de modo diverso.  
Por mais lágrimas verta,  
Sem luta não cresce.

Carlos A. Baccelli.

# SUMÁRIO

<i>Assunto</i>	<i>Páginas</i>
<b><u>LISTA DE ABREVIATURAS</u></b> .....	<b><u>xiv</u></b>
<b><u>RESUMO</u></b> .....	<b><u>xx</u></b>
<b><u>ABSTRACT</u></b> .....	<b><u>xxi</u></b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b><u>1</u></b>
<b>1.1) HANSENÍASE</b> .....	<b><u>1</u></b>
1.1.1) Características Gerais .....	<b><u>1</u></b>
1.1.2) Agente Etiológico.....	<b><u>2</u></b>
1.1.3) Patogênese .....	<b><u>5</u></b>
<b>1.2) CÉLULAS DE SCHWANN</b> .....	<b><u>10</u></b>
1.2.1) Origem e função.....	<b><u>10</u></b>
1.2.2) <i>M. leprae</i> e as células de Schwann.....	<b><u>19</u></b>
1.2.3) Papel das células de Schwann na lesão neural da hanseníase.....	<b><u>21</u></b>
1.2.4) A linhagem ST88-14 .....	<b><u>23</u></b>
<b>1.3) FATOR DE NECROSE TUMORAL-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b> .....	<b><u>26</u></b>
1.3.1) A superfamília do TNF.....	<b><u>26</u></b>
1.3.2) Biologia do TNF- $\alpha$ e seus receptores .....	<b><u>28</u></b>
1.3.3) Sinalização celular.....	<b><u>30</u></b>
1.3.3.1) Proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPKs) .....	<b><u>32</u></b>
1.3.4) TNF- $\alpha$ e lesão neural da hanseníase .....	<b><u>35</u></b>
<b>2 - JUSTIFICATIVA</b> .....	<b><u>37</u></b>
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	<b><u>38</u></b>
<b>4 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b><u>39</u></b>
4.1) Cultura de Células de Schwann da linhagem humana ST88-14.....	<b><u>39</u></b>

4.2) Estímulos.....	<b><u>39</u></b>
4.3) RT-PCR em tempo real .....	<b><u>40</u></b>
4.3.1) Síntese de cDNA.....	<b><u>40</u></b>
4.4) Western Blotting .....	<b><u>41</u></b>
4.4.1) Análise dos níveis intracelulares de TNF- $\alpha$ .....	<b><u>42</u></b>
4.4.2) Análise da fosforilação de Erk 1/2 e p38 .....	<b><u>43</u></b>
4.5) Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	<b><u>43</u></b>
4.6) Imunofluorescência.....	<b><u>44</u></b>
4.5.1) Análise da fosforilação de ERK 1/2 e p38 .....	<b><u>44</u></b>
4.7) Análise Estatística.....	<b><u>44</u></b>
<b>5 – RESULTADOS .....</b>	<b><u>45</u></b>
5.1) Avaliação da expressão do TNF- $\alpha$ pelas CS da linhagem humana ST88-14 em resposta ao estímulo com ML. ....	<b><u>45</u></b>
5.2) Avaliação da produção e secreção do TNF- $\alpha$ pelas CS da linhagem humana ST88-14 em resposta ao estímulo com ML.....	<b><u>46</u></b>
5.3) Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ pelas CS da linhagem humana ST88-14 através da existência de um mecanismo de retroalimentação positiva .....	<b><u>47</u></b>
5.4) Avaliação do efeito do ML em associação ou não com o TNF- $\alpha$ na produção e na secreção dessa citocina pela linhagem ST88-14.....	<b><u>49</u></b>
5.5) Avaliação do efeito do ML e do TNF- $\alpha$ em associação ou não na produção e na secreção de citocinas pelas CS da linhagem humana ST88-14.....	<b><u>50</u></b>
5.6) Avaliação da participação da MAPK p38 nas vias de sinalização ativadas pelo ML e TNF- $\alpha$ em associação ou não nas CS da linhagem humana ST88-14.....	<b><u>55</u></b>
5.7) Avaliação da participação de MAPK ERK 1/2 nas vias de sinalização ativadas pelo ML e TNF- $\alpha$ em associação ou não na linhagem ST88-14.....	<b><u>57</u></b>
<b>6 - DISCUSSÃO .....</b>	<b><u>59</u></b>
<b>7 - CONCLUSÕES.....</b>	<b><u>68</u></b>
<b>8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b><u>70</u></b>

## INDICE DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Morfologia do <i>M.leprae</i> .....	<b>03</b>
<b>Figura 2:</b> Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i> .....	<b>03</b>
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo do espectro clínico da hanseníase.....	<b>06</b>
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo do padrão de resposta na hanseníase.....	<b>07</b>
<b>Figura 5:</b> Neurulação e geração das células da crista neural.....	<b>11</b>
<b>Figura 6:</b> Principais estágios do desenvolvimento das células de Schwann originadas da crista neural.....	<b>13</b>
<b>Figura 7:</b> Etapas de diferenciação das células de Schwann em associação com os axônios.....	<b>18</b>
<b>Figura 8:</b> Esquema dos possíveis efeitos da infecção das células de Schwann pelo <i>M. leprae</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 9:</b> Estrutura normal do nervo periférico normal e dos neurofibromas.....	<b>24</b>
<b>Figura 10:</b> A superfamília de TNF.....	<b>27</b>
<b>Figura 11:</b> Representação das formas biologicamente ativas do TNF- $\alpha$ .....	<b>29</b>
<b>Figura 12:</b> Complexos de receptores associados pelos PLADs.....	<b>29</b>
<b>Figura 13:</b> Vias de sinalização moduladas por TNF-R1 e TNF-R2.....	<b>34</b>
<b>Figura 14:</b> <i>M. leprae</i> induz a expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ nas células da linhagem humana ST88-14.....	<b>45</b>
<b>Figura 15:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> na secreção do TNF- $\alpha$ na linhagem humana ST88-14.....	<b>46</b>
<b>Figura 16:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> na produção de TNF- $\alpha$ em CS da linhagem humana ST88-14.....	<b>47</b>
<b>Figura 17:</b> Efeito do TNF- $\alpha$ na sua própria expressão gênica, produção e secreção nas células de Schwann da linhagem humana ST88-14 através de um mecanismo de retroalimentação positiva.....	<b>48</b>

<b>Figura 18:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> e TNF- $\alpha$ em associação na expressão gênica, produção e secreção dessa citocina na linhagem ST88-14.....	<b>49</b>
<b>Figura 19:</b> Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$ na secreção de IL-1 $\beta$ na linhagem humana ST88-14.....	<b>50</b>
<b>Figura 20:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> e do TNF- $\alpha$ em associação ou não na secreção de IL-1 $\beta$ na linhagem humana ST88-14.....	<b>51</b>
<b>Figura 21:</b> Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$ na secreção de IL-10 na linhagem humana ST88-14.....	<b>51</b>
<b>Figura 22:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> e do TNF- $\alpha$ em associação ou não na secreção de IL-10 na linhagem humana ST88-14.....	<b>52</b>
<b>Figura 23:</b> Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$ na secreção de IL-6 na linhagem humana ST88-14.....	<b>52</b>
<b>Figura 24:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> e do TNF- $\alpha$ em associação ou não na secreção de IL-6 na linhagem humana ST88-14.....	<b>53</b>
<b>Figura 25:</b> Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$ na secreção de IL-8 na linhagem humana ST88-14.....	<b>53</b>
<b>Figura 26:</b> Efeito do <i>M. leprae</i> e do TNF- $\alpha$ em associação ou não na secreção de IL-8 na linhagem humana ST88-14.....	<b>54</b>
<b>Figura 27:</b> Participação das MAPKs p38 nas vias de sinalização ativadas pelo <i>M. leprae</i> e TNF- $\alpha$ , em associação ou não na linhagem humana ST88-14.....	<b>56</b>
<b>Figura 28:</b> Participação das MAPKs ERK 1/2 nas vias de sinalização ativadas pelo <i>M. leprae</i> e TNF- $\alpha$ , em associação ou não na linhagem humana ST88-14.....	<b>58</b>
<b>Figura 29:</b> Esquema representativo da participação do <i>M. leprae</i> e do TNF- $\alpha$ na ativação das células de Schwann.....	<b>69</b>

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Prevalência da hanseníase e números de novos casos detectados em países com população > 1 milhão de habitantes que não eliminaram a doença.....	<b>02</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.....	antes de Cristo
AG.....	Arabinogalactano
AP2- $\alpha$ .....	Proteína Ativadora 2 $\alpha$
BAAR (ou AFB) .....	Bacilo Álcool-Ácido Resistente
BB.....	Forma “borderline-borderline” da Hanseníase
BDNF.....	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BFABP.....	Proteína Cerebral ligante de Ácidos Graxos
BL .....	Forma “borderline” Lepromatosa da Hanseníase
BMP.....	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BSA .....	Albumina Sérica Bovina
BT.....	Forma “borderline” Tuberculóide da Hanseníase
cDNA.....	DNA complementar
CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de Carbono
CS .....	Células de Schwann
CX-32.....	Conexina 32
DAPI.....	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
DD.....	Domínio de morte
Dhh.....	Desert hedgehog
dNTP .....	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
2-ME .....	2-Mercaptoetanol
DTT .....	Ditiotreitol
EDTA .....	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF .....	Fator de Crescimento Endotelial
ELISA .....	Ensaio Imunoenzimático

ENL .....	Eritema Nodoso Leproso
EP .....	Erro Padrão
ErbB .....	receptor de neuregulina
ERK.....	Kinases reguladas por sinais extracelulares
<i>et al.</i> .....	Do latim, <i>et alia</i> – e outros
FADD.....	Proteína com domínio de morte associado a Fas
FGF.....	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
GalC.....	Galactocerebrosidase
GAP-43 .....	Proteína Associada ao Crescimento, 43kDa
GDNF.....	Fator neurotrófico derivado da glia
GDP.....	guanosina difosfato
GFAP.....	Proteína Fibrilar Glial Ácida
GGF.....	Fator de crescimento glial
GTP.....	guanosina trifosfato
IAP .....	Proteínas Inibidoras de Apoptose
ICAM .....	Molécula de adesão intracelular
IFN- $\gamma$ .....	Interferon-gama
Ig .....	Imunoglobulina
IGF .....	Fator de Crescimento semelhante à Insulina
IL .....	Interleucina
ILR.....	Receptor de interleucina
IFN- $\gamma$ .....	Interferon-gama
JNK .....	Quinase Jun N-terminal
kDa.....	kilo Dalton
Krox20/Egr2 .....	Fator de transcrição de resposta ao crescimento precoce



LAM .....	Lipoarabinomanana
LBP21.....	Proteína ligante de laminina 21
LIF.....	Fator Inibitório de Leucemia
LM.....	Lipoamanan
LL .....	Forma Lepromatosa da Hanseníase
LPA.....	Ácido Lisofosfatídico
LPS .....	Lipopolissacarídeo
LT.....	Linfotoxina
M.....	Molar
MAG.....	Glicoproteína associada á mielina
MAPK.....	Proteínas kinases ativadas por mitógenos
MAPKK.....	MAPK kinase kinases
MAPKKK.....	MAPK kinase kinase kinases
Mb.....	Mega base
MB.....	Multibacilar
MCP-1 .....	Proteína quimiotática de monócitos-1
MDT .....	Multidrogaterapia
µg .....	microgramas
MHC (HLA).....	Complexo Principal de Histocompatibilidade
ML .....	<i>Mycobacterium leprae</i>
µL .....	microlitros
ml .....	mililitros
mM.....	mili Molar
MPB.....	Proteína Básica Mielina
NCAM.....	Molécula de adesão celular neural
NF-1 .....	Neurofibromatose tipo 1

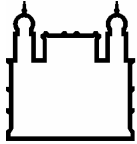
NF- $\kappa$ B .....	Fator Nuclear $\kappa$ B
ng .....	nanogramas
NGFR.....	Receptor fator de crescimento neural
NGS.....	Soro de cabra normal
nm .....	nanômetros
NO .....	Óxido Nítrico
NP.....	Neural Pura
NT .....	Neurotrofina
Oct6 (SCIP/tst-1) .....	Fator de transcrição 6 de ligação ao octâmero
OMS .....	Organização Mundial de Saúde
PAMPs.....	Padrões moleculares associados a patógenos
Pax3 .....	gene da família BOX emparelhado 3
PB.....	Paucibacilar
PBS .....	Salina Tamponada com Fosfato
PKC .....	Proteína Quinase C
PDGF $\beta$ .....	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta $\beta$
PDIMs.....	Ácidos Micocerosóicos de Dimicocerosatos de Fitiocérol
PEES .....	Penicilina/Estreptomicina
pg/ml.....	picograma/mililitro
PMP22.....	Proteína mielínica periférica 22
P <sub>0</sub> .....	Proteína zero
pg .....	picograma
PGL-1 .....	Glicolípídeo Fenólico –I
PLAD .....	Domínio de Associação Prévia ao Ligante
PMP22 .....	Proteína de Mielina Periférica, 22kDa

Rh.....	Recombinante humano
RIP .....	Proteína de Interação com o Receptor
RNAm .....	Ácido Ribonucléico mensageiro
RR .....	Reação Reversa
PCR.....	Reação da polimerase em cadeia
SDS.....	Dodecil sulfato de sódio
S100 .....	Proteína de Ligação ao Cálcio – S100
SFB .....	Soro Fetal Bovino
SNC .....	Sistema Nervoso Central
SNP .....	Sistema Nervoso Periférico
SODD.....	Silenciadores do domínio de morte
SOS.....	“Son of sevenless”
Sox10 .....	SRY (região determinante do sexo Y) box 10
TACE .....	Enzima Conversora de TNF
TGF- $\beta$ .....	Fator Transformador de Crescimento- $\beta$
THD.....	Domínio homólogo TNF
T <sub>h</sub> .....	Linfócito T <i>helper</i>
TLR.....	Receptor <i>Toll like</i>
TMM.....	Monomicilatos de trealose
TNF .....	Fator de Necrose Tumoral
TNF-R .....	Receptor de TNF
TRADD .....	Domínio de Morte Associado ao receptor de TNF
TRAF .....	Fator Associado ao TNFR
TRAIL .....	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

TT ..... Forma Tuberculóide da Hanseníase

WHO..... World Health Organization

V..... Volts



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

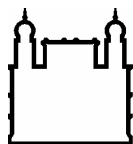
### *Mycobacterium leprae* e o efeito do TNF $\alpha$ na ativação de células de Schwann humanas

#### Resumo

Dissertação de Mestrado

**Priscila Ribeiro Andrade**

A hanseníase é uma das doenças mais antigas a acometer o homem e tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae* (ML), um patógeno intracelular obrigatório que infecta principalmente, macrófagos e células de Schwann (CS). As CS estão envolvidas na imunomodulação da lesão neurológica causada pelo ML, podendo, assim, desencadear uma resposta inflamatória frente à presença da bactéria. Entre as citocinas que participam dessa resposta está o Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), molécula envolvida na patogênese de diversas doenças que acometem os sistemas nervosos central (SNC) e periférico (SNP). Foi descrito recentemente que o TNF- $\alpha$  pode atuar como um mediador autócrino na lesão neural, sendo capaz de ativar CS na ausência do patógeno. Nesse trabalho foi avaliada a contribuição do TNF- $\alpha$  e do ML para a injúria nervosa da hanseníase, através da análise da participação do efeito autócrino dessa citocina na resposta a infecção pelo ML e no processo de ativação sustentada das CS, utilizando a linhagem humana ST88-14. Nossos resultados sugerem que no dano neural da hanseníase, a infecção pela micobactéria pode contribuir para ativação sustentada das CS, ativando vias de sinalização com participação de ERK 1/2, e induzindo a produção de TNF- $\alpha$ , que por sua vez, promove seus diversos efeitos através da interação com outras células do espaço endoneural, não sendo, imediatamente secretada. Além disso, foi observada a participação do mecanismo de retroalimentação positiva dessa citocina na ativação dessas células, que pode não só aumentar os níveis dessa molécula no meio, como também a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, que cooperam com a resposta imune e com o estado de ativação prolongado das CS.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### *Mycobacterium leprae* and the effect of TNF- $\alpha$ in human Schwann cells activation

#### Abstract

Dissertação de Mestrado

**Priscila Ribeiro Andrade**

Leprosy is one of the oldest diseases to afflict humankind. Its pathological agent is *Mycobacterium leprae* (ML), an obligatory intracellular bacterium that infects, mainly, macrophages and Schwann cells (SC). SC are glial cells involved in the immune response regulation that occurs during the peripheral neural damage caused by ML. Among the cytokines that contribute to this response, there is the Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), a molecule related to the pathogenesis of many diseases of the central (CNS) and peripheral nervous systems (PNS). It has been described that TNF- $\alpha$  may act as an autocrine mediator in neural injury, and therefore, may activate SC in the absence of ML. This study evaluated the contribution of TNF- $\alpha$  and ML to nerve injury in leprosy, by analysing the participation of the cytokine's positive feedback mechanism in ML infection and in the SC sustained activation state, using the human lineage ST88-14. Our results suggest that in the leprosy neural injury, ML can induce SC activation by recruiting ERK pathways, and promoting TNF- $\alpha$  production, which instead of acting as secreted cytokine, evokes its biological effects through interactions with other cells in the endoneural space. In addition, it was also observed the participation of TNF- $\alpha$ 's positive feedback mechanism in SC activation, which increased the secretion of this molecule and other proinflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1) A HANSENÍASE

### 1.1.1) Características Gerais

A hanseníase, também conhecida como lepra, é uma doença infecciosa crônica caracterizada por lesões cutâneas e pelo acometimento dos nervos periféricos, podendo resultar em problemas motores e sensoriais graves, e levar, assim, ao desenvolvimento de deformidades e deficiências permanentes ([1];[2]). Evidências históricas apontam para o leste da África e Oriente, em particular a Índia, como local de origem da doença, que parece ter sido disseminada para o resto do mundo através das sucessivas migrações humanas que ocorreram a partir do século IV a.C ([3]; [4]).

Apesar de a hanseníase ter sido no passado uma doença distribuída pelos continentes da Europa e Ásia, atualmente concentra-se em países em desenvolvimento situados em regiões tropicais e temperadas, como Índia, República Federativa do Brasil, República Democrática do Congo, República Unida da Tanzânia, Nepal, Moçambique, Madagascar, Timor Leste e República Central Africana ([5]; [2]).

Recentemente a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou uma estratégia baseada no diagnóstico precoce e no tratamento com a multidrogaterapia (MDT), para reduzir tanto a prevalência quanto a incidência da hanseníase, com compromisso de manter as iniciativas de controle entre o período de 2006 e 2010. A prevalência global registrada no início de 2009 foi de 213.036 casos da doença, sendo o número reportado de novos casos em 2008 de 249.007 em 121 dos países investigados [6]. Entre os anos de 2002 e 2008, a taxa de detecção de novos casos apresentou um declínio substancial, mesmo em países endêmicos [7].

No início de 2008, o Brasil registrou uma prevalência de 45.847 casos e, juntamente com Nepal e Timor Leste, constitui o grupo de países com população superior a 1 milhão de pessoas que ainda não alcançou o estágio de eliminação da doença, definida pela taxa de prevalência de <1 caso/10.000 habitantes (Tabela 1) [7].

Países	Prevalência registrada <sup>a</sup>			Nº de novos casos detectados <sup>b</sup>		
	Início de 2006	Início de 2007	Início de 2008	2005	2006	2007
Brasil	27 313 (1.5)	60 567 (3.21)	45 847 (2.40)	38 410 (20.6)	44 436 (23.53)	39 125 (20.45)
Nepal <sup>c</sup>	4 921 (1.8)	3 951 (1.43)	3 329 (1.18)	6,150 (22.7)	4 253 (15.37)	4 436 (15.72)
Timor Leste	289 (3.05)	222 (2.2)	131 (1.23)	288 (30.41)	248 (24.63)	184 (17.23)

<sup>a</sup> taxa/10.000 população

<sup>b</sup> taxa/10.000 população

<sup>c</sup> Detecção registrada do meio de Novembro/2006 ao meio de Novembro/2007

**Tabela 1: Prevalência da hanseníase e números de novos casos detectados em países com população > 1 milhão de habitantes que não eliminaram a doença [7].**

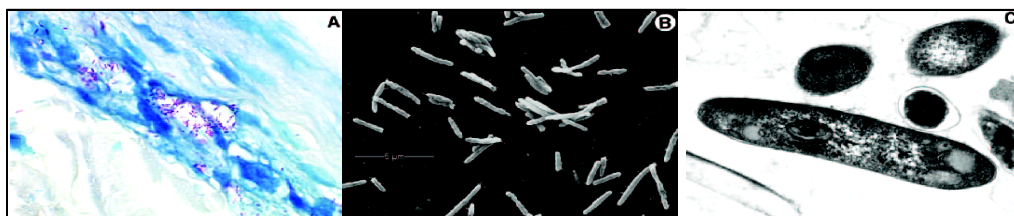
Na década de 40 do século XX, observou-se que o antibiótico dapsona, potente inibidor da enzima dihidropteroato sintase envolvida no metabolismo do ácido fólico, interrompia o progresso dos sintomas da hanseníase [1]. Entretanto, um fenômeno generalizado de resistência a essa droga diminuiu sua eficácia no tratamento da doença, sendo sua administração posteriormente acoplada aos antibióticos rifampicina e clofazimina, estabelecendo, então, a chamada multidrogaterapia (MDT) que constitui, atualmente, a estratégia mais eficaz de combate a essa infecção [2].

### 1.1.2) Agente Etiológico

A hanseníase é uma doença resultante da infecção pelo *Mycobacterium leprae* (ML), um patógeno intracelular obrigatório, provavelmente transmitido pela via respiratória e que tem como nicho preferencial macrófagos e células de Schwann [8]. Descoberto em 1874, por Armauer Hansen em biópsias de pele, o ML foi o primeiro agente etiológico de uma doença humana a ser identificado.

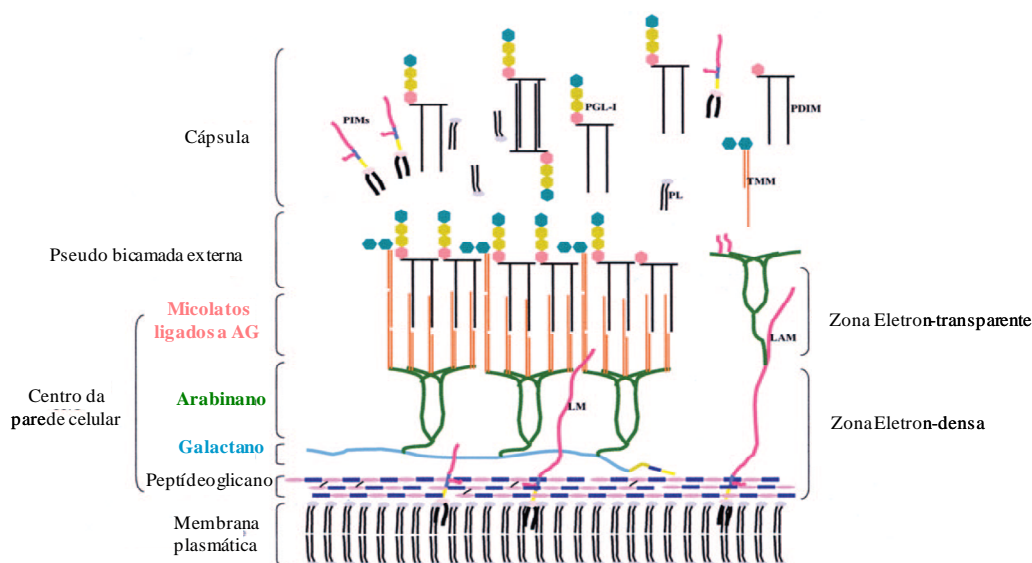
É um bacilo imóvel, não formador de esporos e que se multiplica por divisão binária ([9]; [10]). Apresenta-se sob a forma de um bastonete ligeiramente curvado, podendo ser encontrado também em grupos denominados “globias”, onde vários bacilos interagem entre si através de uma substância chamada de “gléia” (Figura 1) [1].





**Figura 1: Morfologia do *M. leprae*.** (A) ML corado em vermelho pelo método de Fite-Faraco. (B) Suspensão de ML derivada de pata de camundongo *nude* visualizada por microscopia eletrônica de varredura. (C) Características internas do ML são observadas na seção ultrafina do bacilo por microscopia eletrônica de transmissão [9].

Sua parede celular consiste de uma camada de peptídeoglicanos composta de cadeias de N-acetilglicosaminas e N-glicosilmurâmico dispostas alternadamente, e que por meio de moléculas de arabinogalactano, se liga a uma camada de galactano. A essa camada ancoram-se moléculas de arabinano, formando assim um arranjo que concede a essa porção da parede celular uma propriedade elétron-densa. Acoplado ao arabinano, estão moléculas de ácidos micólicos que juntamente com glicolipídios fenólicos (PGLs) constituem a zona elétron-transparente da parede da micobactéria (Figura 2) [9].



**Figura 2: Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae*.** A membrana plasmática é envolvida pela camada da parede celular formada de peptídeoglicanos ligados covalentemente a galactanos por uma ponte de arabinogalactanos (AG). Ligados a camada de galactano estão moléculas de arabinano, aos quais ácidos micólicos estão acoplados, formando a porção interna de uma bicamada pseudolipídica. A porção externa dessa bicama é constituída por monomicilatos de trealose (TMM), ácidos micocerosóicos de dimicocerosatos de fitiocerol (PDIMs) e glicolipídios fenólicos (PGLs). A cápsula provavelmente composta de PGLs e PDIMs envolve a bactéria. Lipomanan (LM) e lipoarabinomanan (LAM) são observados tanto ancorados à membrana plasmática quanto na constituição da cápsula [9].

A abundância de moléculas lipídicas como ácidos micólicos e os PGLs faz com que o ML seja considerado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), pois resiste a descoloração por solventes orgânicos acidificados de amostras submetidas à coloração por corantes básicos ([11]; [10]). Essa micobactéria é também considerada Gram-positiva, apesar de não ser bem corada por esse método [11].

O ML apresenta um genoma de aproximadamente 3,3 Mb, onde apenas 49,5% correspondem a genes funcionais, ou seja, cerca de 1.604 seqüências codificantes de proteínas e 1.116 pseudogenes [12]. Ao comparar seu genoma com o de outras micobactérias, como *M. tuberculosis*, podemos observar que o ML sofreu ao longo do tempo um processo de evolução redutiva, que envolve a perda de certas funções e de seus respectivos genes, resultando no encolhimento do genoma. São sugeridas diversas causas para a ocorrência desse fenômeno, inclusive as alterações de nichos sofridas por esses organismos como, por exemplo, a mudança: (1) de vida livre para uma vida intracelular ou estritamente associada a um hospedeiro, (2) de variados hospedeiros para um hospedeiro específico, ou até mesmo, (3) de variados tecidos para um tecido específico do seu hospedeiro [13].

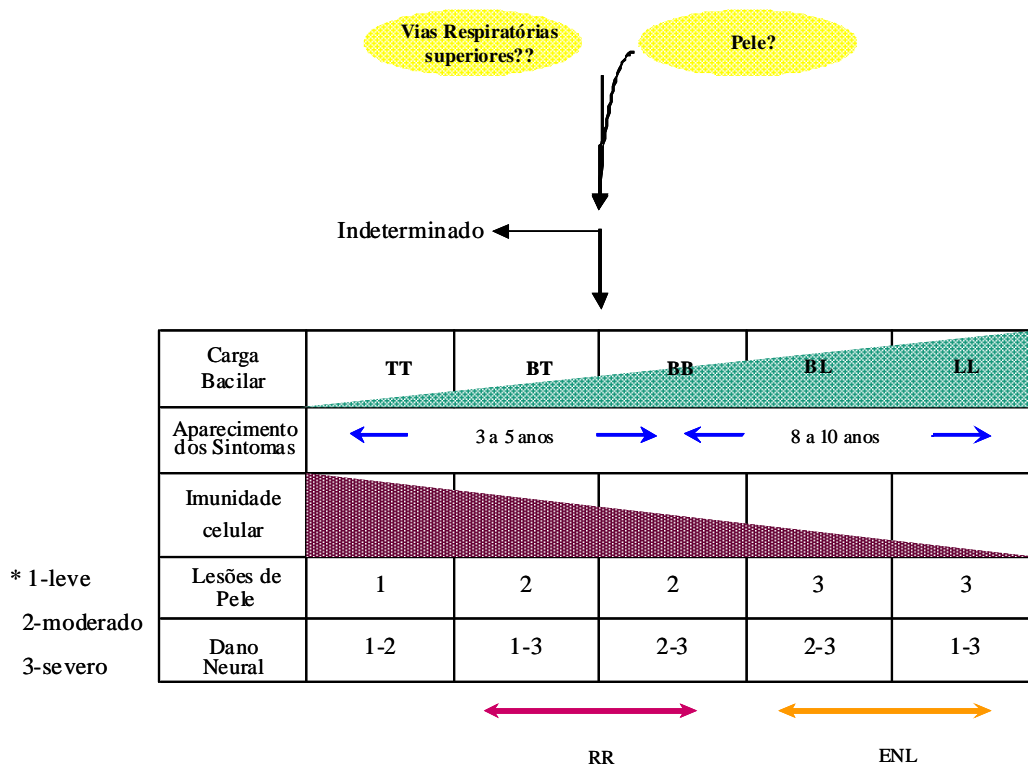
O ML apresenta um tempo de geração de aproximadamente 14 dias, tendo sido frustradas todas as tentativas de cultivá-lo *in vitro* até o momento. É provável que os efeitos combinados da deleção gênica e de mutações ocorridas em diversas regiões do genoma envolvidas no metabolismo, regulação, reparo de DNA, entre outras, seriam as causas do insucesso do cultivo *in vitro* desse bacilo [8]. Além dos aspectos genéticos, o crescimento do ML também é determinado pela temperatura do ambiente em que se encontra, tendo dificuldade de se multiplicar na temperatura corporal de 37°C. Sua taxa ótima de crescimento ocorre na faixa de 27°C a 30°C, o que explica o seu tropismo por áreas mais frias do corpo humano, como a pele, nervos e trato respiratório [14].

Portanto, o cultivo do ML é feito *in vivo* e está restrito a alguns modelos animais, incluindo o tatu e camundongos [15], o que dificulta seu estudo e limita a quantidade de informações disponíveis sobre esse bacilo, quando comparado às outras micobactérias. Com exceção dos animais já citados e alguns primatas, os seres humanos são os únicos reservatórios de infecção do ML, cuja rota de transmissão acredita-se ser por inalação de partículas infectadas, não podendo ser descartado o contato com a pele dos pacientes [16].

### **1.1.3) Patogênese**

A hanseníase é a principal causadora de neuropatias não traumáticas no mundo. Estima-se que mais de um quarto de todos os pacientes hanseníacos apresentam algum grau de incapacidade e, destes, cerca da metade apresenta lesões neurológicas permanentes, que podem evoluir mesmo após a eliminação do patógeno [17].

O diagnóstico da hanseníase é baseado nos sinais clínicos e nos sintomas clássicos da doença, como as lesões de pele e perda sensorial. O sistema de classificação estabelecido pela OMS determina duas categorias: paucibacilar (PB), definida por cinco ou menos lesões de pele e esfregaço de pele negativo para a bactéria, e multibacilar (MB), definida por seis ou mais lesões e esfregaço positivo ([18]; [1]). Outra classificação, o sistema de Ridley-Jopling concebido em 1966 [19], considera características histopatológicas e clínicas, assim como a carga bacteriana e variações na resposta imunológica dos pacientes, para definir os espectros clínicos observados na hanseníase. Segundo essa classificação, podemos distinguir os pólos tuberculóide-tuberculóide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL), além das formas intermediárias denominadas borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatoso (BL) (Figura 3) [5]. Os indivíduos que não se encaixam em nenhum desses perfis, ou seja, apresentam uma resposta insuficientemente diferenciada para permitir sua classificação, são denominados de indeterminados e podem ao longo da doença evoluir para qualquer uma das formas mencionadas anteriormente ou até evoluir para cura espontânea [20].

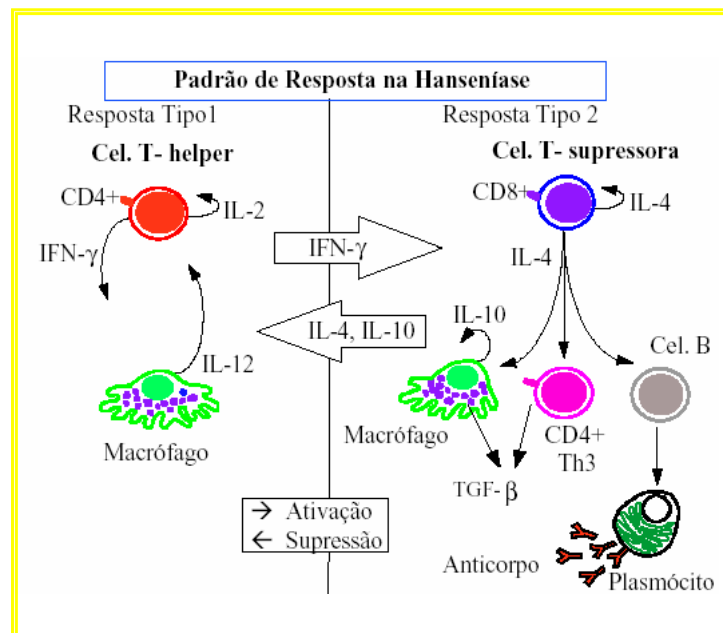


**Figura 3: Esquema representativo do espectro clínico da hanseníase.** TT – forma tuberculóide; LL – forma lepromatosa; BT, BB, BL – grupo “Borderline”; RR- reação reversa; ENL – eritema nodoso leproso. As lesões de pele e o dano neural estão classificados de acordo com o grau de severidade clínica em: 1- leve, 2- moderado e 3- severo [21].

O sistema de classificação da OMS é mais simples e útil em locais onde não há recursos para obtenção das informações adotadas pela classificação de Ridley-Jopling. Nesse caso, as formas TT e BT são consideradas paucibacilares e as BB, BL e LL são classificadas como multibacilares por apresentarem uma alta carga parasitária.

O pólo tuberculóide agrupa pacientes que apresentam uma vigorosa resposta celular ao ML, sendo, portanto, capazes de controlar a carga bacilar. Seus sintomas são restritos a poucas lesões de pele bem definidas e sem a presença de bacilos [2]. Nesta porção do espectro, predomina o perfil de citocinas do tipo Th1, tendo sido observadas células produtoras de IL-2, linfotóxina e IFN- $\gamma$  (interferon-gama), o que justifica o quadro de resistência à proliferação do ML e os casos de cura espontânea relatados neste pólo [22]. Nesses pacientes há também a formação de granulomas, constituídos pela agregação de células fagocitárias mononucleares e linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Além disso, a produção de anticorpos contra o ML é muito reduzida ou indetectável nesse grupo [20].

O pólo lepromatoso é caracterizado pela ausência de mecanismos da imunidade celular específica contra o ML, ocorrendo, portanto, a proliferação descontrolada dessa bactéria nos indivíduos infectados. Os pacientes desse grupo apresentam inúmeras lesões cutâneas e intensa infiltração celular nos nervos e na pele, caracterizada pela presença de macrófagos carregados de bacilos. A derme, além dos macrófagos parasitados, apresenta poucos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, com granulomas desorganizados [2]. As citocinas do tipo Th2 predominam nesses indivíduos, em destaque IL-4, IL-5 e IL-10, que estão relacionadas com um cenário de resposta celular ineficiente ou ausente, devido a uma ativação falha dos macrófagos e da intensificação da resposta humoral, o que justifica os altos títulos de anticorpos contra PGL-1 e outros antígenos específicos do ML (Figura 4) [2].



**Figura 4: Esquema representativo do padrão de resposta na hanseníase.** Na forma TT, na resposta tipo 1, a IL-2 é um fator de crescimento autócrino para linfócitos T helper, responsáveis pela ativação dos macrófagos mediada pelo IFN- $\gamma$  (imunidade mediada por células). Na forma LL, na resposta tipo 2, IL-4 é um fator de crescimento para linfócitos T supressores, estimulando a diferenciação de linfócitos B para produção de anticorpos (imunidade humoral). O TGF- $\beta$  e IL-10 são supressores de macrófagos e IL-12 é um estimulador de linfócitos T helper [20].

As formas intermediárias ou borderline são extremamente instáveis, ocorrendo uma progressiva redução da resposta imune celular entre o grupo de maior resistência, o borderline-tuberculóide (BT), e o de menor resistência, o borderline-lepromatoso (BL) [2]. Os pacientes BT apresentam lesões com poucos bacilos, os BB são raros com tendência a mover-se para um dos pólos do espectro e os BL possuem granulomas compostos de macrófagos indiferenciados altamente parasitados [20].

O envolvimento neural pode ocorrer em todas as formas do espectro da hanseníase, sendo necessária a destruição de, em média, 30% das fibras nervosas para que haja manifestação clínica. Essa agressão pode se estabelecer nas fases iniciais, ou seja, na ausência de células inflamatórias, fato comum tanto nas formas paucibacilares quanto nas multibacilares; ou nas fases tardias da doença, onde é acompanhada por um intenso processo inflamatório [23]. Há casos classificados como forma neural pura (NP), em que o comprometimento neurológico antecede o dermatológico, havendo ausência de lesões cutâneas e espessamento dos troncos nervosos periféricos acometidos, podendo levar a deformidade e perda sensorial e motora ([24];[5]).

Pacientes hansênicos podem, além dos sintomas clássicos, desenvolver estados reacionais, ou seja, manifestações clínicas resultantes de alterações no balanço imunológico frente ao ML. Esses episódios podem ocorrer tanto durante o curso natural da doença, durante o tratamento, ou até mesmo quando o indivíduo é considerado curado [20]. Essas reações são classificadas de acordo com Ridley-Jopling, em reação do tipo 1 ou reação reversa e reação do tipo 2 ou eritema nodoso leproso (ENL), e são a principal causa de morbidade e de danos permanentes ao nervo periférico.

A reação reversa ou do tipo 1 é causada por um aumento espontâneo da reatividade de linfócitos T contra os antígenos da micobactéria [2]. As manifestações clínicas se apresentam como exacerbações inflamatórias locais das lesões cutâneas ou nervosas pré-existentes ou como lesões novas eritematosas, hiperreativas e com granulomas infiltrantes, relacionadas à resposta imune celular contra a bactéria, e propiciadas pela infiltração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  ([25]; [2]). A reação reversa acomete usualmente pacientes com as formas borderline da doença e a sua ocorrência em indivíduos que finalizaram o tratamento pode ser explicada pela presença de bacilos mortos remanescentes e pelo desequilíbrio na regulação da resposta imune inflamatória decorrente da redução da carga bacilar [26].

O eritema nodoso leproso ou reação do tipo 2 é uma resposta inflamatória sistêmica contra deposição de complexos imunes, o que resulta na infiltração de neutrófilos e na ativação do complemento [2] e ocorre em pacientes LL e BL, não tratados ou em tratamento. Lahiri e colaboradores (2008) observaram que tanto o ML integro quanto as suas partes processadas são capazes de causar a fixação do complemento, o que pode explicar a ocorrência de reações do tipo 2 em pacientes em curso de tratamento, fase onde há intensa morte bacilar [27]. O ENL é acompanhado por altas concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  séricos, o que poderia sugerir o envolvimento da imunidade celular nessa reação. Entretanto, um aumento seletivo do RNAm de IL-10, assim como o de IL-4 e IL-5 é observado nas lesões, o que pode indicar um perfil de resposta Th2 [20].

## **1.2) CÉLULAS DE SCHWANN**

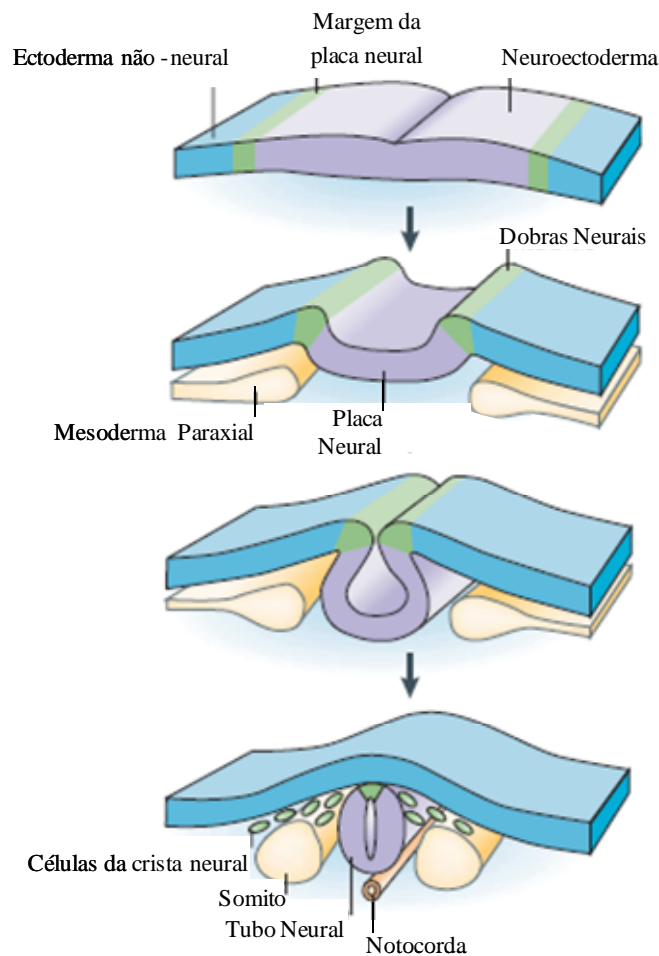
### **1.2.1) Origem e função**

O sistema nervoso é anatomicamente classificado em sistema nervoso central (SNC), constituído pelo encéfalo e a medula espinhal, e sistema nervoso periférico (SNP), formado pelos gânglios nervosos e os nervos raquidianos e cranianos originados da medula. Os principais componentes celulares desses sistemas são os neurônios, capazes de transmitir sinais elétricos sob a forma de potenciais de ação, e as células da glia ou neuroglia, que são determinantes para a formação da arquitetura neural e para transmissão sináptica. Em vertebrados, a glia compreende principalmente quatro tipos de células: os astrócitos, os oligodendrócitos e a microglia no SNC; e as células de Schwann (CS) no SNP, cujas funções principais são de fornecer suporte, proteção e nutrição aos neurônios e facilitar a condução dos impulsos nervosos, também estando envolvidas em outros eventos importantes, como na migração dos neurônios durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário [28].

A glia é evolutivamente conservada entre as espécies animais, sendo encontrada desde invertebrados mais simples até vertebrados mais complexos, como os seres humanos. Essas células, assim como os neurônios, são derivadas do ectoderma durante o desenvolvimento embrionário [29].

Na fase inicial do desenvolvimento neural, a formação do tecido nervoso começa no ectoderma do embrião, resultando na divisão desse folheto em três regiões principais: o ectoderma neural ou placa neural, do qual emergirá o sistema nervoso central; o ectoderma não-neural, precursor da epiderme; e uma população de células, situada nos limites dessas duas porções, cuja maioria irá compor a crista neural. O tecido em formação, então, dobra sobre si mesmo e origina o tubo neural, durante um fenômeno chamado de neurulação. As células da margem da placa neural se deslocam e formam as dobras neurais, que eventualmente passam a compor a região dorsal do tubo neural (Figura 5) [30].





**Figura 5: Neurulação e geração das células da crista neural.** A margem da placa neural (verde) recebe sinais dos ectodermas neural (lilás), não-neural (azul) e do mesoderma paraxial (amarelo). Durante a neurulação a placa neural se eleva e gera o tubo neural. As células da crista neural se desprendem das dobraduras neurais ou da porção dorsal do tubo neural recém-formado, dependendo da espécie [30].

As células das dobraduras neurais são consideradas um estágio pré-migratório das células da crista neural, cuja existência depende de uma série de eventos complexos de sinalização, oriundos das regiões adjacentes à placa neural, do ectoderma não-neural e do mesoderma paraxial subjacente. A diferenciação das células da dobra neural em células da crista neural é induzida pela secreção de fatores como BMP (proteínas morfogenéticas ósseas), proteínas WNT, FGF (fatores de crescimento de fibroblastos) e noelina <sup>[1]</sup> [30].

Durante esse estágio de transição são observados perfis de expressão gênica predominantes e característicos de cada fenótipo celular, como por exemplo, *Foxd 3*, *Slug*, *Sox 9* e *Sox 10* <sup>[2]</sup>, marcadores moleculares das células das dobraduras neurais, e, *Zic (1, 2, 3, 4 e 5)*, *Pax 3*, *Pax 7* e *Notch 1* <sup>[3]</sup>, adotados como marcadores da crista neural. As células da crista apresentam um enorme potencial migratório, podendo assim, colonizar diversas

regiões do embrião, sendo as linhagens celulares resultantes da diferenciação dessas populações multipotentes, determinadas pelos fatores liberados nos meios nos quais se estabelecem [30]. Se essas células migrarem lateralmente ao tubo neural, originarão os melanócitos da pele e se seguirem ventralmente, serão as precursoras dos neurônios da raiz dorsal, das células da glia e de neurônios periféricos. Caso estabeleçam-se na porção anterior do tubo neural, ou seja, na crista cardíaca, serão precursoras de fibroblastos e células do músculo liso, e aquelas que se instalarem na crista cefálica, originarão as cartilagens e os ossos do embrião [31].

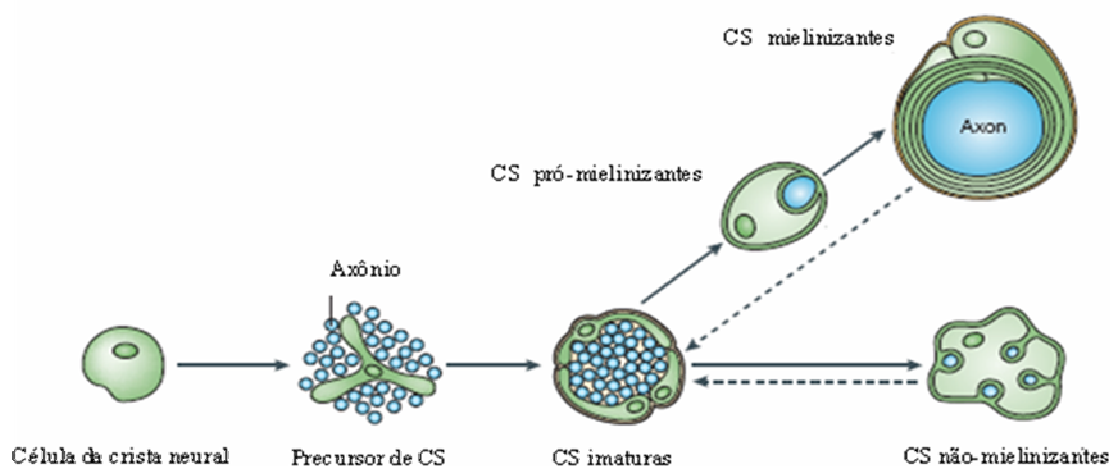
Para originarem CS maduras, as células da crista neural precisam se associar a neuritos em crescimento, incorporando-se assim, aos nervos embrionários [32]. A partir dessa associação, as células passam por três importantes etapas de diferenciação, durante as quais, originam inicialmente CS precursoras, que posteriormente se transformam em CS imaturas, cujo destino é gerar duas populações distintas de CS maduras: as mielinizantes e não-mielinizantes (Figura 6). Esses eventos são rigorosamente dependentes de fatores de crescimento, fatores mitógenos e sinais de diferenciação providos pelos axônios [31].

---

<sup>1</sup> **BMP** (proteínas morfogenéticas ósseas) são moléculas multifuncionais da superfamília do TGF- $\beta$  que estão envolvidas na sinalização do início da migração das células da crista neural. As proteínas **WNT** são uma família de moléculas de sinalização altamente conservadas e relacionadas com proteínas de *Drosophila*, que regula interações célula-célula durante a embriogênese. Os **FGFs** (fatores de crescimento de fibroblastos) são moléculas multifuncionais envolvidas no desenvolvimento embrionário, controlando proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência celular. A **noelina** é uma glicoproteína secretada que participa da regulação do período de produção de células da crista neural [30].

<sup>2</sup> **Foxd 3** é um gene exclusivamente expresso em células precursoras da crista neural no ectoderma de todos os vertebrados e acredita-se que esteja envolvido com a acessibilidade transcricional de um conjunto de genes responsável pela multipotência das células da crista e outras células tronco. **Slug** é um repressor transcricional com dedos de zinco que medeia a resposta às proteínas WNTs. **Sox 9** e **Sox 10** são fatores de transcrição expressos em células da crista neural pré-migratórias envolvidos na estruturação da cromatina e regulação gênica [30]

<sup>3</sup> A família **Zic** compreende os genes **Zic 1, 2, 3, 4 e 5**, que são fatores de transcrição de dedos de zinco, cuja expressão ocorre no ectoderma neural, provavelmente em resposta à indutores neurais, estando envolvidos com a regulação da proliferação e diferenciação celular. **Pax 3** e **Pax 7** são fatores de transcrição expressos tanto na crista quanto na placa neural. **Notch 1** é um gene que codifica o receptor Notch, que ao interagir com um de seus ligantes ativa vias de sinalização e fatores de transcrição necessários para formação da crista neural [30].



**Figura 6: Principais estágios do desenvolvimento das células de Schwann originadas da crista neural.** [31].

As moléculas responsáveis pela indução da gliogênese em vertebrados, ou seja, as que promovem o comprometimento das células da crista com a geração do fenótipo glial, ainda não foram identificadas. O fator de transcrição Sox 10, apesar de essencial para geração dessa linhagem, pois participa da ativação de diversos genes gliais, não é capaz de promover esse fenômeno individualmente. A ação dessa molécula na crista neural pode preservar tanto a sua capacidade de diferenciação gliogênica quanto neurogênica, através da restrição dos fatores inibitórios de um desses eventos [33]. É responsável também pela regulação da expressão de ErbB3, receptor do fator de crescimento  $\beta$ -neuregulina 1<sup>[4]</sup>, e é de extrema importância para diferenciação das CS, principalmente na geração do fenótipo mielinizante. O Sox 10 não é exclusivamente expresso pelas células migratórias da crista neural, estando em atividade nas células dos gânglios periféricos, inclusive em CS maduras e nos melanócitos em diferenciação, entretanto, encontra-se ausente em neurônios e em tipos celulares não neurais derivados da crista [35].

<sup>4</sup> As moléculas de neuregulina 1 são uma família de mais de 15 fatores de crescimento existentes tanto na forma solúvel quanto na associada à membrana, e derivados de um único gene através de splicing alternativo. Dentro dessa família há três subgrupos: I que inclui as proteínas NDF, heregulina e ARIA; II formado pelo fator de crescimento glial ou GGF e III caracterizado por moléculas que possuem um terceiro domínio transmembrana e, portanto, não apresentam forma solúvel, como os subgrupos anteriores. Todas as formas apresentam um domínio EGF-like que ativam os receptores da família ErbB [34].

As CS precursoras, além de responderem aos sinais extracelulares de uma maneira distinta da qual fazem as células migratórias da crista, já possuem um perfil fenotípico característico da linhagem glial, expressando genes como *p0*, *dhh* e *bfabp* <sup>[5]</sup>, e também estabelecem uma íntima relação com os axônios aos quais estão associadas [39]. Essa relação morfológica é essencial para o desenvolvimento dessas células, e o fato de morrerem quando privadas desse contato, revela a importância dos sinais axonais para sua sobrevivência e diferenciação [40]. A  $\beta$ -neuregulina 1, as endotelinas e a via de sinalização Notch são alguns dos sinais envolvidos na regulação das alterações fenotípicas associadas com maturação das CS [35].

A  $\beta$ -neuregulina 1, molécula existente tanto acoplada à membrana do axônio quanto na forma solúvel, interage com o complexo de receptor heterodimérico ErbB2/ErbB3 nas CS precursoras, ativando a via das MAPKs, promovendo assim, a proliferação celular, e a via PI3K/Akt, impedindo a apoptose [41]. Ao contrário, as endotelinas apresentam efeitos opostos aos da  $\beta$ -neuregulina 1, pois apesar de promoverem a sobrevivência das CS precursoras, retardam o processo de transição para o tipo celular maduro, sendo consideradas então, reguladores negativos da diferenciação dessas células ([41]; [40]). A via de sinalização de Notch promove a proliferação das CS precursoras e a sua diferenciação em CS imaturas, reduzindo a expressão de AP2 $\alpha$  (proteína ativadora 2 $\alpha$ ) e aumentando a expressão de S100 $\beta$  e de GFAP (proteína fibrilar glial ácida) <sup>[6]</sup>, fenótipo característico desse tipo celular [39].

---

<sup>5</sup> *p0*: gene codificante da proteína de mielina zero, a proteína mielínica mais expressa pelas CS, responsável pela função e estrutura adequada da mielina [36]; *dhh*: gene codificante da proteína Desert hedgehog (Dhh, pertencente à família Hedgehog de moléculas sinalizadoras, e apresenta grande homologia com o gene *hegdedhog* encontrado em *Drosophila* que está envolvido com o padrão de formação da fase embrionária e adulta da mosca [37]; *bfabp*: gene codificante de BFABP (proteína cerebral ligante de ácidos graxos) que se liga a moléculas hidrofóbicas, aumentando sua solubilidade e facilitando seu transporte [38].

<sup>6</sup> **AP2 $\alpha$**  é um fator de transcrição expresso nos estágios iniciais de desenvolvimento das CS que favorece a proliferação através da repressão de genes que promovem a diferenciação definitiva [30]. **S100 $\beta$**  é um componente da família S100 de proteínas que apresentam um sítio ligante de íons de cálcio, e agem como sensores transmitindo sinais dependentes de cálcio para uma proteína alvo, controlando assim sua atividade biológica [42]. **GFAP** é um filamento intermediário específico das células da glia envolvido na formação e manutenção do citoesqueleto, sendo expresso somente em CS imaturas e não-mielinizantes. Encontram-se altos níveis dessa molécula em CS que sofrem desdiferenciação após o dano neural [43].

Após essa transição, os mecanismos de controle de sobrevivência celular também são alterados, trocando-se a dependência parácrina dos neurônios pelo suporte autócrino, já que as CS imaturas são capazes de secretar fatores como IGF-2 (fator de crescimento semelhante à insulina – 2), NT3 (neurotrofina 3), PDGF $\beta$  (fator de crescimento derivado de plaqueta  $\beta$ ), LIF (fator inibitório de leucemia) e LPA (ácido lisofosfatídico) que proporcionam a sua sobrevivência. Essa mudança tem uma grande relevância biológica, pois permite que em casos de dano nervoso, as CS sobrevivam para dar apoio trófico ao axônio em regeneração [31].

A etapa final de desenvolvimento das CS é a diferenciação das populações mielinizantes e não-mielinizantes. O fenótipo das CS imaturas e das CS não-mielinizantes é relativamente similar, pelo menos, no que diz respeito a aspectos morfológicos e a expressão de marcadores moleculares, com exceção de GalC (gactocerebrosidase) e as integrinas  $\alpha_1\beta_1$  e  $\alpha_7\beta_1$ , exclusivos do perfil não-mielinizante [35]. Além disso, as CS não-mielinizantes envolvem múltiplos axônios de pequeno calibre, formando uma estrutura chamada de *Renak bundle* (Figura 7), e expressam também GFAP, NGFR (um receptor do fator de crescimento neural de baixa afinidade), NCAM (molécula de adesão celular neural) e GAP-43 (proteína de 43 kDa associada ao crescimento) [44].

O surgimento da mielina, adaptação exclusiva dos vertebrados, possibilitou o aparecimento de organismos de maior massa corporal sem que fosse necessário o aumento do diâmetro de seus axônios, além de aperfeiçoar os comportamentos de fuga e predação [29]. A glia mielinizante participa ativamente do funcionamento do sistema nervoso, regulando as propriedades elétricas e estruturais dos axônios, controlando seu calibre, assim como a distribuição e agrupamento dos canais iônicos presentes nos nódulos e paranódulos nervosos [45].

Para que tenha início o processo de mielinização nas CS imaturas é necessário que dois eventos ocorram: o chamado *radial sorting*, que constitui o rearranjo espacial dessas células, de modo que as mesmas estabeleçam uma relação final de 1:1 com os axônios do SNP; e a “polarização”, em que ocorre um alongamento lateral da célula, definido assim, a sua orientação para a membrana axonal que será mielinizada, e a face externa que irá secretar a lâmina basal [46].

Os sinais determinantes da seleção dos axônios do SNP que devem ou não ser mielinizados ainda não foram elucidados. Sabe-se, entretanto, que o calibre do axônio é um importante critério e que CS acopladas a axônios de maior calibre ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ) adquirem a

capacidade de produzir mielina, enquanto aquelas que associam-se a axônios de menor diâmetro ( $< 1 \mu\text{m}$ ) permanecem fenotipicamente não-mielinizantes. Entretanto, estudos sugerem que não é o calibre do axônio propriamente dito, que determina o perfil dessas células, mas sim, a quantidade de neuregulina 1 do tipo III expressa em sua superfície [47]. Neurônios não-mielinizados expressam pouca neuregulina 1 do tipo III na sua membrana, enquanto que os neurônios altamente mielinizados apresentam grandes concentrações dessa molécula. Baseando-se nesses dados, atualmente há um consenso de que existam concentrações de neuregulina na superfície dos axônios capazes de despertar as CS para o fenótipo mielinizante, e, portanto, níveis abaixo do valor mínimo necessário não induzem sinais pró-mielinizantes nessas células. Além disso, a interação dessas moléculas e os receptores ErbB das CS também controla a espessura da bainha de mielina secretada, processo que visa alcançar uma razão numérica ótima entre o diâmetro do cilindro do axônio e o diâmetro do axônio já mielinizado (aproximadamente 0,68), a fim de atingir a maior velocidade de propagação possível do impulso nervoso [48].

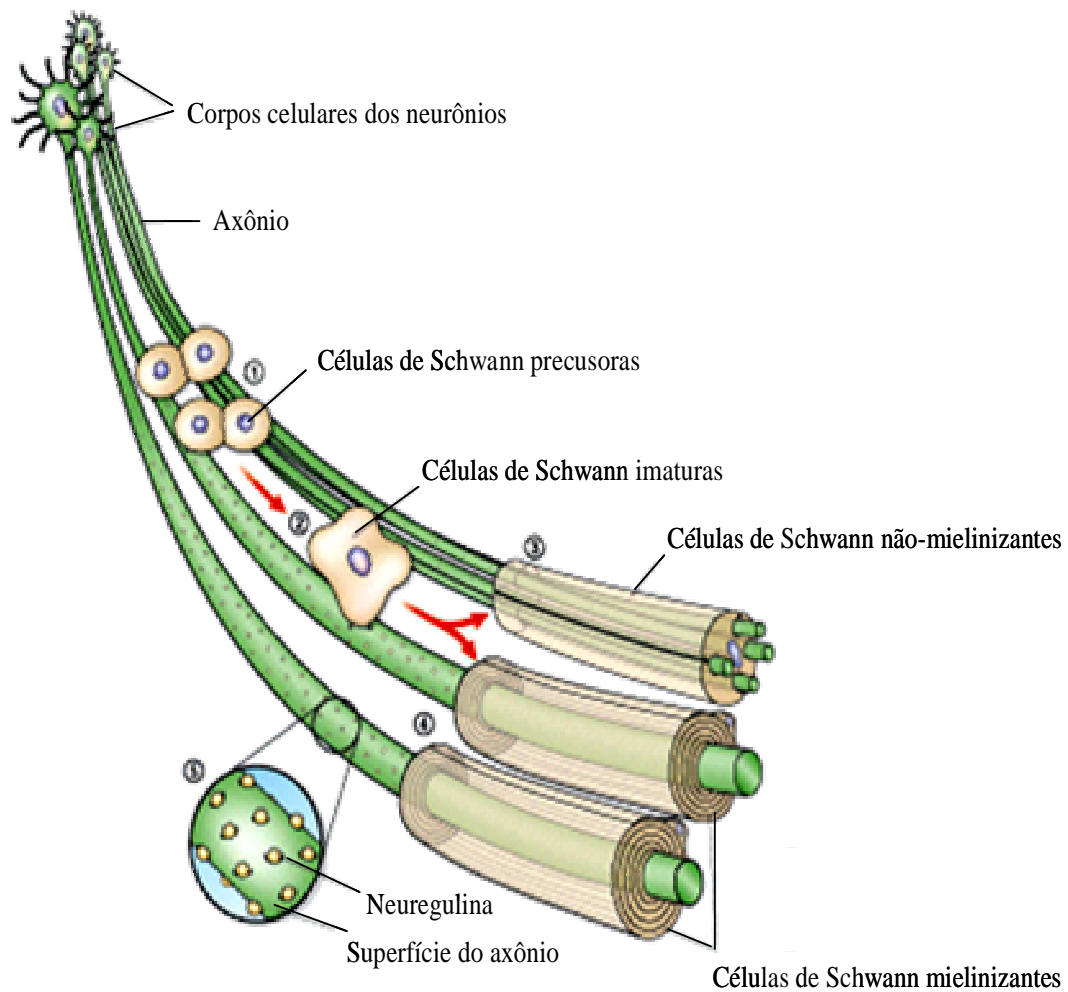
Há evidências que diversas vias de sinalização inibidoras da diferenciação celular para o fenótipo mielinizante, encontram-se ativadas em CS imaturas, sendo suprimidas no início da mielinização. A via de c-Jun-amino-terminal kinase (JNK) e de Notch 1, por exemplo, são inativadas quando vias pró-mielínicas que envolvem os fatores de transcrição Krox20/Erg2, Oct6/Scip, Sox 10 e Brn2, são acionadas [40]. O fator Sox 10 age sobre Oct6/Scip, que juntamente com Brn2 ativam Krox20/Erg2, um potente indutor da expressão dos genes *p0*, *Mbp* (proteína mielínica básica), *Pmp22* (proteína mielínica periférica 22), *Cx32* (conexina-32) e *Mag* (glicoproteína associada a mielina) [49].

A montagem da bicamada de mielina inicia-se durante o processo de transporte de seus componentes em direção à membrana plasmática da CS. Entre os constituintes dessa bicamada estão o colesterol, fosfolipídios e glicoesfingolipídios, que compreendem cerca de 70% da sua estrutura, a galactosilceramida e a proteína básica de mielina (MBP). A maioria dos componentes mielínicos é sintetizada no retículo endoplasmático das CS e provavelmente transportada por vesículas da rede trans do complexo de Golgi até a membrana, com exceção da MPB, que utiliza uma via de transporte alternativa ainda pouco conhecida.

A MBP é essencial para organização estrutural da bainha de mielina, associando as unidades lipídicas simples montadas durante do transporte em direção à membrana plasmática, e garantindo sua compactação ideal. Essas camadas de mielina secretadas

pelas CS envolvem seus respectivos axônios em um arranjo espiral e segmentado ao longo da fibra nervosa, formando assim uma bainha isolante descontínua (Figura 7) [46]. Entre os segmentos de mielina, localizam-se os nódulos de Ranvier, região onde há uma alta densidade de canais de sódio voltagem-dependentes que produzem potenciais conduzidos pelo modo saltatório ao longo do axônio por entre os nódulos [50].

As CS mielinizantes e não-mielinizantes diferem também em suas funções, sendo as células do perfil mielinizante melhor compreendidas. Esse fenótipo em particular, possibilita o modo de condução nervosa saltatório através da bainha de mielina, além de contribuir para estrutura e regular a formação dos nódulos de Ranvier. Já as células não-mielinizantes são essenciais para manutenção e funcionamento dos axônios aos quais estão associadas, e estão envolvidas nos mecanismos de nocicepção na fase adulta [51]. Ambos os fenótipos de CS apresentam considerável plasticidade, podendo sofrer um processo de desdiferenciação caso a interação com o axônio seja interrompida, regredindo assim, para seu estágio imaturo. O restabelecimento desse contato proporciona o retorno dessa célula a um de seus perfis maduros, o que depende dos sinais fornecidos pelos axônios aos quais estão associadas [41].



**Figura 7: Etapas de diferenciação das células de Schwann em associação com os axônios.** (1) CS precursoras proliferam ao longo do axônio. (2) As CS imaturas têm dois destinos: ou se associam a diversos axônios de menor calibre (Renak bundle) (3) ou envolvem axônios de maior diâmetro e se diferenciam em CS mielinizantes (5). Esses eventos são controlados pela interação da neuregulina 1 do tipo III, presente na superfície do axônio (5), com os receptores ErbB localizados nas CS [34].



### 1.2.2) *M. leprae* e células de Schwann

O ML apresenta um tropismo pelos nervos periféricos, que são formados por unidades de CS-axônio completamente envolvidas pela lamina basal, uma característica anatômica que exige que os mecanismos de invasão utilizados por essa bactéria sejam diferentes daqueles adotados, por exemplo, na infecção de macrófagos [52].

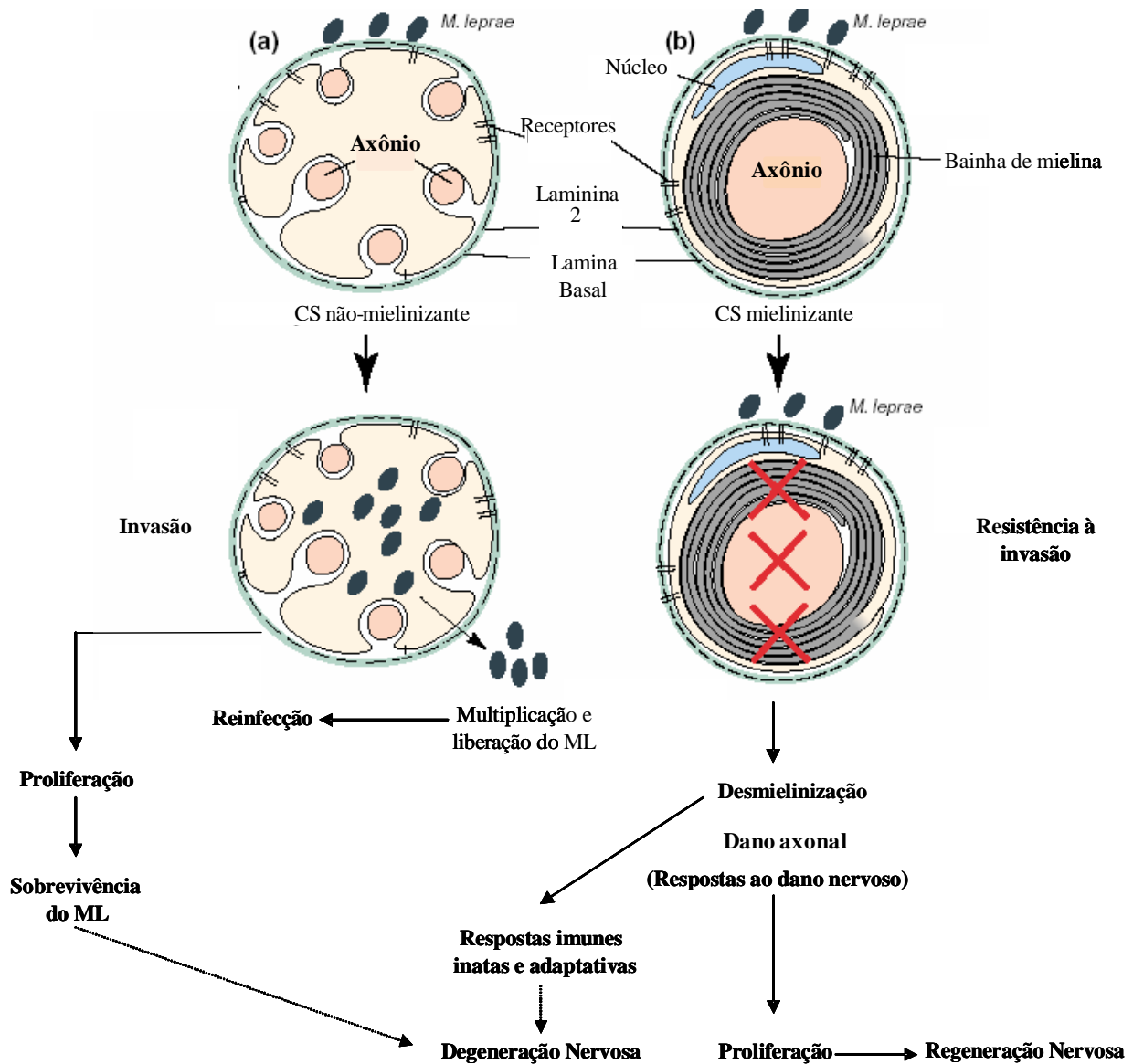
A adesão do ML às CS é mediada pela interação do PGL-1 e algumas adesinas da micobactéria, como a LBP21, com a cadeia  $\alpha_2$  da laminina-2, que compõe a lâmina basal das CS (Figura 8). Com o auxílio do receptor  $\alpha$ -dístroglicano, um tipo de receptor de laminina-2 presente na membrana da célula que pode se ligar ao ML, essas moléculas permitem a infecção das CS pela micobactéria [53]. A cadeia  $\alpha_2$  da laminina apresenta uma distribuição muito restrita, sendo encontrada apenas nas lâminas basais de CS, músculo estriado e placenta, fato que pode justificar o tropismo dessa bactéria pelo SNP [52].

Como as CS não são fagócitos profissionais, elas apresentam dificuldade de destruir o ML, que por permanecer no meio intracelular consegue escapar da ação do sistema imune do hospedeiro e se proteger contra agentes terapêuticos, garantindo sua sobrevivência e replicação [54]. Apesar dessa micobactéria não apresentar mecanismos de locomoção, esta pode se mover através do endotélio e tecidos conjuntivos para alcançar as CS, sendo possível que seu transporte para o SNP seja realizado via macrófagos infectados ou capilares intraneurais [54].

O ML pode infectar tanto CS mielinizantes como não-mielinizantes, tendo preferência pelas últimas, que parecem ser mais susceptíveis a esse tipo de parasitismo. Essas células, além de serem os principais alvos de infecção desse patógeno, também podem ser as responsáveis pela sua contínua liberação na circulação, e, portanto, pela sua disseminação para outras partes do organismo ([54]; [50]).

Estudos demonstraram que, na ausência de células imunes, o simples contato entre o ML e as unidades de CS mielinizantes /axônios, é suficiente para induzir a ruptura da bainha de mielina, sem causar apoptose na neuroglia nem nos neurônios. Apesar da manifestação dos sintomas da hanseníase ser dependente das respostas imunológicas do hospedeiro contra a micobactéria, essa desmielinização inicial causada pela bactéria

poderia acarretar um desequilíbrio na homeostasia do microambiente neural, desregulando algumas vias de sinalização importantes para manutenção da integridade da bainha, e levando assim, ao desenvolvimento de um rápido processo de desmielinização. Esse efeito pode ser provocado pelo contato celular tanto com bactérias viáveis como bactérias mortas, e até mesmo com as moléculas de PGL-1 [50].



**Figura 8:** Esquema dos possíveis efeitos da infecção das células de Schwann pelo *M. leprae*. (a) CS não-mielinizantes e (b) mielinizantes podem ser infectadas pelo ML. Entretanto, nas CS não-mielinizantes, a bactéria multiplica-se e é liberada no meio, podendo infectar outras células. O ML pode aumentar o número de CS não-mielinizantes, seu nicho preferido, através da indução proliferação das mesmas, ou pelo processo de desmielinização [50].

### 1.2.3) Papel das células de Schwann na lesão neural da hanseníase

Como discutido anteriormente, o acometimento neural é um dos marcos da hanseníase e a principal causa de morbidade entre os indivíduos afetados [55]. Entre os mecanismos envolvidos na lesão dos nervos periféricos, podemos destacar a possível interferência bioquímica do ML com o metabolismo celular do hospedeiro, o dano mecânico provocado pelo influxo de células e fluido e a ação imunológica. Esse quadro desenvolve-se particularmente durante as reações do tipo 1, onde são registradas, elevada participação da imunidade celular e uma hipersensibilidade mediada por linfócitos T contra os antígenos do ML, cenários dos quais as CS podem participar ativamente [56].

Spierings e colaboradores (2000) demonstraram que CS humanas são capazes de endocitar, processar e apresentar antígenos micobacterianos para linfócitos T CD4<sup>+</sup> via MHC de classe II, além de expressar outras moléculas envolvidas na apresentação de antígenos como MHC de classe I, ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1) e CD80 [56]. Essas células, portanto, podem agir como apresentadoras de antígenos não profissionais, tornando-se, assim, alvos dos linfócitos T citotóxicos. Recentemente, Hao e colaboradores (2009) demonstraram que a expressão de TLR4, uma molécula do sistema imune inato que reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), é tanto constitutiva como induzível em CS, o que aumenta a sua capacidade de interagir com endotoxinas bacterianas [57]. Esse tipo celular também expressa o receptor TLR2, cuja ativação por uma lipoproteína de 19 kDa do ML promove apoptose celular, o que pode colaborar para injúria tecidual [55].

Além disso, as CS sofrem a ação de mediadores secretados pelas células inflamatórias presentes na lesão, que podem não apenas causar efeitos deletérios para unidade CS-axônio, mas também determinar o perfil da contribuição desse tipo celular para o dano neurológico. Foi descrito que as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são capazes de induzir e aumentar a expressão de I-CAM 1 na superfície das CS, que além de contribuir para a função de apresentação de antígenos próprios e não-próprios aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, permite a ação citotóxica mediada pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nesse tipo celular. Outro possível efeito dessas moléculas seria a produção de óxido nítrico (NO), composto potencialmente tóxico para os axônios e CS, por meio da indução da enzima NO

sintase [58]. Em CS de ratos, a combinação das citocinas TNF-  $\alpha$  e TGF- $\beta$  provoca a dissociação da unidade axonal e a lise dessas células [59].

As CS também têm a capacidade de produzir e secretar uma variedade de citocinas, o que reforça o seu potencial de modular a resposta imunológica, tanto sob condições patológicas quanto normais. Estudos já detectaram a liberação de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-8 por essas células *in vitro* e algumas dessas moléculas também *in vivo*, assim como de outros mediadores pró-inflamatórios como a prostaglandina E2, o tromboxano A2, o leucotrieno C4 e NO ([60]; [61]). A secreção de MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) acoplada à síntese de IL-8, após a infecção das CS, evidencia uma das possíveis contribuições dessas células para o recrutamento celular e para eventos iniciais que podem levar ao agravamento do dano neural [60]. Hao e colaboradores (2009) sugerem que essas células são a primeira linha de defesa contra a presença de endotoxinas nos nervos mielinizados, produzindo imediatamente mediadores inflamatórios, e contribuindo, portanto, para a disfunção axonal seguida de infecções bacterianas [57].

Apesar das CS colaborarem indiretamente com a injúria nervosa, essas células são essenciais para o processo de regeneração do nervo periférico, através da sua influência neurotrófica e neurotrópica [62]. O dano neural é seguido de um fenômeno denominado “degeneração Walleriana”, que consiste em uma série de respostas celulares direcionadas para a remoção e reciclagem de fragmentos oriundos da destruição celular, gerando assim, um ambiente permissivo para o início da regeneração axonal. Os macrófagos são recrutados para o local comprometido, e juntamente com as CS promovem a retirada dos *debris* celulares e, desta forma, enquanto a porção distal do axônio sofre degeneração, a região proximal inicia a sua recuperação [63].

O reparo do nervo afetado compreende basicamente dois fenômenos: a proliferação das CS dissociadas do axônio e a remielinização, eventos que são regulados, principalmente, por proteínas de matriz extracelular, fatores neurotróficos e hormônios ([58]; [63]). A degeneração nervosa ocasiona a perda de contato entre as CS e o axônio comprometido, o que leva essas células a iniciarem o processo de desdiferenciação, que só é revertido após o restabelecimento de um novo contato axonal. A laminina e seus receptores, integrina  $\beta$ 1 e distroglicano, têm uma importante participação na regulação da sobrevivência e proliferação das CS, assim como, na sua organização espacial ao longo dos axônios durante a reconstrução nervosa [63].

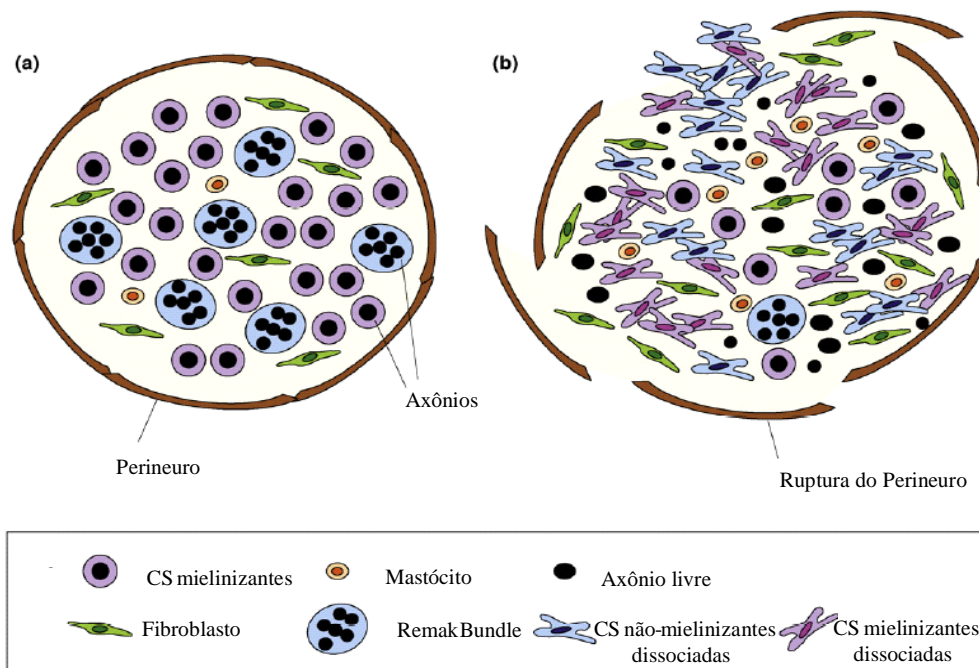
Entre os fatores neurotróficos envolvidos na reconstrução do nervo, temos a família da neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 e NT4/5), o FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2), o GDNF (fator neurotrófico derivado da glia), a neuregulina-1 e o TGF- $\beta$  que, de um modo geral, contribuem para sobrevivência e proliferação das CS, manutenção e organização estrutural dos neurônios e para remielinização [63].

O papel da neuregulina-1 no desenvolvimento de CS parece ser distinto daquele que exerce na regeneração nervosa, não sendo nesse caso essencial para a proliferação das CS e apresentando uma participação reduzida nos eventos de remielinização. Já o TGF- $\beta$ , que durante o desenvolvimento atua no controle da densidade populacional e na inibição da mielinização das CS, age aumentando o tropismo das mesmas por axônios em crescimento após o dano neural [63].

#### **1.2.4) A linhagem ST88-14**

A maioria dos tumores que ocorre no SNP é derivada das CS ou de seus precursores. Estes neoplasmas incluem neurofibromas, schwannomas e tumores malignos da bainha nervosa periférica [64].

A estrutura normal dos nervos periféricos compreende fascículos unidos por tecido conjuntivo. Cada fascículo, a unidade básica do nervo, é formado por grandes axônios envoltos por CS mielinizantes, *Renak bundles*, fibroblastos endoneurais e mastócitos envoltos em matriz extracelular, que juntos são encapsulados por células perineurais. Nos neurofibromas, a estrutura dos fascículos é completamente desorganizada, com elevado número de fibroblastos e de CS, sendo a maioria encontrada dissociada de seus axônios, alta deposição de colágeno, degeneração axonal e ruptura do perineuro (Figura 9) [65].



**Figura 9: Estrutura normal do nervo periférico e dos neurofibromas.** Diagrama mostrando a seção transversal de (a) um fascículo nervoso normal e (b) a estrutura aberrante dos fascículos em neurofibromas [65].

A ST88-14 é uma linhagem de SC que está entre os schwannomas imortalizados por Yan e colaboradores (1995), e foi isolada de um paciente com neurofibromatose-1, uma desordem genética causada pela inativação de uma das cópias do gene *Nf1*, fato que predispõe o indivíduo a desenvolver neurofibromas ([65]; [66]; [67]). O gene *Nf1* codifica a proteína supressora de tumor neurofibromina, capaz de inativar a proteína Ras, convertendo seu GTP em GDP, e, portanto, inibindo essa via de sinalização celular [65].

A linhagem ST88-14 apresenta altos níveis de Ras-GTP (forma ativa), provavelmente, devido à produção de baixos níveis de neurofibromina, e expressa grandes taxas de algumas variantes de CD44, molécula associada à invasão de células tumorais e metástase [68].

Essas células têm sido adotadas por alguns grupos como modelo para o estudo da interação entre ML e CS. Foi demonstrado que o ML é capaz de invadir essas células através de uma proteína específica de 21 kDa ligante da laminina (LBP21), e que lipoproteínas dessa micobactéria são capazes de ativar receptores Toll-like 2 presentes nessa linhagem, podendo levar à apoptose e secreção de citocinas por parte dessas células. As ST88-14 também apresentam um receptor de manose na sua superfície que facilita a

entrada do ML. De um modo geral, o fenótipo dessas células se assemelha ao das CS não-mielinizantes, o que faz dessa linhagem um modelo ideal para o estudo da interação ML/CS [67].

### **1.3) FATOR DE NECROSE TUMORAL – $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

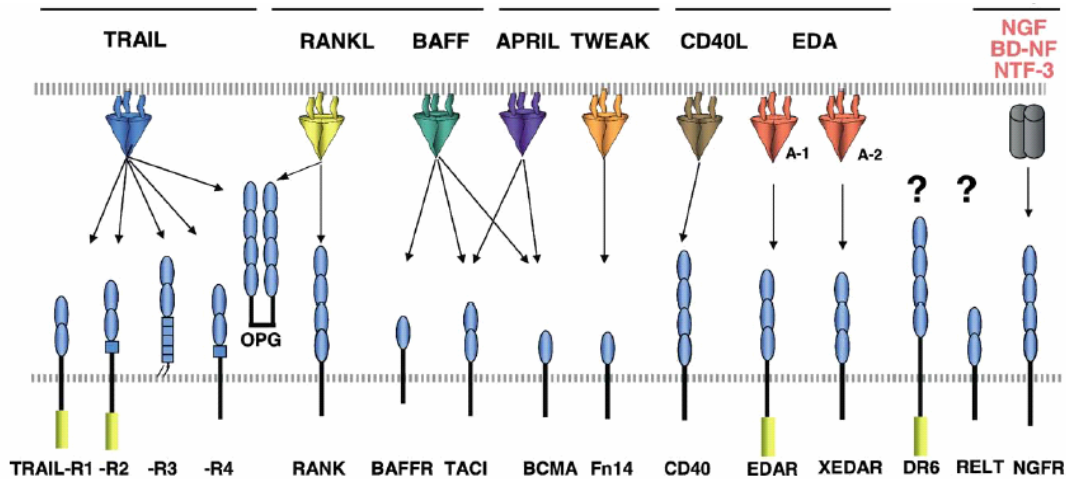
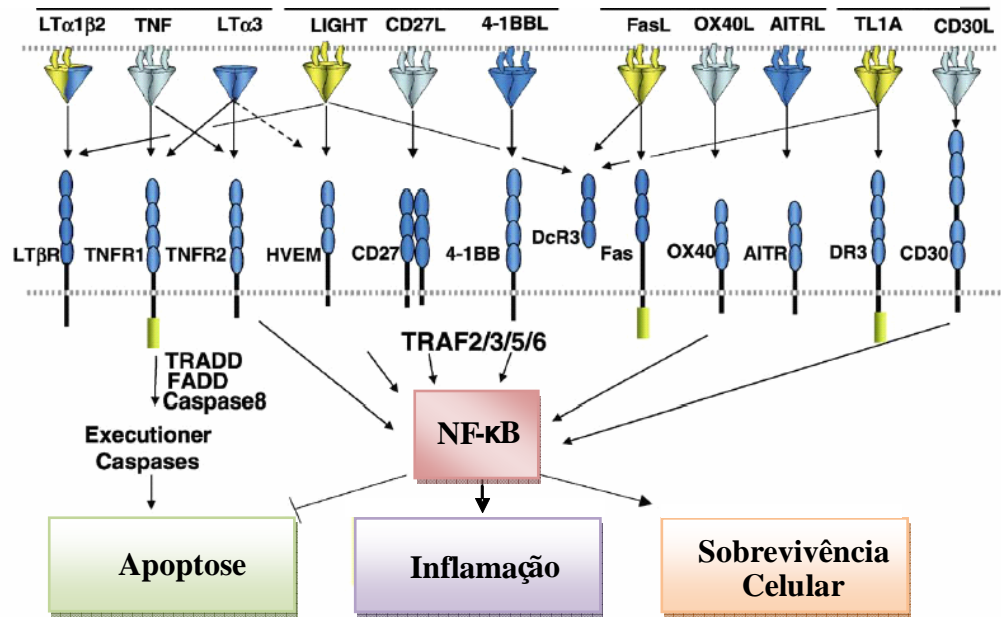
#### **1.3.1) A superfamília do TNF**

A superfamília do TNF engloba atualmente 19 ligantes que promovem seus efeitos biológicos através da interação com receptores específicos pertencentes à superfamília de receptores de TNF [69]. A maioria dos membros da superfamília do TNF, com exceção da LT- $\alpha$  (linfotoxina  $\alpha$ ), são proteínas transmembrânicas do tipo II que compartilham um domínio homólogo de TNF (THD) na região C-terminal, cujo arranjo espacial resulta no formato trimérico característico dessas moléculas ([70]; [69]). Muitos representantes dessa superfamília podem ser expressos na forma transmembrânica ou clivados proteoliticamente da membrana celular por proteases específicas, entretanto, a maioria age principalmente quando associada à membrana e requer contato célula-célula para induzir seus efeitos, o que sugere que em condições normais esses fatores têm ação local ([70]; [71]).

Tanto as formas secretadas da superfamília do TNF quanto às transmembrânicas são capazes de interagir com um ou mais integrantes da superfamília dos receptores de TNF, e cada tipo de associação ligante-receptor corresponde a um sistema de sinalização específico, já sendo conhecidos atualmente mais de 40 vias (Figura 10) [69]. A superfamília de receptores de TNF é constituída por 30 proteínas transmembrânicas do tipo I com domínios homólogos ricos em repetições de cisteína na porção extracelular, através do qual interagem com o THD dos seus ligantes [72]. Entre os receptores dessa família, há um grupo que apresenta o domínio de morte (DD) na porção citoplasmática, uma região de aproximadamente 80 aminoácidos envolvida na indução de apoptose celular [71].

Ao contrário de seus receptores, que são expressos por uma variedade de tipos celulares, a maioria das moléculas da superfamília de TNF é expressa apenas por células do sistema imune como linfócitos B, linfócitos T, células Natural killer (NK), monócitos e células dendríticas. A associação ligante-receptor entre esses dois grupos pode levar a apoptose, sobrevivência, diferenciação ou proliferação celular, através da ativação de vias de sinalização que podem envolver NF- $\kappa$ B, Jun kinase amino-terminal (JNK), as kinases ativadas por mitógenos (MAPK) p42/p44 e p38 [71].





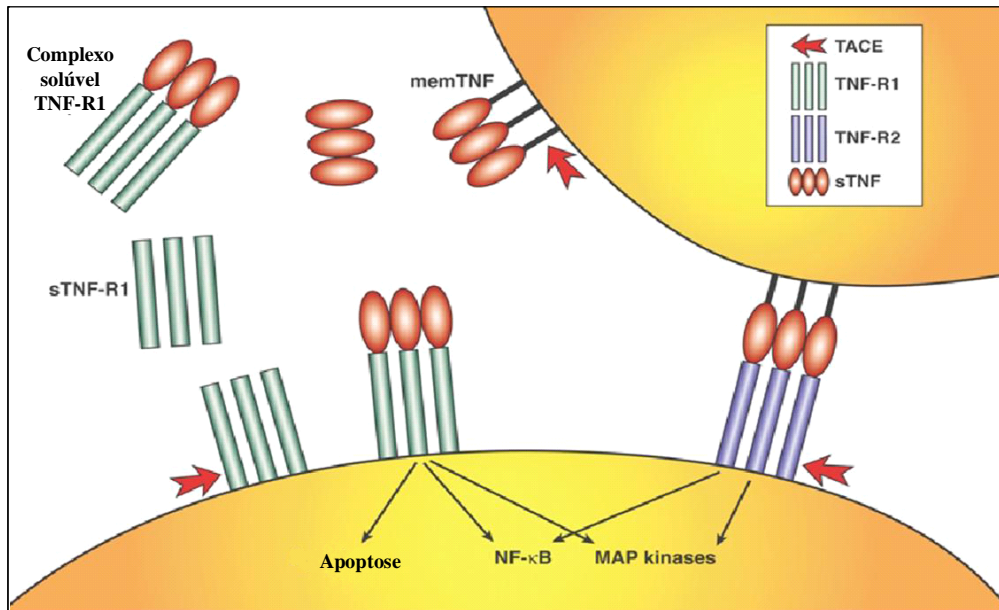
**Figura 10: A superfamília de TNF.** Descrição dos ligantes da família do TNF. As setas indicam interações com receptores conhecidos. O ectodomínio dos receptores é mostrado em azul com o número aproximado de domínios ricos em cisteína. Aqueles receptores com caudas citoplasmáticas que contêm um domínio de morte são identificados com um cilindro amarelo. Os outros receptores se ligam a moléculas adaptadoras TRAF [69].

### 1.3.2) Biologia do TNF- $\alpha$ e seus receptores

O TNF- $\alpha$  foi identificado em 1975 como uma endotoxina sintetizada sob ativação do sistema imune e capaz de exercer uma citotoxicidade significativa em diversas linhagens tumorais, promovendo necrose tumoral em muitos modelos animais [73]. Desde então, tem sido observado o intenso envolvimento dessa citocina em diversas condições patofisiológicas, através de seus efeitos no crescimento, na diferenciação e na morte de vários tipos celulares, sendo considerada, portanto, uma das principais moléculas reguladoras da inflamação e de respostas imunes [74]. Apesar de ser produzido por diversos tipos celulares, a principal fonte do TNF- $\alpha$  *in vivo* são os macrófagos e os monócitos submetidos a estímulos inflamatórios, infecciosos ou acionados por injúria tecidual, que ao liberarem essa citocina, deflagram um largo espectro de ações biológicas, cuja natureza depende do tipo e do estágio de desenvolvimento da célula alvo [75].

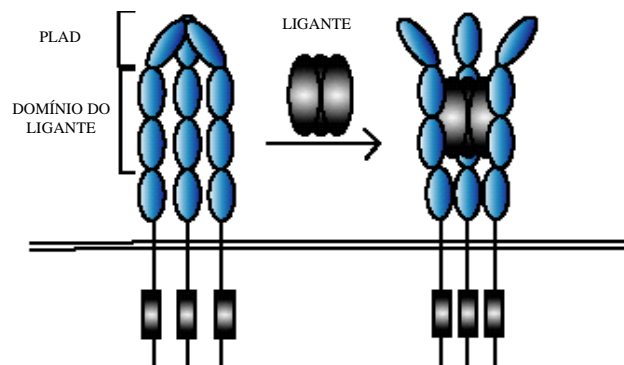
O TNF- $\alpha$  é codificado dentro do *locus* do MHC e sintetizado inicialmente como moléculas transmembrânicas do tipo II de 26 kDa arranjadas em complexos homotriméricos estáveis na superfície celular. A porção extracelular desses complexos pode ser clivada proteoliticamente pela enzima TACE (Enzima Conversora de TNF- $\alpha$ ), e liberada como um arranjo protéico solúvel constituído de três unidades de 17 kDa associadas (Figura 11) [76]. Ambas as formas dessa citocina são biologicamente ativas e podem apresentar perfis de ação e efeitos celulares distintos [77].

As ações mediadas pelo TNF- $\alpha$  são promovidas através da sua ligação com os receptores TNF-R1 (CD120a, p55/60) e TNF-R2 (CD120b, p75/80) que transmitem a informação extracelular para célula alvo através da ativação de vias de sinalização distintas ou até mesmo sobrepostas [78]. Ambas as moléculas são glicoproteínas transmembrânicas simples que compartilham cerca de 28% de identidade, principalmente entre os domínios extracelulares, que podem ser clivados proteoliticamente e liberados no meio como fragmentos potencialmente neutralizantes de seus respectivos ligantes (Figura 11) [79].



**Figura 11: Representação das formas biologicamente ativas do TNF- $\alpha$ .** Interação entre o TNF- $\alpha$  de membrana e solúvel com seus receptores (TNF-R1 e TNF-R2). As setas vermelhas destacam os sítios de clivagem onde a TACE atua [80].

A ativação inicial desses receptores envolve regiões conhecidas como PLAD (domínio de associação prévia ao ligante) localizadas na porção distal extracelular de suas cadeias simples. Na ausência do ligante, os PLADs interagem entre si e formam complexos triméricos de receptores ao longo da superfície celular, que permanecem assim, em estado silencioso e, por conseguinte, menos susceptíveis a auto-ativação espontânea. A ligação do TNF- $\alpha$  promove uma série de mudanças conformacionais nesses conjuntos, tornando-os competentes para recrutar moléculas citoplasmáticas ou induzindo a formação de associações mais complexas a fim de alcançar uma transmissão de sinal eficiente (Figura 12) [76].



**Figura 12: Complexos de receptores associados pelos PLADs:** A interação mais estável com o ligante desfaz a estrutura silenciosa mantida pelos PLADs, dando início a ativação do complexo de receptores [81].

O TNF- $\alpha$  promove a maioria das suas ações biológicas através da ativação do TNF-R1, cuja porção intracelular C-terminal apresenta um domínio de morte (DD) capaz de ancorar outras moléculas acessórias e levar a ativação de vias apoptóticas na célula-alvo [79]. Esse receptor é expresso na maioria dos tecidos, sendo encontrado em diversos tipos celulares e pode ser ativado tanto pelo TNF- $\alpha$  solúvel quanto pela forma de membrana, com os quais estabelece uma ligação de alta afinidade, seguida da internalização do complexo TNF/TNF-R1 ([82]; [77]; [76]).

O TNF-R2 é ativado apenas pela ligação com o TNF- $\alpha$  de membrana, que devido a reduzida estabilidade dessa interação, pode dissociar-se da molécula receptora e ativar o TNF-R1 da mesma célula, fenômeno conhecido como “passagem de ligante” e exclusivo de certos tipos celulares [77]. Após sua ativação, esse receptor é rapidamente clivado da superfície celular e liberado no meio, podendo assim, agir como uma molécula neutralizante [78]. A expressão do TNF-R2 é induzível e sua distribuição tecidual é restrita, sendo característica de células do sistema imune [76]. Ao contrário do TNF-R1, esse receptor não possui um DD na sua cauda citoplasmática e parece estar principalmente envolvido na indução de vias de proliferação e sobrevivência celular, apesar de também poder ativar vias apoptóticas, independentemente ou em cooperação com TNF-R1 [79].

### **1.3.3) Sinalização Celular**

Como mencionado anteriormente, as moléculas não ativadas de TNFRs dispõem-se em trímeros associados através de PLADs ao longo da superfície celular, o que os mantém em estado silencioso. Quando dispostos nesses complexos, as porções citosólicas das cadeias de TNF-R1 apresentam seus domínios de morte acoplados aos SODD (silenciadores do domínio de morte), que bloqueiam fisicamente esses sítios e contribuem para não-atividade do receptor [73]. A ligação do TNF- $\alpha$  promove mudanças conformacionais nos complexos de TNF-R1 que induzem a dissociação dos SODD e, por conseguinte, a exposição dos DDs, que podem então, recrutar as moléculas TRADD (proteína do domínio de morte associado ao receptor de TNF) [79].

TRADD inicia a sinalização associando-se a RIP-1 (proteína de interação com receptor-1) e a TRAF-2 (fator associado ao receptor de TNF – 2), formando o complexo I

que se destaca do TNF-R1 após a internalização do receptor [73]. Antes de se separar do receptor, essa estrutura mobiliza a via de NF- $\kappa$ B, através da ativação de I $\kappa$ B kinase (IKK), um complexo formado de duas subunidades catalíticas (IKK- $\alpha$  e/ou IKK- $\beta$ ) e uma regulatória (IKK- $\gamma$ ) que leva à fosforilação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , o que pode servir de sinal para a posterior ubiquitinação e degradação dessa proteína. Esse evento libera o NF- $\kappa$ B, retido no citoplasma pela associação com I $\kappa$ B- $\alpha$ , permitindo sua migração para o núcleo, onde poderá regular a transcrição de diversos genes relacionados à sobrevivência celular, como, por exemplo, as proteínas antiapoptóticas bcl-xL, c-FLIP e XIAP (Figura 13) [83].

Após a dissociação do TNF-R1, o complexo I (TRADD/TRAF-2/RIP-1) recruta as moléculas FADD (proteína com domínio de morte associado a Fas) e a procaspase-8, formando então, o chamado complexo II, que por sua vez, ativa a procaspase-8, convertendo-a em caspase-8 [83]. A atividade do complexo II pode ser inibida pelo regulador negativo c-FLIP, cuja transcrição é induzida pelo NF- $\kappa$ B, sugerindo que, na sinalização do TNF-R1, a via apoptótica só predomina sobre a via pró-inflamatória e de sobrevivência celular quando o complexo I falha em ativar NF- $\kappa$ B (Figura 13) [84]. Quando funcional, o complexo II ativa caspase-3 que cliva diversas proteínas citoplasmáticas responsáveis pelas alterações morfológicas e bioquímicas características do processo apoptótico. Em alguns casos, a caspase-8 do complexo II pode clivar BID, uma molécula capaz de ativar a via apoptótica intrínseca, que envolve processos como a liberação do citocromo-c e a formação do apoptossoma, podendo assim, amplificar a cascata apoptótica já iniciada pelo TNF-R1. Entretanto, em células classificadas com do tipo II, a apoptose só pode ser induzida através da via intrínseca e a ativação do TNF-R1 leva à clivagem direta de BID [85].

Como mencionado anteriormente, o TNF-R2 não possui DD na sua cauda citoplasmática e, portanto, assim que é ativado recruta TRAF-2 diretamente. TRAF-2, por sua vez, se associa a TRAF-1, formando um complexo heterodimérico capaz de ativar a via de NF- $\kappa$ B [73]. As moléculas c-IAP-1 e c-IAP-2 juntam-se a esse complexo após a indução de sua transcrição por NF- $\kappa$ B, e atuam bloqueando a atividade da caspase-8 e inibindo a apoptose celular (Figura 13) [79].

A sinalização mediada por TNF-R2 também ativa vias pró-apoptóticas através da cooperação com TNF-R1 pelo fenômeno de “passagem de ligante”, onde a ativação inicial de TNF-R2 leva a depleção de TRAF-2 do citoplasma, indisponibilizando essa molécula

para a montagem do complexo I do TNF-R1, e, portanto, comprometendo a posterior indução das vias de NF- $\kappa$ B e JNK por esse receptor [86]. A via utilizada pelo TNF-R2 para induzir apoptose de maneira independente de TNF-R1 ainda não foi elucidada, entretanto, sabe-se que é necessário recrutamento de RIP-1 por esse receptor [79].

A utilização de diferentes vias de sinalização pelo TNF-R1 e TNF-R2 é consistente com a capacidade de cada receptor de poder induzir respostas biológicas distintas, onde a ativação do TNF-R1 é suficiente para induzir os efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios do TNF- $\alpha$ , e a ação de TNF-R2, além de cooperar com o receptor 1, também pode promover a ativação, proliferação e migração celular [73].

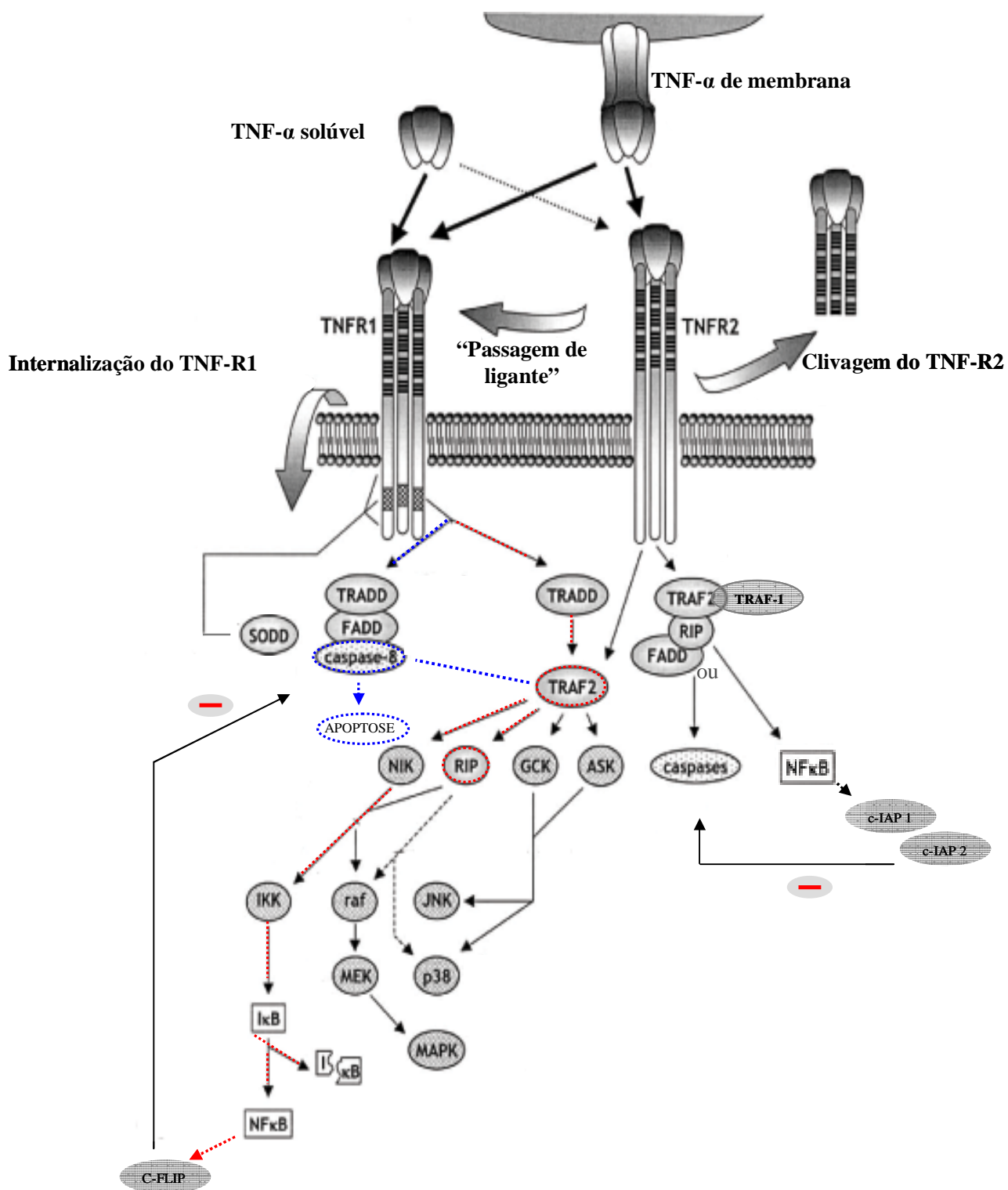
### **1.3.3.1) Proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPKs)**

A superfamília das MAPKs engloba uma ampla rede de moléculas reguladoras de uma variedade de processos fisiológicos, como o crescimento celular, a diferenciação, a migração, a apoptose, entre outros, e é formada por pelo menos 3 subfamílias: as ERKs (kinases reguladas por sinais extracelulares), p38 e as JNKs (Jun amino-terminal kinase) [87]. Cada um desses grupos é composto por três espécies de kinases evolutivamente conservadas que atuam em seqüência nas cascatas de sinalização. São elas, as MAPK kinase kinases (MAPKKK) que ativam as MAPK kinases (MAPKK), que por sua vez, agem sobre as MAPK, cujo efeito biológico depende das moléculas com as quais irão interagir a partir desse evento [88]. Esse arcabouço de ativações sucessivas além de promover a amplificação do sinal, também aumenta em número os possíveis pontos regulatórios da via, permitindo o controle da cinética, da amplitude e da duração de sua atividade [89].

A subfamília ERK é extensamente estudada e compreende as isoformas ERK 1 (p44) e ERK 2 (p42) que apresentam em sua estrutura a seqüência de aminoácidos treonina-glutamina-tirosina inserida em seus domínios kinases [87]. Essas proteínas possuem cerca de 83% de identidade entre si e são expressas em praticamente todos os tecidos. Tipicamente elas são ativadas por receptores acoplados á proteína G ou á tirosina kinase, que convertem a proteína Ras em sua forma ativa, convertendo seu GDP em GTP por intermédio da molécula SOS (“son of sevenless”). Ras atua, então, como um

adaptador que se liga com alta afinidade a MAPKKK Raf -1, translocando-a para membrana plasmática, aonde irá fosforilar e ativar as MAPKKs MEK (MAP/ERK kinase) 1 e 2 [89]. MEK 1/2 são responsáveis pela total ativação das ERK 1/2, que migram para diferentes compartimentos celulares, inclusive para o núcleo, e fosforilam inúmeros substratos. Essas moléculas são descritas como reguladores essenciais da proliferação celular, estando também envolvidas na migração e na proteção celular contra o estresse oxidativo [88]. Há trabalhos que descrevem a habilidade do TNF- $\alpha$  de ativar Ras em diversas linhagens celulares, sendo, portanto, capaz de mediar seus efeitos biológicos através da ativação da via de ERK [90].

A subfamília das MAPKs p38 compreende as isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$  da proteína p38, que estão envolvidas em respostas celulares ao estresse, como a hiperosmolaridade, irradiação ultra-violeta e inibição da síntese de proteínas, tendo participação também na sinalização de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [91]. A p38 compartilha cerca de 50% de identidade com as proteínas ERK, mas ao contrário destas, não responde eficientemente a estímulos mitogênicos. É ativada pelas MAPKKs MEK 3 e MEK 6, que, por sua vez, podem ser ativadas por uma amplo espectro de MAPKKKs. A p38 pode ser encontrada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células, mas sua localização após a ativação ainda não é bem compreendida, havendo evidências de sua localização em ambos os compartimentos. As isoformas de p38 estão envolvidas em mecanismos de apoptose, diferenciação, sobrevivência, proliferação, desenvolvimento, inflamação e respostas ao estresse ambiental [92].



**Figura 13: Vias de sinalização moduladas por TNF-R1 e TNF-R2.** As linhas pontilhadas vermelhas indicam as moléculas recrutadas pelo complexo I do TNF-R1. As linhas pontilhadas azuis indicam as moléculas recrutadas pelo complexo II do TNF-R1. O sinal (—) indica inibição de outra via de sinalização celular [78].



#### 1.3.4) TNF- $\alpha$ e a lesão neural da hanseníase

Diversas evidências fornecidas por estudos *in vivo* e *in vitro* apontam para o envolvimento do TNF- $\alpha$  na imunopatogênese de doenças inflamatórias desmielinizantes do SNC e SNP [93]. Níveis elevados dessa citocina são observados em desordens neurodegenerativas, como a síndrome de Alzheimer, de Parkinson e esclerose múltipla, assim como, em lesões provocadas por trauma cerebral e dano isquêmico [94]. Já foi demonstrada a interferência prejudicial do TNF- $\alpha$  na velocidade de transdução nervosa e sua participação na destruição de nervos periféricos, observados na patologia de neurites, como por exemplo, a síndrome de Guillain-Barré, que se estabelecem após infecções microbianas [57]. De fato, a produção inapropriada ou ativação sustentada dessa molécula pode provocar extensa injúria tecidual, através de ações como recrutamento constante de macrófagos ativados e indução da liberação de mediadores inflamatórios no sítio lesionado.

Atualmente inúmeros dados evidenciam o extenso envolvimento do TNF- $\alpha$  no contexto imunológico e patológico da hanseníase. Níveis elevados dessa citocina são observados na derme e na epiderme de pacientes, assim como no soro durante os episódios reacionais ([95]; [96]). Além disso, foram identificadas altas concentrações de RNA mensageiro de TNF- $\alpha$  em biópsias de nervo de pacientes em reação reversa e de pacientes com a forma neural pura [97], o que sugere que esta molécula apresenta uma forte contribuição para o dano neurológico característico dessa doença.

Como mencionado anteriormente, a lesão neural da hanseníase é acompanhada de uma resposta inflamatória orquestrada pelas CS associadas aos axônios, e que por expressarem constitutivamente ambos os receptores de TNF- $\alpha$ , representam alvos em potencial dessa citocina. Apenas recentemente foi demonstrado que as CS são capazes de secretar TNF- $\alpha$ , o que significa que essas células, além de serem moduladas por essa molécula, também podem sustentar a sua produção no nervo periférico [98].

Na lesão neural, a ativação das CS provoca um rápido aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  no endoneuro, que por sua vez, intensifica o influxo de macrófagos ativados para região, deflagrando assim, a secreção de uma complexa rede de citocinas envolvidas no processo de degeneração Walleriana e dor neuropática ([99]; [100]). Além de contribuir para desmielinização e degeneração axonal, a produção sustentada do TNF- $\alpha$  atua promovendo o aumento da permeabilidade da barreira hemato-nervosa, a migração de outras células

imunes para o sítio da lesão e a liberação de mediadores inflamatórios como óxido nítrico, IL-1 $\beta$ , IL-6 e metaloproteinases (MMPs), podendo também induzir sua própria secreção (em uma alça de retroalimentação positiva), potencializando assim, o dano neurológico ([101]; [102]; [103]; [104])

Entretanto, apesar da sua intensa neurotoxicidade, o TNF- $\alpha$  pode atuar promovendo efeitos neuroprotetores, ou seja, aqueles resultantes da ativação da via de NF- $\kappa$ B, que visam controlar a extensão da injúria e a recuperação da região acometida. Na maioria dos modelos estudados, cuja grande parte engloba desordens inflamatórias do SNC, os efeitos citotóxicos dessa citocina são atribuídos à ativação do TNF-R1, enquanto que a ação via TNF-R2 parece estar envolvida em processos de proteção e regeneração tecidual ([105]; [106]; [76]; [107]). George e colaboradores (2005) observaram uma brusca elevação dos níveis de TNF-R2 em nervos lesionados de camundongos durante o processo de degeneração Walleriana, capaz de persistir por um longo período de tempo, sugerindo a possível participação desse receptor na regeneração da injúria nervosa [99].

## 2. JUSTIFICATIVA

A invasão das CS pelo ML resulta em dano celular, desmielinização e degeneração axonal, que correspondem a uma série de eventos que levam, freqüentemente, às deformidades características da hanseníase. No entanto, os eventos moleculares e celulares que perfazem esta interação e as diferentes formas clínicas da doença ainda não foram esclarecidos. Apesar do contato inicial entre o bacilo e a CS ter sido descrito como suficiente para a indução de desmielinização sem promover apoptose ou qualquer outro tipo de morte celular nessas células ou nos neurônios associados, também é aceito que a resposta imune inflamatória desencadeada pela presença da micobactéria ou de seus antígenos contribui para destruição da bainha de mielina e do nervo ([50]; [60]). Uma vez que dados anteriores de nosso grupo demonstraram que o ML aumenta a expressão gênica de TNF- $\alpha$  [108], esse estudo justifica-se pela necessidade de avaliarmos o papel dessa molécula na ativação das células de Schwann frente ao estímulo do ML, de modo a elucidar seu papel nas fases iniciais do dano nervoso. A análise da modulação da expressão e função do TNF- $\alpha$  em células de Schwann estimuladas com ML pode esclarecer o quadro inflamatório resultante do longo período de ativação dessas células observado no extenso dano neurológico da hanseníase, nas doenças neurodegenerativas e nos estágios crônicos de desmielinização inflamatória.

### 3. OBJETIVOS

***Objetivo geral:***

Avaliar o envolvimento do TNF- $\alpha$  na ativação de CS da linhagem ST88-14 na presença do ML.

***Objetivos específicos:***

1. Avaliar o efeito do ML na produção e secreção do TNF- $\alpha$  em CS da linhagem humana ST88-14;
2. Avaliar o efeito do TNF- $\alpha$  na indução da sua própria síntese e secreção em CS humanas da linhagem humana ST88-14;
3. Avaliar o efeito conjunto do ML e do TNF- $\alpha$  na produção e secreção dessa citocina em CS humanas da linhagem humana ST88-14;
4. Analisar o efeito do ML e do TNF- $\alpha$ , individualmente ou em associação, no perfil de secreção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 em CS da linhagem ST88-14;
5. Avaliar o envolvimento das proteínas ERK 1/2 e p38 nas vias de sinalização ativadas pelo TNF- $\alpha$  e ML, individualmente ou em associação, em CS da linhagem ST88-14.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cultura de células de Schwann da linhagem humana ST88-14

A linhagem celular humana ST88-14 foi isolada de um tumor maligno da bainha de mielina do nervo periférico, obtida de um paciente diagnosticado com neurofibromatose tipo 1 (NF-1) [109], gentilmente doada pelo Dr J.A. Flechter (Dana Farber Câncer Institute, Boston, Massachusetts, USA).

As células foram mantidas em meio RPMI (Sigma, MO, USA) suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 2 Mm de L-glutamina e 15% de soro fetal bovino (Hyclone, London, UK) em garrafas de cultura para tecido (Falcon) e incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Como esse tipo celular é aderente em cultura, as células foram soltas com Tripsina/EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) 0,25%/1mM por aproximadamente 1 minuto e suspensas em meio de cultura suplementado.

Nos experimentos de extração de RNA ou obtenção de extratos celulares para análise por western blotting e ELISA (ensaio imunoenzimático) foram plaqueadas 5 x 10<sup>5</sup> células/poço em placas de 6 poços. Para a realização da técnica de imunofluorescência, 7 x 10<sup>4</sup> células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidros esterilizadas e previamente tratadas com solução de silane 4% (aminopropyltriethoxysilane) (Sigma, USA) em etanol absoluto, por 4 minutos, submetidas então, a 2 lavagens em etanol absoluto e duas lavagens com água destilada estéril de 2 minutos cada. Posteriormente, as lamínulas foram acondicionadas em embalagem estéril até o momento do uso.

### 4.2. Estímulos

As células ST88-14 plaqueadas foram estimuladas por intervalos entre 15 minutos e 24 horas. Nos experimentos de avaliação da secreção do TNF- $\alpha$ , os estímulos foram adicionados por 2 horas, em seguida retirados e depois foi concedido um período de 24 horas em cultura para análise da secreção dessa citocina pela linhagem em questão. Já na avaliação da produção do TNF- $\alpha$  de membrana, os tempos de estímulo variaram entre 1 e

7 horas. Entre os estímulos aplicados, foi utilizado TNF- $\alpha$  humano recombinante (Rh) (Calbiochem, USA) em concentrações que variaram de 10 a 100 ng/ml e 2 e 10  $\mu$ g/ml de LPS. Foram adicionados, respectivamente, 12,5 e 1,75  $\mu$ g de ML nos experimentos com cultura de  $5 \times 10^5$  e  $7 \times 10^4$  células por poço, o que corresponde a uma multiplicidade de infecção de 50:1 (bactérias:células).

A temperatura ideal de crescimento do ML é de 33°C, sob a qual células humanas sobrevivem com dificuldade. Aliado ao fato dessa bactéria não ser viável *in vitro* por mais de um dia, nem mesmo a 33°C [110], optou-se por realizar os experimentos a 37°C com bacilos mortos, a fim de garantir o bom crescimento das células ST88-14. O ML utilizado nesse estudo foi generosamente doado pelo Dr. Brennan do Departamento de Microbiologia da Universidade do Estado do Colorado, CO, Collins, sendo cultivado em tatu, purificado e em seguida irradiado com raios gama.

### 4.3. RT-PCR em tempo real

Foi adicionado 1mL de Trizol às culturas de CS e o RNA extraído foi purificado conforme orientação do fabricante, utilizando clorofórmio e álcool isoamílico. O RNA foi precipitado por, pelo menos, 30min a -20 °C em isopropanol, em seguida, lavado em etanol 70%, ressuspensão em água livre de RNase (água devidamente tratada com diethylpirocarbonato – 0,1%) e armazenado a -70 °C até o uso.

#### \* 4.3.1) Síntese de cDNA

Em um tubo eppendorf contendo cerca de 1 $\mu$ g de RNA, foi adicionado 1 $\mu$ L de oligo dT (Invitrogen, MN, USA) e o volume final da reação foi elevado para 10 $\mu$ L, com H<sub>2</sub>O livre de RNase. O tubo foi, então, incubado por 10min a 65°C. Em seguida, foram adicionados 1 $\mu$ L de RNAsin (40U/ $\mu$ L) (Applied Biosystems, CA USA), 1 $\mu$ L de dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 0.2mM cada; Applied Biosystems), 4 $\mu$ L do tampão de transcrição 5X (Tris HCl 250mM, KCL 375mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM), 2 $\mu$ L de ditiotretol (DTT 0.1M), e 1 $\mu$ L Super Script II RNase H- (200U/ $\mu$ L). A reação foi realizada a uma temperatura de 42°C por 1h, e em seguida, o tubo foi aquecido a 90°C por 10min. O volume das amostras foi elevado para 80 $\mu$ L com água estéril e os tubos mantidos a -20°C até uso posterior.

Foi utilizado o sistema Taqman de RT-PCR em tempo real com o ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) para contínuo monitoramento da fluorescência.

Para a reação de PCR, as amostras de cDNA foram utilizadas na quantidade de 50 ng por reação em um volume final de 25  $\mu$ l ( já contendo o cDNA). Foram adicionados em cada poço (placa de 96 poços, ABI Prism optical plates, Applied Biosystems), 12,5  $\mu$ l de 2X TaqMan Universal Master Mix (1X) [contendo AmpliTaq Gold 250U, AmpErase UNG, 10X Taqman Buffer A e dNTPs] e 1  $\mu$ l 20x TaqMan assays contendo iniciadores e sondas específicas para as moléculas de interesse (TNF- $\alpha$  e GAPDH). O material foi então amplificado em um total de quatro etapas: 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, para a ativação da enzima AmpErase UNG, 1 ciclo a 95°C por 10 minutos para a ativação da AmpliTaqGold DNA polimerase e 45 ciclos contendo etapas de desnaturação a 95°C por 15 segundos e o anelamento e a extensão em uma mesma etapa a 60°C por 1 minuto.

A variação nos níveis de expressão dos genes de interesse foi calculada a partir da variação entre os valores de Ct deste gene e do GAPDH (gene endógeno) ( $\Delta$ Ct). Os valores de  $\Delta$ Ct foram calculados segundo a fórmula abaixo, de modo a gerar resultados que refletem a expressão dos genes em relação à expressão do GAPDH:

$$\Delta\text{Ct: (Ct gene de interesse} - \text{Ct GAPDH)}$$

De posse dos valores de  $\Delta$ Ct foram calculados os valores de  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , a fim de se ter a noção exata de quantas vezes mais um transcrito está presente em relação ao outro. Os valores foram utilizados como expoente para a base 2 devido ao fato do crescimento ocorrer de forma exponencial nas reações de PCR [111]. Por último, o expoente tem sinal negativo por questões matemáticas, permitindo a correção do fato de menores valores de Ct corresponderem a uma maior quantidade de RNAm.

#### **4.4. Western blotting**

A análise da produção de TNF- $\alpha$  ou ativação de ERK e p38 em células ST88-14 resultante dos estímulos aplicados foi feita pela técnica de western blotting. Após o tempo de estímulo e o recolhimento do sobrenadante da cultura, as células foram raspadas com

1ml de PBS 1X gelado e contadas. A quantidade de células de todos poços foi igualada para normalizar a concentração de proteína dos extratos.

Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a  $5000 \times g$  4°C e os sobrenadantes descartados. Ao *pellet* resultante foi adicionado 60 µl de tampão de lise (50mM Tris-Hcl, pH 7,5; 5mM EDTA, 10mM EGTA, 50mM NaF, 20mM β-glicerofosfato, 250mM NaCl, 0,1% Triton-X100) com inibidores de proteases (Calbiochem, USA) na diluição de 1:200 e os tubos mantidos a 4°C por 30 minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados a  $5000 \times g$  4°C por 15 minutos, os sobrenadantes contendo as proteínas foram coletados e armazenados a - 20°C até o uso.

Posteriormente, as amostras foram misturadas a um tampão 6X (10% glicerol, 5% 2-ME, 2% SDS, 0,06 M Tris-Hcl, pH 6,8 e Azul de Bromofenol), desnaturadas por 5 minutos a 100°C e aplicadas em um gel de poliacrilamida - SDS 12%. A corrida eletroforética foi realizada a 100V por aproximadamente 2 horas (tampão de corrida: 25 mM Tris Base, 192 mM glicina, 0,1% SDS) e a transferência das amostras para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, USA) foi feita a 100V por 1 hora (tampão de transferência: 25 mM Tris Base, 192 mM glicina, 10% metanol).

\* 4.4.1) Análise dos níveis intracelulares de TNF-α:

As membranas foram bloqueadas com solução de 3% BSA (Sigma, USA) em PBS 1X por 1 hora em temperatura ambiente ou overnight a 4°C. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas (PBS 1X) e incubadas com anticorpo monoclonal murino anti-tubulina (Sigma, USA) na diluição de 1:5000 e anticorpo monoclonal murino anti-TNFα (R&D Systems, USA) a 0,3 µg/ml em solução (1% BSA, PBS 1X, 0,15% Tween-20) por 1 hora cada, a temperatura ambiente. Foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Dako Cytomation, USA) na diluição de 1:2000 em solução (1% BSA, PBS 1X, 0,15% Tween-20) por 1 hora. Após cada incubação de anticorpo foram feitas 3 lavagens de 5 minutos cada (PBS 1X, 0,15% Tween-20). A visualização do resultado foi feita por quimioluminescência (ECL – Santa Cruz Biotechnology, USA). A densitometria das bandas resultantes foi realizada pelo programa Adobe Photoshop 7.0.1.



\* 4.4.2) Análise da fosforilação de ERK 1/2 e p38:

As membranas foram bloqueadas (5% leite desnatado, TBS 1X, 0,15% Tween-20) por 1 hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas (TBS 1X, 0,15% Tween-20) e incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-ERK 1/2 ou anti-p38 fosforiladas (Cell-Signaling Technology, USA) na diluição de 1:1000 em solução (5% BSA, TBS 1X, 0,1% Tween-20) overnight a 4°C. Foi utilizado um anticorpo secundário conjugado a peroxidase (Dako Cytomation, USA) na diluição de 1:2000 em solução (BSA 1%, TBS 1X, 0,15% Tween-20) por 1 hora a temperatura ambiente. Após cada incubação foram feitas 3 lavagens de 5 minutos (TBS 1X, 0,15% Tween-20) e a visualização do resultado foi realizada por quimioluminescência (ECL – Santa Cruz Biotechnology, USA).

Para a obtenção da taxa de fosforilação dessas proteínas, foi necessário analisar também os níveis de ERK 1/2 e p38 totais. Para isso, os anticorpos associados à membrana foram removidos (tampão de *stripping*: glicina 0,2 M pH 2,2; 0,05% Tween-20) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após 3 lavagens (TBS 1X, 0,15% Tween-20) de 5 minutos, as membranas foram novamente bloqueadas e incubadas com anticorpos policlonal de coelho anti-ERK 1/2 ou anti-p38 totais (Cell-Signaling Technology, USA) na diluição de 1:1000, da maneira previamente descrita. Após a visualização dos resultados, a densitometria das bandas foi feita pelo programa Adobe Photoshop 7.0.1.

#### **4.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

A análise da produção e secreção de TNF- $\alpha$  em células ST88-14 frente aos estímulos aplicados também foi realizada pela técnica de ELISA. Extratos celulares e sobrenadantes coletados da cultura foram obtidos de acordo com o procedimento descrito no item 4.4 e foram dosados por kits comerciais para TNF- $\alpha$  de alta sensibilidade (Ebioscience, USA).

Para análise de secreção de outras citocinas nos sobrenadantes coletados das culturas dessa linhagem foi foram utilizados kits comerciais para IL-6, IL-8 (Quantikine, R&D Systems, USA), IL-10 e IL-1 $\beta$  (Ebioscience, USA) de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro para microplaca (Spectra Max-Molecular Device, USA) com filtro de 450 nm e a análise dos resultados foi feita através

de um software específico (SOFTmax Pro 2.6, Molecular Devices, USA). Os níveis de produção da proteína foram expressos em pg/ml.

#### **4.5. Imunofluorescência**

##### **\* 4.5.1) Análise da fosforilação de p38 e ERK 1/2:**

Após o tempo de estímulo, os sobrenadantes das culturas foram descartados e as células lavadas com PBS 1X. Em seguida, elas foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 15 minutos. Após 3 lavagens de 5 minutos com PBS 1X, as lamínulas foram incubadas em solução de bloqueio e permeabilização (5% NGS, 0,3% Triton X-100, PBS 1X) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a incubação individual das respectivas lamínulas com os anticorpos policlonais de coelho anti-ERK 1/2 e anti-p38 fosforiladas (diluição 1:200) e anti-ERK 1/2 e anti-p38 totais (diluição 1:25) (Cell-Signaling Technology, USA) em solução de incubação (1% BSA, 0,3% Triton X-100, PBS 1X) overnight a 4°C. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG1 de coelho Alexa 568 (Molecular Probes-invitrogen, Oregon, USA) na diluição 1:1000 em solução (1% BSA, 0,3% Triton X-100, PBS 1X) por 1 hora a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS 1X, foi adicionado o corante DAPI diluído 1:100 em PBS 1X por 15 minutos. Finalmente, as lâminas foram montadas com Vectashield (Vector Labs) e as imagens foram capturadas em microscópio confocal (Laser Scanning Confocal Microscopy LSM 510-META, Zeiss).

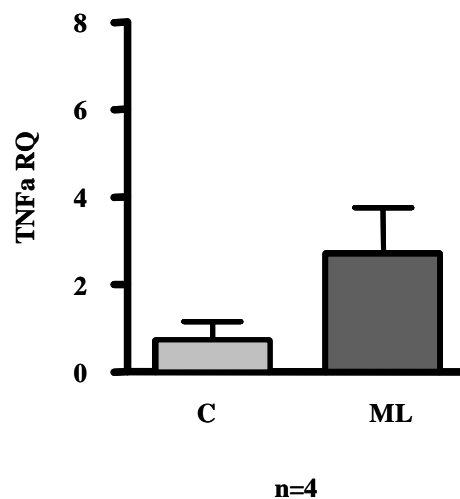
#### **4.7. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do programa Graph prism 5.0 utilizando o teste estatístico não-paramétrico de Wilcoxon. Alguns dados obtidos foram normalizados dividindo os valores das condições estimuladas pelo valor do seu respectivo controle (condição não estimulada), considerando assim, que o controle será sempre representado pelo valor 1, já que seu valor foi dividido por ele mesmo. Todos os resultados são expressos em média  $\pm$  erro padrão (EP). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo (\*).

## 5. RESULTADOS

### 5.1) Avaliação da expressão de TNF- $\alpha$ pelas CS da linhagem humana ST88-14 em resposta ao estímulo com ML.

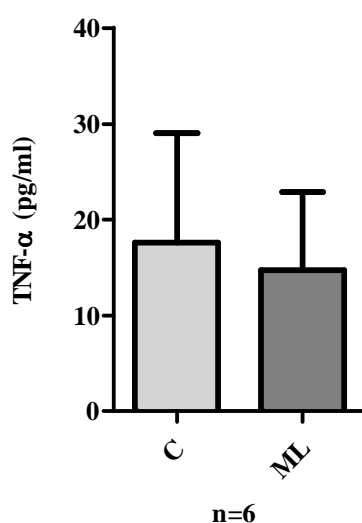
O TNF- $\alpha$  é produzido na forma de cadeias protéicas de 26 kDa arranjadas em trímeros ao longo da membrana, sendo secretados no meio após a clivagem pela enzima TACE. Como essa citocina é uma das primeiras a serem liberadas no endoneuro por CS ativadas após a lesão neural, foi avaliado previamente por nossa equipe a capacidade do ML de induzir a expressão gênica do TNF- $\alpha$  em células da linhagem ST88-14 pela técnica de RT-PCR em tempo real. Esse efeito foi analisado através de uma cinética temporal (0-3 horas) sendo sugerido, mais evidentemente em 3 horas de cultura, que o ML é capaz de elevar os níveis de RNAm dessa citocina (Figura 14).



**Figura 14:** *M. leprae* induz a expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  nas células da linhagem humana ST88-14. Determinação da expressão de RNAm de TNF- $\alpha$  em células ST88-14 cultivadas na ausência ou presença de *M. leprae* (MOI de 50:1), por PCR em tempo real usando sondas Taqman e *primers* para TNF- $\alpha$  e GAPDH (normalizador). Os resultados representam a média  $\pm$  EP de quatro experimentos independentes. RQ = relative quantification.

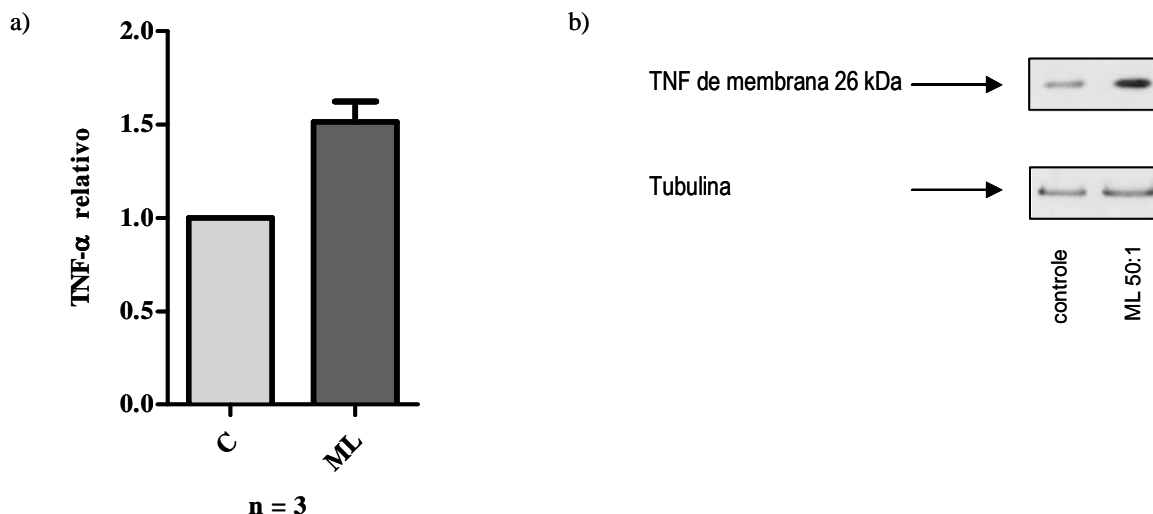
## 5.2) Avaliação da produção e secreção do TNF- $\alpha$ pelas CS da linhagem humana ST88-14 em resposta ao estímulo com ML.

Após a constatação de que o ML induz a expressão de TNF- $\alpha$ , foi avaliado o efeito do ML na secreção dessa citocina pelas células ST88-14 por ELISA. Foi realizada uma cinética temporal (0-72 horas) e, em nenhum dos tempos avaliados o ML foi capaz de induzir o aumento da secreção de TNF- $\alpha$  (dados não mostrados). A Figura 15, ilustrando o experimento de estímulo de 24 horas, demonstra que o ML não foi capaz de induzir a secreção de TNF- $\alpha$  na linhagem ST88-14,



**Figura 15:** Efeito do *M. leprae* na secreção do TNF- $\alpha$  na linhagem humana ST88-14. Análise por ELISA da secreção de TNF- $\alpha$  CS da linhagem ST88-14 estimuladas com ML 50:1 por 24 horas.

Uma vez que o ML não foi capaz de induzir a secreção de TNF- $\alpha$  pelas CS, apesar do aumento da expressão gênica desta citocina, foi analisada, então, a modulação da produção dessa proteína em CS pela micobactéria através da técnica de western blotting. A análise dos extratos celulares correspondentes à cinética temporal realizada (0-3 horas), sugere que o ML é capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$ , sendo esta mais evidente no tempo de 3 horas após o estímulo (Figura 16).



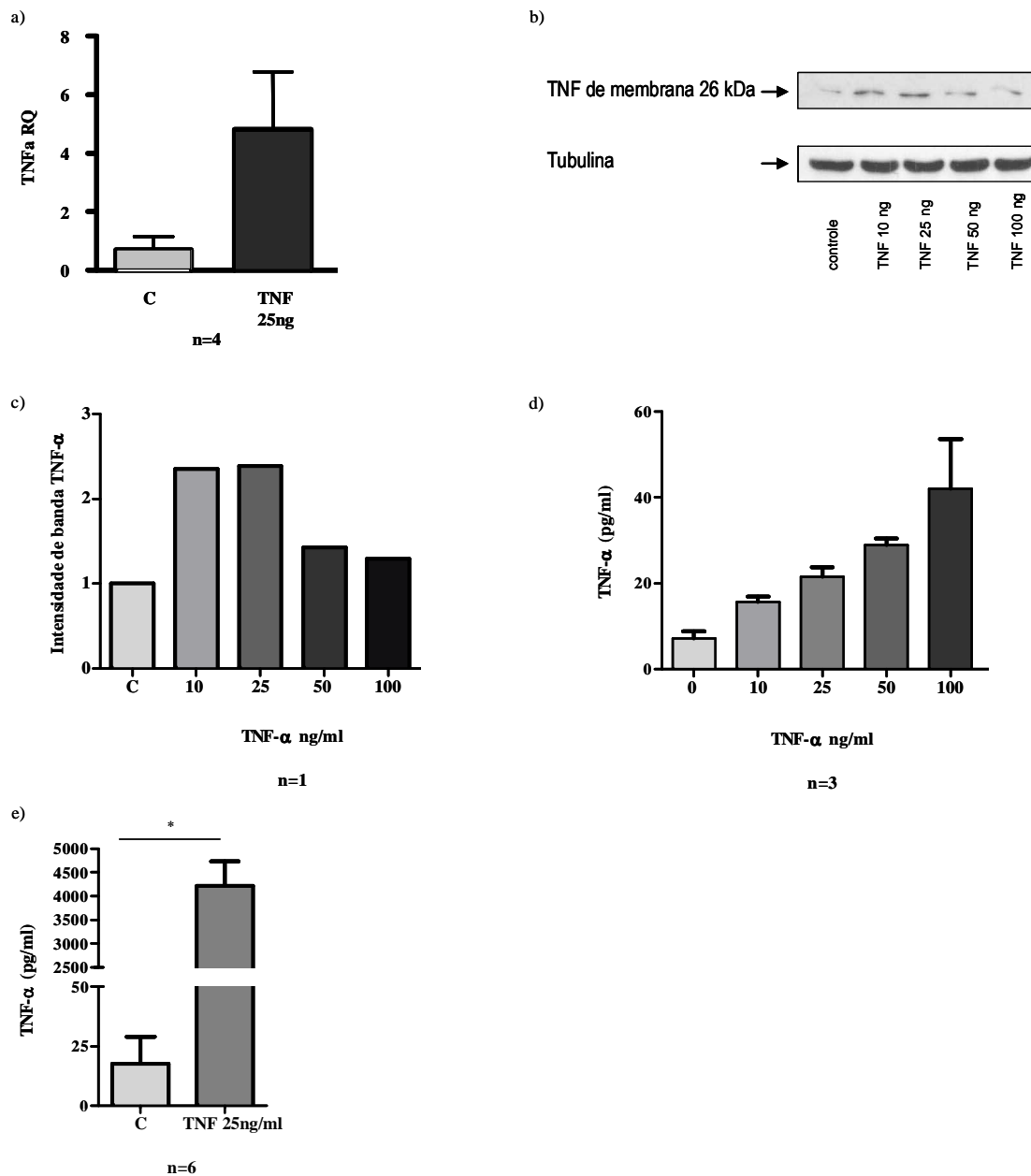
**Figura 16: Efeito do *M. leprae* na produção de TNF- $\alpha$  em células de Schwann da linhagem humana ST88-14. a)** Análise por ELISA da produção de TNF- $\alpha$  em extratos celulares da linhagem ST88-14 após estímulo de 3 horas com ML 50:1. Os dados estão representados em relação ao controle. **b)** Análise por western blotting do efeito do ML sobre a produção de TNF- $\alpha$  no período de 3 horas. Os valores normalizados de produção de TNF- $\alpha$  pela linhagem em questão referem-se aos valores reais médios de 6,4 pg/ml (C) e 9,4 pg/ml (ML).

### 5.3) Avaliação da produção de TNF- $\alpha$ pelas CS da linhagem humana ST88-14 através da existência de um mecanismo de retroalimentação positiva.

A próxima etapa desse estudo foi avaliação da existência de um mecanismo de retroalimentação positiva do TNF- $\alpha$  na célula ST88-14. Para desenvolver essa idéia foi necessário estabelecer primeiramente o impacto do TNF- $\alpha$  na indução da sua própria produção nessa linhagem celular. Portanto, além da análise da expressão gênica dessa citocina por RT-PCR em tempo real no tempo de 3 horas, foram avaliados a sua produção e secreção em culturas estimuladas com rTNF- $\alpha$  e o efeito de diferentes concentrações desse estímulo na síntese dessa citocina por ELISA e western blotting no período de 2 horas de estímulo, de acordo com Qin e colaboradores (2008) [112].

Os resultados sugerem que o TNF- $\alpha$  exógeno é capaz de induzir a sua própria expressão gênica nessa linhagem celular e que todas as concentrações testadas tiveram efeito positivo na produção dessa citocina, conforme observado na análise dos extratos celulares por ELISA e western blotting. Baseando-se nesses dados, a concentração adotada para os demais experimentos foi a de 25 ng/ml. Essa dose também se mostrou eficaz na indução da secreção do TNF- $\alpha$ , cuja detecção foi realizada com um estímulo inicial de 2 horas, pois esse tempo, de acordo com os dados anteriores, foi suficiente para indução da

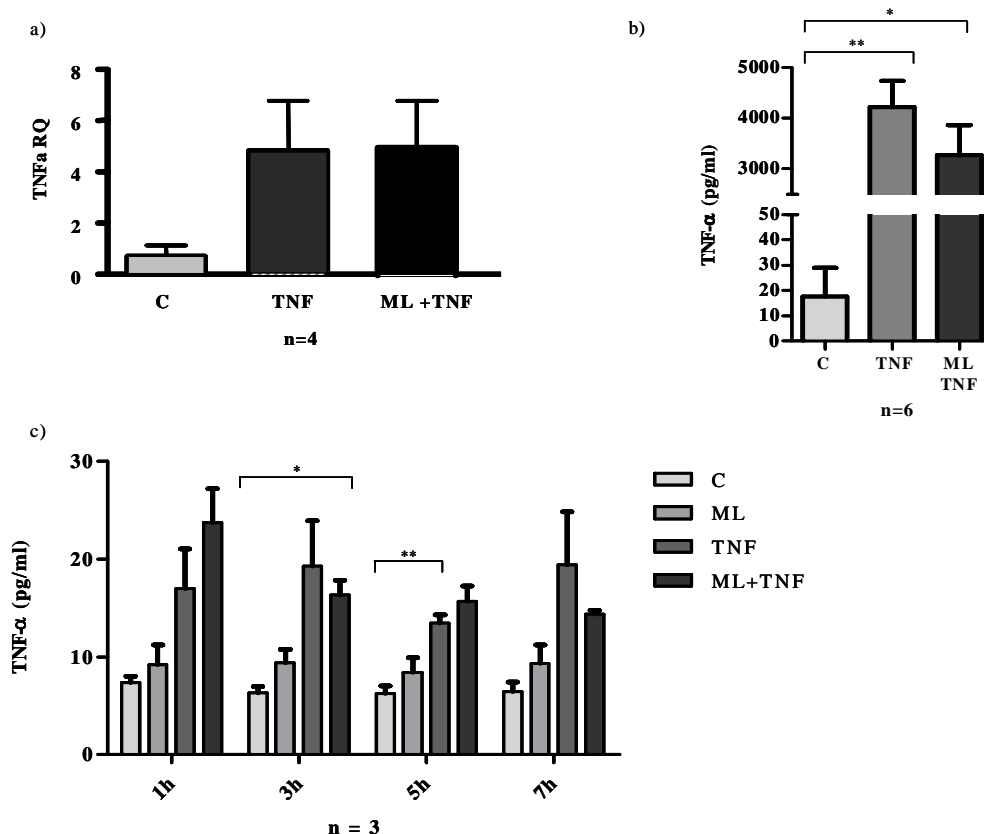
produção da citocina nessa linhagem. Em seguida, após lavagens consecutivas, foi adicionado somente meio completo a cultura, para que, após um período de 24 horas, fosse possível avaliar a liberação de TNF- $\alpha$  pelas células ST88-14 nos sobrenadantes coletados (Figura 17).



**Figura 17: Efeito do TNF- $\alpha$  na sua própria expressão gênica, produção e secreção nas células de Schwann da linhagem humana ST88-14 através de um mecanismo de retroalimentação positiva.** a) Análise por RT-PCR em tempo real do efeito do TNF- $\alpha$  sobre sua própria expressão. b) Análise por western blotting do efeito de diferentes concentrações de rTNF- $\alpha$  na produção da forma membrânica da citocina em extratos de células ST88-14. c) Densitometria do resultado mostrado em a). d) ELISA dos mesmos extratos de células ST88-14 analisados também em b). e) Análise da secreção de TNF- $\alpha$  por ELISA nos sobrenadantes de células ST88-14 estimuladas com 25 ng/ml de rTNF- $\alpha$ . Os valores representam a média  $\pm$  EP de experimentos independentes. \* p < 0,05.

#### 5.4) Avaliação do efeito do ML em associação ou não com o TNF- $\alpha$ na produção e na secreção dessa citocina pelas CS da linhagem humana ST88-14.

Com base nos dados obtidos anteriormente, a próxima etapa desse estudo foi analisar a ação conjunta do ML e do TNF- $\alpha$  na expressão gênica por RT-PCR em tempo real, na produção e secreção de TNF- $\alpha$  por ELISA na linhagem ST88-14, além de avaliar a variação dos perfis induzidos ao longo do tempo. A expressão gênica foi analisada após o tempo de estímulo de 3 horas, enquanto que os experimentos de detecção da produção do TNF- $\alpha$  em extratos celulares por ELISA foram realizados entre 1 e 7 horas. A análise da secreção dessa citocina nos sobrenadantes das culturas estimuladas seguiu o molde do experimento detalhado no item 5.3. Os dados obtidos indicam que o efeito conjunto do TNF- $\alpha$  e do ML induz a expressão gênica, a síntese e a secreção dessa citocina, entretanto, em todos os casos, o efeito dessa associação não difere do perfil induzido pelo estímulo individual do TNF- $\alpha$  exógeno (Figura 18).

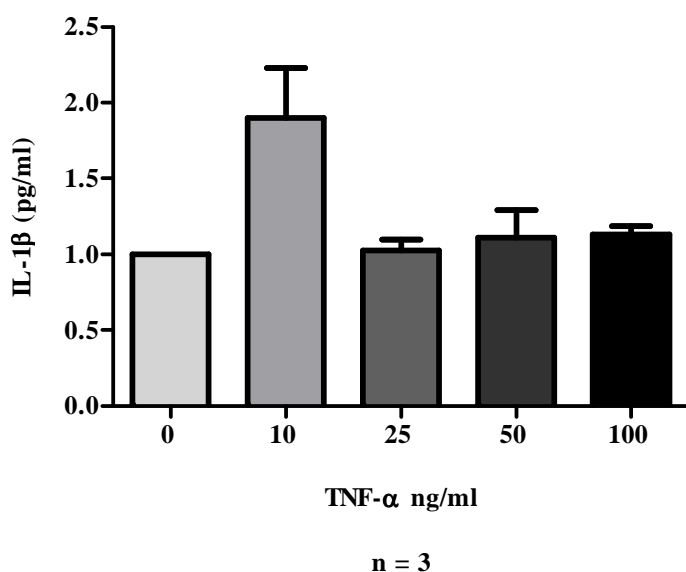


**Figura 18:** Efeito do *M. leprae* e TNF- $\alpha$  em associação na expressão gênica, produção e secreção dessa citocina na linhagem ST88-14. Avaliação do efeito do ML 50:1 e rTNF- $\alpha$  (25 ng/ml) em associação ou não a) na expressão gênica do TNF- $\alpha$  por RT-PCR em tempo real b) na secreção dessa citocina em sobrenadantes de cultura por ELISA. c) na produção dessa citocina em extratos celulares nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas por ELISA em células ST88-14. Os valores representam a média  $\pm$  EP de experimentos independentes \*  $p < 0,05$ .

### 5.5) Avaliação do efeito do ML e do TNF- $\alpha$ em associação ou não na produção e na secreção de citocinas pelas CS da linhagem humana ST88-14.

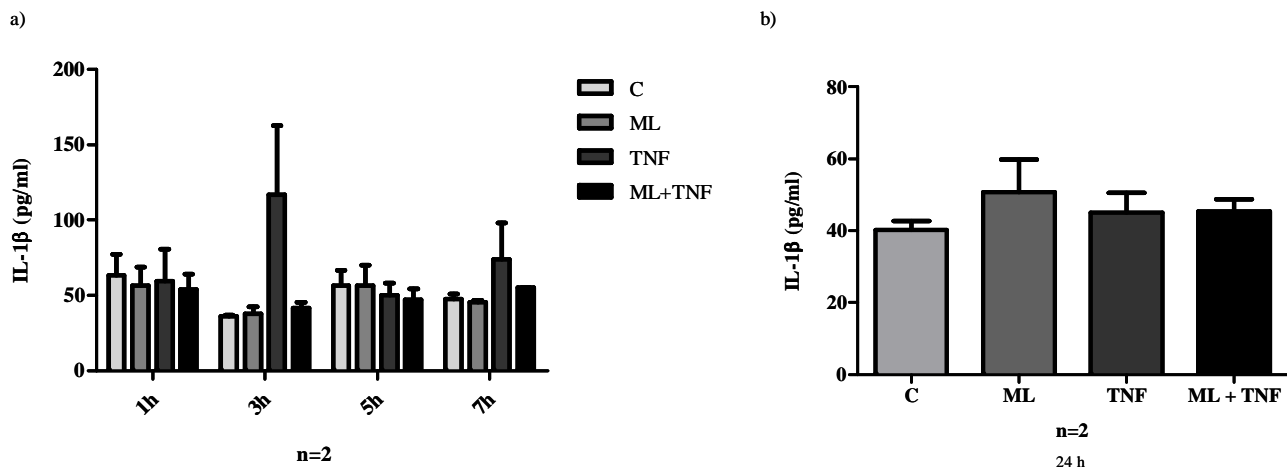
Como mencionado anteriormente, as CS participam ativamente de processos inflamatórios em desenvolvimento na região nervosa periférica, sendo capazes de processar e apresentar antígenos, além de produzir e secretar citocinas, podendo assim, modular a resposta imune. Portanto, a próxima fase desse estudo foi estabelecer o efeito do TNF- $\alpha$  e do ML na secreção de IL-6, IL-8, IL-10 e IL-1 $\beta$  na linhagem humana ST88-14 por ELISA. Para essa avaliação, foram utilizados sobrenadantes de culturas estimuladas com TNF- $\alpha$  e ML, em associação ou não, nos intervalos de tempo adotados nos experimentos anteriores. Em um tempo inicial de estímulo de 2 horas foi avaliado o impacto de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  na modulação dessas citocinas. Já para a análise do efeito da micobactéria e sua ação conjunta com TNF- $\alpha$  no perfil de secreção dessas moléculas, foram conduzidos estímulos em intervalos de tempo mais longos (1-7 horas e 24 horas).

Inicialmente, foi verificado o efeito do ML e do TNF- $\alpha$  na modulação da produção de IL-1 $\beta$  pelas CS. Entre as concentrações de TNF- $\alpha$  adicionadas na cultura de ST88-14, apenas a de 10 ng/ml induziu a secreção de IL-1 $\beta$  no período de 2 horas de estímulo (Figura 19). O ML não induziu a secreção de IL-1 $\beta$  em nenhum dos tempos testados, nem quando em cooperação com TNF- $\alpha$ , que sozinho pareceu induzir a liberação de IL-1 $\beta$  no tempo de 3 horas de estímulo (Figura 20).



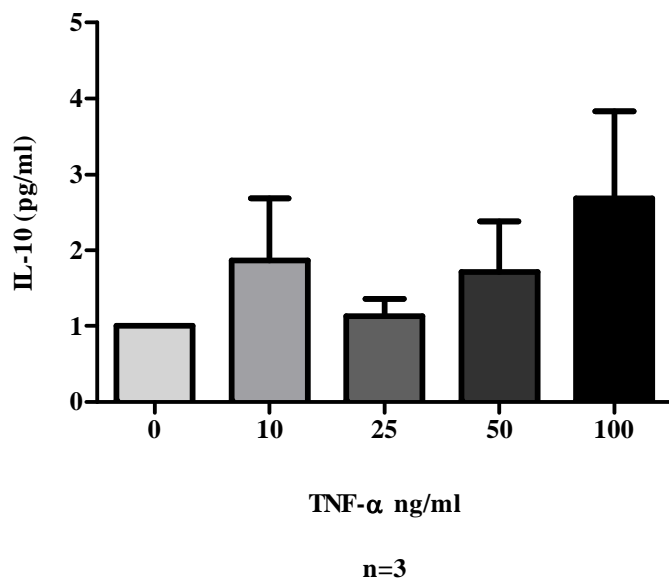
**Figura 19: Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  na secreção de IL-1 $\beta$  na linhagem humana ST88-14.** ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com diferentes concentrações de rTNF- $\alpha$  durante 2 horas. Dados representados em relação ao controle.



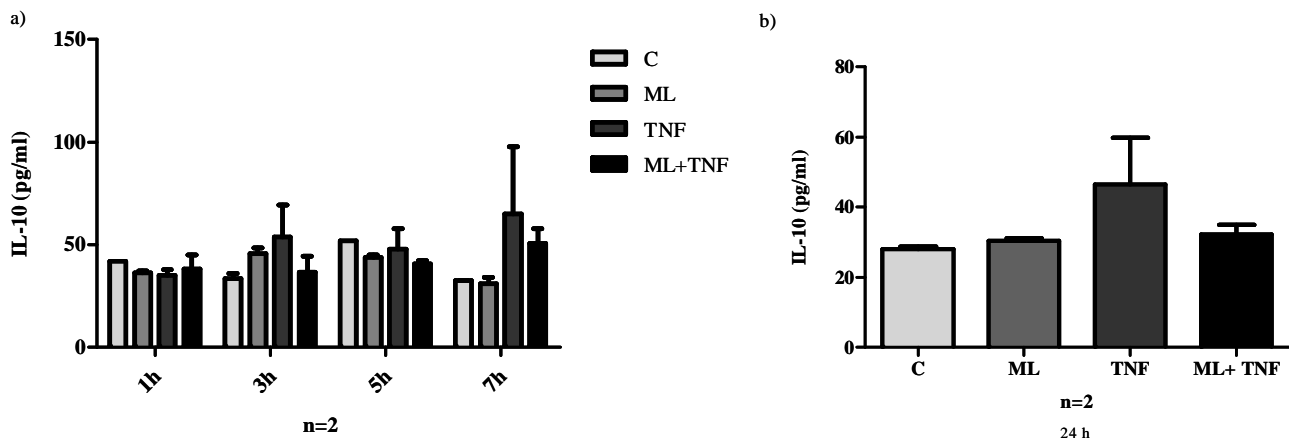


**Figura 20: Efeito do *M. leprae* e do TNF- $\alpha$  em associação ou não na secreção de IL-1 $\beta$  na linhagem humana ST88-14.** ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com ML 50:1 e rTNF- $\alpha$  (25 ng/ml) **a)** nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas **b)** no tempo de 24 horas.

Nenhuma das concentrações de TNF- $\alpha$  adicionadas na cultura de ST88-14 foi capaz de induzir a secreção de IL-10 no período de 2 horas de estímulo (Figura 21) Entretanto, no tempo de 24 horas foi observado um aumento da secreção de IL-10 frente ao estímulo de TNF- $\alpha$ . Já o estímulo do ML não induziu a secreção dessa citocina em nenhum dos tempos testados, nem quando em cooperação com TNF- $\alpha$  (Figura 22).

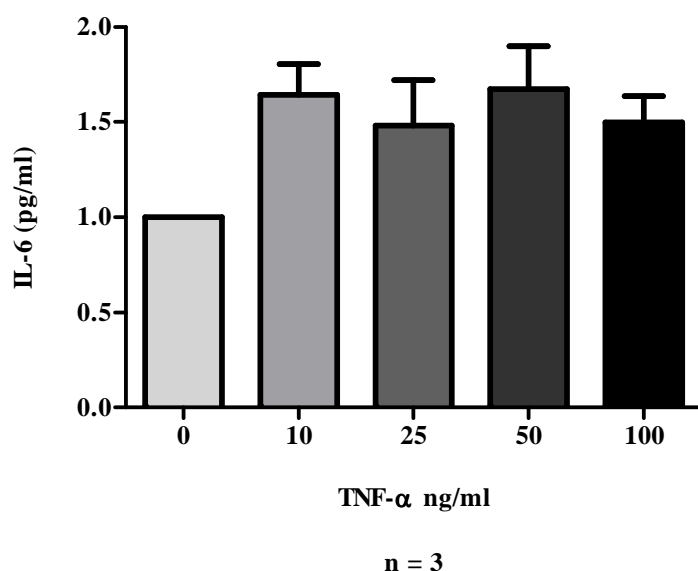


**Figura 21: Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  na secreção de IL-10 na linhagem humana ST88-14.** ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com diferentes concentrações de rTNF- $\alpha$  durante 2 horas. Dados representados em relação ao controle.

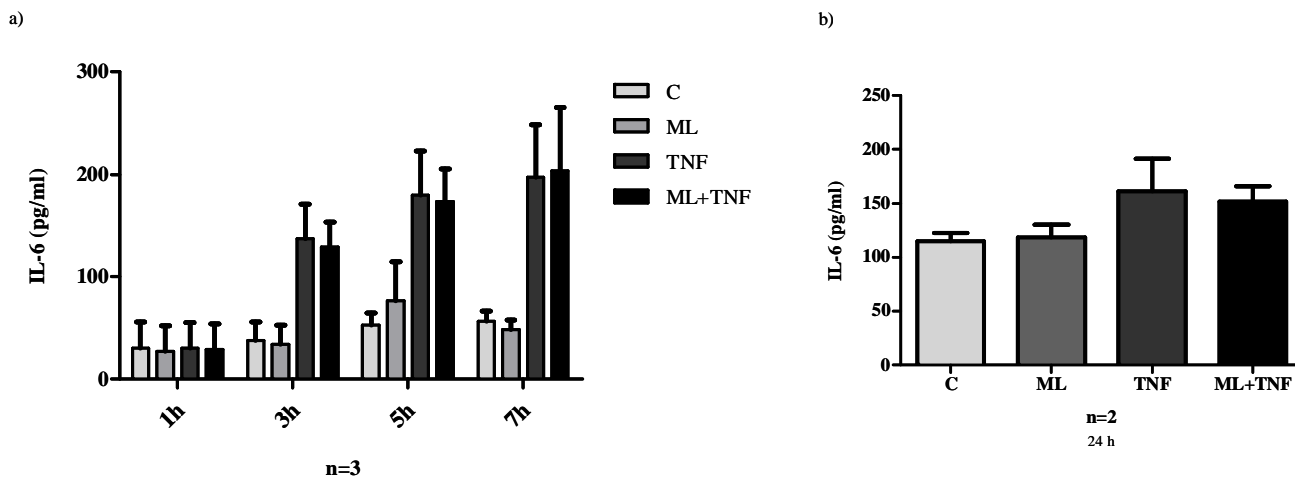


**Figura 22: Efeito do *M. leprae* e do TNF- $\alpha$  em associação ou não na secreção de IL-10 na linhagem humana ST88-14.** ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com ML 50:1 e rTNF- $\alpha$  (25 ng/ml) a) nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas b) no tempo de 24 horas.

Todas as concentrações de TNF- $\alpha$  utilizadas na cultura de ST88-14 foram capazes de induzir a secreção de IL-6 no período de 2 horas de estímulo (Figura 23). O estímulo do ML não induziu a secreção dessa citocina em nenhum dos tempos testados, sendo detectada a liberação de IL-6 frente ao estímulo da bactéria associada ao TNF- $\alpha$ , que apresentou um perfil de indução semelhante ao promovido pelo TNF- $\alpha$  individualmente (Figura 24).

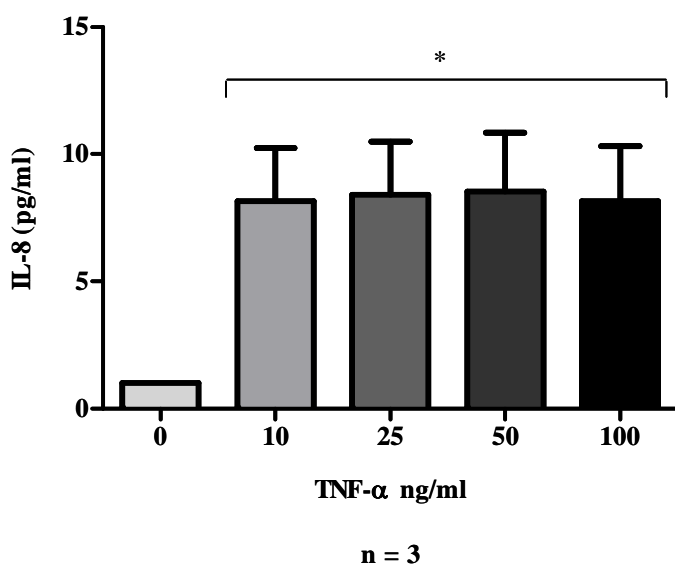


**Figura 23: Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  na secreção de IL-6 na linhagem humana ST88-14.** ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com diferentes concentrações de rTNF- $\alpha$  durante 2 horas. Dados representados em relação ao controle.

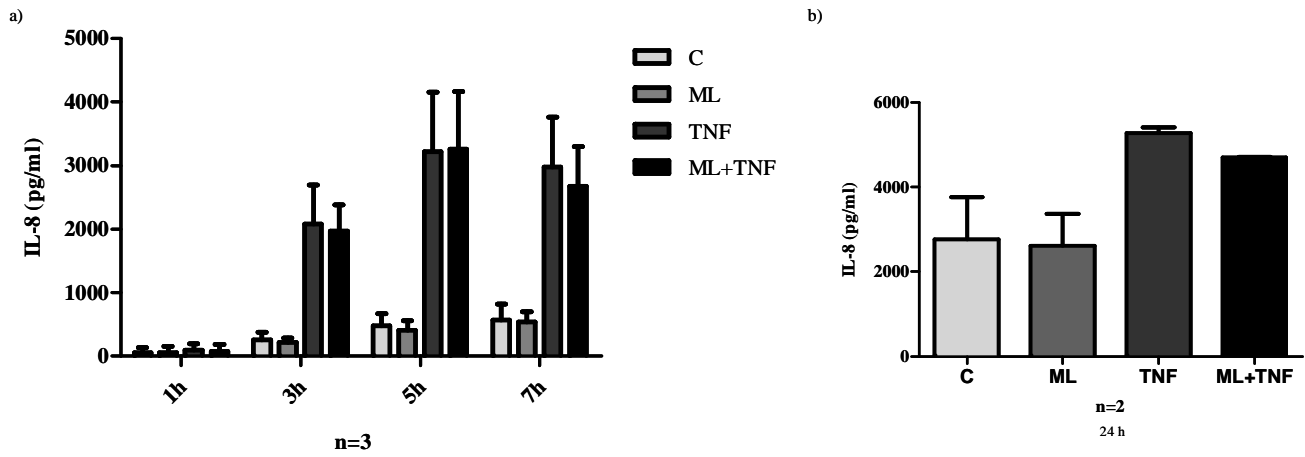


**Figura 24:** Efeito do *M. leprae* e do TNF- $\alpha$  em associação ou não na secreção de IL-6 na linhagem humana ST88-14. ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com ML 50:1 e rTNF- $\alpha$  (25 ng/ml) a) nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas b) no tempo de 24 horas.

Todas as concentrações de TNF- $\alpha$  adicionadas na cultura de ST88-14 foram capazes de induzir a secreção de IL-8 no período de 2 horas de estímulo (Figura 25). O ML não induziu a secreção dessa citocina em nenhum dos tempos testados, entretanto, foi detectada a liberação de IL-8 quando as células foram estimuladas com o ML na presença de TNF- $\alpha$ , que apresentou um perfil de indução semelhante ao promovido pelo TNF- $\alpha$  individualmente (Figura 26).



**Figura 25:** Efeito de diferentes concentrações de TNF- $\alpha$  na secreção de IL-8 na linhagem humana ST88-14. ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com diferentes concentrações de rTNF- $\alpha$  durante 2 horas. Dados representados em relação ao controle.

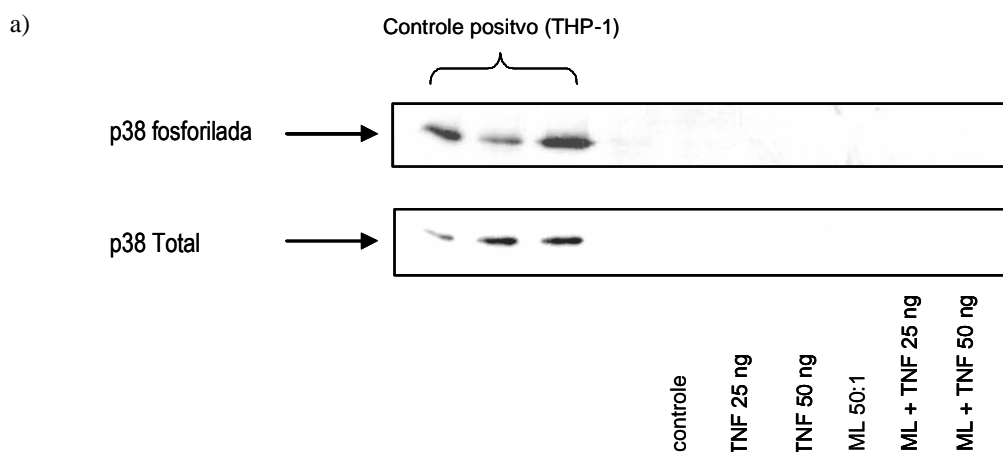


**Figura 26: Efeito do *M. leprae* e do TNF- $\alpha$  em associação ou não na secreção de IL-8 na linhagem humana ST88-14. ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada com ML 50:1 e rTNF- $\alpha$  (25 ng/ml) a) nos tempos de 1, 3, 5 e 7 horas b) no tempo de 24 horas.**

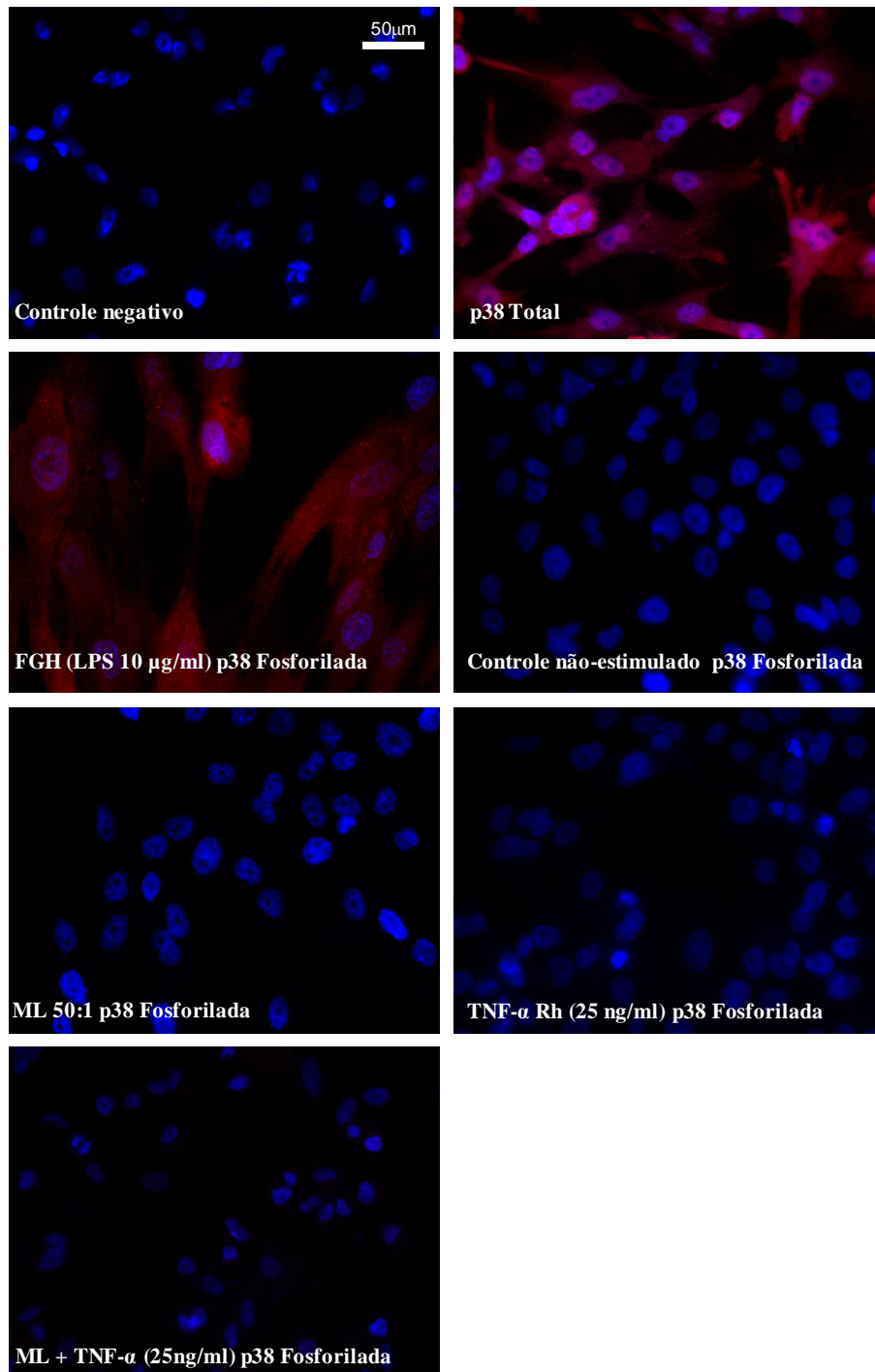
### 5.6) Avaliação da participação da p38 nas vias de sinalização ativadas pelo ML e TNF- $\alpha$ em associação ou não nas CS da linhagem humana ST88-14

Outro objetivo desse trabalho foi investigar as possíveis vias de sinalização ativadas pelo ML e pelo TNF- $\alpha$  em associação ou não, na linhagem humana ST88-14. Para atingir esse propósito as culturas foram estimuladas por 15 minutos e seus extratos analisados por western blotting. A técnica de imunofluorescência também foi adotada para confirmação dos resultados.

De acordo com os experimentos realizados, a MAPK p38 não é ativada por nenhum dos estímulos aplicados nessa linhagem celular. Um fato curioso foi a não detecção da proteína não-fosforilada pela técnica de western blotting, o que levou a realização de uma série de testes com o anticorpo utilizado. Entretanto, foi obtida com sucesso a marcação dessa proteína pela técnica de imunofluorescência, que, também, confirmou os dados obtidos pelo western blotting ao não revelar marcação da proteína fosforilada nas condições estimuladas (Figura 27). O motivo pelo qual esse anticorpo não funcionou na técnica de western blotting não foi elucidado.



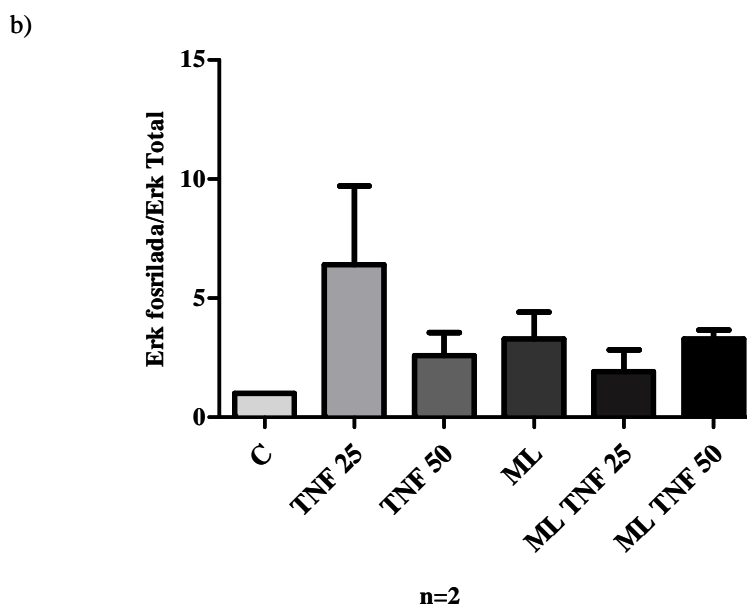
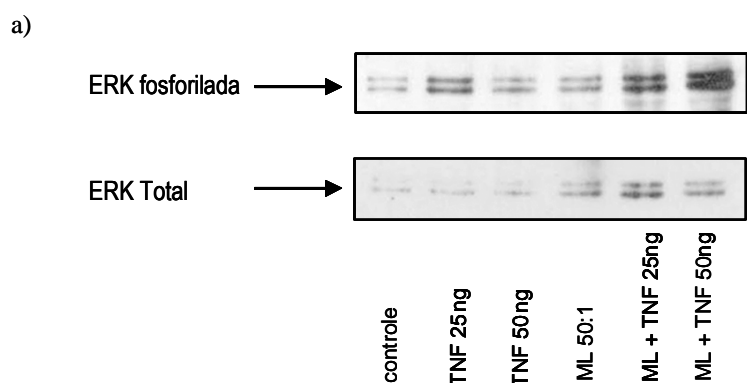
b)



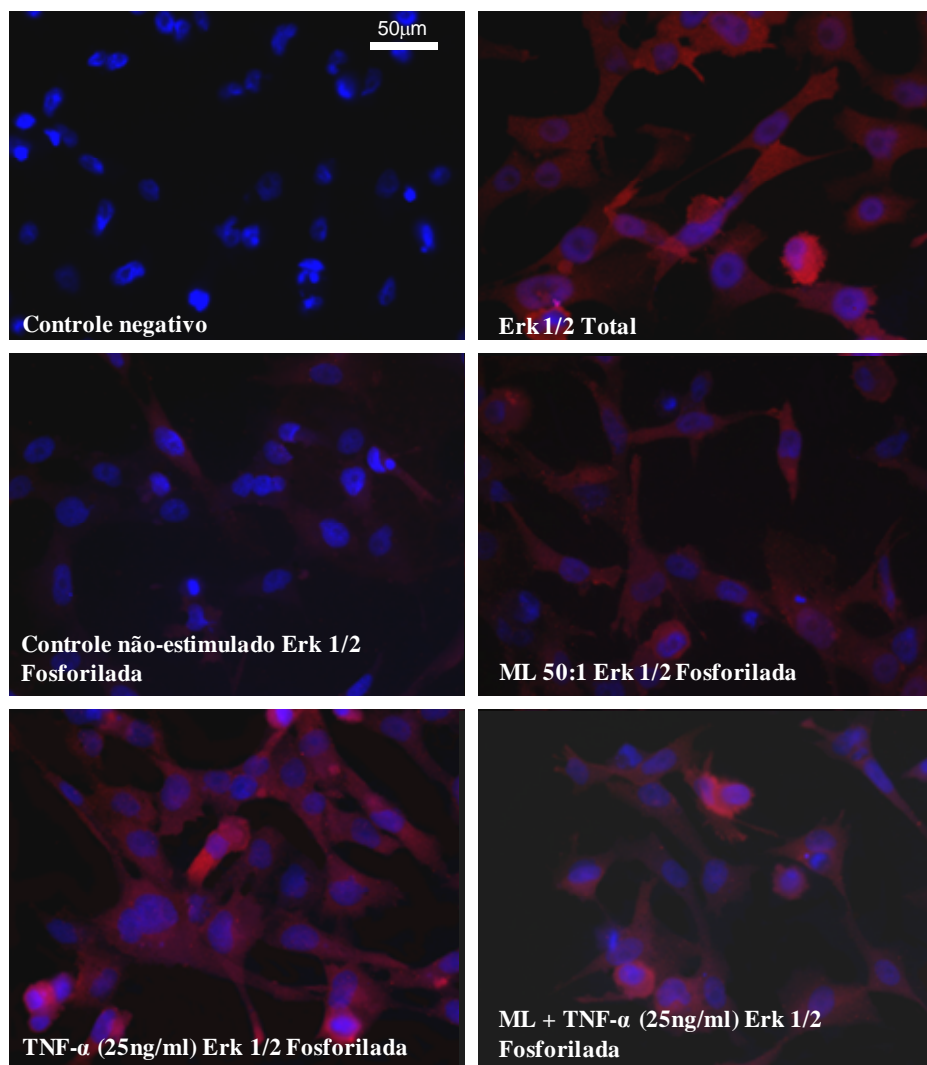
**Figura 27: Participação da MAPK p38 nas vias de sinalização ativadas pelo *M. leprae* e TNF- $\alpha$ , em associação ou não na linhagem humana ST88-14. a) Análise da fosforilação da p38 frente aos estímulos de ML (50:1) e rTNF- $\alpha$  (25 e 50 ng/ml) de duração 15 minutos por western blotting. Extratos da linhagem celular THP-1 estimuladas com LPS (2µL/ml) foram utilizados como controle de qualidade dos anticorpos. b) Fotomicrografias representativas da marcação com anticorpo p38 total e fosforilada (vermelho) em CS da linhagem ST88-14. Em azul a marcação do núcleo com DAPI.**

### 5.7) Avaliação da participação de Erk 1/2 nas vias de sinalização ativadas pelo ML e TNF- $\alpha$ em associação ou não na linhagem ST88-14.

A avaliação da participação de Erk 1/2 nas vias ativadas por ML e TNF- $\alpha$  através de western blotting e imunofluorescência revelou que essas proteínas são fosforiladas intensamente pelo estímulo da citocina. O ML induziu uma ativação menor dessas moléculas e a sua associação com o TNF- $\alpha$  parece reduzir a fosforilação de Erk 1/2 em comparação ao perfil observado no estímulo com TNF- $\alpha$  sozinho. A avaliação do western blotting fornece os dados na forma de taxa de ativação que consiste na razão da proteína fosforilada e a total (Figura 28).



c)



**Figura 28: Participação das MAPKs ERK 1/2 nas vias de sinalização ativadas pelo *M. leprae* e TNF- $\alpha$ , em associação ou não na linhagem ST88-14. a) Análise por western blotting da fosforilação de Erk 1/2 frente aos estímulos de ML 50:1 e TNF- $\alpha$  (25 e 50 ng/ml) de duração de 15 minutos. b) Densitometria das bandas com representação em relação ao controle. a) Fotomicrografias representativas da marcação com anticorpo Erk 1/2 total e fosforilada (vermelho) em CS da linhagem ST88-14. Em azul a marcação do núcleo com DAPI.**



## 6. DISCUSSÃO

Os pacientes com hanseníase podem desenvolver deficiências e perda sensorial permanentes, resultantes de neurites progressivas que evoluem até mesmo após o tratamento poliquimioterápico ([113]; [114]). Esse comprometimento neural caracteriza-se por um processo inflamatório crônico desencadeado pelo ML, capaz de danificar as fibras nervosas periféricas, e resulta na substituição do tecido nervoso funcional por uma matriz extracelular rica em colágeno, levando assim, ao aparecimento de deformidades físicas irreversíveis [115].

Os estudos realizados com co-culturas de nervos e CS mielinizantes demonstraram que fibras mielinizantes e não-mielinizantes exibem respostas distintas a infecção pelo ML [116]. Entretanto, as unidades axonais não-mielinizadas são mais susceptíveis a essa invasão, consistindo o alvo principal dessa micobactéria no SNP ([117]; [118]; [119]; [116]). Os eventos iniciais da interação entre o ML e as CS ainda são desconhecidos, mas esse patógeno parece ter evoluído de modo a promover processos como desmielinização, proliferação e desdiferenciação dessas células, estabelecendo assim, um nicho propício para sua sobrevivência e perpetuação, além de compensatório para sua limitação genômica [120].

Estudos de Rambukkana e colaboradores (2002) defendem que o contexto neuropatológico da hanseníase é determinado inicialmente pela infecção do ML, já que este pode causar um processo de desmielinização em fibras nervosas antes da ação da resposta imune local. Entretanto, os dados clínicos apontam para participação reduzida dessa desmielinização precoce induzida pela micobactéria na injúria nervosa periférica, pois em lesões de pacientes, as fibras danificadas são do tipo não-mielinizadas, sugerindo que a resposta inflamatória tem uma contribuição essencial para a evolução da degeneração nervosa na hanseníase [116].

Lesões neurais periféricas, assim como de seus tecidos adjacentes, deflagram um conjunto de respostas inflamatórias que podem promover entre outras coisas, o aumento do fluxo sanguíneo, mudanças na permeabilidade capilar e a migração de células imunes para os tecidos circundantes. Essa rede de eventos pode ser amplificada pela ativação das CS que passam a expressar novamente altos níveis de GFAP e iniciam a síntese e a liberação de mediadores neuroinflamatórios [121]. Dados de nosso laboratório demonstraram um aumento da expressão de TNF-R1 [60] e TNF-R2 [108] na linhagem de

CS humanas ST88-14, após a infecção pelo ML, indicando, portanto, que após a ativação, essas células podem sofrer mudanças tanto fenotípicas quanto funcionais e adquirir um perfil inflamatório. Após a lesão, a composição celular do espaço endoneural também é alterada pela proliferação de outras populações celulares e a infiltração de células extraneurais, responsáveis pela secreção de mais citocinas inflamatórias e fatores neurotróficos que contribuem para modulação do processo degenerativo e regenerativo em curso no local [122].

Shubayev e colaboradores (2000) detectaram dois picos de aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  em nervos periféricos de ratos após a injúria por constrição crônica, sendo o primeiro detectado após 6 horas e promovido por CS, e o segundo, após cinco dias, atribuído aos macrófagos recrutados do sangue que atingem o local cerca de 2 a 3 dias após o dano axonal [123]. Já Üçeyler e colaboradores (2007) detectaram o aumento da expressão gênica dessa citocina em nervos ciáticos de camundongos 1 hora após a injúria por constrição crônica [124]. Portanto, pode-se afirmar que o TNF- $\alpha$  é um dos mediadores inflamatórios liberados imediatamente após a lesão neural por CS ativadas e outras células residentes [100]. O aumento da sua produção promove diversos efeitos durante o desenvolvimento de desordens neurológicas, incluindo o controle da desmielinização e/ou degeneração axonal, o aumento da permeabilidade da barreira hemato-nervosa e o recrutamento de células imunes para o sítio danificado [101].

Estudos de nosso laboratório demonstraram níveis elevados de TNF- $\alpha$  na derme, epiderme e no soro de pacientes hansênicos em episódios reacionais [95], assim como, altas concentrações de RNAm dessa citocina em biópsias de nervo de pacientes em reação reversa e de pacientes com a forma neural pura da doença [97]. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo investigar a participação dessa citocina na ativação das CS frente ao estímulo do ML, a fim de esclarecer a interação entre essa molécula e a infecção nas fases iniciais do dano nervoso.

O modelo experimental adotado consistiu na utilização da linhagem humana ST88-14, já estudada amplamente do ponto de vista metabólico e genético ([125]; [126]; [66]) Estudos realizados em nosso laboratório confirmaram que essa linhagem interage com ML e é capaz de internalizar este bacilo tanto vivo quanto morto. Além disso, também foi descrito que estas células, da mesma forma que CS primárias, produzem as proteínas S100, P<sub>0</sub> e MBP. A linhagem ST88-14 também expressa o RNAm e a proteína laminina 2

na sua superfície, o que permite a sua utilização em ensaios de infecção pelo ML *in vitro* [127].

Dados preliminares indicaram que o ML induz um pequeno aumento na expressão gênica do TNF- $\alpha$  em células da linhagem humana ST88-14 (Figura 14). Tal fato direcionou esse estudo para uma investigação mais detalhada do papel dessa citocina na ativação das CS seguida da infecção pela micobactéria. Portanto, posteriormente, foi avaliada a secreção dessa molécula por essas células, o que poderia esclarecer sua contribuição imediata para a resposta inflamatória no nervo devido à infecção. Entretanto, não foi observada a secreção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas de CS estimuladas com ML, em nenhum dos tempos testados, mesmo utilizando um kit de detecção da eBioscience de alta sensibilidade.

A etapa inicial desse estudo constatou que o ML induz a expressão gênica do TNF- $\alpha$ , mas não a liberação dessa molécula, o que poderia indicar a existência de mecanismos pós-transcripcionais inibidores da tradução dessa proteína, ou a ação de um rígido controle da secreção dessa citocina após sua síntese nesse tipo celular. Portanto, o próximo passo desse estudo foi avaliar a expressão protéica do TNF- $\alpha$  na linhagem ST88-14 após a infecção pelo ML. Os extratos celulares foram analisados pela técnica de western blotting e ELISA para detecção dos níveis da proteína intracelular, ou seja, previamente ao seu acoplamento à membrana plasmática. A cinética temporal (0-3 horas) (dados não mostrados), revelou que de fato o ML induz a síntese dessa citocina logo no início da infecção, sendo esta mais intensamente observada no estímulo de 3 horas (Figura 16). Esse dado indica que o ML promove a produção do TNF- $\alpha$  nessas células e que, portanto, não há mecanismos pós-transcripcionais inibindo a tradução dessa proteína na linhagem estudada.

A responsividade das CS a citocinas ocorre pelos seus respectivos receptores. A expressão constitutiva dos receptores de TNF- $\alpha$  já foi descrita em CS ([59]; [93]; [60]; [128]), o que as torna então, susceptíveis aos efeitos dessa molécula. Para avaliar a existência de um mecanismo de retroalimentação positiva no quadro de infecção do ML, foi necessário avaliar os efeitos do TNF- $\alpha$  na sua própria expressão gênica, síntese e secreção nessa linhagem celular. Pela técnica de RT-PCR em tempo real foi analisada a expressão gênica dessa citocina frente ao estímulo do TNF- $\alpha$  exógeno no tempo de 3 horas de cultura, sendo constatado o efeito positivo dessa molécula na indução de sua própria expressão nas células ST88-14 (Figura 17). Para a análise da síntese dessa proteína pela

técnica de western blotting e ELISA, foram adicionadas diferentes doses de rTNF- $\alpha$  em cultura por 2 horas para avaliação do impacto de variadas concentrações na produção dessa citocina. Esse experimento inicial foi realizado de acordo com os padrões adotados por de Qin e colaboradores (2008), cujos dados indicam que esse intervalo de tempo é suficiente para síntese do TNF- $\alpha$  [112].

Nossos resultados evidenciaram a indução da síntese da citocina por todas as concentrações testadas (Figura 17), sendo a concentração adotada para os experimentos seguintes de 25 ng/ml. A secreção de TNF- $\alpha$  foi analisada por ELISA dos sobrenadantes da cultura de ST88-14 estimulada por 2 horas com TNF- $\alpha$  exógeno. A retirada do estímulo foi seguida de algumas lavagens da cultura com meio RPMI puro, para garantir que só fosse detectado o TNF- $\alpha$  secretado pelas células durante o período de 24 horas e não a molécula adicionada como estímulo. Esses resultados constataram que, de fato, o TNF- $\alpha$  foi capaz de promover sua própria secreção, assim como sua expressão e produção nessa linhagem celular (Figura 17). Qin e colaboradores também demonstraram esse efeito dose-dependente em CS de ratos, encontrando o ponto de saturação da síntese da citocina frente ao estímulo de 50 ng/ml de TNF- $\alpha$  exógeno e observou um aumento da sua expressão gênica no tempo de 1 hora [112].

Após o esclarecimento do impacto individual do ML e do TNF- $\alpha$  na expressão, síntese e secreção do TNF- $\alpha$ , foi investigado o efeito conjunto desses estímulos. Os dados obtidos indicaram que a associação da micobactéria e da citocina promove perfis similares ao induzido individualmente pelo TNF- $\alpha$  exógeno na expressão gênica, na síntese e na secreção dessa molécula na linhagem ST88-14 (Figura 18). Diante desses dados pode-se sugerir que a intensidade superior da ação do TNF- $\alpha$  pode fazer com que essas células atinjam seus limites de expressão e produção dessa citocina, podendo portanto, ocultar o efeito promovido pelo ML individualmente.

A maioria dos componentes da família TNF é expressa sob a forma transmembrânica, o que indica que essas moléculas devem induzir efeitos locais, e que somente sob condições não-fisiológicas têm sua secreção induzida, podendo então, ser implicadas no desenvolvimento de diversas patologias [71]. Nossos resultados constataram que o ML induz a produção de TNF- $\alpha$ , mas não a sua secreção em CS da linhagem ST88-14. Esse fato pode refletir a existência de um mecanismo celular regulatório da liberação dessa citocina, já que esta pode mediar efeitos deletérios quando secretada irregularmente. Portanto, após sua produção frente ao estímulo do ML, o TNF- $\alpha$

permanece acoplado à membrana plasmática das CS, e no quadro inicial da lesão neural, promove seus efeitos através da interação com outras células presentes no endoneuro. Nossos dados também indicam a existência de um *loop* positivo na produção de TNF- $\alpha$  nessa linhagem, estando em concordância com os dados descritos por Qin e colaboradores [112].

Como mencionado anteriormente, Shubayev e colaboradores (2000) constataram dois picos nos níveis de TNF- $\alpha$  após a injúria nervosa por constrição crônica em ratos [126]. O primeiro e o segundo coincidiram com a detecção dos maiores níveis de MMP-9 e MMP-2 na lesão, respectivamente. Ambas são metaloproteinases de matriz extracelular, cujo substrato principal é o colágeno tipo IV, e, portanto, têm uma participação relevante na alteração e remodelação do espaço neural durante a lesão. Dados do nosso laboratório demonstraram que o ML, individualmente ou em associação com TNF- $\alpha$ , induz a expressão de MMP-9 em CS da linhagem ST88-14, e que essa metaloproteinase, assim como a MMP-2, encontra-se aumentada em biópsias de pacientes com a forma neural pura da hanseníase [129]. Portanto, os resultados obtidos nesse estudo, juntamente com os dados relatados acima, evidenciam o importante papel dessa citocina e da micobactéria no desenvolvimento da injúria neural nessa doença.

A capacidade de produzir citocinas confere às CS a propriedade de modular a resposta imune sob condições patológicas e não patológicas. Portanto, o próximo passo desse trabalho foi elucidar a contribuição do ML e do TNF- $\alpha$  no contexto inflamatório do dano nervoso da hanseníase nessa linhagem de CS, avaliando a dinâmica de secreção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-10 por ELISA, frente aos estímulos da micobactéria e do TNF- $\alpha$ , em associação ou não.

A família da IL-1 compreende dois ligantes bioativos (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), dois tipos de receptores transmembrânicos IL-1RI e IL-1RII, além de um receptor antagonista específico (IL-1Ra) [130]. A IL-1 $\beta$  é uma potente citocina pleiotrópica com importantes efeitos na resposta imune, como por exemplo, a indução da angiogênese em tecidos inflamados, a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias por células apresentadoras de antígeno, e também, a polarização de células Th17 [131]. No SNC saudável essa molécula é produzida em níveis reduzidos, sendo aumentada, portanto, após lesões teciduais, já sendo, inclusive, descrita sua participação em respostas neuroimunes e na indução de morte celular em casos de dano e isquemia cerebral ([132]; [133]). A IL-1 $\beta$ , juntamente com o TNF- $\alpha$ , tem uma participação importante no processo de degeneração Walleriana,

no qual podem induzir a secreção de outras citocinas e contribuir para o recrutamento dos macrófagos até o local danificado [134]. Além disso, essa molécula também induz fatores de crescimento neurais e foi demonstrado que a sua neutralização por IL-1Ra, impede a regeneração nervosa [135]. Em nossos experimentos foi observado que no tempo de 2 horas, a concentração de 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  induziu essa citocina (Figura 19), e nos tempos de estímulo mais longos, foi detectada a sua secreção apenas no tempo de 3 horas frente à adição de 25 ng/ml de TNF- $\alpha$  na cultura. Como análise desses experimentos foi realizada simultaneamente, não foi possível adotar a concentração de 10 ng/ml de rTNF- $\alpha$  na cinética temporal de 1 a 7 horas, tendo como base o dado anterior da curva de concentração. Entretanto, o aprofundamento da investigação da secreção de IL-1 $\beta$  frente aos estímulos adotados, será conduzida futuramente com essa nova concentração de rTNF- $\alpha$ . Já o ML não induziu a liberação da IL-1 $\beta$ , nem quando em associação ao TNF- $\alpha$  exógeno (Figura 20).

Já foi descrita na literatura a capacidade das CS de produzir e secretar a citocina IL-10, assim como linfócitos T, monócitos, macrófagos, microglia, astrócitos, e outras populações celulares ([136]; [137]; [138]). A IL-10 é uma citocina pleiotrópica responsável, principalmente, por ações antiinflamatórias, podendo reduzir potencialmente a expressão de moléculas de MHC II, a apresentação de antígenos pelos macrófagos, e inibir a liberação de citocinas próinflamatórias, como, IL-8, IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 [137]. Em geral a IL-10 atua negativamente sobre todas as ações que promovem respostas inflamatórias e a imunidade celular, e positivamente, sobre os fenômenos que levam à tolerância na imunidade adaptativa [139]. Os níveis dessa citocina aumentam rapidamente após a injúria nervosa periférica e sofrem redução imediatamente após a mesma [135]. Em modelos de lesões traumáticas na medula espinhal a IL-10 foi implicada na recuperação da função motora, redução da dor, redução do dano tecidual e neuroproteção através da prevenção de apoptose celular ([140]; [141]; [142]; [143]; [144]). Nos experimentos realizados nesse trabalho não houve detecção da secreção de IL-10 frente a nenhum dos estímulos aplicados na linhagem ST88-14. Apesar da expressão gênica dessa citocina ter sido observada por Qin e colaboradores (2008) frente ao estímulo de 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  exógeno em CS de ratos [112], nossos dados sugerem a reduzida participação dessa citocina antiinflamatória no contexto inicial de infecção pelo ML (Figura 21 e 22).

A IL-6 é uma citocina importante para o processo de regeneração tecidual, sendo aumentada no meio imediatamente após a injúria nervosa ([98]; [135]). Essa molécula próinflamatória é expressa por células apresentadoras de antígeno, como por exemplo, linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e uma variedade de outras populações celulares. Entre as suas ações podemos destacar a sua propriedade antiapoptótica, sua atuação como fator de crescimento celular, seu envolvimento na migração de linfócitos T e na indução de respostas Th2, assim como, na diferenciação de células Th17, quando em associação com TGF- $\beta$  [145]. Já a IL-8, também conhecida como CXCL8, é uma quimiocina próinflamatória associada com a indução de quimiotaxia de neutrófilos e degranulação, sendo também relacionada com respostas angiogênicas, tumorais e com o fenômeno de metástase [146]. Dados do nosso laboratório demonstraram a expressão gênica dessa molécula em CS da linhagem ST88-14 [60]. Os resultados obtidos nesse estudo revelam a indução da secreção de IL-6 e IL-8 por todas as concentrações de TNF- $\alpha$  avaliadas no período de 2 horas (Figuras 23 e 25). Em intervalos de tempo mais extensos, foi constatado o efeito positivo do TNF- $\alpha$  exógeno na secreção de ambas as citocinas, não sendo observado, entretanto, o mesmo efeito frente ao estímulo do ML. A indução de IL-6 em resposta ao TNF- $\alpha$  está de acordo com dados observados por Qin e colaboradores (2008), que observaram aumentos nos níveis de RNAm dessa citocina em CS de ratos após o estímulo de TNF- $\alpha$  exógeno [112]. Já a associação da micobactéria e do TNF- $\alpha$  promoveu perfis de secreção de IL-6 e IL-8 similares ao observado no estímulo individual da citocina nas células ST88-14 (Figuras 24 e 26).

A etapa final desse estudo foi a caracterização das vias de sinalização ativadas pelo ML e TNF- $\alpha$ , em associação ou não, na linhagem ST88-14. A análise da ativação da MAPK p38 pelas técnicas de western blotting e imunofluorescência, revelou que as vias recrutadas pela interação do ML e do TNF- $\alpha$ , individualmente ou em associação, não envolvem a fosforilação dessa proteína (Figura 27). Um fato curioso na avaliação dos extratos celulares por western blotting foi a não detecção da forma não ativada da p38 pelo anticorpo utilizado. Amostras da linhagem THP-1 previamente estimuladas com LPS (2 $\mu$ g/ml) foram utilizadas como controle de qualidade do anticorpo total e fosforilado, e, portanto, atestaram a funcionalidade de ambos nessa técnica. A razão pela qual não houve marcação da proteína total nos extratos celulares da linhagem ST88-14 não foi elucidada, pois o anticorpo usado foi policlonal e variações na estrutura da molécula de p38 entre as duas linhagens, teoricamente, não impossibilitariam a capacidade de reconhecimento desse

reagente. Uma possível explicação seria o fato das células ST88-14 expressarem níveis menores de p38 em relação à linhagem THP-1, sendo necessário, portanto, o aumento a concentração de uso do anticorpo para sua detecção. Felizmente a avaliação por imunofluorescência foi bem sucedida, havendo marcação da proteína total e da fosforilada. A última foi visualizada apenas no controle de qualidade do anticorpo, que consistiu em fibroblastos gengivais humanos estimulados com LPS (10µg/ml) por 15 minutos (Figura 27).

As MAPKs ERK 1/2 são geralmente fosforiladas pela ação sequencial das moléculas SOS/Ras/Raf/MEK, considerada a via canônica de ativação dessas proteínas. Essa via está envolvida com a regulação da diferenciação e ativação das CS durante o dano e a regeneração nervosa periférica, promovendo a desmielinização, desdiferenciação e proliferação dessas células [120]. Nesse estudo, a análise da ativação das MAPKs ERK 1/2 por western blotting e imunofluorescência, revelou a participação dessas proteínas nas vias acionadas pelo ML e TNF- $\alpha$ , individualmente e também em associação, na linhagem ST88-14. Os ensaios realizados revelaram por ambas as técnicas, que o TNF- $\alpha$  promove uma fosforilação mais intensa dessas MAPKs que o ML, e curiosamente, a associação desses estímulos parece reduzir o efeito individual dessa citocina na ativação dessas proteínas, podendo indicar que, a competição pelo recrutamento de uma mesma via, pode levar ambos os estímulos a ativar outras vias de sinalização distintas para indução de seus efeitos (Figura 28).

Já foi descrito que o ML pode ativar a via de ERK 1/2 em CS humanas através do recrutamento da PKC- $\epsilon$  (proteína kinase C- $\epsilon$ ), de uma maneira independente de MEKs, promovendo assim, a desdiferenciação e proliferação dessas células [147]. Nossos resultados, acoplados a dados prévios constatados por nossa equipe, evidenciam o efeito ERK-dependente do TNF- $\alpha$  e ML na proliferação da linhagem ST88-14, já que ambos induzem a replicação dessas células a partir de 48 horas e mais pronunciadamente após 72 horas de estímulo [108].

Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que na injúria neural da hanseníase, a infecção pelo ML pode contribuir para ativação sustentada das CS, ativando vias de sinalização dependentes de ERK 1/2 e induzindo a produção de TNF- $\alpha$ . Além disso, foi observada a participação do mecanismo de retroalimentação positiva dessa citocina na ativação dessas células, que pode não só aumentar os níveis dessa molécula no meio,



como a secreção de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, que cooperam com a resposta imune e com o estado de ativação prolongado das CS.

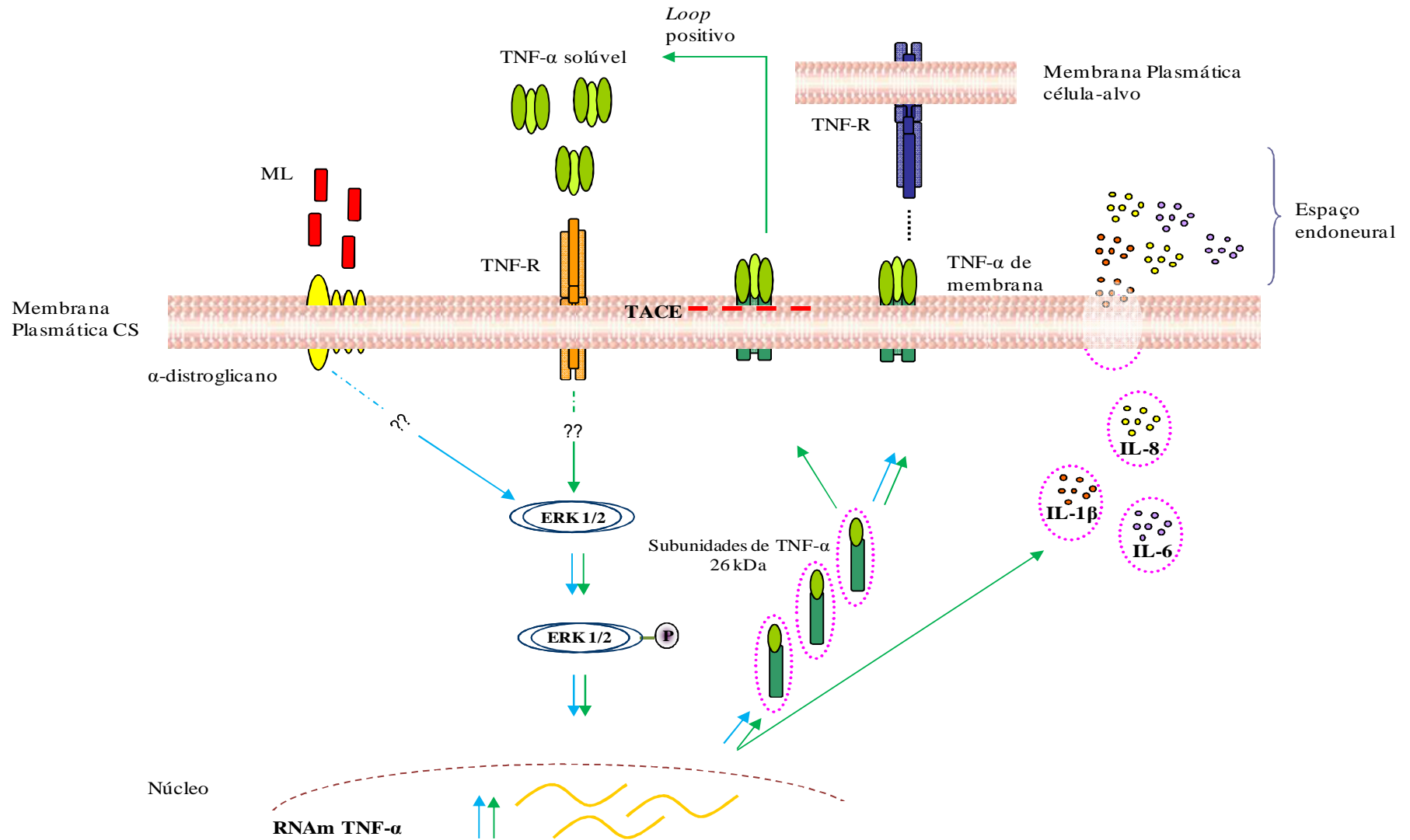
São necessários mais estudos *in vivo* que concretizem estes dados uma vez que a resposta das células ao TNF- $\alpha$  e ao ML depende de diversos outros fatores. Estudos realizados até então, sugerem que a ação dessa citocina pode variar, e indicam que o tipo de célula, seu estado de maturação, o contexto celular preciso e a composição dos receptores, assim como, o tempo de interação com os mesmos são parâmetros importantes na determinação dos seus efeitos biológicos ([76]; [148]). Uma melhor compreensão da interação do ML e do TNF- $\alpha$  com CS humanas, dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos, assim como, seus efeitos pró-inflamatórios e imunossupressores, contribuirão para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes no tratamento dessa doença.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse estudo, apesar de preliminares, sugerem que o ML é capaz de induzir a expressão e a produção de TNF- $\alpha$  através da ativação de vias de sinalização com a participação de ERK1/2 em CS da linhagem ST88-14. Como a secreção dessa citocina frente ao estímulo da micobactéria não foi detectada, podemos concluir que o TNF- $\alpha$  expresso age localmente no contexto de injúria neural, ativando outros tipos celulares através do contato célula-célula.

Nossos dados também evidenciaram a existência de um mecanismo de retroalimentação positiva de TNF- $\alpha$  que utiliza vias de sinalização com a participação das MAPKs ERK1/2 nessa linhagem celular, sendo esta citocina capaz de induzir sua própria expressão, produção e secreção, e, portanto, de manter essas células em estado prolongado de ativação. Além disso, o TNF- $\alpha$  mostrou-se eficaz na indução da secreção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 na linhagem ST88-14, corroborando seu importante papel, assim como o das CS, na lesão neural da hanseníase.

A ação conjunta do TNF- $\alpha$  e do ML promoveu uma ativação reduzida da via de sinalização de ERK 1/2, quando comparada ao efeito individual de cada um dos estímulos. Em relação a indução da expressão, produção e secreção do TNF- $\alpha$  e da liberação de outras citocinas, essa cooperação promoveu ações semelhantes ao estímulo exclusivo do TNF- $\alpha$  exógeno na linhagem ST88-14. A figura 29 ilustra um modelo de ativação das CS no contexto de infecção pelo ML proposto pelos dados desse estudo.



**Figura 29: Esquema representativo da participação do *M. leprae* e do TNF- $\alpha$  na ativação das células de Schwann.** As setas verdes e azuis indicam os processos resultantes do estímulo do TNF- $\alpha$  e ML, respectivamente. Ambos os estímulos ativam a via de sinalização de ERK 1/2 e induzem a expressão e produção de TNF- $\alpha$ . A ação dessa citocina induz a secreção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 nessas células.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hussain T. Leprosy and tuberculosis: an insight review. *Critical rev in microbiol* 2007;33:15-66.
2. Britton, WJ, Lockwood, DN. Leprosy. *Lancet* 2004.Apr 10;363 (9416):1209-19.
3. Monot M, Honore N, Garnier T, Araoz R, Coppe JY, Lacroix C, Sow S, Spencer JS, Truman RW, Williams DL, Gelber R, Virmond M, Flageul B, Cho SN, Ji B, Paniz-Mondolfi A,11 Convit J, Young S., Fine PE, Rasolofo V, Brennan PJ, Cole ST. On the origin of leprosy. *Science* 2005 May;308: 1040-42.
4. Robbins G, Tripathy VM, Misra VN, Mohanty RK, Shinde VS, Gray KM, Schug MD. Acient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.c). *Plos One*. 2009; 4(5):1-8.
5. Walker SL, Lockwood DJN. Leprosy. *Clinics in Dermatol*. 2007; 25:165-1
6. **World Health Organization**. *Weekly epidemiological record* (Nº 26, 2009, ano 84, 261-268) [http:// www.who.int/wer](http://www.who.int/wer)
7. **World Health Organization**: *Weekly epidemiological record* (Nº 33, 2008, ano 83, 293-300) [http:// www.who.int/wer](http://www.who.int/wer)
8. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: minimal mycobacterial gene set. 2001 Aug; 2(8): 1023.1- .5.
9. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):338-81. Review.
10. Brennan, PJ, Nikaido, H. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem*. 1995 64:29-63.
11. Rees, RFW. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, RC (ed). *Leprosy* Churchill Livingstone Inc. New York. 1985; 31-52.
12. Cole ST., Eiglmeier K., Parkhill J., James KD., Thompson NR., Wheeler PR., *et al.*, Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001 Feb 22; 409(6823): 1007-11.
13. Gómez-Valero L, Rocha EPC, Latorre A, Silva FJ. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome research*. 2007;17:1178-85.
14. Agrawal A. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2005 Nov;107(6):445-454.
15. Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev* 2005;76(3):198-208.

16. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. *Lepr Rev.* 2000 Dec;71 Suppl:S121-9
17. Pfaltzgraff RE. Leprosy vaccines. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1990;58(3):573.
18. WHO. World Health Organization. In. 1998 ed; 1998;
19. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.
20. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2002; 35(4):365-375.
21. UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. *Tropical disease research: a global partnership.* Geneva; World Health Organization; 1987. 23 p.
22. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *The Society for Invest Dermatol* 1994 Jun;102:828-32.
23. Chacha JJ, Sotto MN, Peters L, Lourenço S, Rivitti EA, Melnikov P. Sistema nervoso periférico e pressupostos da agressão neural na hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2009;84(5):495-500.
24. Ooi WW, Srinivasan J. Leprosy and the peripheral nervous system: basic and clinical aspects. *Muscle Nerve.* 2004 Oct;30(4):393-409.
25. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. 1988 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:1213-17.
26. Manandhar R, Shrestha N, Butlin CR, Roche PW. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. *Clin Exp Immunol.* 2002 May;128(2):333-8
27. Lahiri R, Sandoval FG, Krahenbuil JL, Shannon EJ. Activation of complement by *Mycobacterium leprae* requires disruption of the bacilli. *Lepr Rev* 2008; 79:311-314.
28. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2003 Nov; 6(11): 1127-34.
29. Allen NJ, Barres BA. Glia — more than just brain glue. *Nat Neuroscience.* 2009 Feb; 457: 675-677.

30. Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural Crest Specification: Migrating Into Genomics. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Oct;4:795-805.
31. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Sep;6(9):671-82.
32. Jessen KR, Mirsky R. Embryonic Schwann cell development: the biology of Schwann cell precursors and early Schwann cell. *J Anat*. 1997; 191: 501-05.
33. Kim J., Lo L., Dormand E., Anderson D.J. SOX10 Maintains Multipotency and Inhibits Neuronal Differentiation of Neural Crest Stem Cells. *Neuron*. 2003; 38; 17–31.
34. Nave KA, Schwab MH. Glial cells under remote control. *Nat Neurosci*. 2005 Nov;8(11):1420-2
35. Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1481-90.
36. Shy ME. Peripheral neuropathies caused by mutations in the myelin protein zero. *Journal of the Neurological Sciences*. 2006;242:55 – 66.
37. Parmantier E, Lynn B, Lawson B, Turmaine M, Namini SS, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen KR, Mirsky R. Schwann Cell-Derived Desert Hedgehog Controls the Development of Peripheral Nerve Sheaths. *Neuron*, 1999 Aug;23, 713–724.
38. Chmurzyńska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): Function, structure and polymorphism. *J Appl Genet*. 2005;47(1): 39-48.
39. Woodhoo A, Alonso MBD, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen K. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci*. 2009 Jul;12(7): 839-49.
40. Jessen KR, Mirsky R. Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat*. 2002 Apr;200(4):367-76.
41. Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(12):1995-9.
42. Marenholz I, Hausmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004;322: 1111–1122.
43. Triolo D, Dina G, Lorenzetti I, Malaguti M, Morana P, Del Carro U, Comi G, Messing A, Quattrini A, Previtali SC. Loss of glial fibrillary acidic protein (GFAP) impairs Schwann

- cell proliferation and delays nerve regeneration after damage. *J Cell Sci.* 2006 Oct 1;119(Pt 19):3981-93.
44. Ndubaku U, Bellard ME. Glial cells: Old cells with new twists. *Acta Histochem.* 2008; 110(3): 182–195.
  45. Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron.* 2008 Nov;60: 430-440.
  46. Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 2007 Oct;17(5):533-40.
  47. Garbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000 Jun;61(3):267-304.
  48. Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Oct;16(5):492-500.
  49. Svaren J, Meijer D. The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia.* 2008 Nov 1;56(14):1541-51.
  50. Rambukkana A. Mycobacterium leprae-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol.* 2004 Aug;16(4):511-8.
  51. Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci.* 2004 Oct 20;24(42):9250-60.
  52. Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):21-7
  53. Harboe M, Asefa A, Leekassa R. Challenges presented by nerve damage. *Lep Rev.* 2005;76:5-13.
  54. Rambukkana A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system. *Trends Microbiol.* 2000. 8: 23-8.
  55. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, Modlin RL. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun.* 2003 Mar;71(3):1427-33.
  56. Spierings E, De Boer T, Zulianello L, Ottenhoff TH. The role of Schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands. *Lepr Rev.* 2000 Dec;71 Suppl:S121-9

57. Hao HN, Peduzzi-Nelson JD, VandeVord PJ, Barami K, DeSilva SP, Pelinkovic D, Morawa LG. Lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production by Schwann's cells dependent upon TLR4 expression. *Journal of Neuroimmunology*. 2009;212:26–34
58. Lisak RP, Skundric D, Bealmear B, Ragheb S. The role of cytokines in Schwann cell damage, protection, and repair. *J Infect Dis*. 1997 Dec;176 Suppl 2:S173-9. Review.
59. Skoff AM, Lisak RP, Bealmear B, Benjamins JA. TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. *J Neurosci Res*. 1998 Sep 15;53(6):747-56.
60. Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, Antas PR, Sarno EN. 2005. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Oct;64(10):882-90.
61. Kieseier BC, Hartung HP, Wiendl H. Immune circuitry in the peripheral nervous system. *Curr Opin Neurol*. 2006 Oct;19(5):437-45.
62. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 4:S24-9.
63. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:209-33.
64. Carroll SL, Ratner N. How Does the Schwann Cell Lineage Form Tumors in NF1? *Glia*. 2008; 56:1590–1605.
65. Parinello S, Lloyd AC. Neurofibroma development in NF1 – insights into tumour initiation. *Trends in Cell Biology*. 2009;19(8): 395-403.
66. Yan N, Ricca C, Fletcher J, Glover T, Seizinger BR, Manne V. Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type I (NF1) malignant phenotype. *Cancer Res*. 1995 Aug 15;55(16):3569-75.
67. Silva TP, Silva ACC, Baruque MGA, Oliveira RB, Machado MP, Sarno EN. Morphological and functional characterizations of Schwann cells stimulated with *Mycobacterium leprae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2008;103(4): 363-369.
68. Su W, Sin M, Darrow A, Sherman LS. Malignant peripheral nerve sheath tumor cell invasion is facilitated by Src and aberrant CD44 expression. *Glia*. 2003 Jun;42(4):350-8.
69. Ware CF. The TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Jun-Aug;14(3-4):181-4.
70. Sun M, Fink PJ. A new class of reverse signalling costimulators belongs to the TNF family. *J of Immunol* 2007;179:4307-12.



71. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56.
72. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF Receptor superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell.* 2001 February;104, 487–501.
73. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008;214:149-160.
74. Koulis G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockage may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2002; 13:315-21
75. Jupp OJ, McFarlane SM, Anderson HM, Littlejohn AF, Mohamed A A A, Mackay RH, Vandenameele P, Macewan DJ. Type II tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem. J.* 2001;359, 525-535
76. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2003 Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10:45-65.
77. Palladino MA, Bahjat FR, Theodorakis EA, Moldawer LL. Anti-TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Sep;2(9):736-46.
78. McEwan DJ. 2002 TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal.* 14:477-92.
79. Ihnatko R, Kubes M. TNF signaling: early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys* 2007; 26: 159-67.
80. Campbell IK, Roberts LJ, Wicks IP. Molecular targets in immune-mediated diseases: the case of tumour necrosis factor and rheumatoid arthritis. *Immunology and Cell Biology* 2003;81, 354–366
81. Ka-Ming Chan F. Three is better than one: Pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokines.* 2007; 37: 101-107.
82. Higuchi M, Aggarwal BB. Differential roles of two types of the TNF receptor in TNF-induced cytotoxicity, DNA fragmentation, and differentiation. *J Immunol.* 1994 Apr 15;152(8):4017-25.
83. Han D, Ybanez MD, Ahamadi S, Yeh K, Kaplowitz N. Redox regulation of tumor necrosis factor signalling. *Antioxidants and redox signalling* 2009.
84. Wertz IE, Dixit VM. Ubiquitin-mediated regulation of TNFR1 signaling. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2008;19:313–324

85. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:782-798.
86. Wicovsky A, Henkler F, Salzmann, Scheurich P, Kneitz C, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene* 2009;28:1769-81.
87. Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Science* 2004;117:4619-28.
88. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2) 320-344.
89. Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway by protein interaction. *Biochem J* 2000; 351: 269-305.
90. Saklatvala J, Davis W, Guesdon F. Interleukin 1(IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) signal transduction. *The Royal Society* 1996;351:151-57.
91. Mittelstadt PR, Salvador JM, Fornace AJ, Ashwell JD. Activating p38 MAPK. *Cell Cycle* 2005;4(9): 1189-92.
92. Zhang Q, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 2002; 12(1): 9-18.
93. Bonetti B, Valdo P, Stegagno C, Tanel R, Ramarli D, Fiorini E, Turazzi S, Carner M, Moretto G. Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000 Jan;59(1):74-84.
94. Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U. Neurodegenerative and neuroprotective effects of Tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):RC216.
95. Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. *Brazilian J Med Biol Res*. 1998;31(1):69-76.
96. Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, Misra RS, Ramesh V. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. *Immunol Lett*. 2000 Dec 1;75(1):69-76.

97. Teles RMB, Antunes SLG, Jardim MR, Oliveira AL, Nery JAC, Sales AM, Sampaio EP, Shubayev V, Sarno EN. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF- $\alpha$  in the nerves of leprosy patients. *J Periph Nerv Syst* 2007; 12: 195-204.
98. Cheng C, Qin Y, Shao X, Wang H, Gao Y, Cheng M, Shen A. Induction of TNF-alpha by LPS in Schwann cell is regulated by MAPK activation signals. *Cell Mol Neurobiol*. 2007 Nov;27(7):909-21. Epub 2007 Sep 28.
99. George A, Buehl A, Sommer C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *J Neurosci*. 2005;192:163-166.
100. Campana WM, Li X, Dragojlovic N, Janes J, Gaultier A, Gonias SL. The low density lipoprotein receptor-related protein is a pro-survival receptor in Schwann cells: possible implications in peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2006 Oct 25;26(43):11197-207.
101. Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, Shubayev V. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun*. 2007 Jul;21(5):561-8.
102. Shubayev VI, Angert M, Dolkas J, Campana WM, Palenscar K, Myers RR. TNF-alpha-induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol Cell Neurosci*. 2006 Mar;31(3):407-15. Epub 2005 Nov 16.
103. Kuno R., Yoshida Y., Nitta A., Nabeshima T., Wang J., Sonobe Y., Kawanokuchi J., Takeuchi H., Mizuno T., Sazumura A. The role of TNF-alpha and its receptors in the production of NGF and GDNF by astrocytes. *Brain Res* 2006 Oct 20; 1116(1):12-8.
104. Arandjelovic S, Dragojlovic N, Li X, Myers RR, Campana WM, Gonias SL. A derivative of the plasma protease inhibitor alpha(2)-macroglobulin regulates the response to peripheral nerve injury. *J Neurochem*. 2007 Oct;103(2):694-705. Epub 2007 Aug 23.
105. Yang L, Lindholm K, Konishi Y, Li R, Shen Y. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci*. 2002 Apr 15;22(8):3025-32.
106. Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci*. 2001 Nov; 4(11):1116-22.
107. Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine*. 2004 May 15;29(10):1082-8.

- 108.Silva ACC. Participação do TNF e NGF na lesão neural da hanseníase. Fiocruz. Dissertação de mestrado defendida em 2008.
- 109.Glover TW, Stein CK, Legius E, Andersen LB, Brereton A, Johnson S. Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1991 Jan;3(1):62-70
- 110.Sinsimer D, Falows D, Peixoto B, Krahenbuhl, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naive human monocytes. *America Society for Microbiol*. 2009.
- 111.Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- 112.Qin Y, Cheng C, Wang H, Shao X, Gao Y, Shen A. TNF- $\alpha$  as an autocrine mediator and its role in the activation of Schwann cell. *Neurochem Res* 2008Nov; 11064(007): 9552-61.
- 113.Van Brakel WH, Khawas IB. Nerve damage in leprosy: an epidemiological and clinical study of 396 patients in west Nepal--Part 1. Definitions, methods and frequencies. *Lepr Rev* 1994;65(3):204-21.
- 114.Hagge DA, Robinson SO, Scollard D, Cormick GM, Williams DL. A New Model for Studying the Effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann Cell and Neuron. *JID* 2002;186: 1283-96.
- 115.Miko TL, Le Maitre C, Kinfu Y. Damage and regeneration of peripheral nerves in advanced treated leprosy. *Lancet* 1993;342(8870):521-5
- 116.Rambukkana, A., Zanazzi, G., Tapinos, N., Salzer, J.L.,. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune responses. *Science*. 2002;296: 927-931.
- 117.Johnson, P.C., 1997. Peripheral nerve pathology. In: Davis, R.L., Robertson, D.M. (Eds.), *Text Book of Neuropathology*. 3rd ed. William and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1233-1323.
- 118.Shetty, V.P., Mehta, L.N., Irani, P.F., Antia, N.H., 1980. Study of the evolution of nerve damage in leprosy. Part I. Lesions of the index branch of the radial cutaneous nerve in early leprosy. *Lepr. India* 52, 5-18.
- 119.Shetty, V.P., Antia, N.H., Jacobs, J.M., 1988. The pathology of early leprosy neuropathy. *J. Neurol. Sci.* 88, 115-131.

- 120.Rambukkana, A., Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog. Neurobiol.* (2009).
- 121.White FA, Bhangoo SK, Miller RJ.Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005 October ; 4(10): 834–844.
- 122.Campana WM. Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2007 Jul;21(5):522-7.
- 123.Shubayev,V.I., Myers, R.R.,. Upregulation and interaction of TNF-a. and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res.* 2000;855:83-89.
- 124.Üçeyler N, Tschärke A, Sommer C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain, *Brain Behav. Immun.* 21 (2007) 553–560.
- 125.Johnson MD, Kamsso-Pratt J, Federspiel CF, Whetsell WO Jr. Mast cell and lymphoreticular infiltrates in neurofibromas. Comparison with nerve sheath tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 1989 Nov;113(11):1263-70.
- 126.DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell.* 1992 Apr 17;69(2):265-73.
- 127.Vidal Pessolani MC, Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect.* 2003 Jun;5(7):677-84.
- 128.Boyle K, Azari MF, Cheema SS, Petratos S. TNFalpha mediates Schwann cell death by upregulating p75NTR expression without sustained activation of NFkappaB. *Neurobiol Dis.* 2005 Nov;20(2):412-27.
- 129.Oliveira AL, Antunes SLG, Teles RM, Silva ACC, Silva TP, Teles RB, Meideiros MF, Britto C, Jardim MR, Sampaio EP, Sarno EM. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2010;69:27-39.
- 130.Ricote M, Garcia-Tunon I, Bethencourt FR *et al.* Interleukin-1 (IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and Its Receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in Prostate Carcinoma. *American Cancer Society.* 2004
- 131.Mercer F, Kozhay L, Unutmaz D. Expression and Function of TNF and IL-1 Receptors on Human Regulatory T Cells. 2010; *PLoS ONE.* 2010 Jan;5 (1): e8639

132. Gibson RM, Rothwell NJ, Le Feuvre RA. CNS injury: the role of the cytokine IL-1. *The Veterinary J.* 2004;168:230-37.
133. Boutin H, Kimber I, Rothwell NJ, Pinteaux E. The Expanding Interleukin-1 Family and Its Receptors: Do Alternative IL-1 Receptor/Signaling Pathways Exist in the Brain?. *Molecular Neurobiology.* 2003; 27(3): 239–248.
134. Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The Cytokine Network of Wallerian Degeneration: Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$ . *The Journal of Neuroscience.* 2002 April 15; 22(8):3052–3060.
135. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and Regeneration of the Peripheral Nervous System: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J of the Peripheral Nerv Syst.* 2002;7:13-27.
136. Jander S, Pohl J, Gillen C, Stoll G. Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res.* 1996 Jan 15;43(2):254-9.
137. Schroeter M, Jander S. T-Cell Cytokines in Injury-Induced Neural Damage and Repair. *NeuroMolecular Medicine.* 2005;07:183–196
138. Sawada T, Sano M, Omura T, Omura K, Hasegawa T, Funahashi S, Nagano A. Spatiotemporal quantification of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 after crush injury in rat sciatic nerve utilizing immunohistochemistry. *Neurosci Lett.* 2007 Apr 24;417(1):55-60.
139. Asadullah K, Sterry W, Volk H. D. Interleukin-10 Therapy—Review of a New Approach. *Pharmacological Rev;* 2003; 55(2):241-269.
140. Bethea, J.R., Nagashima, H., Acosta, M.C., Briceno, C., Gomez, F., Marcillo, A.E., Loo, K., Green, J., Dietrich, W.D., 1999. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma* 16, 851–863.
141. Brewer, K.L., Bethea, J.R., Yezierski, R.P., 1999. Neuroprotective effects of interleukin-10 following excitotoxic spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 159, 484–493.
142. Jackson, C.A., Messinger, J., Peduzzi, J.D., Ansardi, D.C., Morrow, C.D., 2005. Enhanced functional recovery from spinal cord injury following intrathecal or intramuscular administration of poliovirus replicons encoding IL-10. *Virology* 336, 173–183.

- 143.Plunkett, J.A., Yu, C.G., Easton, J.M., Bethea, J.R., Yeziarski, R.P., 2001. Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp. Neurol.* 168, 144–154.
- 144.Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2009;220:183-190.
- 145.Diez O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol.* 2009 January ; 130(1): 27–33.
- 146.Waugh DJJ, & Wilson C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(21).
- 147.Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1\_2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *PNAS.* 2005 June;102(26)9188–9193.
- 148.Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:1217-81.