

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Parasitária



EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM
LINHAGEM DE CÉLULAS SCHWANN : UMA CONTRIBUIÇÃO À
PATOGENESE DA LESÃO NEURAL NA HANSENÍASE



Smile
on my mac

Rosane Barbosa de Oliveira

RIO DE JANEIRO
OUTUBRO DE 2003

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

**EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM
LINHAGEM DE CÉLULAS SCHWANN : UMA CONTRIBUIÇÃO À
PATOGENESE DA LESÃO NEURAL NA HANSENÍASE**

POR

ROSANE BARBOSA DE OLIVEIRA

**RIO DE JANEIRO
OUTUBRO DE 2003**



DBP - IOC
Smile
on my mac

R. B. OLIVEIRA

2003

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Curso de Pós - graduação em Biologia Parasitária

**EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE RECEPTORES TOLL-LIKE EM LINHAGEM DE CÉLULAS
SCHWANN : UMA CONTRIBUIÇÃO À PATOGÊNESE DA LESÃO NEURAL NA HANSENÍASE**

por

Rosane Barbosa de Oliveira

**TESE SUBMETIDA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA
DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ VISANDO OBTENÇÃO O TÍTULO DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE HANSENÍASE.**

ORIENTADORAS : DRA. EUZENIR NUNES SARNO

DRA. ELIZABETH PEREIRA SAMPAIO
Smile
on my mac

OUTUBRO, 2003

ESTA TESE FOI REALIZADA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM HANSENÍASE, LAB. DE HANSENÍASE DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, SOB ORIENTAÇÃO DA DRA. EUZENIR NUNES SARNO (PESQUISADOR TITULAR) E CO-ORIENTAÇÃO DA DRA. ELIZABETH PEREIRA SAMPAIO (PESQUISADOR TITULAR), COM RECURSOS DAS SEGUINTE ENTIDADES:

WHO/TDR

NIH

IOC



Smile
on my mac

Tardezinha lentamente submerge o sol nas brumas do horizonte, remoto pervagam no firmamento anilado pálidos clarões do ocaso, o bronze merencório também faz sua oração embalhar compassado ferindo corações que jazem encarcerados nas prisões eternas, de eternas saudades, um silêncio sepulcral envolve a natureza inteira, quebrando-o redobra o campanário, o bronze soluçam solta gemidos e repete-nos os ecos dos vales.

É hora da Ave Maria. Neste instante suplicamos a ti Mãe Santíssima paz para o mundo, bálsamo de amor para os que estão nos leitos de dores e alegria para os que choram a dor da perda do ente amado.

Oh! Mãe abençoe seus filhos que dormem nas sarjetas, tendo o céu por teto e as pedras como leito. Mãe amada encoraja os desenganados da vida e perdoa-nos pelas desobediências a vós cometidas e tira de nós o micróbio da inveja, do ódio da ambição, e, dá-nos para sempre a humildade do vosso filho Jesus.

Oremos todos contritos assim: Ave Maria cheia de graça, o Senhor é convosco, bendita sois vós entre as mulheres e bendito é o fruto do vosso ventre Jesus. Santa Maria Mãe de Deus rogai por nós pecadores agora e na hora de nossa morte. Amém.



Smile
on my face

Antônio de Oliveira Borges Junior

Movimento de Reintegração de Pessoas Atingidas pela Hanseníase (MORHAN)



Smile
on my mac

A Minha mãe Marita

A Minha irmã Eliane

Aos pacientes com Hanseníase

AGRADECIMENTOS

Dra. EUZENIR NUNES SARNO

DRA. ELISABETH PEREIRA SAMPAIO

DR. SÉRGIO ANTUNES

DR. FERNANDO AARESTRUP

PAULO ZUQUIM ANTAS

DR. ROBERT MODLIN

DR. ANURA RAMBUKKANA

DR. PETER SIELING

DR. THOMAS REA

DRA. MARIA TERESA OCHOA

Ambulatório Souza Araújo - FIOCRUZ

Laboratório de Hanseníase – FIOCRUZ

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Christiane Pflegshorl

Ilka Rocha

Judy Grevan



Smile
on my mac

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR	bacilo-álcool-ácido resistente	MBP	proteína básica mielina
BB	borderline borderline	MEC	matriz extracelular
BCG	bacilo Calmette-Guérin	MMP	metaloproteinase de matriz
BCL-2	B-cell lymphoma/leukemia-2	MyD88	fator de diferenciação mielóide
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro	NCAM	células de adesão molecular neural
BL	borderline lepromatoso	NF- κ B	fator nuclear kappa B
BT	borderline tuberculóide	NF-1	neurofibromatose de von Recklin Ghausem
CR3	receptores do complemento do tipo 3		tipo-1
CrmA	modificador de resposta de citocinas	NGF	fator de crescimento de nervo
CS	célula de Schwann	NK	natural killer
DCs	células dendríticas	NT3	neutropismo-3
DNA-CpG	deoxioguanilato fosfato-deoxicetilato	OMS	Organização Mundial de Saúde
DTH	hipersensibilidade tardia	P13-K	fosfatidilinositol 3 kinase
dToll	Toll de Drosophila	P21	proteína-21
EAN	neurite alérgica experimental	P-43	proteína associada ao crescimento-43
ELISA	ensaio imunoenzimático	PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos
ENL	eritema nodoso leproso	PB	paucibacilares
FAAD	domínio de morte associado a Fas	PDGF-BB	fator de crescimento derivado de plaquetas
GFAP	fator de crescimento associado à proteína	PDIC	poliradiculoneuropatia desmielinizante
GPI	glicosilfosfatidilinositol		inflamatória crônica
HBHA- α	heparin binding hemagglutinin adhesin	PGE2	prostaglandina E 2
HLP	proteína histona-like	PGL-I	glicolípido fenólico-1
HNPP	hereditary neuropathy with ressure palsies	PIM	fosfatidil inositol manoseído
hToll	Toll humano	PKC	proteína quinase de cálcio
IB	índice baciloscópico	PLP	proteína proteolípida
ICAM-1	molecula de adesão intracelular-1	PMN	polimorfonucleares
IFN- γ	gama interferon	PO	protéina zero
IGF	fator de crescimento de insulina	PQT	poliquimioterapia
IKK1	kappa1/kinase 1	PTK	proteína tirosina kinase
IKK2	kappa2/1kinase2	rhIFN	interferon humano recombinante
IL	interleucina 1	RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
IL-1R	receptores de interleucina-1	RR	reação reversa
IMC	imunidade mediada por células	RT-PCR	transcrição reversa associada a reação
IRAK	interleucina 1 associada a kinase		polimerásica em cadeia
LAK	linfócitos killer ativados	sCD-14	CD-14 solúvel
LAM	lipoarabinomanana	SNC	sistema nervoso central
LBP	proteína ligadora de LPS	SNP	sistema nervoso periférico
LI	inibidor leucêmico	TACE	enzima conversora do TNF-alfa
LIF	fator inibidor leucêmico	TCR	receptor de célula T
LL	lepromatoso lepromatoso	TGF- β	fator de transformação de crescimento beta
LM	lipomanana	Th	células T auxiliares
LPS	lipopolissacarídeo	TIMP	pequenas proteínas
LPs	lipoproteínas bacterianas	TIR	lipoproteínas intracelular
LRR	receptores ricos em leucinas	TLR	receptor toll-like
MAG	glicoproteína associada ao crescimento da mielina	TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
MALP-2	ativação de macrófagos lipopídeos 2kda	TNFR-I	receptor 1 de fator de necrose tumoral
MAP	moléculas adaptadoras de proteínas	TNFR-IIreceptor	2 de fator de necrose tumoral
MAP3K	proteína mitogeno-ativada 3 kinase	Tp47	treponema pallidum 47
MB	multibacilares	TRAF-6	proteína adaptadora fator -6

SUMMARY

A major complication in leprosy is the development of deformities along the chronic course of disease. In the present study, a malignant human Schwann cell line (ST88-14) was used to characterize the induction of cell death and the production of cytokines in these *in vivo* and *in vitro* SCs. It had previously been shown that, in some neuropathies, SC became activated and produced cytokines during experimental injury. Here, the physiological functions of SC and how cytokines, *M. leprae*, and *M. leprae* components possibly cause damage to these cells were investigated. The recent description of the mechanisms utilized by *M. leprae* to enter SCs and, consequently, the study of *M. leprae*-SC interaction in the innate immune response (Toll-like receptors - TLR) are essential to understanding what is involved in the development of nerve damage. In this connection, an evaluation was made of TLR expression in skin biopsies and the ST88-14 cell line and whether these cells were susceptible to cell death through TLR2 activation. It was found that TLR2 expression on SCs and their activation by a TLR2 agonist - a synthetic lipopeptide comprising the N-terminal portion of the putative *M. leprae* 19kD lipoprotein – simultaneously induced IL-6 and IL-8 secretion and triggered increased production of apoptotic cells, which, along with cytokine production, was blocked by an anti-TLR2 monoclonal antibody. Besides demonstrating the presence of TLR2 expression in the SCs of skin lesions of leprosy patients, SCs were also identified in lesions that had undergone apoptosis *in vivo*.

The ability of *M. leprae* ligands to induce apoptosis of schwann cells through TLR2 provides a mechanism by which activation of the innate immune response contributes to nerve injury in leprosy. Thus, by investigating the capacity and effects of TNF α /TGF β and *M. leprae* within the human ST88-14 cell line, this study showed that SCs constitutively expressed both TNF receptors and that, in comparison to the controls, their presence triggered increased apoptosis in culture, also observed when ST88-14 was maintained in culture in the presence of live and/or dead *M. leprae*. It would, therefore, seem apparent that these observations are clear indications that the TNF-Rs, in conjunction with a specific TNF α response, the synergistic effect with TGF β , and *M. leprae* infection are all implicated in the pathogenesis of nerve damage.



ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix

I. INTRODUÇÃO

I.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE HANSENÍASE.....	1
I.1.1. ESTADOS REACIONAIS.....	3
I.1.1.1. REAÇÃO TIPO I.....	5
I.1.1.2. REAÇÃO TIPO II.....	6
I.1.1.3. NEURITES.....	7
I.2. O AGENTE ETIOLÓGICO.....	12
I.2.1. LIPOPROTEÍNAS BACTERIANAS.....	14
I.2.1.1. LIPOPROTEÍNA PUTATIVA 19 kD.....	15
I.3. RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE.....	20
I.4. CÉLULAS DE SCHWANN.....	30
I.4.1. SCHWANOMA HUMANO ST88-14.....	30
I.5. INTERAÇÃO ENTRE <i>M. LEPRAE</i> E AS CÉLULAS DE SCHWANN.....	32
2. IMUNIDADE INATA.....	37
2.1. RECEPTORES TOLL-LIKE.....	39
2.1.3. CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS DA ATIVAÇÃO CELULAR VIA TLRs.....	47
2.1.3.1. PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	
2.1.3.2. TLR ENTRE IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA.....	55
2.1.3.3. TLRs E RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	57
2.1.3.4. POLIMORFISMO DE TLRs.....	59
APOPTOSE.....	53
3.1. RECEPTORES DE MORTE CELULAR E VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	63
3.2. MORTE CELULAR INDUZIDA POR BACTÉRIAS.....	66
3.3. APOPTOSE EM CÉLULAS DE SCHWANN.....	67

OBJETIVOS.....70

Geral.....
Específicos.....

RESULTADOS.....72

Capítulo 1

Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy.....

Capítulo 2

Induction of apoptosis in a human schwann cell line *in vitro*: a role for cytokines and *M. leprae* infection
.....

CONCLUSOES73

DISCUSSÃO.....74

Anexo 1

T Cell–Monocyte Contact Enhances Tumor Necrosis Factor– α Production in Response to *Mycobacterium leprae*.....83

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS84



Smile
on my mac

I. INTRODUÇÃO

HANSENÍASE

A Hanseníase é uma doença endêmica em vários países em desenvolvimento¹⁴, sendo que o Brasil ocupa o 2º lugar no mundo em número absoluto de casos (76.550 em 2002), com uma taxa de prevalência de 4.28/10.000, apenas superada pela Índia. A meta da Organização Mundial de Saúde (OMS) é eliminar a Hanseníase como problema de saúde pública, atingindo uma prevalência de menos de 1 caso por 10.000 habitantes até 2005. Devido à alta taxa de detecção (cerca de 42 mil casos novos ao ano) considera-se difícil o país alcançar esta meta (Figura 1).

A Hanseníase é a principal causadora das neuropatias não-traumáticas no mundo. As neurites agudas podem ocorrer nos pacientes em todo o espectro da doença, particularmente durante os estados reacionais. Estima-se que mais de um quarto de todos os pacientes com Hanseníase apresentam algum grau de incapacidade no curso da doença, e destes cerca da metade severa debilidade. No Brasil, cerca de 8% dos pacientes que são diagnosticados apresentam grau II de incapacidade, o que significa lesões neurológicas permanentes. Com mais de 700.000 pacientes com Hanseníase registrados no mundo, a perda econômica para a comunidade causada pelas neurites hansênicas é significativa já que as lesões neurais evoluem apesar da cura bacteriológica em resposta ao tratamento poliquimioterápico. Os efeitos sociais e psicológicos da deformidade são imensuráveis e contribuem fortemente para o estigma de que são vítimas os pacientes.

Aproximadamente 3 milhões de pessoas no mundo são fisicamente deformadas como consequência das lesões dos nervos periféricos, causadas por esta doença. Apesar dos efeitos serem específicos do *M. leprae* sobre o parênquima do nervo, os mecanismos celulares e moleculares que envolvem a infecção das células de Schwann e a instalação e irreversibilidade das lesões das estruturas nervosas permanecem desconhecidos.

¹ Os principais países endêmicos contribuem com 92% dos casos estimados de Hanseníase no mundo, sendo que os cinco principais contribuem com mais de 80%, a maioria concentrada no Sudeste asiático, África e Américas. Em 2003, 12 países ainda não atingiram a meta de eliminação. São eles: Índia, Brasil, Angola, Costa de Marfim, Guiné, Libéria, Madagascar, Moçambique, Nepal, República Centro Africana e Tansânia. O Brasil ocupa o primeiro lugar em casos registrados de Hanseníase na América Latina. Cerca de 74,04% da população brasileira vive em área de alta prevalência.

A infecção da célula de Schwann pelo *M. leprae* é um exemplo ímpar de relação parasito-hospedeiro, constituindo por isso um excelente modelo de estudo do dano do nervo periférico induzido por um agente vivo. O *Mycobacterium leprae* é o único agente patogênico bacteriano com capacidade de invadir os nervos periféricos. A ocorrência de uma forma clínica de Hanseníase cujos sintomas aparecem exclusivamente no nervo (forma neural pura) fortalece ainda mais a hipótese de que a lesão de nervo emerge durante um estágio precoce e que talvez aconteça até antes da colonização dermatológica pela bactéria. Alterações semelhantes nos nervos podem ser vistas em todas as formas de Hanseníase, o que sugere que um mecanismo comum possa ser responsável pela ocorrência das lesões de nervo em todas as formas da doença. É, portanto, inquestionável que o evento que inicia as manifestações neurológicas nesta doença seja a infecção das células de Schwann.

Recentemente, vários estudos vieram esclarecer algumas etapas da interação do *M. leprae* com a célula de Schwann, criando excelente oportunidade para a compreensão da biologia desta célula-chave no desenvolvimento e na manutenção da integridade da fibra nervosa.



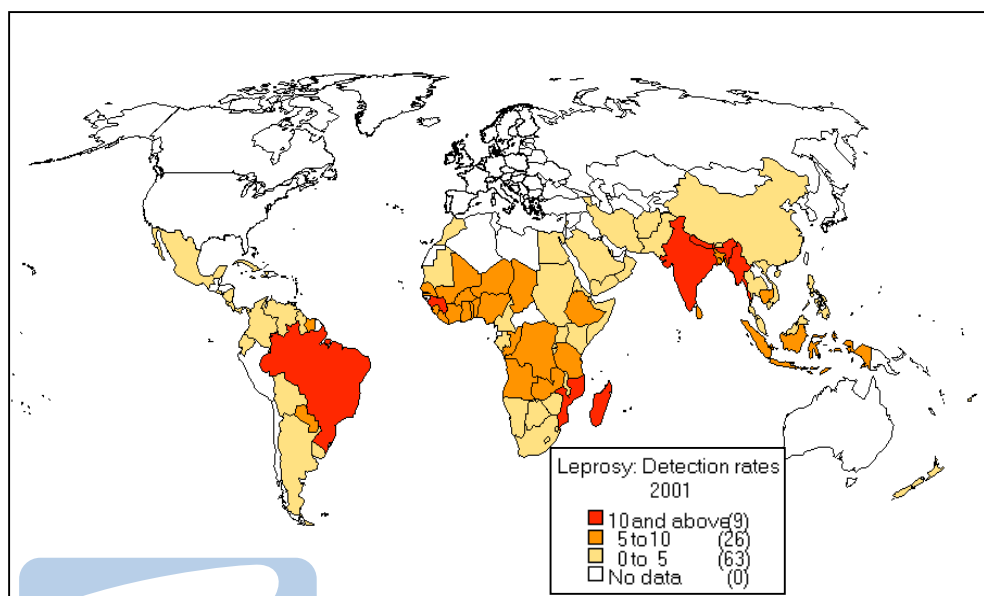
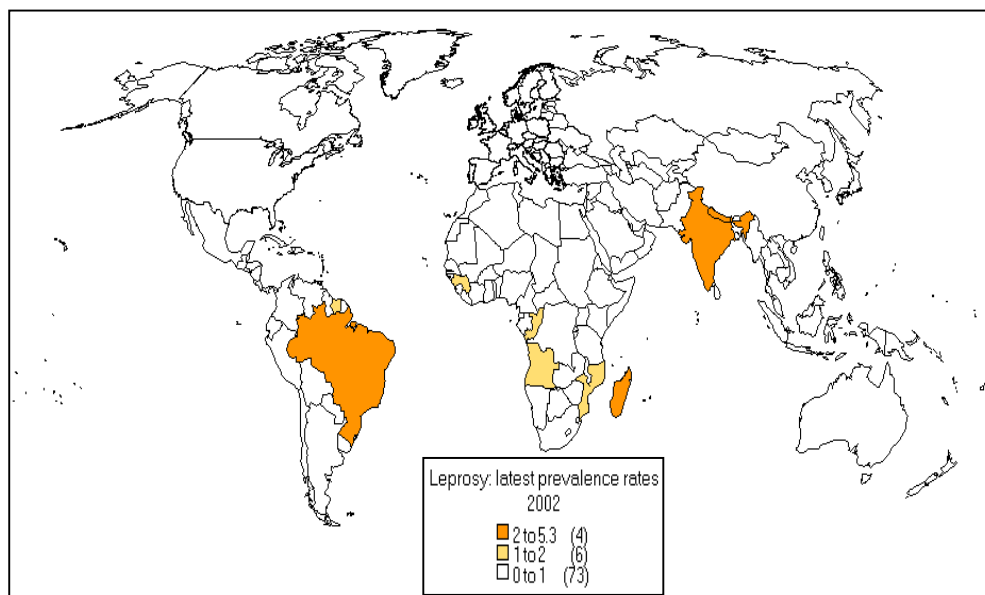


Figura 1: Fonte: WHO/LEP.

<http://www.who.int/lep/stat2002/global02.htm>

Smile
on my mac

I.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE HANSENÍASE

A Hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae*, é uma doença infecciosa crônica, granulomatosa, cujas manifestações clínicas predominantes são lesões da pele, mucosas e nervos periféricos. O homem é considerado o seu principal reservatório, e o modo de transmissão mais conhecido da doença é a dispersão de partículas infectadas a partir das vias aéreas superiores dos pacientes multibacilares. O início da doença é geralmente gradual e os primeiros sinais podem aparecer dois a dez anos após a infecção. As características clínicas da doença refletem a diversidade da patologia, a qual depende do equilíbrio entre a multiplicação bacilar e o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro.

Clinicamente, a Hanseníase é caracterizada por um espectro de formas clínicas¹⁵. Ridley e Jopling (1966) conceberam uma classificação considerando principalmente as variações da resposta imune celular apresentada pelos pacientes individualmente. Esta classificação vem sendo usada nos trabalhos de investigação e em alguns centros na rotina diagnóstica. A classificação espectral de Ridley e Jopling é baseada nos critérios clínicos, bacteriológicos e principalmente imunológicos e histopatológicos, definindo os grupos: tuberculóide-tuberculóide (TT), “borderline”-tuberculóide (BT), “borderline-borderline” (BB), “borderline”-lepromatoso (BL), lepromatoso-lepromatoso (LL) e indeterminado (I). Os pacientes com a forma indeterminada podem evoluir para a forma tuberculóide, “borderline” ou lepromatosa, regredir espontaneamente, ou permanecer como indeterminados por um longo período de tempo.

O diagnóstico¹⁶ da Hanseníase ainda é principalmente clínico, acrescido de exames laboratoriais como a pesquisa do bacilo em esfregaço de linfa (baciloscopia) e do exame

² As formas clínicas da Hanseníase receberam várias classificações. Em 1953, no VI Congresso Internacional de Hanseníase, cria-se a chamada classificação de Madrid, que acrescenta aos critérios de polaridade de Rabello, critérios bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos, definindo então as três formas: as polares (tuberculóide e virchowiana), o grupo transitório e inicial, com a forma indeterminada e o grupo instável e intermediário, com a forma dimorfa ou “borderline”.

¹⁶ A forma LL apresenta numerosos bacilos nas lesões e caracteriza-se por lesões cutâneas múltiplas com uma distribuição lateral e simétrica. As lesões podem ser máculas, pápulas ou nódulos. As máculas são as primeiras a aparecer e podem ser eritematosas ou hipopigmentadas. A reação de lepromina é negativa e, histologicamente, ela se caracteriza por um infiltrado inflamatório constituído predominantemente por macrófagos e raros linfócitos. A forma TT é considerada como benigna, com reação de lepromina positiva.

histopatológico. As formas clínicas da Hanseníase expressam uma relação entre o curso clínico evolutivo e a extensão do comprometimento cutâneo e neural. A partir de 1982, a OMS propôs uma classificação operacional em Hanseníase multibacilar e paucibacilar, baseada na presença ou não de bacilos. Esta classificação foi adaptada pelo Ministério da Saúde do Brasil adicionando a baciloscopia, que é parâmetro decisivo, o número e distribuição das lesões cutâneas e o número de troncos nervosos acometidos.

O paciente deverá ser classificado operacionalmente para fins de tratamento em paucibacilares (BT e TT) e multibacilares (LL, BL, BB) para indicação do esquema poliquimioterápico (PQT/OMS). Este esquema foi preconizado pela Organização Mundial de Saúde-OMS em 1982, e introduzido no Brasil em 1991.

O *M. leprae* tem taxa de multiplicação lenta e o dano do nervo progride lentamente em todas as formas clínicas da Hanseníase não tratada. A lesão neural ocorre mais freqüentemente no pólo lepromatoso, especialmente entre pacientes do tipo borderline, que podem apresentar destruição lenta, gradual e insidiosa em grande extensão dos nervos periféricos (Duncan e Pearson, 1982; Job, 1989; Pearson e Ross, 1975). Nas formas neurais puras, a injúria do nervo ocorre insidiosamente, e em grande parte é despercebida durante longos períodos de tempo, ao contrário da injúria aguda e/ou subaguda dos nervos periféricos que ocorre no curso dos episódios reacionais vistos em pacientes tratados com quimioterapia. Um dado considerável no quadro clínico de vários pacientes é que, mesmo depois de terminar a MDT e apesar da ausência de bacilos na linfa, observa-se significativo dano ativo do nervo periférico por neurite persistente. A presença de bactérias mortas como tentativa de “eliminar” as bactérias ou seus componentes poderia explicar a lesão neural ativa após o fim do tratamento. Alguns autores admitem que os quimioterápicos não alcançariam os nervos em concentrações suficientes para matar os bacilos ali alojados, permitindo o surgimento dos bacilos persistentes (Chimelli et al., 1997). A terapia com esteróides administrados antes da instalação do dano nervoso é freqüentemente capaz de

Não se observam habitualmente os bacilos nos exames bacteriológicos. Com maior freqüência, a lesão é uma mácula eritematosa única com bordos elevados e bem circunscritos, com superfície seca e às vezes de aspecto escamoso no qual o crescimento do pelo é deficiente (ou está ausente) e se comprovam transtornos de sensibilidade tátil, dolorosa e térmica. A lesão histológica compreende um granuloma bem formado constituído de macrófagos diferenciados e células epitelióides. A Hanseníase indeterminada caracteriza-se por mácula hipocrômica ou discretamente eritematosa com alteração da sensibilidade, alopecica ou por área hipostésica, sem lesão dermatologicamente visível. O teste de Mitsuda pode ser negativo, duvidoso ou

prevenir sintomas de incapacidade permanente. Entretanto, em alguns casos, rápida e adequada administração de prednisona oral parece ter efeito muito pequeno na recuperação de lesões instaladas no nervo (Van Brakel, 1996).

I.1.1.1. ESTADOS REACIONAIS

Durante o curso da doença, pacientes hansenianos podem desenvolver estados reacionais, que constituem episódios agudos de resposta inflamatória e imunológica não relacionadas a infecções secundárias, e que podem se manifestar em várias formas da doença. Os episódios reacionais são os principais fatores de risco do aparecimento das deformidades primárias. O tratamento específico precoce, o reconhecimento e tratamento adequado das reações e as medidas educativas são importantes na prevenção dessas deformidades. As reações são classificadas em dois tipos, de acordo com suas manifestações clínicas e histológicas: Reação Reversa (RR) ou Reação do tipo I e Eritema Nodoso Leproso (ENL) ou Reação do tipo II (Ridley, 1969; Jolliffe, 1977).

Nery (1995) encontrou uma frequência de 59,2% de estados reacionais em pacientes MB durante a poliquimioterapia, sendo 51% com ENL, 42% com reação reversa e 7% com neurite isolada. Não foi encontrada diferença significativa quando as formas clínicas foram avaliadas separadamente ou agrupadas (BL/LL). Todas as formas clínicas multibacilares têm potencial de apresentar reações.

A Reação-Reversa, ou reação tipo I, que pode ocorrer em casos de Hanseníase paucibacilar ou multibacilar, caracteriza-se pelo aparecimento de novas lesões de pele, lesões de pele antigas que se tornam avermelhadas e edemaciadas, edema de mãos e pés e neurite, entre outros sinais e sintomas. O tratamento antiinflamatório deve ser instituído prontamente devido ao risco de dano permanente aos nervos. Prednisona (1 a 2 mg/kg dia) deve ser introduzida conforme avaliação clínica e seguir o esquema de redução da dose após melhora clínica de 5-10 mg/semana até a retirada completa do medicamento.

A reação do tipo II ocorre nos pacientes de Hanseníase multibacilar, sendo suas principais características clínicas o aparecimento de nódulos dolorosos e avermelhados, acompanhados ou não de febre, dor articular, mal estar, orquite, iridociclite, edema nas

levemente positivo. A histopatologia revela infiltrado linfo-histiocitário na derme, acompanhando os feixes

extremidades e presença de nervos dolorosos e espessados. O tratamento de escolha é a talidomida¹⁷ na dose de 100-400 mg ao dia, associada ou não a esteróides. Mulheres em idade fértil são tratadas com corticóide. O tratamento para os episódios reacionais deve ser mantido junto com a medicação poliquimioterápica¹⁸.

I.1.1.2. REAÇÃO TIPO I - É amplamente aceita a hipótese de que o aumento da imunidade mediada por células (IMC) durante a RR é dependente da expansão de células T específicas para o *M. leprae* (Sampaio, 2000). O ressurgimento da IMC parece estar relacionado com a quebra do estado anérgico que possivelmente ocorre em pacientes com baixa resposta imune (BT, BB e pacientes de BL). As lesões de RR, independentemente da forma clínica, apresentam granulomas bem diferenciados nas lesões e resposta imune celular ao bacilo quando avaliado pelo teste cutâneo e *in vitro*. As lesões nestes pacientes tornam-se mais infiltradas, eritematosas, amolecidas, suculentas, por vezes escamosas, podendo chegar à ulceração. Histologicamente, há um aumento no influxo de células CD4+. A epiderme está espessada, com expressão aumentada de moléculas de adesão e antígeno HLA-DR. Desta forma, as lesões dos pacientes lepromatosos passam a apresentar características histológicas de lesões de pacientes tuberculóides. A resposta proliferativa para as células T destes pacientes, específica para o *M. leprae*, passa a ser positiva (Laal et al, 1987) e o paciente passa a apresentar reatividade ao teste cutâneo de Mitsuda (Alvarenga et al, 1995). A RR é associado a um aumento da produção de IFN γ que leva à formação de granuloma, aumento da atividade microbicida do macrófago e inflamação (Yamamura, 1992; Verhagen, 1997). Os clones de linfócitos obtidos na lesão de um mesmo

vásculo-nervosos onde podem ser encontrados poucos bacilos. A baciloscopia é geralmente negativa.

¹⁷ A talidomida foi sintetizada em 1953 (na Alemanha Ocidental) e, como um bom hipnótico, foi especialmente utilizada por mulheres grávidas. No entanto, a associação com a taxa aumentada de neonatos com mal formação congênita, reconhecida em 1961, levou a retirada da droga do mercado em 1962 (Mellin, 1962). Em 1965, por causa de seu efeito sedativo, talidomida foi administrada pela primeira vez a pacientes com ENL (Sheskin, 1965). Em 48 horas, uma significativa melhora da condição clínica destes pacientes foi alcançada. Desde então, esta droga vem sendo usada para o tratamento da Reação Tipo II na lepra.

¹⁸ Pacientes lepromatosos - Rifampicina 600 mg e clofazimina 300 mg, uma vez por mês, supervisionado, e dapsona 100 mg e clofazimina 50 mg, diariamente, não supervisionado, por um período de 2 anos.

Pacientes tuberculóides - Rifampicina 600 mg, 1 vez por mês, supervisionado, e dapsona 100 mg por dia, não supervisionado, por um período de 6 meses.

paciente BL antes e durante a reação reversa apresentavam fenótipo CD4⁺ e secretavam IL-4 e IFN γ . Durante o episódio reacional, a maior parte dos clones apresentava uma polarização para a produção de IFN γ (Verhangen, et al, 1997). Quando estes clones de células T foram isolados das lesões de RR, eles expressavam IFN γ e TNF α , caracterizando um perfil Th1 (Verhangen, et al, 1998). Khanolkar-Young e colaboradores (1995) demonstraram a presença de TNF α em pele e nervos de pacientes com RR, o que indica um papel importante dessa citocina na resposta imune do tipo DTH observada durante os episódios. A ocorrência de reação reversa após o término da poliquimioterapia é explicada pela persistência de antígenos de bacilos mortos e pelo desequilíbrio na regulação da resposta imune inflamatória decorrente da redução da carga bacilar. Lesões de troncos nervosos são freqüentes durante a RR, justificando o uso precoce de corticóides em altas doses para impedir o dano irreversível dos nervos periféricos.

I.1.1.3. REAÇÃO TIPO II – caracteriza-se clinicamente pelo aparecimento de nódulos subcutâneos eritematosos e dolorosos não relacionados às lesões lepromatosas preexistentes que podem ocorrer ou não, associados a manifestações sistêmicas inflamatórias tais como febre, mal estar, linfadenopatia, mialgia, edema, leucocitose, neurite, artralgia, orquite e perda de peso - quadro infeccioso sistêmico - que, em alguns pacientes, se assemelha a um quadro endotoxêmico. A presença de nódulos subcutâneos acompanhados de sintomatologia sistêmica parece estar associada a níveis sanguíneos elevados de IL-1 β e TNF α (Sarno et al., 1991) detectados nos pacientes com reação. A participação de complexos imunes circulantes na patogenia do ENL ainda não está definitivamente comprovada (Wemambu et al., 1969; Waters et al., 1972). Dados atuais referem-se a um aumento na resposta de células T para o *Mycobacterium leprae* (Modlin et al., 1983; Laal et al., 1985; Rao et al., 1987) e aumento na expressão de IFN γ (Cooper et al., 1989) em pacientes apresentando ENL. O ENL pode ser observado em pacientes não tratados (Guinto et al., 1993) embora seja mais freqüentemente observado após o início da poliquimioterapia (MDT). No primeiro ano de tratamento, cerca de 15 a 25% dos pacientes podem desenvolver ENL (Browne, 1963). Pacientes multibacilares submetidos a inoculações mensais com IFN- γ durante seis meses apresentaram uma freqüência de ENL (60%) maior do que aqueles que só recebiam o tratamento quimioterápico (15%) (Sampaio et al., 1991,1992). O quadro histopatológico das

lesões de ENL revela um infiltrado inflamatório misto, constituído por células mononucleares (com predomínio de células CD4+), neutrófilos (presentes em cerca de 50% dos pacientes) e bacilos fragmentados. O infiltrado inflamatório se localiza principalmente em torno de vasos. Há espessamento da epiderme, expressão aumentada de moléculas de adesão (ICAM-1 e LFA-1) e antígeno HLA-DR, além do edema que pode afetar toda a derme (Thangaraj et al., 1988; Sullivan et al., 1991). A resposta imune celular durante o ENL tem curta duração e desta forma não causa interferência no quadro histopatológico das lesões prévias, enquanto na reação reversa um infiltrado de células epitelióides se superpõe ao aspecto anérgico prévio. Embora o principal resultado destes estados de reativação inflamatória pareça ser a eliminação do bacilo ou de seus constituintes, lesão irreversível de nervos periféricos poderá ocorrer em um pequeno número de pacientes. A patogênese do ENL tem sido sugerida como dependente do efeito direto de citocinas inflamatórias sobre os componentes do vaso, levando à ativação endotelial e disparo de uma complexa cascata de eventos envolvendo leucócitos e células endoteliais na derme (Sampaio, 1994).

A presença de neutrófilos é um achado comum nas lesões de ENL. No entanto, o acúmulo e função destas células na patogênese do ENL ainda não estão esclarecidos. Interessantemente, foi demonstrado que o acúmulo de neutrófilos em sítios de infecção por patógenos intracelulares, tal como micobactéria, foi dependente da atividade de células T do sistema imune (Appelberg, 1992). Portanto, a presença de resposta imune específica no ENL poderia ser responsável pelo acúmulo de neutrófilos no sítio da lesão. Dados do nosso laboratório demonstraram que os neutrófilos de pacientes com Hanseníase sintetizam e secretam TNF α e IL-8 (Oliveira et al, 1999). Evidências implicam o TNF α como a molécula pivô envolvida nas manifestações sistêmicas locais de reações hansenianas. Foi demonstrado na hanseníase que contato entre macrófagos e linfócitos é importante para produção aumentada de TNF α (Sampaio e colaboradores, 2000). Este pode ser um dos mecanismos a colaborar para o aumento da resposta imune observada durante os episódios de reação, onde um influxo de células é observado nas lesões e também para a alta produção de TNF α , levando posteriormente a redução da viabilidade bacteriana. Desta forma, parece que as células do sistema imune têm a capacidade de se regularem mutuamente e o contato célula-célula parece ser um componente importante nesta interação (ver apêndice).

I.1.1.3.NEURITES REACIONAIS - caracterizam-se pela presença de dor espontânea ou à palpação num tronco nervoso periférico, acompanhada ou não de comprometimento da função. No curso da doença pode ocorrer perda aguda da função do nervo, sem dor, chamada de neurite silenciosa. Em estudo prévio, um total de 33,9% dos pacientes tinha pelo menos um episódio de neurite aguda durante o tratamento e 2,9% apresentaram o quadro de neurite silenciosa (Pimentel, 1998). Neste estudo demonstrou-se que episódios de neurite aguda foram associados à ocorrência de reações de ENL (55,3%), quando comparados aos pacientes com reação reversa (33,3%).

As biópsias de nervos, obtidas para diagnóstico, mesmo na ausência do quadro clínico de neurite aguda, mostram infiltrado inflamatório por vezes intenso, envolvendo o epi-, peri- e endoneuro. Um aspecto predominante é a marcada assimetria no acometimento dos fascículos: alguns se mostram quase normais entre outros completamente destruídos. Granuloma e necrose são vistos nas formas tuberculóides. A lesão axonal é o quadro predominante confirmado pelo exame eletroneuromiográfico (Jardim et al., 2003). Há perda de fibras mielinizadas e sinais de remielinização (Chimelli et al., 1997)

Os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) corados pela fucsina na coloração de Wade podem ser vistos por microscopia ótica e em cortes semifinos dentro de macrófagos e células de Schwann não mielinizadas. Em alguns casos há intensa fibrose substituindo fascículos. Os nervos mais afetados pelos episódios reacionais são os nervos ulnar, fibular e tibial posterior. Há uma correlação entre a ocorrência de neurites e o desenvolvimento de incapacidades físicas durante e após o tratamento poliquimioterápico (Pimentel, 1998). Isto justifica o fato da pesquisa da patogênese do dano neural ser prioritária, fato este reforçado por sua inclusão entre as prioridades na pesquisa da Hanseníase apontadas pelo TDR/OMS.



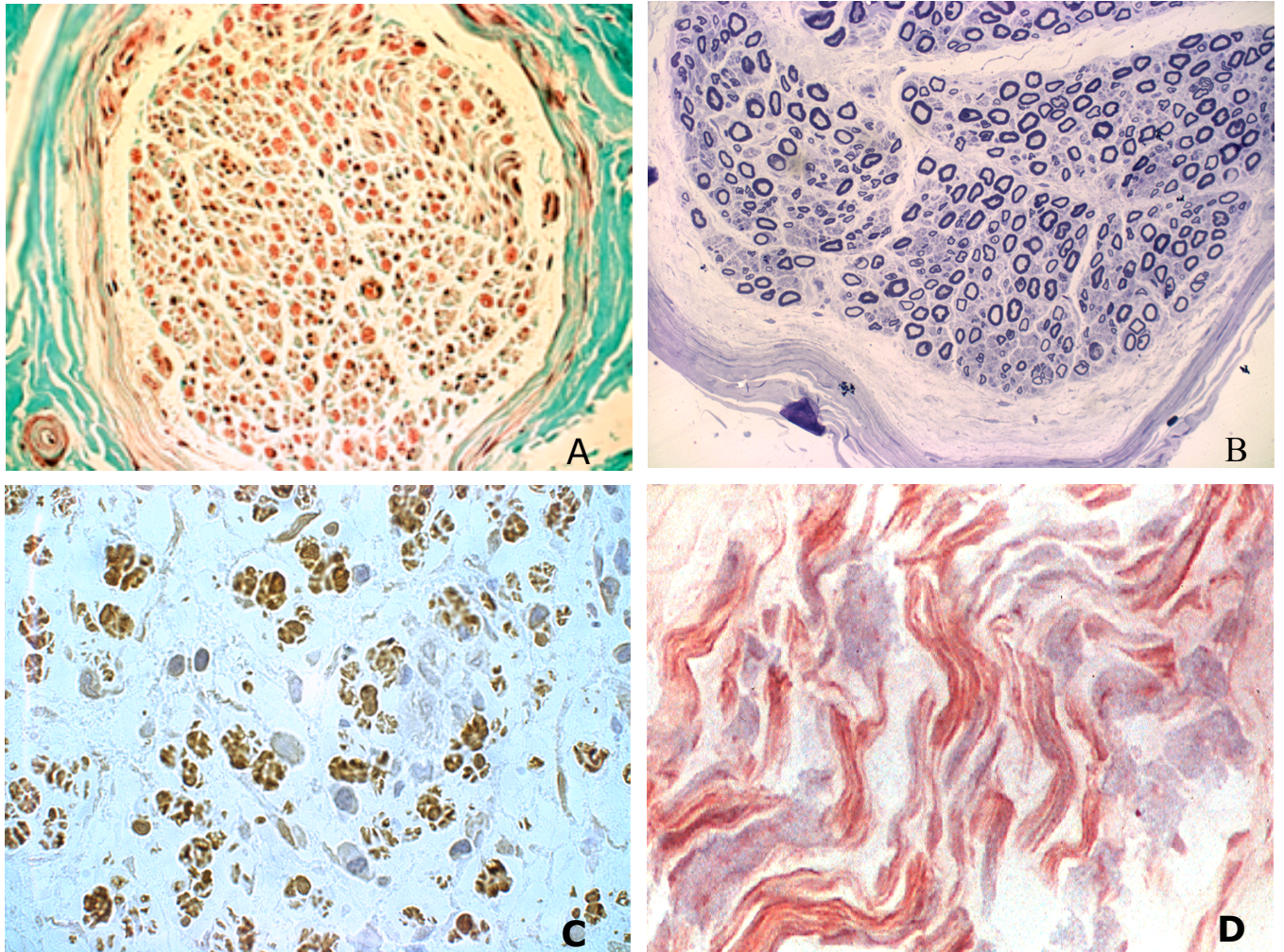


Figura 2:

A - Fascículo de nervo periférico mostrando estrutura neural conservada. Fibras mielinizadas do endoneuro coradas em vermelho. Perineuro de espessura normal. Paciente com neuropatia periférica. Tricrômio de Gomori 600x

B - Fascículo de nervo periférico mostrando alargamento do espaço subperineural e discreta perda de fibras mielinizadas. Paciente com forma neural pura da hanseníase. Corte semifino. Azul de toluidina. 600x

C - Presença de células S100-positivas coradas em marrom no endoneuro em meio à células inflamatórias que infiltraram este compartimento neural. Paciente com forma neural pura da hanseníase. Imunoperoxidase Complexo avidina-biotina 2000x

D - Presença de células N-CAM-positivas no endoneuro de nervo periférico com a forma neural pura da hanseníase. Imunoperoxidase. Complexo avidina-biotina 4000x

I.2. O AGENTE ETIOLÓGICO

O agente causal, o *Mycobacterium leprae*, foi descoberto por Gerhard Henrik Armauer Hansen (Noruega, 1873). O *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente, que compartilha com outras micobactérias muitas de suas características fenotípicas como a coloração pela fucsina resistente a soluções a álcool-ácidas, um envelope celular rico em lipídios, ausência de exo- e endotoxinas e crescimento lento. À microscopia ótica, apresenta-se sob a forma de bastonete porém, mais frequentemente, é visualizado formando grupamentos denominados globias.

O *Mycobacterium leprae* é uma bactéria gram-positiva de crescimento lento, com tempo de geração de 12-13 dias, (multiplica-se por divisão binária, Brennan & Nikaido, 1995), fato relacionado com o longo período de incubação da doença. Sendo encontrado preferencialmente em fagócitos mononucleares e células de Schwann (CS) do nervo periférico, o *M. leprae* não é cultivável em meio de cultura artificial, o que resulta na dificuldade de estabelecer estudos que elucidariam vários aspectos da patogenia causada por este microrganismo. Charles Shepard (Shepard, 1960) realizou um inóculo subcutâneo de 5.000 a 10.000 *M. leprae* isolado de biópsias humanas no coxim plantar de camundongos Balb/c e observou uma lesão inflamatória localizada de Hanseníase que regredia após o bacilo atingir o número de um milhão de células bacterianas na lesão. Demonstrou-se também, que camundongos timentomizados apresentam uma infecção generalizada quando inoculados com *M. leprae* (Shepard, 1962). O mesmo autor demonstrou que, após o limite de multiplicação ter sido alcançado, existe pouca mudança no número total dos organismos e eles começam a perder a viabilidade (Shepard & Chang, 1967).

Em 1971, a inoculação de 10^7 bacilos em tatus *Dapsillus novemcinctus* deu origem a uma infecção sistêmica em 50% dos animais inoculados. Estes tatus apresentaram uma forma disseminada da doença com comprometimento de pele, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. (Kirchheimer & Storrs, 1971). A partir daí passou-se ter disponibilidade de massa bacteriana até então inacessível, o que permitiu estudos

imunológicos, bioquímicos e de biologia molecular. Além do tatu de nove bandas, somente macacos mangabei e chimpanzés foram encontrados naturalmente infectados com o *M. leprae* (revisto por Pessolani *et al*, 2003).

A estrutura da parede celular do patógeno é diferente das verificadas para outras bactérias e lhe confere resistência à descoloração mediada por solução de álcool-ácido.

Uma camada de peptidoglicana é observada sobre a membrana citoplasmática, e caracteriza-se por apresentar na porção peptídica glicina no lugar de L-alanina. Externamente a esta camada verifica-se a ocorrência de longas cadeias de glicolípídios, entre estes se destacando o glicolípídio fenólico (PGL-I,) presente unicamente no *Mycobacterium leprae*. O PGL-I foi descrito, inicialmente, por Shirley Hunter e Patrick Brennan em 1981 e, após sua caracterização como espécie-específico, revelou-se de grande importância devido à possibilidade de utilizá-lo para o diagnóstico precoce da doença (Hunter & Brennan, 1981; Lefford *et al.*, 1991). Embora o PGL-I esteja presente apenas no *M. leprae*, recentemente se demonstrou que a sua utilização como base para o sorodiagnóstico em áreas endêmicas gerou resultados limitados, já que cerca de 40% dos PB são negativos (Baumgart *et al.*, 1993). A ocorrência de resposta imune e conseqüente presença de anticorpos em indivíduos com infecções subclínicas é uma das dificuldades encontradas no estabelecimento de um teste sorológico para o diagnóstico da hanseníase. Recentemente, um teste soro-diagnóstico rápido e de uso fácil, utilizando o antígeno PGL-1, foi implementado no campo, visando identificar pessoas em risco de adoecer (Buhner-Sekula *et al.*, 2003). O lipoarabinomanana (LAM), outro componente importante da parede celular verificado em várias espécies de micobactérias, apresenta especificidade em suas seqüências glicídicas. A LAM consiste de unidades repetidas de arabinose e manose, ancoradas através de um fosfatidilinositol de membrana semelhante ao lipopolissacarídeo (LPS) (Britton, 1993). Foi ainda verificado que moléculas de LAM de cepas distintas de uma mesma espécie desencadeiam respostas diferenciadas em células de sangue periférico (Chan *et al.*, 1991). Os estudos de Sibley e colaboradores, em 1990, demonstraram que o lipoarabinomanana possui capacidade de inativar macrófagos inibindo a produção de IFN γ por linfócitos. Estas observações sugerem o LAM como uma molécula moduladora dos mecanismos de regulação da resposta imune do hospedeiro. O LM (lipomanana) e o PIM (fosfatidil inositol manosídeo) são versões mais simples do LAM. No primeiro falta a

arabinomanana, enquanto no último falta também a maioria dos resíduos. LM e PIM induziram, de forma semelhante ao LAM, a produção de TNF α , a transcrição de RNA mensageiro e supressão da proliferação induzida por antígeno, indicando que a maioria da atividade biológica do LAM está associada a sua porção fosfatidilinositol (Barnes et al., 1992). O LAM foi identificado como sendo um lipopolisacarídeo, análogo funcionalmente ao LPS de bactérias Gram-negativas, sendo que LPS é o principal componente da membrana externa da bactéria Gram-negativa e pode iniciar uma grande variedade de reações inflamatórias incluindo a liberação de outros fatores solúveis. A produção em excesso destes mediadores solúveis causa choque séptico e morte. A participação de componentes do *M. leprae* na regulação da resposta imune e indução da produção de TNF α *in vitro* (Sampaio et al., 1992; Sampaio et al., 2000; Charlab et al., 2000) também foi demonstrada, indicando que componentes do bacilo possam interferir com a ativação de células T, modulando a resposta imune específica a bactéria, interferindo deste modo nas formas clínicas da hanseníase (ver apêndice).

Cole e colaboradores, (2001), concluíram o seqüenciamento do genoma do *M. leprae*, caracterizando um marco importante para o conhecimento da biologia desta micobactéria. O genoma do *M. leprae*¹⁹ contém somente 49.5% de genes funcionais (que codificam para proteínas, característica esta não observada em nenhum outro genoma bacteriano até hoje seqüenciado), 27% desses genes são pseudogenes (1.116 pseudogenes ou genes degenerados, assim denominados devido à perda de regiões necessárias para sua transcrição e/ou tradução) e 23.5% não foram codificados, provavelmente por causa de mutações.

I.2.1. LIPOPROTEÍNAS BACTERIANAS

As lipoproteínas bacterianas pertencem a um grupo de moléculas com padrões moleculares associados a patógenos. Entre os componentes moleculares da superfície dos

¹⁹ O conhecimento de seqüências de *M. leprae* tornou possível a realização do método de amplificação enzimática de DNA para identificação do bacilo em amostras clínicas. A técnica da reação polimerásica em cadeia (do inglês "polymerase chain reaction", ou PCR) vem sendo utilizada como método de suporte alternativo aos métodos tradicionais de diagnóstico da doença como bacterioscopia e histologia (Santos et al., 1993).

microorganismos há um padrão molecular comum patógeno-específico. O lipídio A no LPS, por exemplo, representa uma parte invariável dos organismos gram-negativos e é responsável por efeitos pró-inflamatórios. Já a porção O pode variar de acordo com as diferentes espécies bacterianas e reconhecimento através do sistema imune inato. Como estes padrões moleculares são alvos reconhecidos pelo sistema imune inato, eles são chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs).

As lipoproteínas bacterianas, que são moduladores das funções da imunidade inata e adquirida, ativam células do sistema imune através de receptores específicos e induzem sinalização em cascata que resulta na ativação de NF- κ B (Norgard, 1996), levando a expansão de célula B e a produção de citocina inflamatória (Kreutz, 1997). A porção ativa da lipoproteína é uma cisteína triacilada amino-terminal. Os lipopeptídeos sintéticos compreendem porções ativas das lipoproteínas bacterianas e têm sido usados como adjuvantes em modelos de vacina animal (BenMohamed et al., 1997), em vacinas experimentais para HIV (Seth et al., 2000), assim como para estimular imunidade contra malária (Nardin et al., 2001) e vírus da Hepatite B em humanos (Vitiello et al., 1995).

I.2.1.1. LIPOPROTEÍNA PUTATIVA 19 kD

O genoma do *M. tuberculosis* revelou cerca de 100 lipoproteínas, (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis), enquanto no genoma do *M. leprae* foram identificadas 31 lipoproteínas putativas (funções desconhecidas) (Tabela 1). Somente duas lipoproteínas de *M. tuberculosis* têm sido bem descritas, 19 e 38 kDa (Mohagheghpour et al., 1998; Oftung et al., 1997; Young et al., 1991). A lipoproteína ML1966 de *M. leprae* (lipoproteína putativa 19 kD de *M. leprae*) compartilha 47% da sequência de aminoácido com a lipoproteína de 19 kD de *Mycobacterium tuberculosis* (Rv3763 de lpqH), um importante indutor de liberação de citocina de monócito por TLR2 (Brightbill et al., 1999; Takeuchi et al., 2001). A 19 kDa do *M. leprae* parece ter tido origem na duplicação de um gene localizado num local diferente do ocupado pela lipoproteína 19 kDa de *M. tuberculosis*. A análise por espectrometria de massa de GC de lipoproteínas micobacterianas proporcionou evidência da presença de três substituições de ácidos graxos: dois na porção glicerol (consistindo-se em um ácido palmítico, esteárico ou

tuberculoesteárico) e um não ligado ao resíduo de cisteína (ácido palmítico). Os lipopeptídeos tri-palmitilados ativam um padrão similar de receptores Toll quando comparados com lipoproteínas de *M. tuberculosis* purificadas (Kruzick et al., 2003). A lipoproteína 33 kDa (ML0603) assim como a 19 kDa estão envolvidas na resposta imune na Hanseníase (Maeda et al., 2002).

Lipoproteínas Putativas do Genoma do <i>M. leprae</i> e correspondentes homólogos em <i>M. tuberculosis</i>		
<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	Function
ML0136	lppX	lipoproteína putativa
ML0246	lpqT	lipoproteína putativa
ML0303	glnH	proteína putativa ligada a glutamina
<u>ML0319</u>	lpqE	lipoproteína putativa
ML0337	Rv2059	proteína putative periplasmática, RV2059, não é lipoproteína
ML0489	Rv2585c	lipoproteína putativa, Rv2585c pode ser secretada
ML0557	lprG	lipoproteína putativa
ML0603	Rv2413c	lipoproteína putativa, antígeno 33-kDa
ML0775	lpqB	lipoproteína putativa
ML0902	lppM	lipoproteína putativa
ML1086	lpqY	lipoproteína transporter ligada a soluto
ML1093	lpqZ	lipoproteína putativa
ML1099	lprE	lipoproteína putativa
ML1115	lprB	lipoproteína putativa
ML1116	lprC	lipoproteína putativa
ML1121	oppA	Lipoproteína de transporte-ligada a soluto extracelular
ML1177	Rv1343c	
ML1199	lspA	signal peptidase lipoproteína, não é lipoproteína
ML1274		prolipoproteína diacilgliceril transferase, não é lipoproteína
ML1315	lppK	
ML1427	Rv2041c	ABC - lipoproteína transporter
ML1441	Rv2051c	apolipoproteína possível N-aciltransferase, não é lipoproteína
ML1577	Rv2864c	proteína ligada penicilina provavelmente
ML1699	lppZ	lipoproteína putativa
ML1729	fecB	Lipoproteína transporter dicitrate putativa FeIII
ML1923	lpqF	lipoproteína putativa
ML1925	sodC	precursor superóxido dismutase (Cu-Zn)
ML1966	lpqH	lipoproteína putativa, antígeno 19-kDa
ML2010	Rv1906c	secretada, não é lipoproteína
ML2095	phoS2	PstS componente de fosfato uptake
ML2192	phoS3	Precursor ligado a proteína 3 fofatase
ML2446	Rv0483	lipoproteína putativa
ML2569	lpqI	glicosil hidrolase putativa secretada
ML2593	lprK	mce1E

Table 1: Modificado a partir de Krutzick et al. 2003

I.3. RESPOSTA IMUNE NA HANSENÍASE

A resposta imune específica, desencadeada pela infecção pelo *M. leprae*, determina não só o curso da infecção como as diversas formas clínicas da Hanseníase. Embora a imunidade celular e humoral estejam simultaneamente ativadas na Hanseníase, o componente celular assume maior importância na eliminação bacilar, pois o *M. leprae* é um patógeno intracelular. Aqueles indivíduos com predomínio da imunidade celular localizam a doença na forma tuberculóide, e aqueles que apresentam depressão da imunidade celular disseminam a doença, caracterizando o pólo lepromatoso (Sehgal, 1989) (Figura 3).

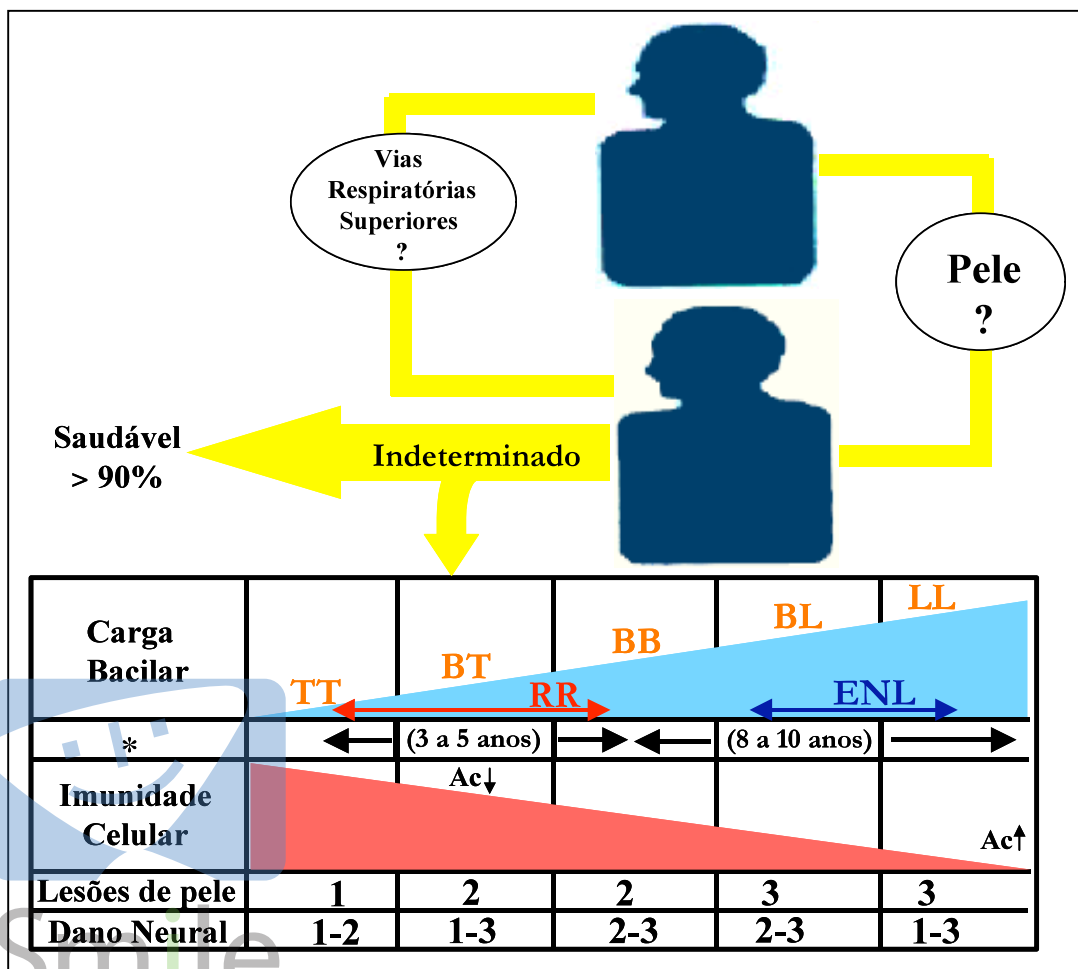


Figura 3 – Hanseníase: ciclo provável de transmissão e espectro clínico, bacteriológico e imunológico. Adaptado de Tropical Disease Research: A Global Partnership, 1987.

O desenvolvimento dos níveis da resposta imune e o aparecimento das formas clínicas da Hanseníase parecem depender de fatores ainda não completamente estabelecidos. Segundo Godal et al. (1972), a carga bacilar, ou seja a concentração local de *M. leprae* assim como a resposta imune do hospedeiro podem ser críticas. A carga bacilar se expressaria em função do tempo de estabelecimento da resposta imune após a exposição. Quanto maior o tempo decorrido para a resposta imune se estabelecer, mais o paciente caminhará para o pólo lepromatoso. A infecção subclínica é definida como um estágio no qual nenhum sinal da doença está presente ou a imunidade definitiva não se desenvolveu.

Os pacientes lepromatosos apresentam um quadro de anergia local, e as lesões se apresentam principalmente com uma relação CD4/CD8 invertida na lesão, ausência de organização e diferenciação dos macrófagos para formar granuloma e atrofia da epiderme. Há total afastamento da epiderme do infiltrado inflamatório na derme por uma faixa de tecido conjuntivo densa, denominada faixa de Unna ou zona clara, característica desta forma clínica. O aspecto quiescente das lesões lepromatosas sugere que o microambiente tissular impede a migração e o acúmulo de linfócitos, especialmente células T CD4+, visto que os linfócitos do sangue periféricos nestes pacientes mantêm uma proporção de células CD4:CD8 normal (2:1) (Van Voorhis et al., 1982). Já os pacientes tuberculóides desenvolvem resposta imune celular que leva à morte e eliminação da maioria dos bacilos, mas que freqüentemente provoca danos aos nervos. As lesões tuberculóides apresentam predomínio de células T CD4+, embora células com fenótipo CD8+ também estejam presentes, mantendo uma relação CD4/CD8 positiva (Modlin et al., 1986). Ocorre a expressão de antígenos HLA-DR em queratinócitos hiperplasiados e presença de linfócitos intraepiteliais (Modlin et al., 1988).

O reconhecimento de pelo menos duas subpopulações distintas de linfócitos T auxiliador 1 (Th1) e T auxiliador 2 (Th2) trouxe novas possibilidades sobre os mecanismos reguladores envolvidos na resposta imune ao *M. leprae* (Mosmann et al., 1986).

O padrão de resposta imune Th1 x Th2 na Hanseníase foi determinado através da detecção da expressão de RNAm de citocinas na lesão de pacientes tuberculóides e lepromatosos. Os pacientes LL apresentaram um perfil predominante de citocinas do tipo

Th2, (IL-4, IL-5 e IL-10) sugerindo susceptibilidade à doença e os pacientes tuberculóides apresentaram perfil do tipo Th1 (IFN γ , IL-2), (Yamamura et al, 1991; Salgame et al, 1991). Vários autores descreveram que lesões de pacientes tuberculóides apresentam RNAm de IL-12, IL-18, IFN γ e TNF α aumentado em comparação com pacientes lepromatosos (Sieling et al, 1994; Garcia et al, 1999; Arnoldi et al, 1990). A citocina IL-10 tem sido detectada em altos níveis em pacientes lepromatosos com correlações positivas com o índice de baciloscópico (IB) (Moubasher et al, 1998).

Eventos celulares precoces na infecção podem ser cruciais em determinar qual destas duas vias predominará definindo o padrão da resposta imune. As células apresentadoras de antígeno poderiam desempenhar um papel importante na regulação da resposta imune, entretanto, o mecanismo pelo qual o modo de apresentação favoreceria a ativação de um tipo ou outro de linfócitos T auxiliares ainda não está definido.

Recentes evidências suportam a hipótese de que o perfil de citocinas gerados pela resposta imune inata possa regular a subsequente capacidade de resposta imune antígeno-específica. Sabe-se que a partir do momento da infecção, fagócitos mononucleares desempenham um papel importante, tanto na resposta imune específica quanto na resposta imune inata. Além de suas funções como célula apresentadora de antígeno e de sua capacidade microbicida (morte e destruição do patógeno), estas células secretam um grande número de fatores solúveis que interagem não só com células do sistema imune, mas também com células dos tecidos.

O sistema imune pode estar altamente envolvido nas neuropatias periféricas causando desmielinização como, por exemplo, na PDIC (poliradiculoneuropatia desmielinizante inflamatória crônica) e na síndrome Guillan Barré. Os tecidos alvos nestas neuropatias apresentam um aumento na expressão de MHC-II (Pollard et al., 1986; Mancardi et al., 1988; Mitchell et al., 1991). Fenômeno similar tem sido sugerido na Hanseníase, uma vez que tem sido observada a expressão de MHC-II por células de Schwann em biópsias de nervo (Narayana et al., 1990). Previamente, Samuel e colaboradores demonstraram a expressão de moléculas MHC-I e MHC-II em células de Schwann humanas dissociadas de nervo periférico após estímulo com *M. leprae*. (Samuel et al. 1987).

Modelos em camundongo demonstraram que as células de Schwann podem ser lisadas por células T CD8+ de maneira antígeno-específica, sugerindo que as células de Schwann murinas estejam suscetíveis à morte através de células T CD8+ (Steinhoff & Kaufmann, 1988). Já foi demonstrado, também, que as citocinas IFN γ e TNF α aumentam a expressão de MHC-II em células de Schwann de roedores (Gold et al., 1995).

Estudos realizados pelo grupo liderado por Tom Ottenhoff propuseram um modelo in vitro no qual células de Schwann podem apresentar antígenos de *M. leprae* a linfócitos T CD4+, mostrando a participação ativa das CS na imunopatologia da neurite na Hanseníase (Spierings et al., 2001). Este estudo sugere que a morte da célula de Schwann durante este evento de apresentação de antígeno poderia representar um mecanismo de injúria no nervo durante a reação reversa.

I.4. CÉLULAS DE SCHWANN

As células de Schwann²⁰ (nos nervos periféricos)²¹ ou oligodentrócitos (no sistema nervoso central) são células da glia especializadas na produção da membrana, que envolve as porções alongadas do neurônio (Figura 4). Aproximadamente 90% de todas as células endoneurais são CS e todas estão associadas a axônios em nervos periféricos normais. Nos nervos periféricos, o axônio é o prolongamento dos neurônios localizados na raiz dorsal e nos ganglios autonômicos para vertebrais (Alberts et al, 1995).

A interação entre o axônio e CS está entre os sistemas mais precisamente regulados em biologia. Os sinais advindos da CS influenciam o desenvolvimento de todos principais componentes dos nervos periféricos: neurônios, células do tecido conjuntivo e mesmo as próprias células Schwann. No desenvolvimento dos nervos, a sinalização axonal determina

²⁰ O fisiologista alemão Theodor Schwann, nascido em Neuss (Prússia) foi um dos fundadores da teoria celular, descobriu a bainha de mielina (lipídio) que envolve o axônio de algumas fibras nervosas.

²¹ O tecido nervoso tem origem no ectoderma do embrião. Anatomicamente, o tecido nervoso forma uma rede de comunicações que constitui o sistema nervoso, e este sistema está dividido em: Sistema Nervoso Central (SNC) formado pelo encéfalo e medula espinhal e Sistema Nervoso Periférico (SNP) formado por gânglios nervosos e por nervos cranianos e raquidianos que saem do encéfalo e da medula. O tecido nervoso constitui-se de dois tipos celulares principais: os neurônios (células que apresentam geralmente longos prolongamentos) e células da glia ou neuróglia (que sustentam os neurônios, participam da atividade neural, da nutrição dos neurônios e de defesa do tecido nervoso).

a sobrevivência, proliferação e diferenciação da CS. Tanto as células CS mielinizadas quanto as não mielinizadas reverterem a fenotipos imaturos se o axônio com o qual estão em contato sofre degeneração. Este aspecto faz destas células um exemplo particular de desdiferenciação celular na vida adulta.

Há evidências, entretanto, de que sinais derivados da glia (CS) são necessários à sobrevivência neuronal em períodos iniciais do desenvolvimento. Estes sinais regulam a especialização molecular e funcional do axônio e controlam a maturação da bainha perineural que protege os nervos da inflamação e de macromoléculas indesejáveis produzidas no tecido circunjacente. Nos nervos adultos um sinal autócrino mantém a sobrevivência da CS na ausência do axônio, o que explicaria a sobrevivência de CS após a transsecção de nervos.

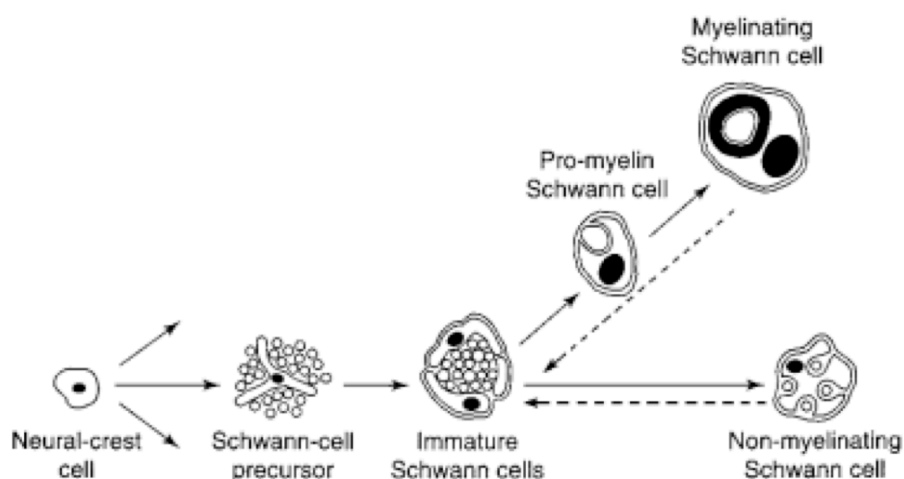


Figura 4: Principais estágios do desenvolvimento de células de Schwann originadas da crista neural. Fonte: *Jensen & Mirsky, 2002*.

Durante a embriogênese dos vertebrados, as células da crista neural surgem do lado dorsal do tubo neural e sofrem extensa migração ao longo de distintas vias onde proliferam intensamente antes de se diferenciarem, dando origem a vários tipos celulares, incluindo os neurônios e a glia (Cs) do sistema nervoso periférico. Estas células, inicialmente identificadas como precursoras e possivelmente instruídas por neuroregulina 1, se diferenciam em CS imaturas que, após o nascimento, se diferenciam tanto em CS não

mielinizadas e em outras, aptas a produzirem a bainha de mielina. Além das suas diferenças morfológicas, as células mielinizadas e não mielinizadas expressam diferentes conjuntos de genes. As fibras mielinizadas expressam principalmente RNAm de várias proteínas da mielina (PO, MBP (myelin-basic-protein) PLP (Proteolipid protein), MAG (myelin-associated glycoprotein), conexina-3 e periaxina. As não mielinizadas quase não expressam as citadas e expressam p75 (low-affinity neurotrophin receptor), GAP-43 (growth-associated protein 43) NCAM (neural cell adhesion molecule) e LI. A expressão de fatores de transcrição tais como Krox-20 e POU são importantes para a mielinização. Outros fatores como membros da família Jun (c-Jun, Jun B e Jun D) e o fator NF-kB são importantes para diferenciação e desenvolvimento das células de Schwann (revisto por Mirsky & Jessen, 1999).

Presume-se que um sinal axonal inicie a mielinização da CS, porém a natureza desse sinal ainda é desconhecida. Os sinais envolvidos na expressão das proteínas relacionadas à mielina são mantidos mesmo nos neurônios adultos e requerem uma contínua interação axônio-CS. A degeneração axonal causa drástica redução da expressão destes genes e expressão de outras proteínas na CS então sem axônio (CS denervada). Essas proteínas são o GAP-43, o BDNF (brain-derived neurotrophic factor), e a proteína de matrix extracelular, F-spondin. Vários fatores de crescimento²² podem modular a diferenciação de CS. TGF- β_1 tem efeitos variáveis na expressão de genes que são expressos por CS não mielinizadas denervadas, aumentando a expressão de NCAM e LI e reduzindo a expressão de p-75 e GAP-43 (Awatramani et al 2002)

Jessen e Mirsky, 2000, estudando o desenvolvimento das células de Schwann em nervo ciático de rato, demonstraram as principais mudanças na expressão de proteínas e lipídios. Os autores mostraram que as células de Schwann imaturas expressavam p75, NCAM, LI, GFAP, GAP-43, A5E3, Ran-2, O4, S100, as células de Schwann não

²² As células do sistema nervoso necessitam de fatores de crescimento durante o seu desenvolvimento para regulação da divisão e sobrevivência. Kimura et al.1990, demonstraram que a linhagem celular de rato JS1 secreta um fator mitogênico denominado SDGF (fator de crescimento derivado de schwannoma). SDGF pertence à família dos fatores de crescimento epidérmicos, e é um fator de crescimento autócrino e fator mitogênico para astrócitos, células de Schwann e fibroblastos. As células Schwann de nervo periférico de camundongos são induzidas a expressar moléculas de adesão celular neuroglial (NgCAM) durante a embriogênese e sob condições patológicas (Martini & Schachner, 1988). Sing et al, 1996 demonstraram que *M. leprae* e produtos secretados de macrófagos modulam a expressão de NgCAM em células de Schwann de camundongo.

mielinizadas p75, NCAM, L1, GFAP, GAP-43, A5E3, Ran-2, GalC, Alpha-1beta integrina, O4, S100 e as células de Schwann mielinizadas Krox-20, Periaxin, Proteína zero, MBP,

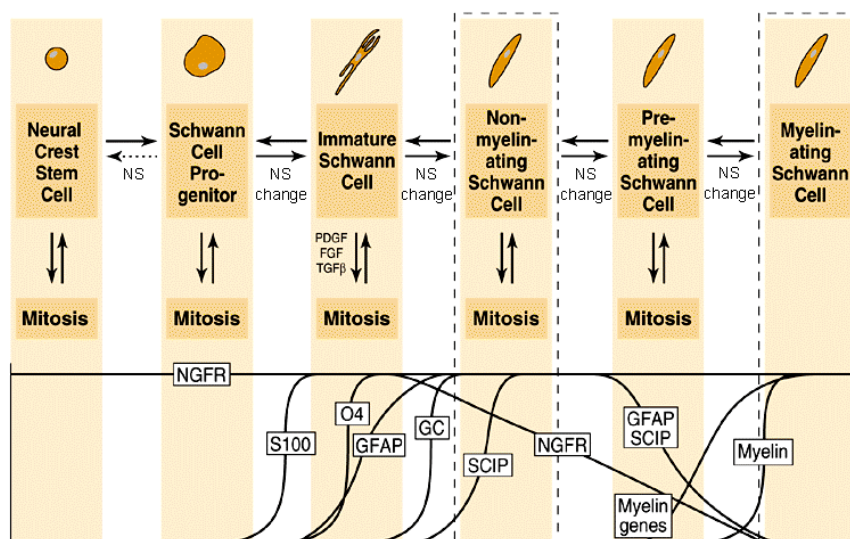


Figura 5: Fonte: Cells of the Nervous System. <http://www.jdaross.cwc.net/intronerv2.htm>

PMP-22, MAG, Conexina-32, P2, PLP, GalC, S100, O4). A figura 5 ilustra a diferenciação seqüencial e a participação dos fatores de crescimento FGF, PDGF, TGF beta das CS e alguns dos marcadores celulares incluindo o receptor NGFR, S100, GFAP e o fator de transcrição SCIP.

A proteína mais representada na bainha de mielina é a Po, uma glicoproteína que constitui mais de 50-60% do total da mielina. A MBP (myelin basic protein) constitui 11-20% e PMP22 variada concentração. A MAG (myelin-associated glycoprotein) é a de menor concentração.

Percursos das células CS mostram uma relação íntima morfológica com os axônios e estas células não sobrevivem quando são desprovidas do contato com o axônio. Sinais parácrinos derivados de neurônios resgatam as CS da morte celular por apoptose.

Estes sinais são identificados como β -neuroregulina 1 e endotelina. Esta última parece ter ação reguladora negativa na geração de CS.

A sobrevivência da CS após a degeneração do axônio é crucial para a regeneração do nervo porque a CS confere fatores tróficos e substratos para adesão que promovem o crescimento axonal. Nestas condições as CS emitem circuitos autócrinos que as capacitam sustentar sua própria sobrevivência. Estes sinais só estão presentes na célula diferenciada. Três principais componentes deste circuito foram identificados: neutropin-3 (NT3) IGF-2 (insulin growth factor-2) e o fator derivado de plaqueta (PDGF-BB). Outro fator, o fator inibidor leucêmico (LIF) também promove sobrevivência (Jessen e Mirsky, 2002). Estes fatores promovem a sobrevivência através da inibição das vias de apoptose.

Outros fatores ao contrário, promovem a apoptose e podem ter um papel importante na morte de CS, tanto no período de desenvolvimento como depois da lesão neural.

Recentemente foi demonstrado um efeito apoptótico do $TGF\beta_1$, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A aplicação de $TGF\beta$ mata as CS por apoptose em cultura e aumenta a morte destas células em nervos transeccionados porém não em nervos normais. O efeito apoptótico do $TGF\beta$ é completamente bloqueado pela presença de β -neuroregulina 1 e sinais autócrinos dos IGF-2, PDGF-BB e NT3. O $TGF\beta$ sinaliza via c-jun-N terminal kinase e através da via de fosforilação de c-jun. As CS mielínicas de nervos pós-natais são resistentes à apoptose induzida pelo $TGF\beta$ e isto está relacionado à falência para fosforilar c-jun. Em nervos adultos todas as células CS tornam-se resistentes à morte celular (Parkinson et al., 2001).

Tem sido demonstrado que além da interação CS x axônio, as CS recrutam a proteína Desert Hedgehog, membro de uma família de proteínas de sinalização, importante na formação do perineuro e do tecido conjuntivo endo- e epineural. Além dos fatores de crescimento, as CS secretam laminina e colágeno IV que são depositados na matriz extracelular além de NCAM e N-cadherina que permanecem localizadas na membrana plasmática. A resposta do axônio a estas proteínas depende de receptores específicos tais como integrinas (Bunge, 1993) Três famílias de proteínas de adesão influenciam a interação CS x axônio. Primeiro, a super família do gene de imunoglobulina inclui NCAM, L1, MAG (myelinic-associated glycoprotein). NCAM e L1 estão expressos na CS e no axônio antes do estabelecimento da relação 1 CS : 1 axônio que precede o embainhamento.

A expressão de NCAM parece ser interrompida quando a CS se mieliniza, entretanto a diferenciação para CS não formadoras de mielina não interrompe a expressão de NCAM. (Bunge, 1993).

A deposição da lâmina basal ao longo da unidade CS-axônio ocorre após o envolvimento do axônio pela CS e depende da liberação da matriz extracelular pela CS incluindo colágeno I, III, IV, V e laminina.

A proliferação de CS é de grande importância funcional para o SNP. As CS podem potencialmente proliferar pelo menos 2 vezes durante seu ciclo vital. Elas proliferam cedo no desenvolvimento para encobrir os axônios e, posteriormente, elas podem proliferar após a lesão do nervo quando a CS associada à fibra nervosa lesada sofre uma onda de proliferação que é característica da degeneração Walleriana. Pelo menos 2 funções críticas do nervo periférico (mielinização e regeneração) estão intimamente associadas com a proliferação de CS.

As unidades axônio-célula de Schwann com e sem mielina formam as fibras nervosas mielínicas e amielínicas, respectivamente (Webster et al., 1973). As células de Schwann diferem dos macrófagos, fibroblastos endoneurais por uma lâmina basal formada por lamininas, colágeno tipo IV, nidogênio e proteoglicanas que envolve as fibras mielínicas e amielínicas e que está justaposta à membrana plasmática (Bunge et al., 1986; Alberts et al., 1995). Uma isoforma da laminina, a lamina-2 é constituída pelas cadeias $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ e no final do braço longo da cadeia $\alpha 2$ se encontra o domínio globular (G) da molécula (Ehring et al., 1990).

Fileiras de células de CS são arrumadas longitudinalmente ao longo da fibra nervosa (axônio) e formam uma bainha em torno delas. Uma lâmina basal rica em carboidratos cobre a superfície da membrana celular de CS. Quando a organização MB é impedida, as CS são incapazes de embainhar e mielinizar os axônios. O núcleo é elipsóide, geralmente localizado no meio da célula. Axônios mielinizados e amielinizados mantêm diferente relação com as CS. Na fibra mielínica a CS envolve um único axônio enquanto na fibra amielínica a CS envolve vários axônios.

A bainha de mielina é um envoltório grosso de fosfolípidios representados principalmente pela esfingomielina. As células de Schwann enrolam-se em espiral no axônio, determinam a formação de um invólucro membranoso pluriestratificado formado

pelas membranas plasmáticas das próprias células, diversas vezes redobradas e sobrepostas. Esse invólucro, de natureza lipídica, é denominado bainha de mielina. Essa bainha atua como isolante elétrico e contribui para o aumento da velocidade de propagação do impulso nervoso ao longo do axônio.

A bainha de mielina (Figura 6), porém, não é contínua. Há uma região de descontinuidade da bainha, o que acarreta a existência de uma constricção (estrangulamento) denominada nódulo de Ranvier (Alberts et al, 1995).

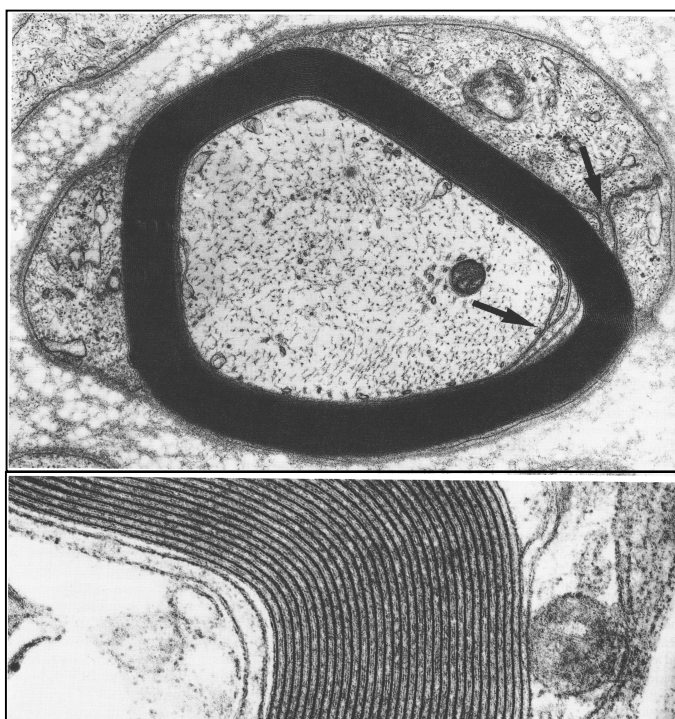


Figura 6: Fibra mielinizada normal. ME. Fonte. Mildroni & Bilbao, 1995.

A parte mais volumosa das células de Schwann representada pelo seu citoplasma perinuclear forma a bainha de Schwann, o segundo envoltório do axônio. Ela é também conhecida como neurilema. Por fora dela, há uma camada de tecido conjuntivo (a terceira bainha do axônio), a bainha conjuntiva ou endoneuro. As fibras sensitivas e motoras estão agrupadas e formam um fascículo nervoso envolvido por várias camadas concêntricas de células planas que se unem em junções íntimas (tight junction) formando o perineuro. O

perineuro e os vasos sanguíneos formam uma barreira entre o parênquima e a circulação sanguínea e os fluidos do tecido, esta barreira está comprometida durante a injúria e a infecção. Os vários fascículos nervosos que formam o nervo estão ligados pelo epineuro composto de tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos que se distribuem paralelamente ao sentido dos axônios para formar um tronco de nervos (Figura 7) Mildroni & Bilbao, 1995.

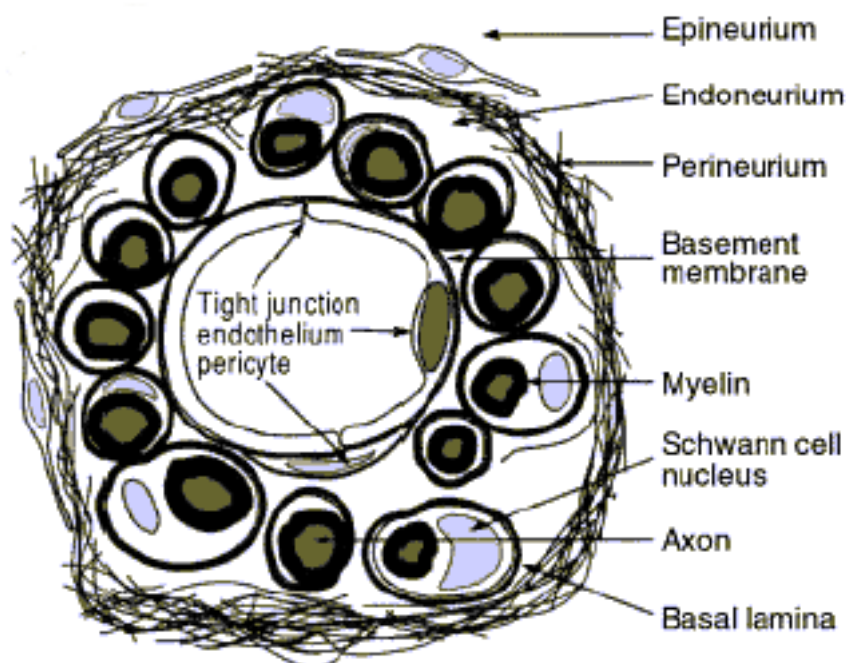


Figura 7: Célula da Schwann e estrutura do Nervo Periférico. Fonte: Spierings et al., 2000.

A interrupção da continuidade axonal por trauma ou inflamação inicia um processo conhecido como degeneração Walleriana que leva a uma série de eventos moleculares e celulares no nervo, orquestrados por macrófagos via complexas interações do axônio lesado, as CS, fibroblastos, mastócitos e células endoteliais. A degeneração Walleriana envolve degeneração da fibra nervosa assistida por proteases, remoção dos debris celulares e mantendo a lâmina basal de CS que irá permitir a regeneração. Seguindo a lesão do nervo, a expressão gênica nas CS mielinizadas é drasticamente alterada. Os RNAm relacionados à mielina desaparecem, e as CS passam a expressar os genes vistos normalmente em CS não mielinizadas tais como NCAM, L1, p-75 e GAP-43.

Os altos níveis de mRNA de TGF β ₁ e da proteína levantam a hipótese que TGF β ₁ modifica o fenótipo da CS denervada (Awartramani et al., 2001). Estas modificações gênicas são acompanhadas de intensas modificações fenotípicas das CS que se desdiferenciam e proliferam mantendo a integridade da membrana basal onde entrará o axônio regenerado. A degeneração axonal e regeneração que levam ao remodelamento do nervo são dependentes da liberação de enzimas proteolíticas e metaloproteinases e seus inibidores TIMP e citocinas (Maeda & Sobel, 1996; Hartung & Kieseier, 2000).

Mesmo na presença de altos níveis destas enzimas liberadas depois da injúria, a membrana basal e o tecido conjuntivo endoneural são preservados e não degradados. A membrana basal ajuda a manter a organização colunar das CS proliferantes durante o reparo. Vários componentes da matrix extracelular, componentes do MB (laminina, fibronectina, colágeno IV e vários proteoglicans) como também NCAM, têm atividade de promover neuritos *in vitro* e são fundamentais na regeneração axonal. As células que produzem citocinas no sistema nervoso periférico incluem macrófagos residentes e recrutados, linfócitos, células de Schwann e provavelmente neurônios. As citocinas são importantes nas neuropatias periféricas e tanto contribuem com as lesões nervosas como mediam o reparo e a regeneração dos tecidos (Creange et al, 1998). Vários estudos têm indicado que algumas células do sistema nervoso, ativadas através de diversos estímulos em sítios de inflamação, injúria e degeneração do tecido nervoso central têm capacidade para produzir citocinas com atividades pró-inflamatórias como o TNF α e IL-1 β ou com atividades anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β 1, entre outros.

TNF é uma citocina pleotrópica que promove inflamação e sinais de morte celular. No SNC está bem esclarecida sua habilidade para iniciar a cascata de eventos que levam à apoptose e lesão neurológica. Rápida indução do gene de TNF ocorre depois de isquemia cerebral e é reduzida pela administração do TNFRI (p55). A proteína transativada do HIV provoca apoptose de neurônios corticais por induzir síntese de TNF α . Ambos os receptores de TNF (p55 e p75) são identificados em neurônios, sendo que a ativação do p55 induz a apoptose. Interessantemente, apesar dos seus efeitos tóxicos para os neurônios, tem sido descrito um efeito neuroprotetor do TNF α . Este papel antídoto do TNF α na neurodegeneração pode estar relacionado com a natureza dupla da inflamação: a eliminação do tecido irreversivelmente lesado e a recuperação daqueles que ainda podem regenerar.

Estudos recentes demonstraram que a IL-6 é expressa em níveis aumentados no sistema nervoso central em vários estados de doenças, e contribuem para processos neuropatológicos (Kallen, 2002). A IL-6, é uma citocina multifuncional que exerce um extenso espectro de atividades sobre uma variedade de células alvo, entre elas indução de maturação de células B, produção de anticorpos (Hirano et al., 1990), e indução de produção de proteínas de fase aguda, entre outros. Elevados níveis de IL-6 podem ser encontrados em várias doenças que atingem a pele, como Psoríase e Hanseníase, onde IL-6 foi encontrada no soro de pacientes em reação (Sampaio et al.,1993).

Fatores de crescimento produzidos pelas células neurais como o IGF-1 (insulin growth factor) têm ação anti-apoptótica no SNC e no SNP. IGF-1 inibe as ações mortais dos receptores de TNF α em precursores de oligodendrócitos e ligantes de Fas em fibroblastos. O TNF α poderia exercer seus efeitos apoptóticos bloqueando a ação de sobrevivência do IGF-1, agindo como um silenciador dos sinais de sobrevivência. Neste caso, as quantidades de TNF α seriam extremamente pequenas (Venters et al.,1999).

O RNAm e a proteína TNF apresentam pico no 1° e no 5° dia após a lesão constritiva do nervo periférico. Da mesma forma, o TNFRI está elevado neste modelo de lesão neural. Neste modelo, o TNF α endógeno contribuiu para a sobrevivência de neurônios sensitivos (gânglio da raiz dorsal) (Shubayev et al, 2001).

O IFN- γ produzido por células T ativadas estimula as células de Schwann a produzirem TNF α e IL-6 demonstrando uma interação entre estas populações celulares. As células de Schwann não produzem IL-2 mais há evidência de que a IL-6 e/ou TNF α produzidas por estas células levam a proliferação de células T de forma independente. (Martino, 1998). Várias evidências apontam para uma potencial função das células de Schwann na modulação da resposta imune intraneural, já que estas células produzem várias moléculas envolvidas na resposta imune inflamatória, entre elas ICAM-1, L1, L2-HNK, NCAM, N-caderina, as citocinas IL-1, IL-6, TNF α e prostanóides inflamatórios, PGE-2 e TxA2 (Lilje & Armati, 1997; Mirwani et al., 1996).

Há interesse de vários autores em estudar a capacidade de citocinas produzidas por células T ou macrófagos/monócitos, por exemplo TNF α , como causa de desmielinização. Selmaj & Raine, (1988) mostraram que não há evidências de que TNF α ou outra citocina cause desmielinização nos axônios no sistema nervoso central. A injeção intraneural de

TNF α levou à desmielinização perivascular em ratos Lewis na presença de anticorpos antimielina (Spies et al., 1995).

As células de Schwann podem atuar como células apresentadoras de antígeno não profissionais (Wekerle et al., 1986; Argall et al., 1992), uma vez que SC de camundongo expressam MHC classe II após estímulo *in vitro* com IFN- γ (Samuel et al 19787a, 1987b). Steinhoff et al., 1990, demonstraram em modelo murino o reconhecimento e lise de células de Schwann (ativadas com IFN- γ) por Células T CD8+ no contexto MHC classe I, com especificidade para a proteína de choque térmico 65 kd. Os autores sugerem que ativação de células T autoreativas com especificidade para epítomos do *M. leprae* poderia contribuir para dano no nervo em pacientes tuberculóides, caracterizado através de baixa presença em células de Schwann. A co-cultura de células de Schwann com linfócitos T específicos para a proteína de choque térmico hsp70 induziu a expressão de moléculas de MHC de classe II sobre a superfície de células de Schwann (Ford et al., 1993).

I.4.1. SCHWANOMA HUMANO ST88-14

O cultivo de células de Schwann tem trazido importantes contribuições à neurociência, destacando-se o entendimento das propriedades da membrana das CS, a comunicação axônio-célula de Schwann, a interação da CS com agentes patogênicos. Muito do que se sabe das propriedades das CS veio dos estudos usando cultura de células embrionomas ou neonatal. Há evidência que as células de Schwann do adulto diferem na expressão de alguns receptores das células em períodos neonatal (Anselin et al., 1995). Infelizmente, as células de Schwann são difíceis de se isolar dos nervos periféricos de mamíferos adultos devido à abundância de tecido conectivo e do estado altamente diferenciado das células, particularmente daquelas envolvidas na formação da mielina. As modificações e o aprimoramento das técnicas de manutenção das culturas *in vitro* tem permitido que se isolem as células de animal adulto e células da cultura de nervo periférico humano.

A linhagem celular humana ST8814 foi isolada de um tumor maligno do nervo periférico, obtido de um paciente diagnosticado com NF-1 (neurofibromatose de Von Recklinghausen tipo 1) (Jonhson et al., 1989). Neurofibromatose é uma das desordens

genéticas humanas hereditárias mais comuns e dominantes, afetando 1 em 3.500 pessoas. O gene para NF1 (um regulador negativo do protocone *ras*) está localizado na região paracitométrica do cromossomo 17 (17q11.2), possui 60 éxons arranjados em 350 kb do DNA e codifica a proteína neurofibromina. Essa proteína é homóloga a *Saccharomyces cerevisiae IRA1* e *IRA2*, e às proteínas ativadoras da função GTPase que aceleram a hidrólise da proteína p21 *ras*-GTP para p21 *ras*-GDP, ou seja passando da forma ativa para a inativa. As mutações nesse gene alteram a estrutura original da proteína neurofibromina, impedindo a inativação da p21 *ras*-GTP, o que resulta em excesso de sinais mitogênicos para proliferação celular, favorecendo o aparecimento de lesões neoplásicas. (Viskochil et al, 1990, Wallace et al., 1990; Tanaka et al, 1991, Xu et al, 1990b). A NF1 caracteriza-se por lesões lisas pigmentadas da pele, anormalidades da íris, anormalidades esqueléticas, dificuldade de aprendizagem, neurofibromas e aumento do risco para tumores malignos no sistema nervoso central e periférico incluindo neurofibrosarcomas, glicomas e Schwannomas (Yan et al, 1995). Sugeriu-se que a NF1 surge quando ocorre uma segunda mutação somática nas células de Schwann, como por exemplo supressão de produtos gênicos tal como retinoblastoma (Weinberg, 1991). A linhagem ST8814 tem habilidade para crescer em baixas concentrações de soro, ou em soft agar, e cresce em multicamadas refráteis (DeClue et al, 1992). Yan et al, 1995, demonstraram que, quando plaqueada com aproximadamente 10% de confluência, esta linhagem cresce em dez dias em alta densidade por empilhamento e as células são ligeiramente refráteis. O crescimento de células malignas tem sido associado ao crescimento independente de ancoragem, ou seja, células não transformadas não crescem em suspensão soft agar. A linhagem ST88-14, quando semeada em suspensão soft Agar, forma colônias de 1-2 mm de diâmetro em uma frequência de aproximadamente 1×10^{-2} (DeClue et al, 1992).

A linhagem ST88-14, semelhante às células primárias, é positiva para os marcadores S-100, laminina, PO e MPB (Morrissey et al., 1991; Rutkowski et al., 1992; Ryan et al., 1994). Apesar de apresentar todos os componentes que compõem a lâmina basal que recobre as CS *in vivo*, as ST88-14 só se organizam *in vitro* em culturas mistas de células de Schwann-neurônios. Recentemente foi demonstrada a presença de RNAm para as cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ da laminina-2 e do receptor distroglicana na linhagem ST88-14 (Tempone et al., 2002), moléculas estas envolvidas na aderência do ML à CS (Marques et al., 2000; Marques et al.,

2001; Portugal, 2003) Em adição foi recentemente descrito que estas células internalizam o *M. leprae* após duas horas de interação seno observado no interior de vacúolos citoplasmáticos através de eletromicroscopia (Alves, 2003).

2. INTERAÇÃO ENTRE *M. LEPRAE* E AS CÉLULAS DE SCHWANN

Nos últimos anos houve interesse crescente no entendimento da interação *M. leprae*-célula de Schwann. O *M. leprae* tem um tropismo específico para nervos periféricos, acumulando-se no interior das células de Schwann. As vias percorridas pelo ML para alcançar as CS ainda não são conhecidas. Há sugestões de que o ML alcance as CS nas terminações nervosas cutâneas e daí, por via retrógrada, alcance o nervo periférico. Entretanto, há sugestões que o ML possa chegar ao endoneuro por via hematogênica, atravessando o endotélio vascular (Pessolani et al., 2003). Os monócitos do sangue infectados com *M. leprae* participariam como vetores, propiciando a entrada do *Mycobacterium* no nervo. Sabe-se entretanto, que a taxa de monócitos circulantes infectados do sangue nos linfáticos é baixa (Scollard et al., 1999). O ML, semelhante a outras micobactérias, entra nos monócitos/macrófagos via receptores do complemento do tipo 3 (CR3) e interage especificamente com o colesterol presente na membrana plasmática. Acredita-se que a parede extremamente rica em glicolipídios facilita esta interação. (Gatfield & Pieters, 2000). O *M. leprae* e outras micobactérias conseguem neutralizar ou driblar os mecanismos de maturação ou fusão com os lisossomas, e desta forma sobrevive dentro do fagossoma. A localização exata das ML nas CS ainda é controversa (Shetty e Antia, 1994). Se estas diferentes localizações estão relacionadas com a viabilidade bacteriana não é conhecido. Na infecção pelo MT, a bactéria viva é encontrada em fagossomas precoces contendo a proteína TACO que evita a maturação do vacúolo e permite a sobrevivência bacteriana. Esta proteína está ausente em vacúolos contendo bacilos mortos. (revisito por Pieters, 2001). Se o ML utiliza este sistema de sobrevivência precisa ser esclarecido.

Os mecanismos de sobrevivência do ML na CS são desconhecidos, de um lado pela dificuldade de se obter culturas perenes de CS humanas, do outro lado pela impossibilidade de se cultivar o *M. leprae*. Estudos recentes demonstraram que a temperatura utilizada na

cultura é crítica para a viabilidade do ML²³ o que explicaria os diferentes resultados descritos na literatura (Hagge et al, 2002).

Na década de 80, autores indianos (Misky & Mukherjee) utilizando CS de linhagens de camundongos, analisaram o efeito da infecção pelo ML em algumas funções destas células, verificando comportamentos diferentes em diferentes cepas de animais. A infecção pelo ML não influenciou os níveis de produção de laminina em CS obtidas de camundongos C57BL/G enquanto houve marcado aumento em células do Swiss branco. Por outro lado, os níveis de proliferação de CS avaliados pela síntese de DNA eram reduzidos em células infectadas por ML vivo, porém não com bacilos inviáveis. Interessantemente, nos modelos em que se observou aumento de produção de laminina pela infecção do ML, verificou-se inibição da proliferação sugerindo um complicado mecanismo de regulação entre estas duas funções.

Estudos recentes (Hagge et al, 2002) utilizando cultura de CS de ratos Holtzman demonstraram que CS infectados pelo ML vivo a 33° perdem a aderência à superfície do frasco de cultura e formam agregados, aspecto este não observado com bactérias mortas. Observou-se ainda que a expressão de genes nas CS infectadas estava alterada: baixos níveis de GFAP RNAm, altos níveis de NCAM RNAm e baixos níveis de RNAm N-cadherina foram encontrados em culturas infectadas com ML viável em comparação à bactéria morta. TGFβ₁, LI e NCAM não mostraram alterações significativas (Hagge, 2002).

Nestes estudos, CS infectadas tanto com bactéria viável como morta foram capazes de se associarem ao axônio em co-culturas e de se mielinizarem, contrastando com

²³ No modelo descrito pelo grupo de Diana Williams, as células de Schwann foram purificadas do nervo ciático de rato outbreak neonatal Holtzman (método modificado de Brockers et al., 1979). Nervos ciáticos de ratos com 1-3 dias de idade foram dissecados, dissociados com colagenase e protease (dispase) e incubados a 37°C. Esta preparação final foi tratada com tripsina e EDTA, incubado a 37°C com agitação, e ressuspensa em meio D-10. A suspensão foi passada através de um filtro de nylon para remover os fragmentos grandes de tecido e obter uma solução célula-única. As células de Schwann foram dissociadas das garrafas de cultura usando Trypsina-EDTA e não foram feitas mais de cinco passagens. O meio de cultura foi suplementado com mitógenos β-herregulin, forskolin e extrato de pituitária bovina. A pureza da cultura foi determinada através de análise da presença do marcador S-100. Os mitógenos foram removidos das culturas antes da realização dos experimentos de co-cultura com neurônios e somente heregulin foi removido quatro dias antes da infecção com *M. leprae*. Desta forma o modelo de infecção de célula de Schwann criado conserva a atividade metabólica de *M. leprae* por até 3 semanas em cultura e mantém capacidades funcionais de células de Schwann para reagir com neurônios em cultura (Hagge et al., 2002).

trabalhos anteriores que mostraram que esta função estava comprometida nas células infectadas. Nestas co-culturas (CS + neurônios) verificou-se que ML foram fagocitados por células mielinizadas e não mielinizadas. Estas observações contrastam com antigos e recentes trabalhos que mostraram que ML infectava exclusivamente CS não mielinizadas (Shetty VP & Antia NH., 1996; Rambukkana et al., 2002). Outra importante contribuição com relação ao efeito do ML em CS foi descrita por Rambukkana et al., (2002) que demonstraram que o ML induziu rápida desmielinização por um mecanismo dependente de contato em um modelo de cultura utilizando tecido nervoso obtido de ciático de camundongo Rag-1^{-/-}. Neste estudo as CS mielinizadas eram resistentes à invasão pelo ML, enquanto as não mielinizadas permitiram intenso parasitismo, embora em ambas houve aderência do ML. O efeito desmielinizante da ligação do ML ocorreu tanto quando se utilizaram bactérias viáveis como mortas e até mesmo quando PGL-1 foi utilizado. Embora este estudo aponte a desmielinização como um evento precoce na interação CS e ML, a lesão axonal foi observada depois de 72 horas de infecção. Até recentemente ignoravam-se as vias pelas quais o ML aderiu especificamente à CS. Rambukkana e colaboradores, em 1997, descreveram que o *M. leprae* se liga às células de Schwann, especificamente pelo domínio globular da cadeia $\alpha 2$ de laminina-2, a isoforma mais abundante da laminina presente na lamina basal que recobre as células de Schwann e que está ligada é suficiente para a adesão do *M. leprae* às células (Rambukkana et al., 1997) (Figura 8).

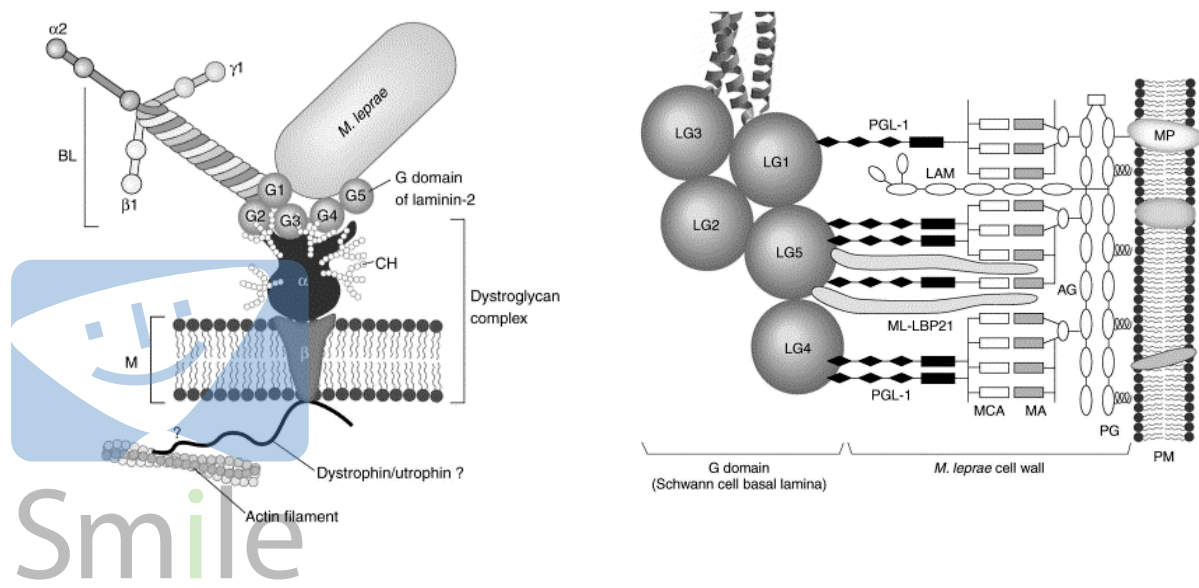


Figura 8. Fonte: Rambukkana et al., 1997; Ng et al., 2000.

Além disso, o receptor distroglicana presente na membrana da CS funciona como receptor da CS para *M. leprae* (Rambukkana et al., 1998; Weinstein et al., 1999). A distroglicana é codificada por um único gene e clivada por processamento pós-traducional em duas proteínas: a distroglicana- β , uma proteína de superfície da membrana altamente glicosilada que se liga a laminina e a agrina, presentes na lâmina basal das CS (Yamada et al., 1994) e a distroglicana, uma proteína transmembrana cujo domínio citoplasmático se liga a extremidade C-terminal da proteína distrofina do citoesqueleto da célula (Suzuki et al., 1994). A laminina-2 liga-se à distroglicana, às integrinas $\beta 1$ e $\beta 4$ seus receptores na CS, cujos domínios citoplásticos se encontram associados a elementos do citoesqueleto celular. (Feltri et al., 2001; Milner et al., 1997; Calderwood et al., 2000; Winder, 2001). Anticorpos anti-distroglicana α inibiriam parcialmente a ligação do bacilo à CS. Estudos subsequentes identificaram a proteína catiônica, proteína histona-like (Hlp), também conhecida como laminin-binding protein (ML-LBP), e o glicolípido de fenólico I (PGL-I) presentes na superfície do ML como adesinas bacterianas potencialmente envolvidas na interação com as células de Schwann (Shimoji et al., 1999; Marques et al., 2000; Ng et al., 2000) (Figura 9).

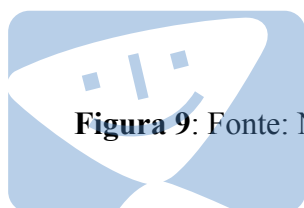


Figura 9: Fonte: Ng et al., 2000.

Nos estudos de Marques e colaboradores foi demonstrado que o *M. leprae* pré-tratado com a Hlp recombinante, induz um aumento da adesão do bacilo à linhagem humana de célula de Schwann ST88-14 (Marques et al, 2000). As Hlps são expressas com

maior intensidade em culturas de micobactérias em fase estacionária e em estado de dormência. (Lee et al., 1998, Matsumoto et al., 1999). Marques e cols., 2000, demonstraram que a Hlp tem sido observada unicamente na fração de parede celular do *M. leprae*, estando ausente no citoplasma (Marques et al., 2000).

Mais recentemente foi demonstrado (Pessolani et al 2003) que o ML produz na sua superfície uma proteína de 188 resíduos intimamente relacionada à adesina “heparin-binding hemagglutinin adhesin” (HBHA) do *M. tuberculosis*. Esta proteína está envolvida na interação do bacilo MT com a célula epitelial, sendo responsável pela disseminação do bacilo (Peth et al., 2001). É possível que o ML utilize via semelhante para atingir os tecidos (Portugal, 2003). Os eventos intracelulares nas CS que se seguem após a ligação do ML foram recentemente descritos.

O *M. leprae* vivo ou irradiado, pré-tratado com rHlp, induz a ativação da proteína tirosina kinase (PTK), proteína quinase dependente de cálcio (PKC) e fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K) (Alves, 2003). As vias PTK, PKC e PI 3-K são utilizados por *M. leprae* e BCG em monócitos humanos e provavelmente representam sinais universais gerados durante a fagocitose (Lima, 2001).

Uma cultura primária de células de Schwann mantida *in vitro* por cerca de oito meses foi obtida a partir de fragmentos de biópsia de nervo sural humano cultivados na presença de sobrenadante de linfócitos killer ativado (LAK) (Van den Berg et al., 1995). A caracterização fenotípica através da expressão de S-100 e do receptor de fator de crescimento de nervo de baixa afinidade, Thy-1, confirmou que estas culturas contêm mais de 99% células de Schwann e ausência de fibroblasto. É possível que este modelo permita esclarecer pontos da interação do ML com as CS até então desconhecidos.



2. IMUNIDADE INATA

A sobrevivência de cada espécie animal depende da sua habilidade de reconhecer patógenos²⁴ invasores e responder rapidamente à presença desses agentes. O sistema imune tem a capacidade de reconhecer, responder e eliminar compostos exógenos (não próprios) e, geralmente, de tolerar os compostos endógenos (próprios). O sistema imunológico inato reconhece as características gerais dos antígenos estranhos que deflagram várias funções efetoras. Essas funções são efetuadas por diversos tipos celulares e fatores solúveis presentes no hospedeiro. Podem destruir ou eliminar numerosos microorganismos e outros antígenos estranhos até mesmo na ausência da imunidade antígeno-específica mediada por células (linfócitos B e T). Todavia, os anticorpos antígeno-específicos derivados dos linfócitos B e as citocinas secretadas por linfócitos T antígeno-específicas ativadas potencializam as funções efetoras inatas. Desta forma, ocorre co-evolução da imunidade adaptativa com a inata na resposta imunológica. No sangue, os microorganismos desencadeiam uma resposta imune específica: produção de anticorpos livres para destruição de patógenos circulantes e interação de fagócitos com linfócitos T durante a apresentação de antígenos, ocorrendo ativação. Após essa ativação, os linfócitos T secretam citocinas que facilitam as funções dos fagócitos, estimulando assim o processo inflamatório.

A resposta inata ou natural proporciona a defesa inicial e participa da indução das respostas adaptativas. Na resposta inata, os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e outras células (macrófagos, eosinófilos, células natural killer) protegem o organismo sadio juntamente com vários outros mecanismos de proteção tais como: barreira física (pele e mucosa); barreiras mecânicas: fluxo de líquidos (suor, saliva, lágrimas, secreções, etc), tosse, espirro; barreiras químicas (pH, lipídeos, enzimas); eosinófilos (no sangue e no tecido), células natural killer, macrófagos e várias moléculas circulantes (citocinas, imunoglobulinas, sistema complemento) (Peñate e Peña, 2001; Janeway & Medzhitov, 2002; Chaplin, 2003). Concomitantemente, citocinas tais como interferons α , β e $\text{TNF}\alpha$ atuam como mediadores solúveis neste tipo de resposta. No sistema imune inato uma das funções das células fagocíticas é fagocitar os patógenos. A fagocitose é um tipo de

²⁴ A resposta imune nos mamíferos pode ser adquirida evolutivamente como resposta a sucessivas infecções pelo mesmo patógeno e é capaz de combater organismos que durante a evolução se adaptaram para resistir à imunidade inata.

endocitose através do qual uma célula se torna capaz de ingerir e degradar grandes partículas insolúveis. O processo de fagocitose se inicia com a ligação do fagócito à partícula que deve ser fagocitada. Essa ligação ocorre através de um reconhecimento molecular entre receptores existentes na superfície celular do fagócito e a partícula a ser fagocitada. Um exemplo é o CD14 (receptor de lipopolissacarídeo-LPS) presente nos macrófagos, que se liga ao lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas, parede celular de estreptococos, e lipoarabinomanana do *Mycobacterium tuberculosis*. Vários autores têm sugerido que a interação do LPS com neutrófilos e macrófagos é mediada por CD14, na presença de fatores do soro tais como LBP (proteína ligadora de LPS) (Shapira, 1995). CD14, é uma proteína, glicosilfosfatidilinositol (GPI) de 55kDa, ancorada à membrana, sobre a superfície de monócitos/macrófagos e, em menor grau de neutrófilos²⁵ (Viriyakosol & Kirkland, 1995). Entretanto, células endoteliais, fibroblastos e linfócitos respondem a LPS, mas não expressam CD14. A molécula sCD14 (solúvel) tem sido detectada no soro normal, na urina de pacientes nefróticos, e em cultura de sobrenadantes de células HL60 após diferenciação e, também, no meio de cultura de células transfectadas expressando CD14 (Haziot, 1993).

O entendimento do sistema imune inato teve um avanço considerável a partir da descoberta de homólogos da proteína Toll de *Drosophila* em mamíferos (Medzhitov et al., 1997). Desde então, houve interesse crescente em investigar a função destas proteínas na imunidade mediada por células. A identificação dos receptores Toll tem dado importantes informações sobre a função da imunidade inata no reconhecimento de microorganismos invasores.

²⁵ Neutrófilos respondem a baixas concentrações de LPS (na presença de soro ou LBP purificado) e a molécula de CD14 se liga ao complexo LPS-LBP (Wright, 1991). Foi demonstrado que PMN têm um pool intracelular de CD14, que aumenta seus níveis após estímulo com TNF- α , G-CSF, GM-CSF e FMLP (Wright, 1991). PMN de sangue periférico também sintetizam ativamente uma molécula CD14 com um peso molecular semelhante ao CD14 de monócitos (Haziot, 1993). Zhang e cols., 1994, demonstraram que LAM (lipoarabinomanana), um componente da parede de micobactérias, pode se ligar à CD14 e disparar a síntese de TNF- α em monócitos.

2.1. RECEPTORES "TOLL-LIKE"

A identificação dos receptores Toll tem dado importantes informações sobre a função da imunidade inata no reconhecimento de microorganismos invasores. O envolvimento dos receptores Toll na imunidade inata foi inicialmente descrito em *Drosophila*. A superfície epitelial do corpo das *Drosophila* serve como a primeira linha de defesa contra microorganismos (Horisato, 1995). O receptor Toll é uma proteína transmembrana, responsável pela regulação da polaridade dorso-ventral no desenvolvimento do embrião da *Drosophila* e sua sinalização ativa a resposta imune inata na mosca adulta. (Chaudhary et al., 1998). A proteína Toll de *Drosophila* (dToll) participa da resposta imune contra fungos e contra infecção por bactéria Gram-positiva (Lemaitre et al., 1996; Rutshmann et al., 2002) e, via IMD, das respostas às bactérias Gram-negativas (figura 10).

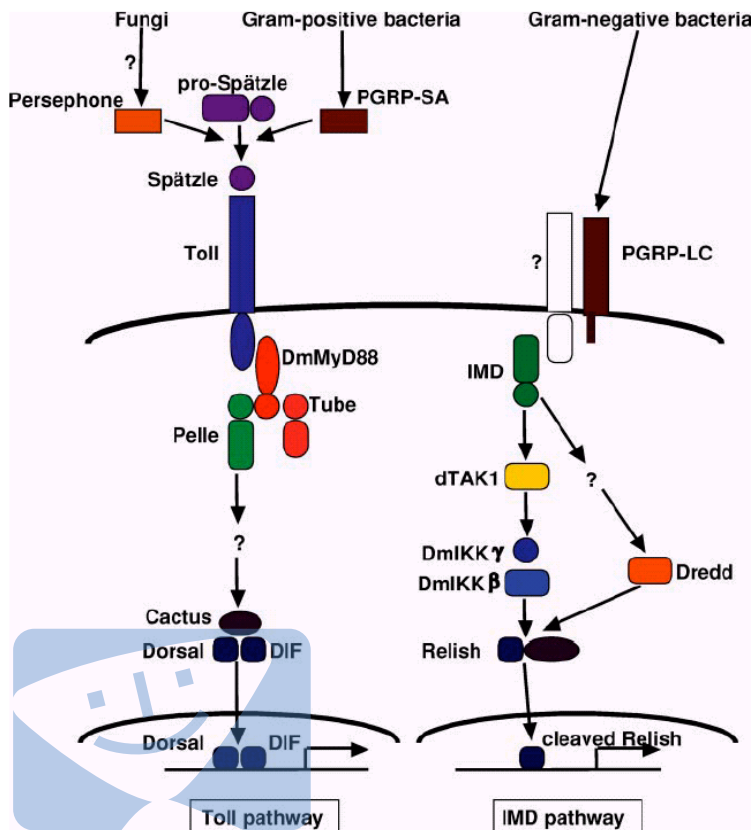


Figure 10. Fonte: Takeda et al., 2003. **Defesa do Hospedeiro em *Drosophila*.** Indução de genes dependents de Toll por infecção bacteriana Gram-positiva, e por fungos; e por bactérias Gram-negativas (genes dependents de PGRP-AS para ativação da via IMD em infecção).

Os domínios intracelular e extracelular de dToll exibem similaridades estruturais e funcionais com proteínas de duas famílias distintas: o receptor de interleucina 1 (IL-1R) (Hoffmann & Reichhart, 2002) e a superfamília das proteínas com domínio rico em leucinas (LRR) (Kobe & Deisenhofer, 1995). As LRRs facilitam a interação lipídeo-proteína e proteína-proteína (Krantz et al., 1991; Kobe & Kajava, 2001). A resposta imune modulada por dToll reflete um sistema ancestral conservado, que tem componente homólogo em plantas (Staskawics et al., 1995) e vegetais, como exemplificado através da indução de resposta inflamatória mediada por IL-1/NF- κ B (Baeuler & Henkel, 1994). Análise de mutações e deleções mostra que resíduos de aminoácidos conservados entre os domínios citoplasmáticos de IL-1R e dToll são essenciais para transdução de sinal destes receptores (Heguy et al., 1992; Schneider et al., 1991).

A Toll humana (hToll) é uma proteína transmembrana tipo 1 com um domínio consistindo de domínios ricos em leucinas (LRRs) e um domínio citoplasmático homólogo para o domínio citoplasmático da proteína humana IL-1R (Medzhitov et al., 1997a). Um grande número de homólogos de Toll tem sido identificado em mamíferos, e parece ser crítico nas respostas para à bactéria Gram-negativas (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). Desde que a primeira versão constitutiva ativa de um receptor Toll foi (TLR) identificada em 1997 por Janeway e Medzhitov na Universidade de Yale (Rock, 1998), mais nove receptores foram identificados (Chaudhary et al., 1998, Takeuchi et al., 1999, Chuang & Ulevitch, 2001) e são referidos como receptores toll-like (TLRs) (Tabela 2). O primeiro receptor Toll identificado hoje está catalogado como TLR4. Todas as proteínas são transmembranas, contendo motivos repetidos e ricos em leucinas nas porções extracelulares, parecidas com proteínas de reconhecimento padrão.

As proteínas TLR contêm uma porção citoplasmática que é homóloga para o receptor interleucina-1 e conseqüentemente podem disparar vias de sinalização. Uma proteína humana homóloga da proteína Toll de *Drosophila*, designada Toll-like receptor, é expressa em células do sistema imune e sua superexpressão em macrófagos causa a liberação de citocinas e expressão de moléculas coestimulatórias que são essenciais para a ativação.

Medzhitov e cols. (1997a), demonstraram a expressão de RNAm para hToll em monócitos, macrófagos, células dendríticas, células T CD4, células Th1 and Th2, linhagem

de células do epitélio intestinal, linhagem de células B e, mais fortemente, em células do baço e leucócitos do sangue periférico (PBL). Uma resposta eficiente requer que as células fagocíticas reconheçam os padrões moleculares associados a patógenos bacterianos (PAMPs-pathogen-associated molecular patterns) (Medzhitov and Janeway, 1997b).

Nome	Cromossomo	Distribuição (RNAm/proteína)	Função/Comentários
TLR1 (TIL, Rsc786)	humano: 4 mouse: 5	4 proteína: baixos níveis em monócitos	associa-se e regula a resposta de TLR2
TLR2 (TIL4)	humano: 4 mouse: 3	4 proteína: monócitos, granulócitos; aumentado em macrófagos	interage com lipoproteínas micobacterianas e peptídeo-glicanas, resposta para LPS em dependente e independentemente de CD14, via NF-κB
TLR3	humano: 4 mouse: 8	RNAm: DC, aumentado em céls. endoteliais/epiteliais Proteína: baixos níveis fibroblastos	interage com RNAs; ativa via NF-κB; induz produção de interferons do tipo I
TLR4 (HToll, Rasl2-8, Ran/M1)	Ly87, humano: 9 mouse: 4	9 proteína: monócitos, aumentada em endotélio	interage com lipoproteínas microbianas, no resposta para LPS dependente de CD14, via NF-κB
TLR5 (TIL3)	humano: 1 mouse: 1	1 RNAm: leucócitos, próstata, pulmão	interage com lipoproteínas microbianas, NF-κB, response to Salmonella
TLR6	humano: 4 mouse: 5	4 RNAm: leucócitos, ovário, pulmão	interage com lipoproteínas microbianas, sequência da proteína mais similar à hTLR1; associa-se com e regula a resposta TLR2
TLR7	humano: X mouse: X	X RNAm: baço, pulmão, placenta; aumentado em macrófagos	baixa similaridade para outros membros da família TLR
TLR8	humano: X mouse: X	X RNAm: leucócitos, pulmão	
TLR9	human: 3 mouse: 9 or ?	3 RNAm: leucócitos proteína: DC, céls. B (intracelular)	receptor para DNA-CpG bacteriano; fraca similaridade para TLR3, pode mediar interação proteína-proteína
TLR10	humano: 4 mouse: ?	4 RNAm: tecidos linfóides	relacionado a TLR1 and TLR6
RP105 (CD180, Ly-78)	humano: 5 mouse: 13	5 Proteína: céls. B maduras	ativação de célula, reconhecimento de LPS r
MD-1 (Ly86)	Humano: 6 mouse: 13	6 proteína: células B maduras	associa-se e regula a expressão de RP105 de superfície
MD-2 (Ly96)	Humano: 8 mouse: 1	8 proteína: macrófagos	associa-se e regula a expressão de TLR4 de superfície 4, sinaliza presença de LPS

Tabela 2. Modificado a partir de *Bioscience*, 2002

Em mamíferos, uma proteína da família Toll, chamada receptor semelhante a Toll-4 ou TLR-4, sinaliza a presença de LPS pela associação com o CD14. Recentemente, membros da família TLR têm sido caracterizados na sinalização de LPS. TLR4, o primeiro TLR humano identificado é ativado por LPS que esta na parede de bactérias tal como Salmonela (Poltorack et al., 1998), e também reconhece outros padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Takeda et al., 2003) e uma proteína viral (Ko et al., 2000). Os camundongos C3H/HeJ e C57BL10/ScCr têm uma mutação em *tlr4* e por isso são hiporesponsivos para LPS (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999). O reconhecimento de LPS induz transdução de sinal mediada por CD14 e o receptor TLR 4 (TLR4) e MD-2. Rock, em 1998, localizou a codificação do gene para o receptor TLR4 no cromossomo 9 (9q32-q33). A ligação do lipopolissacarídeo à CD14 conduz à associação de CD14 com o complexo TLR4-MD-2 que leva a dimerização de TLR4. Uma vez que TLR4 é ativado recruta a proteína MyD88, que é associada à proteína kinase serina-treonina, o receptor de interleucina 1 associado à kinase (IRAK). IRAK é então fosforilado e associada com a proteína adaptadora fator 6, associada ao fator de necrose tumoral (Traf-6). A oligomerização de Traf-6 ativa um membro da família de proteína mitógeno-ativada 3 kinase (MAP3K), que conduz direta- ou indiretamente à ativação de I (kappa) B kinase 1 (IKK1) e de I (kappa) B kinase 2 de (IKK2). Estas kinases fosforilam I (kappa) B em resíduos do serina, levando assim IκB para a degradação e liberando NF-(kappa) B (NF-κB), um heterodímero p50/p65 que se move para o núcleo e induz a ativação transcripcional de uma grande variedade de genes da resposta imune e inflamatória (Yang, 1998; Chaudhary, 1998; Takeuchi, 1999). (Figura 11)

Há evidências de que os receptores TLR4 aumentam a resposta Th1, ao passo que os receptores TLR2 aumentam a Th2 (Re & Strominger, 2001).



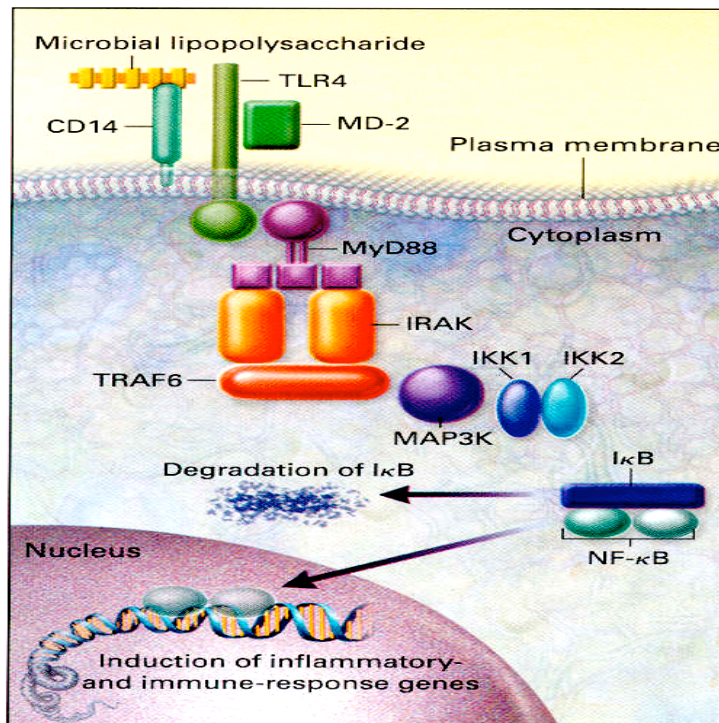


Figura 11. Fonte: Medzhitov & Janeway, 2000.

TLR2 tem sido demonstrado como o principal mediador para a ativação de macrófago em resposta a micobactérias (Lien, 1999, Brightbill, 1999). O gene TLR2 está localizado no cromossomo 4 (4q32). O receptor toll 2 responde a peptídeoglicanas de bactérias Gram-positivas, lipoproteínas bacterianas, lipoarabinomanose da parede celular de micobactérias, fosfatidilinositol glicosil de *Trypanosoma cruzi*, uma modulina fenol-solúvel liberado por *Staphylococcus epidermis*, fungos, e também pode ser ativado por LPS de leptospira (Werts et al., 2001; Means et al., 1999).

Há evidências de que os TLRs podem formar heterodímeros. O TLR6 reconhece a lipoproteína de micoplasma cooperativamente com TLR2 (Takeuchi et al., 2001, Takeuchi et al. 1999). Os camundongos mutantes para TLR2 não respondem para BLP ou MALP-2. As diferenças entre MALP2 (macrophage-activating lipopeptide 2 kDa) e BLP consiste no padrão de acetilação do resíduo de cisteína N-terminal, ou seja, BLP tem uma cisteína N-acil S-diacil enquanto MALP-2 tem somente uma cisteína diacilada. Macrófagos deficientes de TLR2 e TLR6 não respondem ao MALP-2. Entretanto, a expressão de TLR2 extracelular e TLR6 citoplasmático (e vice versa), construídos em fibroblastos mutantes para os dois receptores, levou a produção de IL-6 por estas células induzidas por MALP-2.

Isto demonstra que os dois receptores agem juntos e que TLR6 é responsável pelo reconhecimento das sutis diferenças estruturais entre MALP2 e BLP (Takeuchi et al., 2001).

Ozinsky e cols. (2000) mostraram que TLR2 se associa com TLR6 em células CHO e a hiperexpressão da forma dominante negativa de TLR6 em células RAW264 resultou na supressão da produção de TNF α em resposta aos ligantes PGN e *S. Aureus*, morto por aquecimento (Aliprantis et al., 2002).

Recentemente foi demonstrado que a expressão elevada de TLR1 inibiu a resposta mediada por TLR2 a modulina secretada de *Staphylococcus epidermis* (Hajjar et al., 2001). A Co-transfecção de TLR1 e TLR2 em células Hela confere resposta a fatores solúveis de *Neisseria meningitidis* (Wyllie et al., 2000). Entretanto, os ligantes de TLR1 *in vivo* são lipopeptídeos triacilados e lipoproteínas micobacterianas (Takeuchi et al., 2002). Foi mostrado por Takeuchi e cols (1999) que TLR1 mostra similaridade com TLR6.

O TLR5 é ativado pela flagelina, uma proteína achada na superfície de bactérias flageladas, tal como *Listeria* (Hayashi et al., 2001).

O TLR3 reconhece RNA de dupla fita e induz a produção de IFN β independente das moléculas adaptadoras MyD88 e TIRAP (Toll/IL-1 receptor homology domain-containing adaptor protein (TIRAP). TLR3 é dependente de uma terceira molécula adaptadora chamada (*Toll-Interleukin 1 receptor domain*)-containing adaptor molecule (TICAM)-1 para produção de IFN β (Hiroyuki et al., 2003). A resposta de TLR3 para LPS pode ser célula-específica (Cario & Podolsky, 2000).

O TLR9 está envolvido no reconhecimento de DNA- deoxiguanilato fosfato- deoxicitidilato (CpG) bacteriano, que age como um PAMP (Chuang T, 2001). Uma vez que a citosina é metilada no genoma de mamíferos, a presença de DNA-CpG não metilada indica infecção microbiana. De forma semelhante ao lipopolissacarídeo, o DNA bacteriano induz respostas inflamatórias agudas (Hacker et al., 2000; Schnare et al., 2000). O TLR7 reconhece agonistas sintéticos tais como, imidazoquinoline, um potente antiviral; loxoribine, imunomodulador que aumenta a atividade das células natural Killer (NK) e induz a produção de citocinas incluindo IFNs e bropirimine, um imunomodulador que induz a produção de citocinas incluindo IFN β e que na clínica é usado no tratamento do carcinoma renal (Sarosdy, 1993). O TLR8 ainda não tem um ligante descrito. TLR7 e

TLR8 são altamente homólogos a TLR9. Os três receptores participam na discriminação de estruturas de ácidos nucleicos em microorganismos e TLR7 e TLR9 induzem sinalização via NF-κB (Takeda et al., 2003).

Medzhitov (2001) argumenta que os dez receptores descritos podem se associar a quase 20 combinações específicas de PAMP, e a maioria pode reconhecer qualquer classe de agente infeccioso (Figura 12).

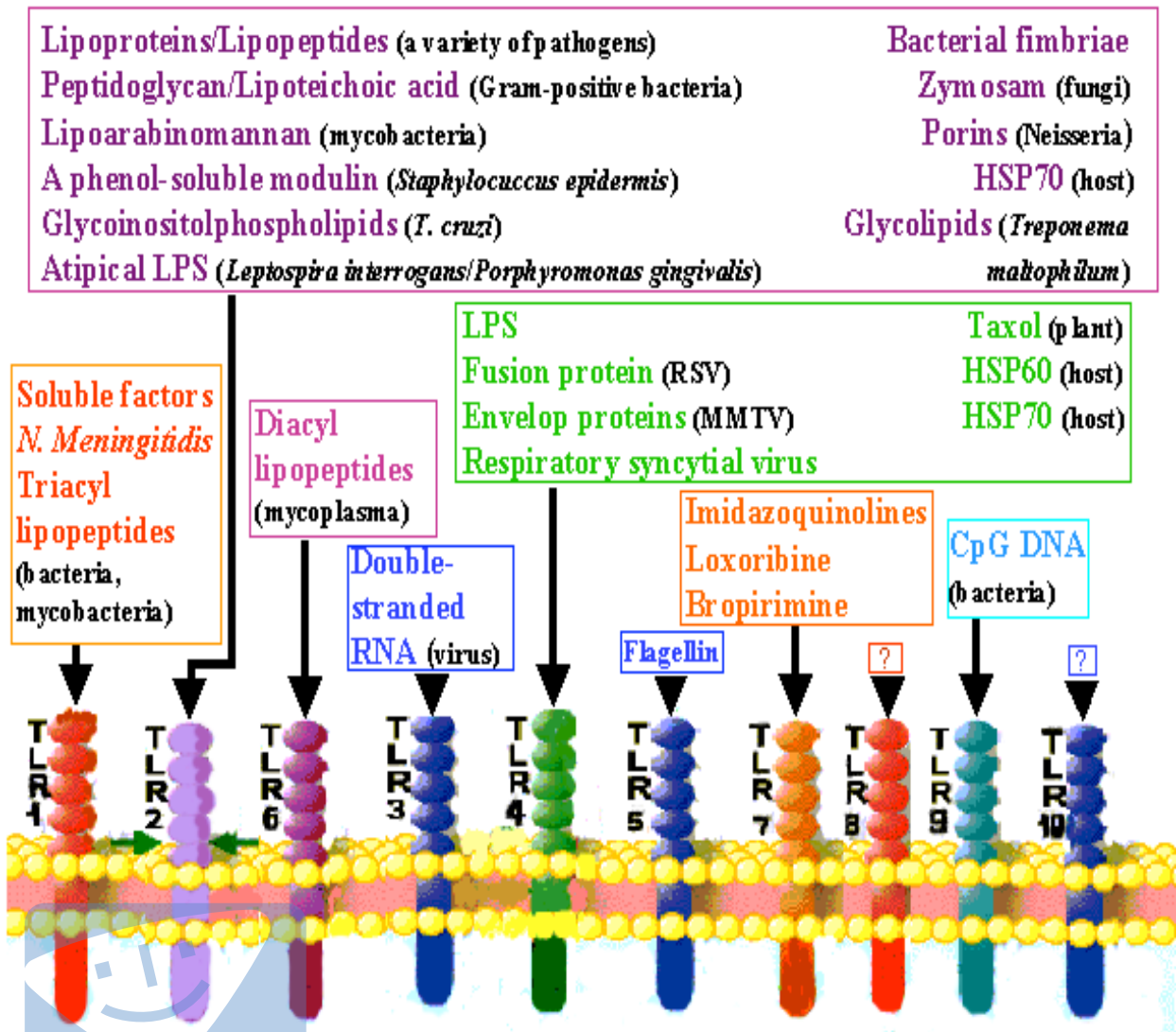


Figura 12. Modificado a partir de <http://www.biotechjournal.com/Pathways/tollvol2.htm> e Takeda et al., 2003.

A ativação realizada por um dos PAMP, dispara nos receptores Toll uma sinalização em cascata que ativa transcrição de NF- κ B e regula a atividade de genes para produzir citocinas tal como TNF e IL-1. Entretanto, também há evidência de que outras rotas são estimuladas pela ativação de TLR. (Figuras 13).

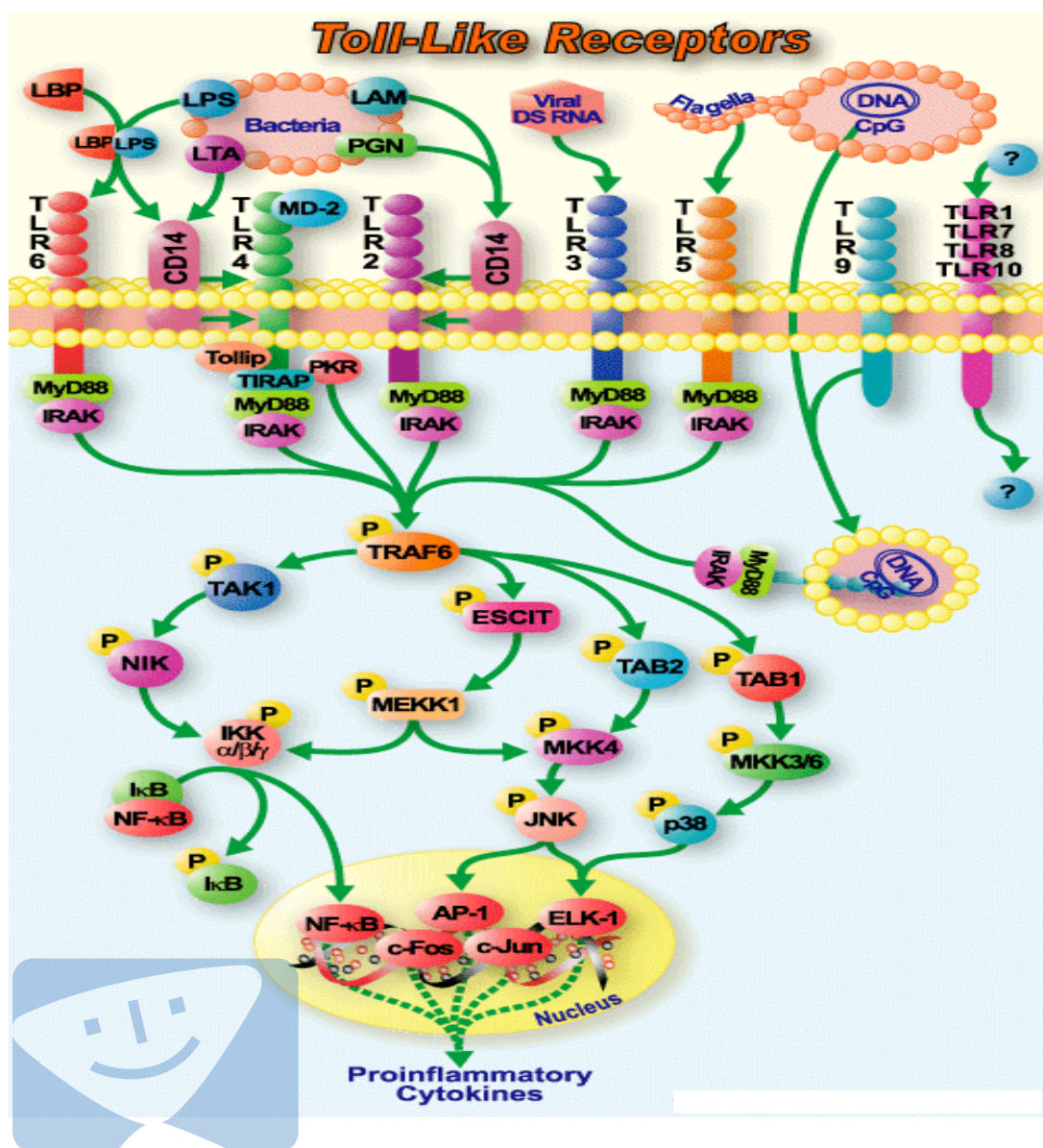


Figura 13. Fonte: <http://www.biotechjournal.com/Pathways/tollvol2.htm>

2.1.3. CONSEQÜÊNCIAS BIOLÓGICAS DA ATIVAÇÃO CELULAR VIA TLRs

Os TLRs são expressos no local da infecção em vários tipos celulares. A identificação de TLRs como mediadores da resposta celular para uma variedade diversa de ligantes bacterianos tem aumentado a compreensão do mecanismo da resposta imune inata. O reconhecimento dos ligantes bacterianos via TLR e a subsequente ativação das vias de sinalização nestas células resultam em uma série de respostas biológicas, incluindo produção de citocina, apoptose, aumento na apresentação de antígenos e da atividade antimicrobica.

2.1.3.1. PRODUÇÃO DE CITOCINAS:

Há evidência de que a indução de muitos genes é mediada, pelo menos em parte, através da ativação do fator de transcrição nuclear, o NF- κ B, incluindo um grande número de genes de citocinas. A ativação de NF- κ B resultante do reconhecimento dos ligantes bacterianos através de TLRs determina a transcrição e secreção de citocinas. Isto tem sido observado em uma variedade de sistemas experimentais que utilizam linhagens celulares transfectadas, assim como células primárias de várias origens (Hertz & Modlin, 2003). As citocinas produzidas em resposta a agonistas de TLR podem variar de acordo com o tipo celular, entre estas podemos citar IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF α . Alguns dos estudos iniciais em TLRs foram realizados em uma linhagem celular monocítica transfectada com TLR4 e se observou um aumento nos níveis de IL-1 e IL-8 nas células transfectadas. A expressão de RNA mensageiro para IL-6 também foi detectada nestas células quando estimuladas com IFN- γ (Medzhitov, 1997). Modlin e cols. (1999) demonstraram que as lipoproteínas são potentes estimuladores da produção de IL-12 por macrófagos humanos e

que a indução é mediada por receptores. Toll-like. A interleucina-12 (IL-12)²⁶ é uma citocina heterodimérica considerada essencial para resposta imune protetora contra patógenos intracelulares. A IL-12 foi descrita como a citocina que faz ponte entre a resistência natural e a resposta imune adaptativa (Cassatela, 1995). IL12 é uma citocina induzida por micobactérias (Zhang, 1994), constituindo um potente sinal para a geração de resposta de linfócitos T helper tipo 1 (Th1) (Trinchieri, 1996), responsável pela ação antimicrobica contra patógenos intracelulares (Heinzel, 1993) incluindo *Mycobacterium tuberculosis* (Romani et al., 1997). As lipoproteínas micobacterianas incluindo 19 kDa e 33 kDa, a proteína OspA de *Borrelia burgdorferi* e uma lipoproteína Tp47 de *Treponema pallidum* induzem a produção de IL-12 em macrófagos e células dendríticas. O bloqueio de TLR2 com anticorpo monoclonal específico inibe a capacidade dos macrófagos produzirem IL-12 (Brightbill, 1999; Krutzik, 2003). Os receptores Toll também podem ativar resposta imune inata incluindo a geração de óxido nítrico (NO), um mecanismo microbicida direto (Brightbill, 1999).

A produção de citocinas dependentes de TLR tem sido demonstrada em camundongos e pode explicar a resistência do camundongo deficiente de TLR4 ao choque endotóxico induzido por LPS. O TNF α é um dos mediadores primários de choque séptico, e macrófagos peritoniais de camundongos selvagens produzem significativamente mais TNF α que em camundongos que sofrem uma mutação natural em TLR4 (Hoshino et al., 1999). Além disso, células de camundongos deficientes de TLR4 falham na produção de óxido nítrico quando ativados por IFN- γ e estimulados com LPS. Estes achados demonstram a importância de TLR4 como mediador da resposta a LPS no início da resposta imune celular e para a eliminação de agentes infecciosos.

Outros TLRs têm sido mostrados como mediadores na produção de citocinas sendo que as células expressando TLR9 produzem IL-8 e TNF α (Bauer et al., 2001).

Camundongos injetados com flagelina bacteriana, um agonista de TLR5, são capazes de produzir IL-6 (Hayashi et al., 2001). Tem sido demonstrado que células endoteliais e epiteliais podem expressar e responder aos agonistas de Toll produzindo citocinas. Dada a

²⁶ A IL-12 é produzida principalmente por monócitos/macrófagos e células B. Entretanto, investigações realizadas por Cassatela (1995) demonstraram que neutrófilos estimulados com LPS e IFN- γ produzem IL-12 p35, IL-12 p40, e também induzem a secreção de IL-12 p70.

importância das citocinas na resposta imune e na resposta inflamatória, a função de TLRs mediando a produção de citocinas coloca esta família de receptores numa posição relevante na defesa contra patógenos bacterianos.

2.1.3.4. TLR ENTRE IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA

As células dendríticas (DCs) também expressam TLR2 e, assim como os monócitos, produzem IL-12 em resposta a lipoproteína 19 kDa de *M. tuberculosis* e 19 kDa /33kDa de *M. leprae* (Thoma-Uszynski et al. 2000; Krutzik, 2003). Entretanto, os monócitos são capazes de produzir IL-10, enquanto as DCs não produzem IL-10. Isto sugere uma expressão diferencial de citocinas em células da mesma origem que expressam TLR2. A produção de IL-10 por monócitos e não por DCs sugere que a ativação de Toll em monócitos pode exercer um efeito regulador no desenvolvimento de células T helper, assim impedindo uma ativação excessiva da resposta imune. Os mecanismos responsáveis por estas diferenças na produção de citocinas não são conhecidos. Recentemente foi demonstrado que outros receptores Toll dimerizam com TLR2 e influenciam respostas dependentes deste receptor. Pode-se pensar, então, que a expressão diferencial de outros TLRs ou de moléculas adaptadoras utilizadas na via de sinalização possa contribuir para a produção diferencial de citocinas em monócitos e em células dendríticas humanas.

As células de origem monocítica, incluindo macrófagos e células dendríticas, participam como células apresentadoras de antígeno para a ativação de células T. O perfil de citocinas afeta as funções das células produtoras de citocinas Th1 e Th2 e, desta forma, determinam a tendência para uma resposta imune mediada por célula ou para uma resposta humoral, respectivamente. Assim, a expressão e ativação de TLR nas células monocíticas tem um efeito potencial no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Krutzik, 2003). A hanseníase vem sendo usada como modelo para o entendimento deste fenômeno. Como dito anteriormente, os padrões da resposta imune Th1 x Th2 na hanseníase foram descritos pelos grupos de Robert Modlin e Barry Bloom em 1991 (Yamamura et al, 1991; Salgame et al, 1991). Os dois grupos demonstraram que clones de linfócitos isolados da lesão de pacientes com hanseníase lepromatosa apresentam um perfil predominante de citocinas do

tipo Th2 que está associado com a produção de IL-4. Já os pacientes tuberculóides apresentariam uma resposta imune do Th1 promovida por IL-12, que é produzida pelas células monocíticas (Yamamura et al, 1991; Salgame et al, 1991; Sieling, 1994). Outros ensaios realizados pelo grupo de Robert Modlin (2003) demonstraram que lesões de pele de pacientes tuberculóides têm uma frequência maior de células positivas para receptores Toll 2 do que nas biopsias de pacientes lepromatosos (Krutzik, 2003).

2.1.3.5. TLRs E RESPOSTA INFLAMATÓRIAS

TLRs respondem a uma série de ligantes bacterianos e participam da resposta imune inata e adaptativa. Entretanto, a produção de citocinas dependentes de TLR pode ser prejudicial para o hospedeiro quando essa produção se torna excessiva. A função de TLR nas infecções bacterianas deve, portanto atingir um equilíbrio.

Os neutrófilos são participantes ativos da resposta imune inata e contêm agentes microbicidas como grânulos citoplasmáticos. A citocina IL-8 é um fator quimiotático de neutrófilo, secretado por uma variedade de tipos celulares incluindo monócitos e células epiteliais. A infiltração prolongada de neutrófilos mediada por IL-8 pode causar injúria no tecido devido à liberação de enzimas proteolíticas dos grânulos de neutrófilos. Na acne, uma lesão encontrada na pele de indivíduos afetados pelo *Propionobacterium acne*, encontra-se um grande número de células inflamatórias incluindo neutrófilos e monócitos expressando TLR2. Além disso, tem sido demonstrado que extrato de *P. acnes* pode ativar monócitos via TLR2 e induzir a produção de IL-8 (Kim et al., 2002).

A inflamação devido à ativação de Toll pode também contribuir para uma diminuição progressiva das funções do pulmão em pacientes com fibrose cística. Estes pacientes são susceptíveis à infecção por bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia cepacia* e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A colonização com pelo menos um destes micróbios envolve um intenso infiltrado de neutrófilos. Recentemente tem sido mostrado que o sobrenadante de cultura de *P. aeruginosa*, lipopeptídeos bacterianos e LPS induzem a secreção de IL-8 em culturas de células epiteliais (Becker et al., 2000).

O TLR também tem sido envolvido na destruição óssea em modelos murinos. Infecção de camundongo com um mistura de 4 bactérias anaeróbicas resultou em destruição óssea peri-apical, porém uma destruição significativamente menor foi observada em camundongos deficientes de TLR4 do que em camundongos do tipo selvagem. A destruição óssea foi correlacionada com os níveis de IL-1 α e IL-1 β na lesão peri-apical, sugerindo que a produção de citocina mediada por TLR4 contribui para a destruição óssea induzida pela infecção (Hou et al., 2000). Desta forma, Toll participa como mecanismo de defesa na resposta imune do hospedeiro e uma superprodução pode levar a dano no tecido, imunopatologia como na injúria de tecido mediada por inflamação e apoptose vista no choque séptico.

Stephan Krutzik e colaboradores (2003), avaliaram a ativação e regulação de TLR2 e TLR1 em pacientes com hanseníase. Como dito anteriormente, os padrões de resposta imune Th1 (pólo TT) x Th2 (pólo LL) (Yamamura et al., 1992; Salgame et al. 1991) na hanseníase caracterizam a resposta imune mediada por células e humoral, respectivamente. Neste estudo foi demonstrado que TLR2 e TLR2-TLR1 heterodímeros foram ativados em monócitos e células dendríticas após estímulo com *M. leprae* e com os lipopeptídeos 19kDa e 33 kDa de *M. leprae*. Ficou demonstrado também que não há diferença nas quantidades de TLR2 circulantes nos pacientes TT e LL. Um achado importante neste estudo foi que a ativação do heterodímero TLR2-TLR1 aumenta a expressão de citocinas Th1 e induz a inibição das citocinas IL-4 e IL-10. A análise de biópsias de pele de pacientes com hanseníase mostrou alta expressão de TLR2 e TLR1 em monócitos e células dendríticas de pacientes tuberculóides quando comparadas com pacientes lepromatosos (Krutzik et al., 2003). A conservação de Toll através da evolução mostra a importância desta classe de receptores como mediadores da resposta imune inata e sugere uma função essencial de TLR na geração da resposta imune protetora.

2.1.3.4. POLIMORFISMO DE TLRs

Em humanos, vários estudos têm revelado a associação entre mutações de TLRs e a susceptibilidade para infecção bacteriana e resposta para LPS. Uma mutação no domínio extracelular do gene de TLR4 foi associada com a resposta diminuída para LPS inalado

(Arbour et al., 2000). Análises em pacientes com choque séptico causado por bactérias Gram-positivas revelaram que estes pacientes tinham uma mutação em TLR2 mais elevada do que a população normal e daquela de pacientes sofrendo de sepsis causada por bactérias Gram-negativa (Lorenz et al, 2000).

A primeira descrição sobre polimorfismo em receptores Toll na hanseníase foi feita em 2002 e ficou demonstrado que a falha de uma resposta imune mediada por células em pacientes LL estaria associada com a mutação de TLR2 Arg677Trp (Kang et al., 2001). O mesmo grupo mostrou posteriormente que monócitos de pacientes apresentando a mutação para TLR2 eram menos responsivos para *M. leprae* e que a produção diminuída de IL-12 em pacientes lepromatosos quando comparada com pacientes tuberculóides estava associada a esta mutação. (Kang et al. 2002). Foi mostrado também que a mutação TLR2 Arg677Trp aboliu a ativação da via NF- κ B em resposta para *M. leprae* e *M. tuberculosis* (Bochud et al., 2003).



3. APOPTOSE

A morte celular é um processo fisiológico natural, no qual bilhões de células morrem todos os dias, enquanto um número similar de novas células é criado para permitir o desenvolvimento e manutenção dos órgãos. A apoptose é uma forma de morte programada, geneticamente controlada morfológica- e bioquimicamente definida. Ocorre durante o desenvolvimento e homeostasia dos tecidos dos organismos multicelulares. É um processo consumidor de energia autodestrutivo e conseqüente à ativação de genes específicos que são filogeneticamente conservados. Este tipo de morte celular difere da morte por necrose. Esta é patológica ou acidental e ocorre quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e isquemia. A necrose pode ter ainda origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus. Esse tipo de morte celular tem como protótipo a necrose isquêmica, caracterizada pela depleção do ATP intracelular, edema da célula com desagregação das organelas e ruptura da membrana plasmática. Apesar das vias de apoptose e necrose serem distintas, elas se sobrepõem *in vivo* (Suda et al., 1993; Hengartner, 2000). (Figura 14). Um evento que produz necrose pode desencadear apoptose no tecido adjacente e vice-versa.

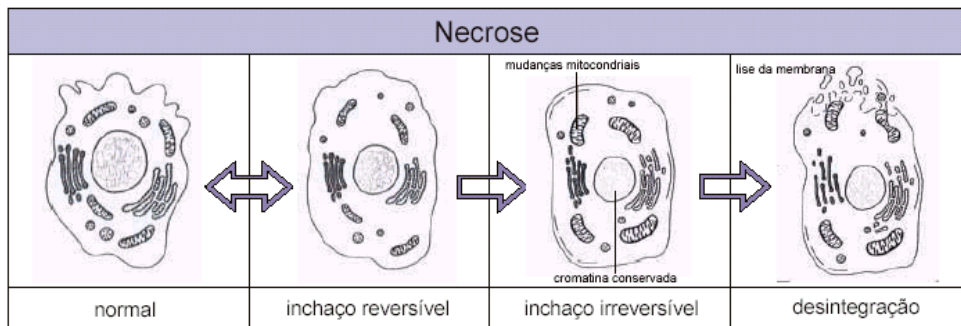


Figura 14 BioAgency. www.bioagency.com.br

Em 1972, John Kerr, Andrew Wyllie e Alastair Currie descreveram os diferentes aspectos das células na morte programada e na patológica. Para distinguí-los, esses autores adotaram a palavra grega *apoptosis*, para distinguir este tipo de morte celular da *necrosis* (necrosar). A palavra apoptose em grego arcaico significa "o ato de cair", como caem as

pétalas das flores e as folhas das árvores no outono, e foi escolhida porque sugere perdas (a morte celular, no caso) benéficas, necessárias ao bom funcionamento e à sobrevivência do organismo (Kerr et al., 1972). A expressão morte celular programada, do inglês “programmed cell death” (PCD) abrange todas as vias através do qual uma célula morre, e é frequentemente usada como sinônimo de apoptose. O termo morte celular programada é derivado da biologia do desenvolvimento para designar eliminação das células durante a embriogênese, morfogênese, nos processos de desenvolvimento, diferenciação e seleção celular (Sen, 1992). Ela participa na fisiologia de vários sistemas celulares tais como em neutrófilos que possuem tempo de vida pré-estabelecido, na eliminação de células T auto-reativas, na regulação da proliferação das células imunes, na involução de células desprovidas de fatores de crescimento e nas células que servem como alvo para células T, células natural killer ou mecanismos citotóxicos celulares dependentes de anticorpos (Cohen, 1993; Kroemer et al, 1998).

A apoptose é reconhecida como um importante mecanismo de defesa contra vírus, parasitas e bactérias, tanto durante a imunidade inata como na imunidade adquirida. Morfológicamente, as células apoptóticas apresentam características tais como: condensação e fragmentação da cromatina nuclear acompanhada de condensação da célula. Há fragmentação do DNA em fragmentos chamados nucleosomo, Na microscopia ótica condensação da cromatina nuclear (picnose) com proeminência nuclear, agregação de cromatina, e vacuolização citoplasmática. Na microscopia eletrônica, enquanto a membrana e as organelas permanecem intactas.(Figura 15). O processo é seguido pela formação de corpos apoptóticos que são subseqüentemente fagocitados por células adjacentes não (macrófagos) sem necessitar processo inflamativo.

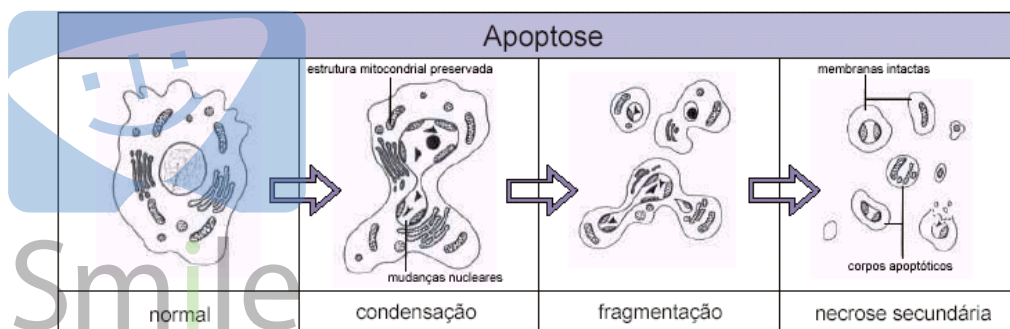


Figura 15. BioAgency. www.bioagency.com.br

As alterações promovidas pela apoptose resultam da ativação de proteases e endonucleases endógena²⁷, indicada através do padrão característico de fragmentação²⁸ internucleosômica da cromatina. Nos vertebrados superiores a apoptose é primordial para o desenvolvimento e função do sistema imune.

Uma das principais características da morte celular programada é a expressão de receptores de superfície específicos que são utilizados por fagócitos no reconhecimento e englobamento de células mortas evitando, desta forma, que os conteúdos intracelulares sejam liberados causando destruição do tecido, inflamação e apresentação de antígenos intracelulares (Arends & Willie, 1991; Savill 1993).

A morte celular programada de células infectadas pode trazer benefícios pois reduz a sobrevivência do patógeno resultando em diminuição da sua multiplicação (Hasnain et al.,1997). Patógenos virais, bacterianos e protozoários tem desenvolvido estratégias diferentes para modular apoptose da célula hospedeira. Sabe-se que os vírus podem interferir tanto com os mecanismos altamente conservados de morte celular programada ou com mecanismos reguladores das células dos mamíferos, constituindo dessa forma um mecanismo de escape para o patógeno oral. A capacidade de inibir a apoptose é também chave para a transformação da célula hospedeira pelos vírus oncogênicos. (Barry and McFadden 1998; Gao and Kwaik 2000). Além de ser induzida por patógenos a apoptose pode ser induzida por outros agentes tais como quimioterápicos, irradiação, ausência de fatores de crescimento, DNA danificado, hipóxia (Vaux and Strasser 1996; Yuan 1997; Evan e Littlewood, 1998); oxidantes ou estimulantes do metabolismo celular oxidativo²⁹. A radiação ultravioleta e ionização são capazes de gerar H₂O₂ e OH• e induzir apoptose. O óxido nítrico (NO), um oxidante, tem sido descrito como um indutor de apoptose em

²⁷ Nuclease(s) endógena(s), responsáveis pela fragmentação do DNA, são dependentes da presença de ions Ca²⁺ e Mg²⁺. Desta forma, a fragmentação do DNA pode ser inibida através de queladores de cálcio extracelulares (EDTA) ou intracelulares (BAPTA-AM, quin-2) em várias situações.

²⁸ No DNA clivado observam-se fragmentos de 180-200 pares de base por eletroforese em gel de agarose com padrão típico de escada, enquanto na necrose o DNA clivado é quebrado ao acaso e é visto como um rastro (Gerschenon & Rotelo, 1993; Duke et al., 1996).

²⁹ Buttke & Sandstrom (1995) hipotetizaram que produtos reativos do oxigênio, superóxido dismutase, catalase, peroxidase, radicais livres, tocoferol, carotenóides, ácido ascórbico ou lactoferrina e transferrina causam stress oxidativo e consequentemente induzem apoptose.

macrófagos e monócitos (Rojas et al, 1997). A liberação de perforina e granzimas pelas células “natural killer” (NK) cells ou linfócitos T citotóxicos antígeno específicos (CTL) induz apoptose em células alvo (Trapani 2000).

A presença de tumores (benigno e maligno) é um estado patológico resultante de um aumento na divisão celular ou de uma taxa reduzida da morte das células. A falha no mecanismo de apoptose normal permite a proliferação de células mutantes assim como divisão celular espontânea associada com o câncer. Muitas células cancerígenas manifestam resistência aos estímulos fisiológicos que ordinariamente provocariam apoptose em células normais. Devido a esta resistência, células tumorais podem multiplicar e sobreviver em muitas regiões inóspitas do corpo (Thompson, 1995). Vários oncogenes e proto-oncogenes (c-fos, c-jun, c-myc, rb-1, p53 e Bcl-2) são conhecidos por ter uma função crítica na regulação da apoptose, por exemplo^{30,31}. (Tabela 3).

³⁰ A proteína anti-apoptótica baculovírus p53 (Henkart & Grinstein, 1996) foi analisada e há uma função crítica na prevenção do câncer. O gene c-myc é um homólogo celular do oncogene viral v-myc, que é estabelecido em um número de retrovírus de aves e felinos induz leucemias e carcinomas. O oncogene c-myc tem sido envolvido no controle da proliferação celular normal. Em células tumorais, expressão elevada ou desregulada de c-myc sugere uma função no estágio da carcinogênese. A expressão não controlada de c-myc quando combinada com a proliferação celular é um potente indutor de morte celular programada (Evan et al., 1992).

³¹ Foi proposto que a atividade protetora de Bcl-2 é devido a sua atuação como antioxidante, neutralizante de efeitos oxigênio reativos, que são moléculas efetivas para várias vias de morte apoptótica. Isto sugere que Bcl-2 deve proteger as células dos produtos oxigênio reativo durante o curso da síntese de ATP (Henkart & Grinstein, 1996).



Inibidores de apoptose

Inibidores fisiológicos		Agentes farmacológicos	
1. Fatores de crescimento 2. Matrix extracelular 3. Ligante CD40 4. Amino ácidos neutros 5. Zinco 6. Estrógeno 7. Andrógenos	1. Adenovírus E1B 2. Baculovírus p35 3. Baculovírus IAP 4. Vírus da varíola bovina crmA 5. Epstein-Barr vírus BHRF1, LMP-1 6. Vírus de febre suína africana LMW-5 HL 7. Herpesvirus δ 1 34.5	1. Inibidores de calpaina 2. Inibidores de cisteína protease 3. Promotores de tumores PMA Phenobarbital α -hexaclorociclohexane	

Indutores de apoptose

Ativadores fisiológicos	<i>Indutores relacionados à lesão</i>	<i>Agentes associados à terapia</i>	Toxinas
1. Família TNF Ligante FAS TNF Fator de crescimento transformador β 3. Neurotransmissores Glutamato Dopamina N-methyl-D-aspartate 4. Retirada do fator de crescimento 5. Perda de aderência à matrix 6. Cálcio 7. Glucocorticóides	1. Choque térmico 2. Infecção por vírus 3. Toxinas bacterianas 4. Oncogenes myc, reel E1A 5. Supressores de tumores p35 6. Células T citolíticas 7. Oxidentes 8. Radicais livres 9. Deprivação de nutrientes - antimetabolitos	1. Drogas quimioterápicas Cisplatina, Doxorubicina, Bleomicina, citosina, arabinosida, mostarda nitrogenada, metotrexate, vincistrina, 2. Radiação gama 3. Radiação ultravioleta	1. Etanol 2. Peptídeo β amiloide

Tabela 3: Inibidores e indutores de apoptose.

A proteína Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia) tem uma função central como molécula repressora de apoptose (Ashwell et al., 1994). A Bcl-2 tem sido demonstrada como responsável pela regulação de apoptose em células epiteliais, neurais e linfóides (linfócitos T maduros), entre outros (Thompson, 1995). A molécula Bcl2 é encontrada na face citoplasmática da membrana externa da mitocôndria, no retículo endoplasmático e no

envelope nuclear (Porter, 1999). (Figura 15). A proteína Bcl-2³² interage com outra proteína, chamada Bax, formando homodimeros (Oltval et al., 1993) e a interação entre estas duas proteínas pode determinar sensibilidade e resistência na indução para apoptose. A permeabilização da mitocôndria induz a liberação de vários dos seus componentes, entre estes include citocromo *c*, SMAC (também conhecido como Diablo) e AIF (fator indutor de apoptose) (Figure 15). O citocromo *c*, um componente essencial no transporte de elétrons, é importante nas reações de oxi-redução celular que ocorre no interior respiração mitocondriana. Após ser liberado no citoplasma, o citocromo *c* leva a formação de um complexo (apoptosomo) contendo Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1), o iniciador procaspase-9 e citocromo. Este complexo leva a clivagem de procaspase-9 e inicia a cascata das caspases efetoras. As caspases³³ (pró-enzimas) são encontradas ativadas por sinais indutores de apoptose, como por exemplo proteinases e granzima B. A liberação de SMAC pela mitocôndria ajuda na inibição dos inibidores de caspase conhecidos como IAPs (apoptotic proteins). Estes inibidores impedem a ativação de caspase através do bloqueio da clivagem e ativação das pró-enzimas. A liberação de AIF pela mitocôndria tem sido demonstrada por iniciar uma via alternativa de morte celular. O AIF transloca-se ao núcleo, iniciando a condensação da cromatina e subsequente fragmentação do DNA (revisto por Opferman & Korsmeyer, 2003) (Figura 16).

³² A família Bcl-2 compreende proteínas pró e anti-apoptóticas. Os membros desta família possuem pelo menos 1 dos 4 domínios do Bcl2 (BH1 a BH4). As proteínas inibidoras da apoptose contêm pelo menos o domínio BH1 e BH2. As proteínas que induzem apoptose formam 2 subfamílias. Uma das subfamílias contem BH1, BH2 e BH3 ((Bax, Bak and Bok) enquanto a outra contêm apenas o domínio BH3. O domínio BH3 (Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa and Puma) pode ser considerado antagonista fisiológico das proteínas inibidoras de apoptose devido às funções de morte celular das proteínas (Adams e Cory, 1998).

³³ As caspases 2, 8, 9 e 10 compreendem as caspases iniciadoras e as caspases 3, 6 e 7 as efetoras (Porter, 1999).



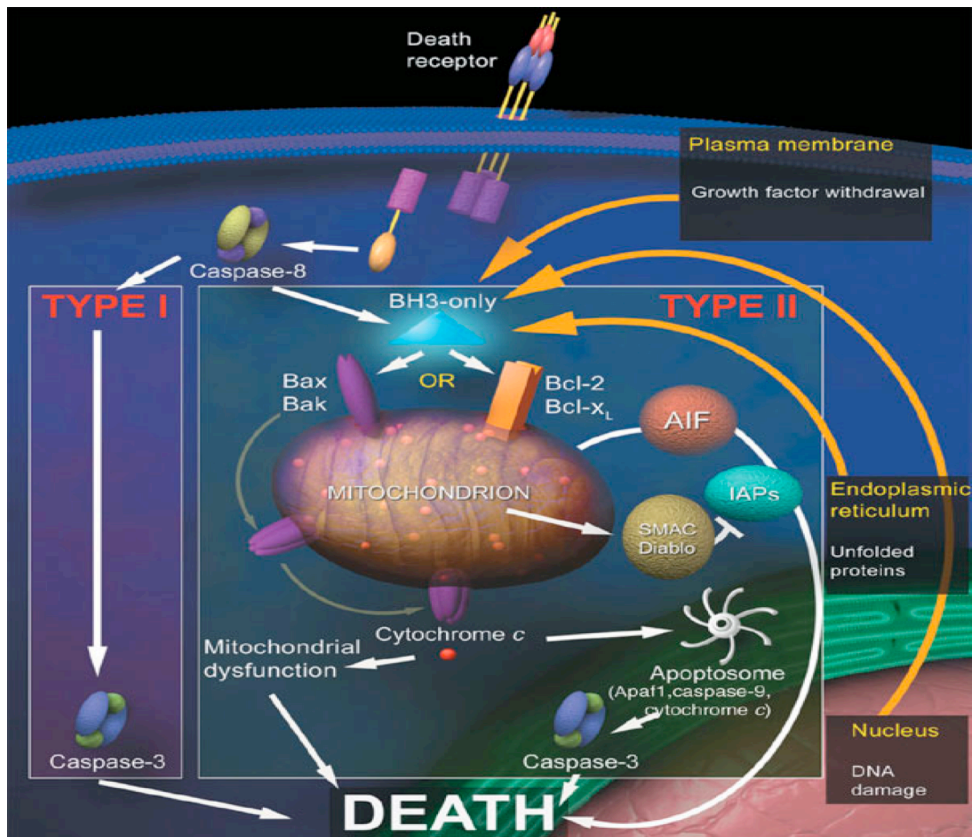


Figura 16. Fonte: *Apoptosis in the development and maintenance of the immune system* Opferman & Korsmeyer. Nature Immunology, 2003.

3.1. RECEPTORES DE MORTE CELULAR E VIAS DE SINALIZAÇÃO

A apoptose é iniciada através da ligação de ligantes relacionadas à morte célula, chamada de “ligantes morte” tais como, Fas L (ligante de Fas), TNF α , linfotoxina α , Apo3L, Apo2L ou TRAIL aos receptores celulares específicos tal como Fas (CD95, APO-1) ou receptores do fator de necrose tumoral³⁴ TNFRI, DR3 (Apo-3), DR4, DR5 (Apo-2) e DR6 (Kaufmann et al., 200; Baud et al., 2001). Estes receptores pertencem à superfamília das proteínas NGF/TNF. O TNF é uma citocina com múltiplas funções que participa em

³⁴ O fator de necrose tumoral ou TNF foi assim denominado por causar necrose hemorrágica em tumores implantados na pele e em camundongos tratados com *Bacillus Calmet-Guerin* (BCG), e ter efeito citolítico sobre uma grande variedade de linhagens celulares “in vitro” (Carswell et al., 1975; Green et al., 1975; Darzynkiewics et al., 1976).

processos de diferenciação e regulação celular (Chouaib et al., 1992). O TNF α pode existir sob duas formas: uma forma de membrana de 26 kDa, e uma forma secretada de 17 kDa. O TNF α ³⁵ é secretado por monócitos, macrófagos, células T, células NK, mastócitos, fibroblastos e neutrófilos, em resposta a estímulos *in vitro* como LPS, vírus, antígenos, e *in vivo* durante infecção, rejeição e enxerto ou injúria (Ding et al., 1992). A produção desta citocina não é constitutiva, mas transitoriamente induzida em uma variedade de células e por vários estímulos tais como vírus, bactéria, LPS e forbol esters. Há evidência de que a indução de muitos genes é mediada, pelo menos em parte, através da ativação do fator de transcrição nuclear, NF-kB. A indução das respostas celulares induzidas por TNF α é mediada por sua ligação a receptores de superfície celulares específicos (Tartaglia et al., 1991). Os dois receptores são distintos imunologicamente, um de 55KDa (TNF-R1), também conhecidas TNF α R60, CD120a, TNFRp55, Tipo 1 (ou A) e ou outro de 75kDa (TNF-R2)³⁶, também conhecidos de TNF-R80, TNF Tipo 2 (ou B), e estão presentes em todos tipos celulares exceto eritrócitos e linfócitos não estimulados. Os receptores Tipo I e II se ligam a TNF α e TNF β que são proteínas estruturalmente e funcionalmente homólogas, com afinidades semelhantes (Engelman et al., 1990). A ligação de TNF ao receptor TNF-R1³⁷ induz várias atividades, tais como citotoxicidade, proliferação de fibroblastos, e síntese de protaglandina E2 (Engelman et al., 1990; Espevik et al., 1990). Proteínas solúveis do receptor de TNF α (sTNF-R) que se ligam a TNF α têm sido encontradas na urina de pacientes com febre, em

³⁵ Os efeitos biológicos do TNF- α incluem necrose hemorrágica de tumores transplantados, crescimento e proliferação de células normais, resposta antiviral, citotóxica, imunoregulatória, inflamatória e choque endotóxico (Carswell et al. 1975). Aumenta a fagocitose, liberação de PGE₂, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, dispara degranulação e atua como um potente estímulo do metabolismo de O₂ em neutrófilos (Tsujimoto et al, 1986; Larrick et al, 1987). TNF induz a expressão de E-selectina (ELAM-1) e aumenta a expressão de ICAM-1 em células endoteliais, receptores que contribuem para aumentar a aderência de várias células ao endotélio vascular.

³⁶ TNF-R2 define a qualidade e quantidade da resposta celular para o TNF de membrana. Foi demonstrado que TNF- α de membrana pode causar morte programada em células endoteliais irradiadas e na linhagem celular COLO 205, através da ativação do receptor TNF-R1 (Mannel et al., 1996).

³⁷ Anticorpos monoclonais direcionados contra o receptor p55, que compete com a ligação para TNF- α , exercem funções agonistas semelhantes a ação de TNF- α ou induzem inibição das respostas de TNF- α . Camundongos deficientes do receptor p55 são resistentes ao choque endotóxico mas sucumbem para infecção de *Listeria monocytogenes*, indicando uma decisiva função deste receptor na defesa do hospedeiro (Pfeffer et al., 1993).

soro e urina de pacientes com insuficiência renal, na urina normal e em soros ultrafiltrados de pacientes com câncer avançado.

A glicoproteína de 43 kD, APO-1/Fas é expressa em células linfóides e não linfóides, sendo expressa em tecidos normais e neoplásicos (Clement e Stamenkovic, 1994). A ativação através de anticorpos antagonistas tal como anti-APO-1 ou anti-Fas, ou através da ligação natural do receptor a um membro da família de TNF (Fas Ligante ou Fas-L), induz transdução do sinal de apoptose naquelas células expressando o receptor. A função essencial deste receptor parece ser a deleção periférica de células T maduras, células infectadas, linfomas e células inflamatórias (Ashkenazi e Dixit, 1998) e também a estimulação da proliferação.

Os receptores Fas, TNFR1, TNFR2 tem um domínio extracelular que se estende através da membrana da célula, onde os ligantes FasL e TNF se ligam Fas e ao TNFR1, TNFR2, respectivamente. Várias proteínas e moléculas adaptadoras de transdução de sinal que transportam sinais são, ativadas após a união dos receptores aos seus ligantes. Ocorrendo uma inteira comunicação entre as diferentes vias de sinalização. Os domínios funcionais dentro de uma proteína são mostrados como blocos coloridos (Figura 17). O recrutamento de uma proteína para outra é indicado pela juxtaposição dos domínios: BID (beta interaction domain); cIAPs, (cellular inhibitors of apoptosis); FADD, (Fas associated death domain protein); IKK, (I κ B kinase); JNK, (c-Jun N-terminal kinase); MAP3K, (mitogen-activated protein 3 kinase); NEMO, (NF- κ B essential modulator protein); RIP, (receptor-interacting protein); T2K, (TRAF2-associated kinase); TANK, TRAF (family member associated NF- κ B activator); TRADD, (TNF receptor-associated death domain protein); TRAF, (TNF receptor-associated factor) (Revisto por Mak & Yeh, 2002) (Figura17).



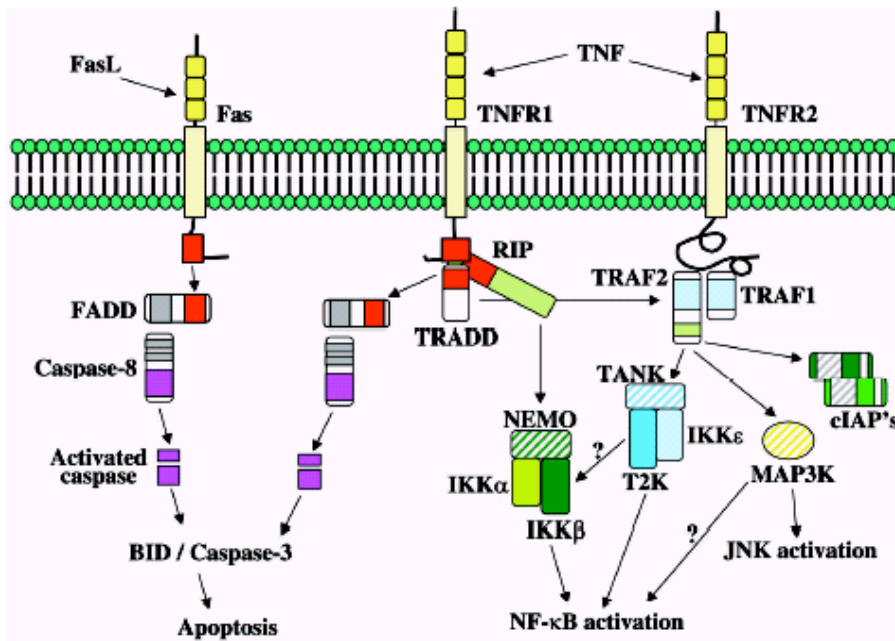


Figura 17. Sinalização intracelular via TNFR. Fonte Mak & Yeh, 2002

3.2. MORTE CELULAR INDUZIDA POR MICOBACTÉRIAS

A apoptose está implicada na geração e na resolução da inflamação em resposta a diferentes patógenos. Recentemente estudos mostraram que muitos patógenos exercem controle no processo que regula a apoptose das células infectadas. A indução da apoptose na infecção resulta de uma complexa interação de proteínas do parasita com a maquinaria de proteínas da célula do hospedeiro. O suicídio da célula resultaria na impossibilidade de sobrevivência do agente invasor, razão porque estes utilizam diferentes vias para impedi-lo. Enquanto alguns vírus patogênicos ativamente inibem a apoptose, garantindo a multiplicação de sua progene, outros, como o do sarampo, induzem apoptose em células dendríticas e células T. Na AIDS a infecção viral induz apoptose em um número maciço de células T, resultando em um comprometimento profundo do sistema imune.

Além de conferir uma vantagem seletiva para o vírus, a capacidade de bloquear a apoptose é a chave da transformação da célula hospedeira pelos vírus oncogênicos. Além de

funcionar como um mecanismo protetor na infecção bacteriana, a apoptose pode permitir a eliminação do patógeno sem inflamação e subsequente dano no tecido.

Recentemente, Zychlinsky propõe que em contraste à clássica teoria da morte celular imunologicamente silenciosa, as células ao sofrerem apoptose iniciariam um processo inflamatório o que explicaria algumas doenças inflamatórias do intestino até mesmo doenças bacterianas, tais como Shigellose onde a apoptose de macrófago parece ser a chave da inflamação Zychlinsky et al (1992 e 1996); (Hersh et al., 1998).

A apoptose também tem sido descrita em várias outras infecções bacterianas entre elas, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., micobactérias, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., etc (revisto por Zychlinsky & Sansonetti, 1997). O papel da apoptose na infecção micobacteriana é um tema controverso.

Molloy e cols. (1994) utilizando um modelo *in vitro* de infecção por BCG demonstraram que a morte de macrófagos por necrose não reduzia a viabilidade bacilar o que era observado quando se induzia a morte por apoptose adicionando ATP às culturas apontando a apoptose como um possível mecanismo de contenção da infecção.

Entretanto, quando a apoptose foi induzida por ativação do receptor Fas, utilizando como ligante anticorpos monoclonais APO1/CD95 em cultura de macrófagos infectados com *M. avium-M. intracellulare*, não se observou correlação entre a taxa de apoptose e a viabilidade bacteriana uma vez que nem todo estímulo para apoptose resulta em morte da micobactéria intracelular (Laochumroonvorapong et al., 1996).

Entretanto, a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*-Mtb induziu em macrófago alveolar humano apoptose TNF dependente e esta apoptose estava associada com uma maior taxa de morte do bacilo.

Keane e cols. (2000) demonstraram que um tipo atenuado de *Mycobacterium tuberculosis*-Mtb (H37Ra) induziu mais apoptose em macrófagos alveolares humanos que um tipo virulento de Mtb (H37Rv). Este fato se correlacionou com a susceptibilidade dos macrófagos ao efeito do TNF e verificou-se que a taxa de crescimento do H37Rv era maior do que a do Mtb atenuado H37Ra.

Análise da resposta da célula THP1 à infecção com micobactéria virulento mostra que o sinal de morte pelo TNF está bloqueado, sugerindo que a interferência com a

sinalização de morte pelo TNF pode ser um fator de virulência que permite ao Mtb driblar a defesa inata.

A primeira descrição de apoptose na hanseníase foi feita por Cree et al., (1986) que mostrou a presença de corpos apoptóticos em biópsias de pele predominantemente na forma tuberculóide sugerindo que se tratava de células epitelióides presentes nos granulomas..

Posteriormente, Gupta e cols. demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de pacientes com hanseníase sofreram apoptose espontânea após 24 horas de cultura o que foi inibido com anticorpos anti-TNF sugerindo um papel desta citocina na indução de apoptose (Gupta et al., 1999).

Interessantemente, neste estudo a inibição da apoptose por ionomicina e zinco aumentou os níveis de IL-2 em contraste com a redução do TNF (Gupta , 1999). Analizando a taxa de apoptose em biopsias de tuberculose, hanseníase e leishmania, Mustafa e cols. (2001) mostraram que apoptose era mais frequente em biópsias de nervo do que nas lesões cutâneas de hanseníase e células com características de células de Schwann (CS) expressarem Fas L e antígenos de micobactérias.

Neutrófilos obtidos de pacientes com hanseníase cultivados *in vitro* apresentaram apoptose, o que foi confirmado utilizando-se a técnica de eletroforese de DNA. Neste estudo verificou-se que a taxa de apoptose em neutrófilos de pacientes semelhantemente as células do indivíduo normal aumentava com o tempo de cultura, porém em 12 horas era significativamente maior nos pacientes. Pacientes com reação tipo II (ENL) exibiam taxa de morte celular significativamente maior quando comparados com pacientes não reacionais e com indivíduos saudáveis. Elevação dos níveis de TNF α e IL-8 foram induzidos por LPS, *M. leprae* e LAM-ML, havendo uma tendência dos pacientes com ENL mostrarem picos mais elevados de produção de TNF α em estágios mais precoces do cultivo fato que poderia estar relacionado à sintomatologia clínica destes pacientes. (Oliveira et al., 1998).

Recentemente, Hernandez e colaboradores (2003) demonstraram que macrófagos infectados com *M. leprae* sofrem apoptose, dependente e com intensidade que variou em função da quantidade de microorganismos infectantes aumentando a taxa progressivamente maior quando a taxa de infecção alcançava 20:1. Quando se adicionou IFN- γ na cultura observou-se um aumento no percentual de células apoptóticas assim como um aumento na

produção de TNF alpha. Isto leva a sugerir que a atividade microbicida atribuída ao IFN- γ pode ser influenciada pelos níveis de TNF e pela taxa de apoptose das células infectadas. A análise de RNA mensageiro (RNAm) extraído destas células mostrou que o *M. leprae* foi capaz de ativar a expressão de genes Bax e Bak envolvidas na regulação de apoptose. Finalmente, a pentoxifilina, uma droga conhecida como inibidora do TNF, quando adicionada às culturas e houve uma diminuição no percentual de apoptose e nos níveis de TNF paralelo à diminuição na expressão dos genes Bax e Bak Interessantemente leucócitos de pacientes sofrendo estados reacionais apresentaram taxa elevada de apoptose espontânea quando comparada com os pacientes não reacionais.

3.3. TLR E APOPTOSE

A indução de apoptose por componentes de micobactérias foi recentemente atribuída à ativação de receptor Toll (TLR) em células estimuladas por estes patógenos (revisto por Heldwein & Fenton, 2002).

O estímulo de células expressando TLR2 com lipopeptídeos bacterianos resulta em citotoxicidade dose-dependente e em mudanças morfológicas sugestivas de apoptose e dependente de TLR2 (Aliprantis, 1999). Outros componentes bacterianos tais como LPS e PAMPs são sinalizadores para morte celular através de TLR.

As proteínas da família Toll identificadas no genoma humano têm funções essenciais na ativação da resposta inflamatória através do reconhecimento de diferentes patógenos. Receptores Toll podem induzir respostas variadas em diferentes tipos celulares freqüentemente associadas à defesa do hospedeiro. Previamente foi descrito que TLR2 e TLR4 ativam a via de transdução de sinal NF- κ B considerado um fator de transcrição anti-apoptótico (Wang et al., 1998), entretanto tem sido descrito que em alguns sistemas o NF- κ B parece participar da indução do processo de morte. A apoptose de células HL-60, induzida por etoposídeo, é dependente de NF- κ B (Aggarwal, 2000). Sabendo-se que as bactérias patogênicas podem usar os receptores Toll para matar macrófagos, as vias de sinalização utilizadas por TLR2 para ativar NF- κ B e apoptose em resposta a BLPs (lipoproteínas bacterianas) tem sido investigada. Há evidências de que a inibição de fatores da via NF- κ B incluindo TRAF-6, NIK e IKKB, aumenta a apoptose, sugerindo que o fator

de transcrição NF- κ B é protetor contra a apoptose mediada por TLR. Por outro lado, a apoptose é bloqueada através da hiperexpressão de uma forma dominante negativa de FADD e de caspase 8. Estes dados demonstram que múltiplas vias de sinalização são iniciadas em resposta a ativação por TLR, sugerindo que o equilíbrio entre as moléculas de transdução de sinal específicas dentro da célula pode determinar o destino da célula após a ativação por TLR.

3.4. APOPTOSE EM CÉLULAS DE SCHWANN

A apoptose desempenha importante papel no período de desenvolvimento do nervo periférico. A relação íntima entre a CS e o axônio é indispensável para a sobrevivência daquela célula e a interrupção induz a apoptose dos precursores da CS (revisto por Jessen e Mirsky, 1999). Entretanto CS apoptóticas não são detectáveis no SNP normal de mamíferos. Uma variedade de doenças neurológicas, entretanto, são caracterizadas por perda específica de neurônios e apoptose parece ser o mecanismo predominante de morte celular. Entre elas se incluem Alzheimer, Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, retinopatia pigmentosa e várias formas de degeneração celular.

O stress oxidativo, a toxicidade pelo cálcio, os defeitos mitocondriais e a deficiência de fator de sobrevivência predispõe os neurônios a apoptose tanto *in vivo* como *in vitro*. Fatores de crescimento neurotróficos e a matriz extracelular alteram o limiar de apoptose destas células semelhantemente ao que se observa quando há hiperexpressão de bcl2. O nível de apoptose de uma célula nervosa é então determinado pelo efeito combinado de fatores de sobrevivência internos e externos. Estes dados se confirmaram quando outros autores utilizaram uma linhagem de célula de Schwann de rato transfectada para estudar os papéis de NGF (fator de crescimento de nervo), Bcl e CrmA (modificador de resposta de citocina) na morte de célula de Schwann *in vitro*. O estudo demonstrou que as células de Schwann transfectadas com Bcl-2 foram suscetíveis a apoptose em resposta a NGF de exógenos, ao passo que as células expressando CrmA foram resistentes (Merja Soilu-Hänninen e cols., 1999).

A injúria celular causada por radicais livres liberados nos locais de inflamação poderia induzir apoptose tal como a que se observa *in vitro*.

Nas atrofias musculares espinhais, uma desordem neurodegenerativa recessiva, um dos genes recentemente associados a esta doença é uma proteína inibidora de apoptose neuronal que é homóloga da proteína inibidora da apoptose no baculovírus. Desta forma as mutações neste gene podem resultar em maior susceptibilidade do neurônio motor a apoptose. (revisado por Thompson et al., 1995).

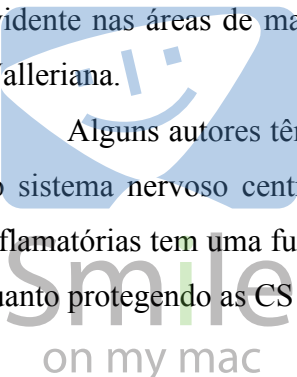
O papel de apoptose nas CSs em neuropatias periféricas também foi demonstrado. As biópsias de nervo de pacientes com neuropatia Charcot-Marie-Tooth exibiram núcleos apoptóticos, o que se correlacionou com áreas desprovidas de neurofilamento e com a identificação imunohistoquímica de células de Schwann não mielinizadas.

Neste estudo foi possível demonstrar a redução concentrada do número de CS favorecendo a apoptose. Em contraste, a presença de apoptose na neuropatia hereditária com paralisia causada por pressão (hereditary neuropathy with pressure palsies - HNPP) estaria relacionada com o estado regenerativo e com o aumento do número de CS. Estes estudos indicam que fatores que regulam o número de CS no desenvolvimento pós-natal continuam a ser importante para a sua sobrevivência na vida adulta.

O modelo experimental de desnervação em rato demonstrou que CS sofre rápida apoptose na junção neuromuscular, e que a aplicação de fatores de crescimento membros da família das neuroregulinas previnem a apoptose *in vitro*. Este foi um estudo importante para confirmar o papel de CS na regulação do crescimento neural e demonstrou que a interação trófica axônio x CS é fundamental no desenvolvimento do sistema neuromuscular (Trachtenberg et al., 1996).

Tem sido demonstrado que no modelo experimental da neurite alérgica experimental (EAN) apoptose de CS contribui com 10% da morte celular durante a fase inicial da recuperação. A apoptose de CS segue o clearance de linfócitos T e é mais evidente nas áreas de maior desmielinização porém é rara onde predomina a degeneração Walleriana.

Alguns autores têm caracterizado as citocinas como agentes citotóxicos em doenças do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico, sendo que as citocinas pró-inflamatórias tem uma função importante nas neuropatias periféricas tanto induzindo lesões quanto protegendo as CS no reparo do SNP (Lisak et al., 1997; Creange et al, 1998).



Estudando o papel do TNF α na (PDIC) poliradiculoneurite desmielinizante inflamatória crônica, Bonetti e cols. (1999) mostraram em estudos funcionais que receptores de TNF promoveriam a ativação de NF-kB e c-jun detectado em núcleo de CS em biópsias de nervo de PDIC sem evidência de apoptose. Os autores concluem que a CS é alvo de TNF, que esta citocina influencia o destino de CS por vias transcricionais de ativação e modula o seu fenótipo.

Em estudo recente, Bonetti e cols. demonstraram que CS expostas a TNF ou IFN eram capazes de induzir tanto apoptose como lise de linfócitos T. Em cultura, as CS aumentaram a expressão de Fas ligante e perforina³⁸ quando estimuladas por γ IFN e TNF. Estes autores concluíram que as CS expostas a citocinas inflamatórias têm a capacidade de induzir dano seletivo ao linfócito T e, assim, de regular a resposta imune no SNP.

A expressão de citocinas tem induzida desmielinização no PNS, e este efeito está diretamente relacionado ao dano na bainha de mielina e no axônio (Gillen et al., 1998). As células que produzem citocinas no nervo periférico incluem macrófagos residentes e recrutados, linfócitos, mastócitos, células de Schwann e, provavelmente, neurônios. Vários estudos têm indicado que astrócitos e micróglia ativados através de diversos estímulos em sítios de inflamação, injúria e degeneração do tecido nervoso central têm capacidade de produzir uma série de citocinas com atividades pró-inflamatórias semelhante as de TNF α e IL-1 β ou atividades antiinflamatórias IL-10 e TGF- β 1. Desta forma, neurônios ou células da glia expressando os receptores podem tornar-se alvos para estas citocinas (Satoh et al., 1998).

Em algumas situações a morte no sistema nervoso pode ser controlada por fatores que garantem a sobrevivência das células. Há crescente investigação da participação de TGF beta na morte de células de Schwann. TGF β (Transforming growth factor β) é expresso por células de Schwann e tem efeitos sobre a proliferação, aumenta a expressão de L1 e ICAM e fenótipo destas células (Cheng and Mudge (1996); Stewart et al.1995a,b; Scherer e Salzer, 1996, e revisto por Mirsky & Jessen, 1996). TGF β induz a morte em células de Schwann durante a fase neonatal e embriogênica das células de Schwann (Meier et al., 1999). Skoff e col. (1998) mostraram que TGF β atua sinergisticamente com TNF α

³⁸ A perforina é uma proteína formadora de poros, presente em células citotóxicas.

na morte celular de CS de rato. Neste estudo ficou demonstrado que as CS de rato expressavam os dois receptores de TNF e que a combinação de TNF com TGF causou significativa perda de adesão nas CS, assim como morte celular. Os fenômenos não se repetiram quando as citocinas foram utilizadas separadamente. Outras citocinas têm sido envolvidas na morte por apoptose em células de Schwann, como por exemplo IL-1 β e IFN- γ que atuam separadamente ou combinadas (mas não sinergisticamente) induzindo proliferação ou apoptose (Conti et al., 2002). Muitos autores têm demonstrado que a liberação de mediadores inflamatórios poderia levar direta ou indiretamente à injúria no nervo na ausência de *M. leprae* vivo. Entretanto, o efeito de bactérias e citocinas sobre células de Schwann ainda não está totalmente esclarecido.



Objetivos

Geral

Explorar os mecanismos de lesão do nervo na hanseníase envolvendo a célula de Schwann e componentes imunoinflamatórios.

Específicos

Estabelecer e caracterizar morfológicamente a linhagem de célula de Schwann humana ST88-14.

Analisar a expressão dos genes e a secreção constitutiva de citocinas (TNF α , IL-8, IL-6) e seus receptores (TNF-RI e II) na linhagem ST88-14.

Identificar a expressão de receptores Toll-like receptor 2 (TLR2) na linhagem ST88-14 e em lesões cutâneas de hanseníase.

Avaliar a expressão de moléculas MHC classe I e II na linhagem ST88-14.

Avaliar a produção de TNF- α pela linhagem ST88-14 *in vitro* na presença de *M. leprae*.

Analisar a expressão e a secreção de citocinas IL-8 e IL-6 pela linhagem ST88-14 na presença do lipopeptídeo 19 kDa de *M. leprae*.

Analisar parâmetros indicativos de morte celular por apoptose induzida via receptor Toll na linhagem ST88-14 na presença do lipopeptídeo 19 kDa de *M. leprae*.

Analisar parâmetros indicativos de morte celular por apoptose na linhagem ST88-14 na presença de *M. leprae*.

Analisar parâmetros indicativos de morte celular por apoptose em lesões cutâneas de hanseníase.

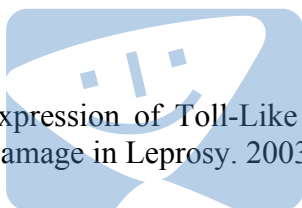


RESULTADOS

CAPÍTULO 1

EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 ON HUMAN SCHWANN CELLS: A MECHANISM OF NERVE DAMAGE IN LEPROSY

O uso de uma linhagem de célula Schwann humana no laboratório tem sido aplicada no que diz respeito ao estudo da interação entre *M. leprae* e célula de Schwann. A capacidade de ligantes de *M. leprae* induzirem apoptose em células de Schwann por TLR-2 proporciona um mecanismo pelo qual a ativação da resposta imune inata contribui para a injúria de nervo na hanseníase. Desta forma, investigamos neste estudo a expressão do receptor TLR-2 na linhagem de células de Schwann (ST88-14) e em pacientes com hanseníase. Posteriormente, a possibilidade destas células serem susceptíveis a morte pela ativação do receptor TLR-2 foi também avaliada. A expressão de TLR-2 na superfície da linhagem ST88-14 e em células primárias foi detectada bem como um aumento no número de células com características apoptóticas seguinte a incubação com a lipoproteína 19kD de *M. leprae*. A apoptose induzida pelo lipopeptídeo nas células de Schwann foi bloqueada com anticorpo monoclonal anti-TLR2. Paralelamente, foi também observado que as células de Schwann em lesões de pele de pacientes com hanseníase expressam TLR-2.



Expression of Toll-Like Receptor 2 on Human Schwann Cells: a Mechanism of Nerve Damage in Leprosy. 2003. *Infection and Immunity*. 71:1427–1433

Smile
on my mac

Expression of Toll-Like Receptor 2 on Human Schwann Cells: a Mechanism of Nerve Damage in Leprosy

Rosane B. Oliveira,^{1,2} Maria T. Ochoa,¹ Peter A. Sieling,¹ Thomas H. Rea,³
Anura Rambukkana,⁴ Euzenir N. Sarno,² and Robert L. Modlin^{1*}

Division of Dermatology, Department of Microbiology and Immunology, David Geffen School of Medicine, University of California at Los Angeles, Los Angeles, California 90095¹; Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Manguinhos, Cep 21045-900, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil²; Division of Dermatology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California 90033³; and Laboratory of Bacterial Pathogenesis and Immunology, Rockefeller University, New York, New York 10021⁴

Received 9 July 2002/Returned for modification 5 September 2002/Accepted 3 December 2002

Nerve damage is a clinical hallmark of leprosy and a major source of patient morbidity. We investigated the possibility that human Schwann cells are susceptible to cell death through the activation of Toll-like receptor 2 (TLR2), a pattern recognition receptor of the innate immune system. TLR2 was detected on the surface of human Schwann cell line ST88-14 and on cultured primary human Schwann cells. Activation of the human Schwann cell line and primary human Schwann cell cultures with a TLR2 agonist, a synthetic lipopeptide comprising the N-terminal portion of the putative *Mycobacterium leprae* 19-kDa lipoprotein, triggered an increase in the number of apoptotic cells. The lipopeptide-induced apoptosis of Schwann cells could be blocked by an anti-TLR2 monoclonal antibody. Schwann cells in skin lesions from leprosy patients were found to express TLR2. It was possible to identify in the lesions Schwann cells that had undergone apoptosis in vivo. The ability of *M. leprae* ligands to induce the apoptosis of Schwann cells through TLR2 provides a mechanism by which activation of the innate immune response contributes to nerve injury in leprosy.

For patients with leprosy, nerve damage is a major cause of morbidity. Although antibiotic therapy can eliminate the pathogen, *Mycobacterium leprae*, therapy is often initiated after nerve damage has occurred. Furthermore, nerve damage can occur during the administration of therapy, in particular, during the reactive states of erythema nodosum leprosum and the reversal reaction.

In all forms of leprosy, *M. leprae* can be detected in nerves in active lesions (24). The *M. leprae*-Schwann cell interaction is a complex process, involving multiple bacterial ligands and cellular receptors (21). One initial target for the *M. leprae* interaction with peripheral nerves is laminin 2, located in the basal lamina of the Schwann cell axon unit (22). A specific glycolipid of *M. leprae* has been shown to mediate this interaction and hence determine the predilection of *M. leprae* for nerves (17). Other mycobacteria, including *M. tuberculosis*, *M. chelonae*, and *M. smegmatis*, exhibit laminin-binding capacity for adherence to Schwann cells (14). The colonization of Schwann cells by *M. leprae* also stimulates granuloma formation and cell-mediated nerve injury (28). However, damage to cutaneous nerves can also occur in the absence of immune cells (23). Therefore, study of the *M. leprae*-Schwann cell interaction is essential for understanding the mechanisms of nerve injury in leprosy.

The ability of the host to rapidly detect invading pathogens is an important feature of the innate immune system and is mediated in part by pattern recognition receptors that recog-

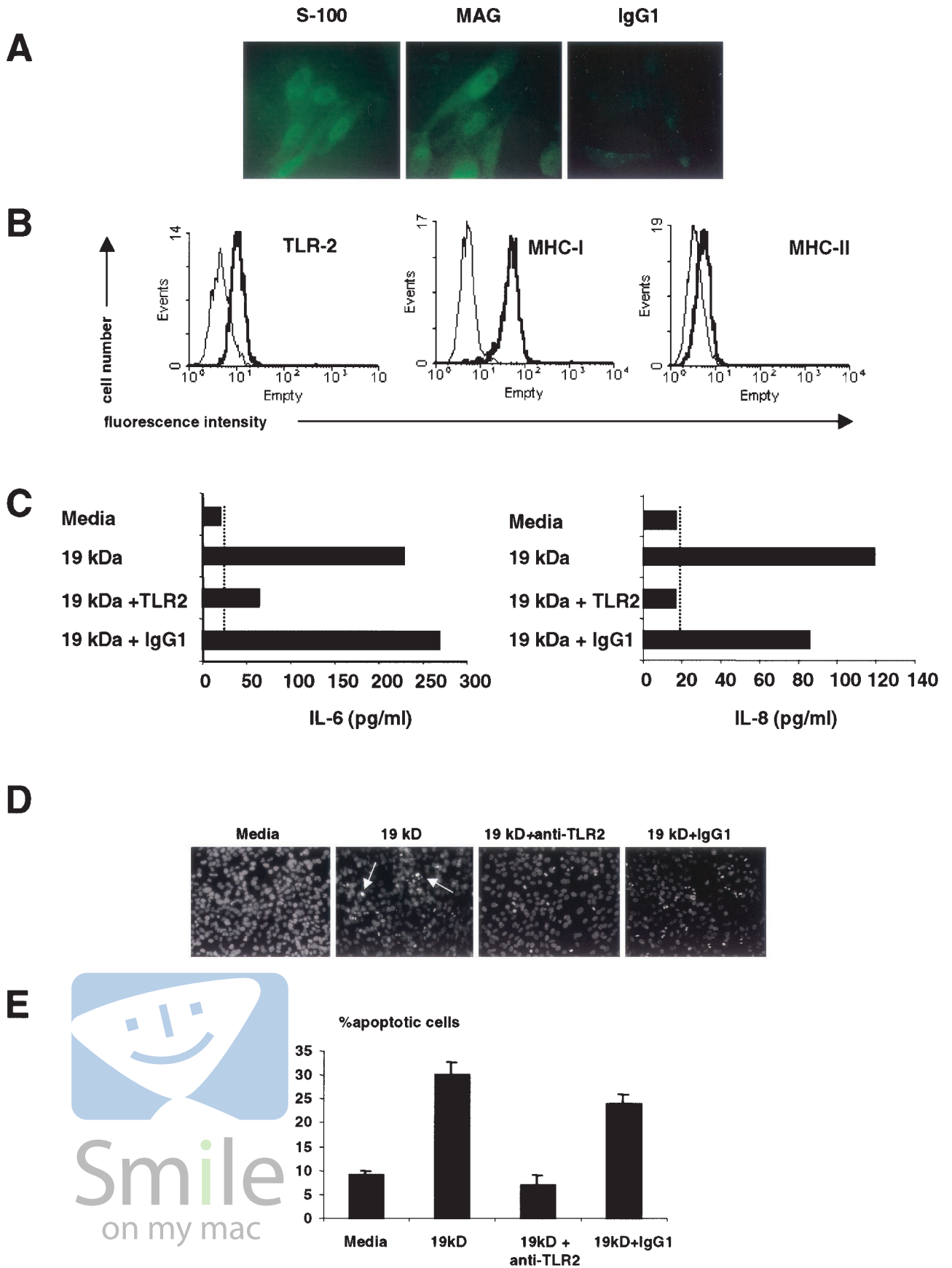
nize various classes of microbial ligands. In particular, Toll-like receptor 2 (TLR2) has been shown to be involved in the recognition of mycobacterial lipoproteins (2, 5). Evidence implicates the Toll family of receptors as having an important role in host defense. The Toll family of receptors has been conserved throughout hundreds of millions of years of evolution, to include both insects and mammals. Mutation of *toll* in *Drosophila* dramatically increases susceptibility to fungal infections (13). Mice with spontaneous or targeted mutations in TLRs are more susceptible to bacterial infections, further implicating TLRs as critical receptors in mammalian host defense (4, 8, 15, 19, 29, 32). TLRs are required for the optimal induction of innate immunity in mouse models of microbial infection (31, 33). Although the activation of TLRs can contribute to host defense through the direct induction of antimicrobial responses (30) or activation of the adaptive immune response (16), the activation of TLRs can also lead to tissue injury, including the manifestations of septic shock (20) and the induction of apoptosis (9).

Previously, whole *M. leprae* was found to favor Schwann cell survival over apoptosis (23). However, the breakdown of *M. leprae* either before or during treatment results in the release of bacterial macromolecules that could activate TLRs, including lipoproteins that activate TLR2. In the present study, we sought to determine whether microbial lipopeptides can trigger Schwann cell apoptosis via TLR2 and hence contribute to nerve damage in leprosy.

MATERIALS AND METHODS

Cell line and culture. The ST88-14 tumor cell line was established from malignant schwannomas (neurofibrosarcomas) from patients with neurofibromatosis type 1 (26) and was generously donated by J. A. Flechter (Dana Farber

* Corresponding author. Mailing address: Division of Dermatology, David Geffen School of Medicine at UCLA, 52-121 CHS, 10833 Le Conte Ave., Los Angeles, CA 90095. Phone: (310) 825-6214. Fax: (310) 206-9878. E-mail: rmodlin@mednet.ucla.edu.



Cancer Institute, Boston, Mass.). The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 100 U of penicillin/ml, 100 µg of streptomycin/ml, 2 mM L-glutamine, and 15% fetal calf serum (HyClone, Logan, Utah) (culture medium) in a humidified CO₂ incubator. The purity of Schwann cells was assessed by microscopic examination after immunostaining with antibodies to myelin-associated glycoprotein (MAG) and Ca²⁺ binding protein (S-100) as described below. For *in vitro* assays, ST88-14 cells were suspended in culture medium and cultured (7×10^4 cells/well) on 24-well plates (Falcon, Franklin Lakes, N.J.) at 37°C.

Primary human Schwann cell cultures. Human Schwann cells were prepared from nerve explants from adult human donors as described previously (6). Briefly, nerve fragments were dissected free of connective tissue, cut into small (2- to 4-mm) fragments, and placed in culture medium with enzymes to dissociate the cells. Schwann cells were further purified to homogeneity by using fluorescence cell sorting with the aid of a Schwann cell-specific p75 (low-affinity nerve growth factor receptor) monoclonal antibody (MAb) (N. Tapinos and A. Rambukkana, submitted for publication). The purity of Schwann cells was evaluated by labeling with anti-p75 antibody, which revealed >95% p75-positive cells (see Fig. 3A). These highly purified Schwann cells were seeded on mouse laminin 1 (4 µg/ml) in phosphate-buffered saline (PBS) in 200-µl chamber slide wells and grown for 2 days prior to the experiments.

Patients and clinical specimens. Patients with leprosy were classified according to the criteria of Ridley and Jopling (25). Scalpel or punch skin biopsy specimens (6-mm diameter) were obtained at the time of diagnosis from patients after they gave informed consent. The specimens were embedded in OCT medium (Ames, Elkhart, Ind.), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C until sectioned.

Antigens and antibodies. The *M. leprae* 19-kDa lipopeptide was synthesized at the University of Texas Southwestern Medical Center (gift of Michael Norgard). The following antibodies were used for immunohistochemical studies: rabbit anti-S-100 (Zymed Laboratories, South San Francisco, Calif.), mouse anti-human MAG (Chemicon, Temecula, Calif.), mouse anti-human neural cell adhesion molecule (anti-human NCAM) (DAKO, Carpinteria, Calif.), mouse anti-human TLR2 (2392; Genentech, San Francisco, Calif.), immunoglobulin G (IgG) controls (Sigma, St. Louis, Mo.), goat anti-rabbit IgG (Caltag, Burlingame, Calif.), and horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.).

Measurement of cytokines. Schwann cells were resuspended in culture medium and cultured (7×10^4 cells/well) on 24-well plates (Costar Corporation, Cambridge, Mass.) at 37°C. Human Schwann cell lines were stimulated with the 19-kDa lipopeptide (100 ng/ml) for 96 h. Cytokine levels (interleukin 1β [IL-1β] [BioSource, Camarillo, Calif.] and IL-6, IL-8, IL-12, and tumor necrosis factor alpha [TNF-α] [BD-Pharmingen, San Diego, Calif.]) in the culture supernatants were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to manufacturer instructions.

Immunoperoxidase labeling. NCAM and TLR2 expression in leprosy lesions was determined by immunoperoxidase labeling of cryostat sections of skin biopsy specimens by using anti-human NCAM, anti-human TLR2, or an isotype control antibody. Cryostat sections (3 to 4 µm) were acetone fixed for 10 min and blocked with normal serum before incubation with the antibodies for 60 min, followed by biotinylated horse anti-mouse IgG for 30 min. Slides were washed with PBS between incubations. Primary antibodies were visualized with the ABC Elite system (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.), which uses avidin and a biotin-peroxidase conjugate (ABC) for signal amplification. ABC was incubated for 30 min, followed by incubation with a substrate (3-amino-9-ethylcarbazole; Vector Laboratories) for 10 min. Slides were counterstained with hematoxylin and mounted in aqueous/dry mounting medium (Crystal Mount; Biomed, Foster City, Calif.).

Immunofluorescence labeling. Schwann cells were cultured on 24-well plates containing glass coverslips covered with 4% silane (Sigma). The samples were washed (three times for 10 min each time) with PBS and fixed in 4% parafor-

maldehyde. After the samples were washed (three times for 10 min each time) with PBS, they were incubated with primary antibodies (anti-S-100 and anti-human MAG). Secondary antibodies (fluorescein isothiocyanate [FITC]-goat anti-rabbit IgG and FITC-goat anti-mouse IgG) were added, and the mixture was incubated for 30 min at room temperature. Coverslips were mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories).

Double immunofluorescence of leprosy lesions. Two-color immunofluorescence staining was performed by serial incubation of sections with mouse anti-human NCAM (IgG2a) MAb followed by incubation with an isotype-specific fluorochrome conjugated MAb (goat anti-mouse IgG2a-specific tetramethyl rhodamine isothiocyanate [TRITC]; Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Ala.). Sections were washed and incubated with mouse anti-human TLR2 (IgG1) followed by goat anti-mouse IgG1-specific FITC (CalTag).

Confocal microscopy. Immunofluorescence sections were examined with a Leica-TCS-SP inverted confocal laser scanning microscope fitted with krypton and argon lasers. Sections and cells were illuminated with 488 and 568 nm of light after filtering through an acoustic optical device. Images decorated with FITC and TRITC were recorded simultaneously through separate optical detectors with a 530-nm band-pass filter and a 590-nm long-pass filter, respectively. Pairs of images were superimposed for colocalization analysis.

Flow cytometry. To assess the cell surface expression of TLR2, standard flow cytometric analysis was performed. Cells were harvested and blocked with human serum for 1 min at 25°C to reduce nonspecific FcR binding. Schwann cells were stained with MAbs to TLR2, major histocompatibility complex class I (MHC-I), and MHC-II for 20 min at 4°C. Cells were washed twice and incubated with phycoerythrin-labeled goat anti-mouse IgG for 20 min at 4°C. After staining, cells were washed and fixed in 2% paraformaldehyde before analysis on a Becton Dickinson (Mountain View, Calif.) FacsScan or FacsCalibur flow cytometer. Gating was set on large granular cells, and 10,000 gated events were collected from each sample. Data were analyzed by using WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Diego, Calif.).

Identification of apoptotic cells by Hoechst staining. Nuclear fragmentation of Schwann cells was assessed as a hallmark of apoptosis. ST88-14 and primary Schwann cells were seeded on 24-well plates containing glass coverslips and incubated in the presence or absence of anti-human TLR2 blocking MAb (10 µg/ml) or isotype control antibody for 30 min. Subsequently, the 19-kDa lipopeptide (100 ng/ml, 20 µg/ml) or actinomycin D (ActD) (10 µg/ml) was added in a total volume of 0.5 ml/well, and the mixture was incubated for 24 h. Control cells were cultured in medium alone. Cells were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, and stained with Hoechst dye 33258 (Sigma) for 15 min. Slides were allowed to air dry, and the nuclear morphology of cells was viewed under UV light exposure. For quantitative analysis, the percentage of nuclear fragmentation was calculated on the basis of the examination of at least 500 cells in multiple vision fields.

TUNEL assay. Apoptotic cells in leprosy lesions were identified by using the terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) method in accordance with supplier instructions (Boehringer Mannheim). Briefly, paraffin skin sections were dewaxed by heating at 60°C for 1 h, washed in xylene, and rehydrated through a graded series of ethanol. Slides were incubated in permeabilization solution (proteinase K [20 µg/ml] in 10 mM Tris-HCl) for 20 min at 37°C, followed by incubation with TUNEL reaction mixture for 60 min at 37°C. After labeling, samples were incubated with Converter-POD for 30 min at 37°C, followed by the addition of the substrate 3-amino-9-ethylcarbazole and incubation for 10 min. Slides were counterstained with hematoxylin and mounted in aqueous dry mounting medium (Crystal Mount). Negative controls included incubation with label solution instead of TUNEL reaction mixture.

Statistical analysis. Student's *t* test was used to compare the numbers of apoptotic cells in the primary human Schwann cells and human Schwann cell

FIG. 1. Expression of TLR2 and TLR2-induced apoptosis in a human Schwann cell line. (A) The human Schwann cell line expressed S-100 and MAG, markers compatible with Schwann cells. (B) Schwann cells were labeled with anti-TLR2, anti-MHC-I, and anti-MHC-II MAbs (thick lines) or isotype control antibodies (thin line), followed by phycoerythrin- or FITC-conjugated goat anti-mouse antibodies, and examined by flow cytometry. The results shown are representative of three independent experiments that gave similar results. (C) Schwann cells produced IL-6 and IL-8 in response to the 19-kDa lipopeptide. The ability of Schwann cells to release IL-6 and IL-8 in response to the 19-kDa lipopeptide was dependent on TLR2. Broken lines indicate the minimum level of detection of the cytokine ELISA. (D) The 19-kDa lipopeptide induced apoptosis in Schwann cells in a TLR2-dependent manner. Arrows indicate apoptotic cells. (E) Quantification of apoptotic cells. The nuclear morphology of apoptotic cells was assessed after Hoechst staining and exposure to UV light. The results from one representative experiment of three are shown. For quantitative analysis, percent nuclear fragmentation was calculated based on an examination of at least 500 target cells in multiple vision fields. The data are shown as mean and standard deviation.

lines. Differences between means were considered significant when *P* values were less than 0.05.

RESULTS

Schwann cell line ST88-14 expresses functional TLR2 and undergoes apoptosis in response to TLR2 ligation. In order to develop an in vitro model to study nerve damage in leprosy caused by *M. leprae*, we used Schwann cell line ST88-14 (26). Immunohistochemical analysis confirmed that the cell line expressed S-100 and (MAG (Fig. 1A), markers compatible with Schwann cells. We measured TLR2 expression by flow cytometry and found that TLR2 was expressed at moderate levels in comparison to MHC-I but at higher levels in comparison to MHC-II (Fig. 1B). We detected no change in TLR2 expression after activation with a TLR2 ligand, the active N-terminal peptide of the *M. leprae* 19-kDa lipoprotein (S. R. Krutzik and R. L. Modlin, submitted for publication). These data indicate that Schwann cell line ST88-4 expresses TLR2 constitutively and thus that Schwann cells may be responsive to microbial pattern molecules.

To investigate the functional significance of TLR2 expression on the Schwann cell line in the context of inflammation, we first evaluated cytokine production in response to the 19-kDa lipopeptide of *M. leprae*. We detected very low levels of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-12, and TNF- α were not detectable; IL-6 and IL-8 are shown in Fig. 1C) in response to the 19-kDa lipopeptide. Lipopeptide activation of IL-6 and IL-8 from the Schwann cell line was inhibited by antibodies to TLR2, demonstrating a functional TLR2 response in Schwann cells.

While evaluating their response to the 19-kDa lipopeptide, we were surprised to find that the normally adherent Schwann cells detached from cell culture plates. TLR2 ligation promotes apoptosis (3) of Schwann cells, thus, we evaluated apoptotic cell death by monitoring changes in nuclear morphology with Hoechst dye. Cells with condensed nuclei, characteristic of apoptosis, comprised $9\% \pm 0.8\%$ (mean and standard error of the mean) of the cultures in the absence of the 19-kDa lipopeptide (Fig. 1D and E), but the frequency of apoptotic cells increased to $29\% \pm 2.6\%$ in the presence of the 19-kDa lipopeptide. When cultures were incubated with an anti-TLR2 MAb prior to exposure to the lipopeptide, nuclear damage was diminished to $7\% \pm 2.1\%$ ($P < 0.05$), whereas the frequency of apoptotic cells in the presence of an isotype control antibody was $24\% \pm 2.1\%$ ($P < 0.001$). These data indicate that TLR2 ligation induces apoptosis in a human Schwann cell line.

TLR2 activation on primary human Schwann cells induces apoptosis. We next wanted to determine whether primary human Schwann cells expressed functional TLR2. Primary human Schwann cells isolated from nerves showed typical Schwann cell morphology when labeled with a MAb to Schwann cell-specific p75 (Fig. 2A). Primary Schwann cells also expressed TLR2 and high levels of MHC-I (Fig. 2B). To determine whether TLR2 might trigger apoptosis in primary Schwann cell cultures, we cultured the cells in the presence or absence of the 19-kDa lipopeptide and assessed morphologic changes characteristic of apoptosis by using Hoechst dye. Cells with nuclear fragmentation, indicative of apoptosis (Fig. 2C), were not detectable in cultures containing medium but in-

creased to $20\% \pm 2.1\%$ in the presence of the 19-kDa lipopeptide. Apoptosis was inhibited in the presence of an anti-TLR2 MAb, with $4\% \pm 2.0\%$ ($P < 0.001$) of cells showing evidence of nuclear damage, whereas the frequency of apoptotic cells in the presence of an isotype control antibody was $12\% \pm 2.1\%$ ($P < 0.05$) (Fig. 2D). These data indicate that the activation of TLR2 induces apoptosis in primary human Schwann cells.

Schwann cells in leprosy lesions express TLR2. To determine whether Schwann cells in vivo express TLR2, skin biopsy specimens from leprosy patients were labeled with MAbs to NCAM, a Schwann cell marker, and TLR2. Although we analyzed almost 20 patients representing the clinical spectrum of leprosy, it was difficult to localize intact nerve cells in the skin. Therefore, we evaluated TLR2 expression in lesions where nerve cells were evident, regardless of the form of leprosy. The NCAM antibody identified cells containing wavy nuclei typical of nerve cells in all lesions (Fig. 3A, left panel). Cells with characteristic nerve morphology were also found to express TLR2 (Fig. 3A, right panel). Immunofluorescence staining for both TLR2 and NCAM demonstrated that NCAM-positive Schwann cells expressed TLR2 (Fig. 3B). The results obtained with isotype control antibodies were negative (data not shown). These data indicate that TLR2 is expressed on Schwann cells in vivo and therefore may be susceptible to apoptosis through TLR2 ligation.

Apoptosis of Schwann cells in leprosy tissues. To determine whether TLR2 expression on Schwann cells in leprosy lesions correlated with apoptosis, DNA strand breaks were evaluated as indicative of cellular apoptosis. Nerve cells within the skin lesions of leprosy patients were stained positive by the TUNEL technique (Fig. 4), which detects DNA strand breaks. Lymphoid tissue (tonsil) was used as a control to demonstrate background levels of apoptosis. These data indicate that in leprosy, human Schwann cells undergo apoptosis in vivo, and this apoptosis correlates with the expression of TLR2 on Schwann cells in lesions.

DISCUSSION

We investigated the contribution of TLR2, a pattern recognition receptor of the innate immune system, to nerve damage in leprosy. We found that TLR2 was expressed by a human Schwann cell line, by primary human Schwann cell cultures, and on Schwann cells in skin biopsy specimens from leprosy patients. The activation of Schwann cells with a lipopeptide comprising the functional N-terminal portion of the putative *M. leprae* 19-kDa lipoprotein triggered nuclear apoptosis. Schwann cells in leprosy lesions were also found to have undergone nuclear apoptosis. These data suggest that the activation of TLR2 on Schwann cells contributes to nerve damage in leprosy.

Several mechanisms of Schwann cell injury have been thought to contribute to nerve damage in leprosy. Previously, Spierings et al. provided striking evidence that human Schwann cells process and present *M. leprae* antigen to CD4⁺ T cells in an MHC-II-restricted manner (28). The ability of these T cells to kill antigen-pulsed Schwann cells provides a mechanism by which cell-mediated immunity to *M. leprae* can contribute to nerve injury in leprosy. The release of TNF- α locally in leprosy lesions and the binding of TNF- α to its

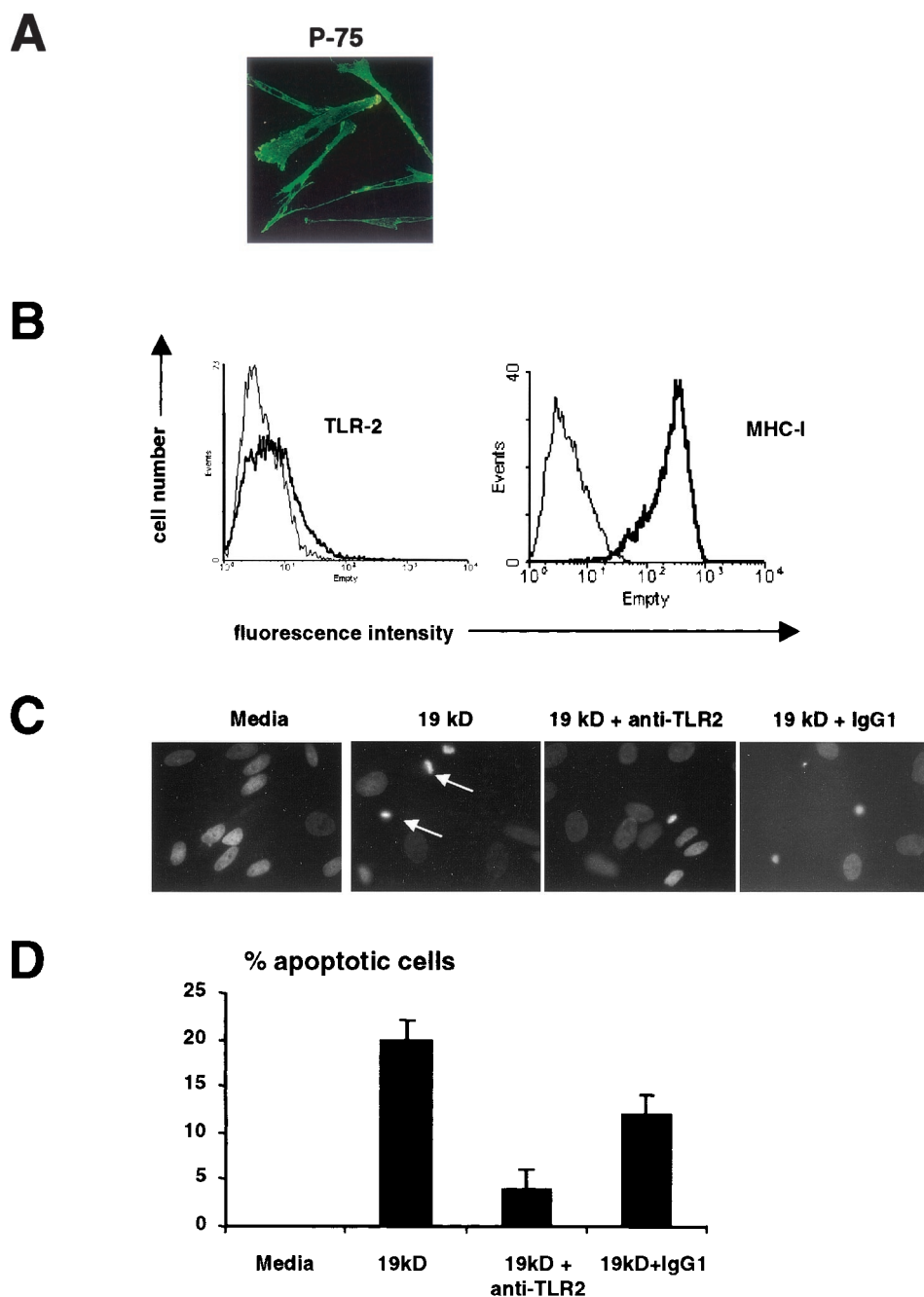


FIG. 2. Expression of TLR2 and TLR2-induced apoptosis in a primary human Schwann cell line. (A) Primary human Schwann cells isolated from nerve explants showed typical Schwann cell morphology when labeled with a MAb to Schwann cell-specific p75. (B) Primary Schwann cells expressed TLR2 and the antigen-presenting molecule MHC class I (MHC-I). Specific antibodies are indicated by thick lines; isotype control antibodies are indicated by thin lines. (C) The 19-kDa lipopeptide induced apoptosis in Schwann cells in a TLR2-dependent manner. (D) Quantification of apoptotic cells. The nuclear morphology of apoptotic cells was assessed after Hoechst staining and exposure to UV light. For quantitative analysis, percent nuclear fragmentation was calculated based on an examination of at least 100 target cells in multiple vision fields. The data are shown as mean and standard error of the mean. The data are from a single donor, since this experiment was performed to confirm the data from the cell lines.

receptors on Schwann cells may also contribute to peripheral nerve injury in leprosy (12, 27, 34). Other cytokines, including IL-1 β and gamma interferon, can also induce apoptosis in cultured Schwann cells (7). Nerve damage can also occur in the absence of apoptosis or lysis because of demyelination upon exposure to *M. leprae* in the absence of immune cells (23).

Here we found that human Schwann cells express TLR2 and that activation of TLR2 can lead to apoptosis. Recent studies showed that bacterial lipoproteins induce the apoptosis of monocytes through a TLR2-dependent pathway (2). Although we measured TLR2-dependent IL-6 and IL-8 production from Schwann cells, it is not clear at present whether inflammatory

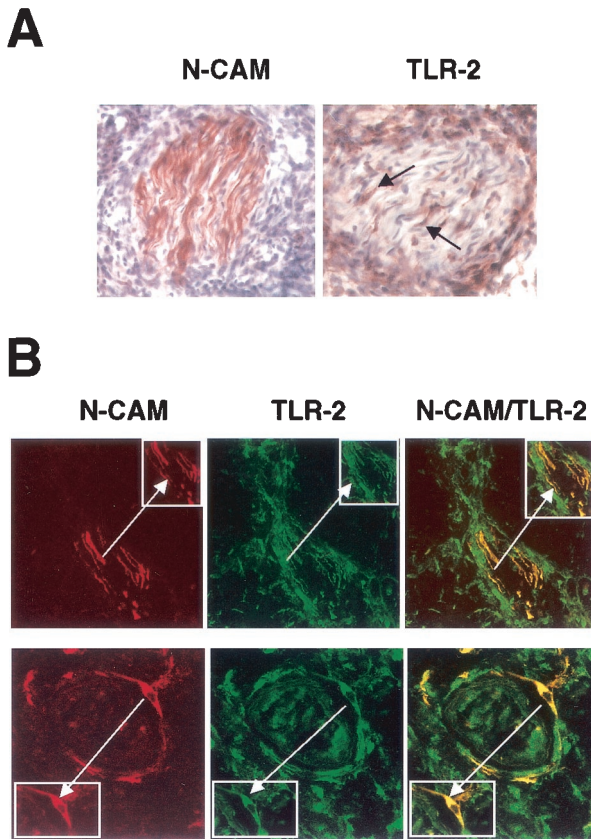


FIG. 3. TLR2 is expressed in vivo on Schwann cells in leprosy lesions. (A) Representative sections of skin biopsy specimens from leprosy patients showing the expression of NCAM and TLR2. Arrows indicate cells with wavy nuclei, characteristic of nerve cells. (B) Two-color immunofluorescence staining of skin lesions from leprosy patients. Cryostat sections of skin biopsy specimens were stained with anti-NCAM (red, left panels) and anti-TLR2 (green, center panels) antibodies. The merge of the two images (right panels) showed colocalization of NCAM and TLR2. The presence of nerves in small biopsy specimens was variable. We analyzed almost 20 patients representing the spectrum of leprosy; the lesions shown were from a patient with erythema nodosum leprosum, a reaction in lepromatous patients. The insets duplicate and highlight the doubly positive cells typical of Schwann cells (arrows). Original magnification, $\times 630$.

cytokines are involved in TLR2-mediated apoptosis. We also found that TLR2-positive Schwann cells in leprosy lesions undergo apoptosis, potentially contributing to nerve damage in leprosy. These findings do not exclude the contribution of other mechanisms, including T cells or TNF- α , to apoptosis in leprosy; rather, they allow for an additional pathway of nerve damage.

Although the induction of apoptosis following the activation of TLR2 may lead to tissue injury, apoptosis can also be a beneficial component of the host response to the pathogen. First, apoptosis, like lysis, can lead to the release of intracellular bacteria, allowing their uptake by freshly activated macrophages, which can dispose of them (11). Second, apoptosis can lead to the release of antigen, which can be taken up and presented, via MHC-I and MHC-II molecules, by professional antigen-presenting cells (1, 10). Although Schwann cells can express MHC-II molecules and present antigen to T cells (28), the activation of TLR2 in monocytes has been shown to down-regulate MHC-II expression and presentation (18). Further studies are required to determine whether TLR activation on Schwann cells directly affects antigen presentation by Schwann cells or, through apoptosis, enhances presentation by professional antigen-presenting cells. The fact that whole *M. leprae* does not induce apoptosis (23) suggests that the bacteria, when intact, can evade detection by this aspect of the innate immune system.

TLR2-induced apoptosis has been shown to involve a novel pathway requiring myeloid differentiation factor 88 and nuclear factor κ B and involving Fas-associated death domain protein and caspase 8 (3). However, the mechanism of TLR-induced apoptosis of Schwann cells remains to be investigated. The use of TLR agonists as therapeutic agents must be carefully evaluated to achieve a balance in generating proinflammatory responses without tissue injury. On the other hand, TLR antagonists could be useful in preventing immunopathologic manifestations of the innate immune response to microbial infection.

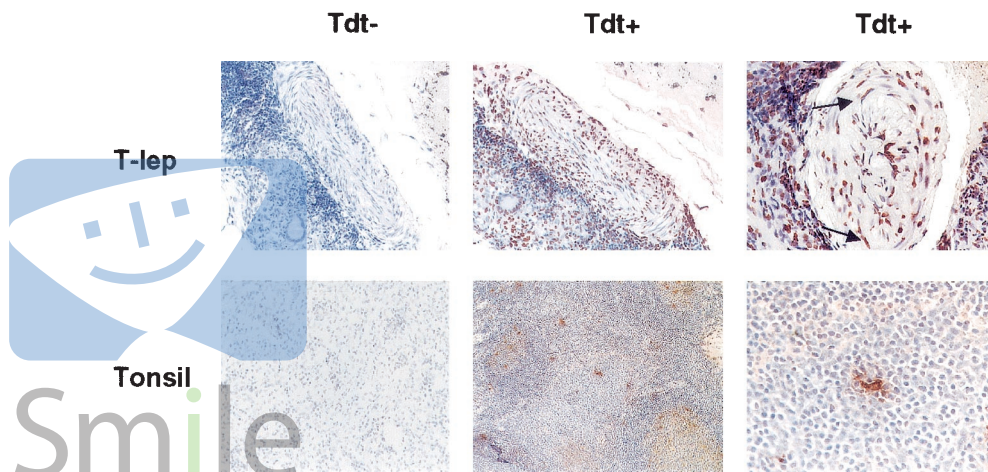


FIG. 4. Apoptotic Schwann cells in leprosy tissues. DNA strand breaks were detected on the basis of terminal deoxynucleotidyltransferase (Tdt) activity and were found in cells with a morphology typical of Schwann cells in leprosy tissues. Arrows indicate apoptosis-positive cells with wavy nuclei, characteristic of Schwann cells. Original magnifications, $\times 100$ (left and middle panels) and $\times 400$ (right panels). Tdt-, no enzyme added (negative control); Tdt+, Tdt enzyme added; T-lep, tuberculoid leprosy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michael Norgard for lipopeptide; Patrick Wood, Linda White, Nikos Tapinos, and Clare Eastby for help in generating primary human Schwann cells; and the UCLA Human Tissue Research Center for preparing paraffin-embedded slides.

This work was supported in part by NIH grants (AI07126, AI22553, and AI47866), a grant from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (to R.L.M.), and NIH grant AI45816 (to A.R.).

REFERENCES

- Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**:86–89.
- Aliprantis, A. O., R.-B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science* **285**:736–739.
- Aliprantis, A. O., R. B. Yang, D. S. Weiss, P. Godowski, and A. Zychlinsky. 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J.* **19**:3325–3336.
- Anderson, G. W. J., and J. V. Osterman. 1980. Host defenses in experimental rickettsial pox: genetics of natural resistance to infection. *Infect. Immun.* **28**:132–136.
- Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski, and R. L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* **285**:732–736.
- Casella, G. T., R. P. Bunge, and P. M. Wood. 1996. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* **17**:327–338.
- Conti, G., A. De Pol, E. Scarpini, F. Vaccina, M. De Riz, P. Baron, M. Tiritico, and G. Scarlato. 2002. Interleukin-1 beta and interferon-gamma induce proliferation and apoptosis in cultured Schwann cells. *J. Neuroimmunol.* **124**:29–35.
- Cross, A., L. Asher, M. Seguin, L. Yuan, N. Kelly, C. Hammack, J. Sadoff, and P. J. Gemski. 1995. The importance of a lipopolysaccharide-initiated, cytokine-mediated host defense mechanism in mice against extraintestinally invasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* **96**:676–686.
- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**:3749–3752.
- Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R. M. Steinman. 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **188**:2163–2173.
- Kaufmann, S. H. E. 1988. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunol. Today* **9**:168–174.
- Khanolkar-Young, S., N. Rayment, P. M. Brickell, D. R. Katz, S. Vinayakumar, M. J. Colston, and D. N. Lockwood. 1995. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin. Exp. Immunol.* **99**:196–202.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**:973–983.
- Marques, M. A., n. Ant, V., E. N. Sarno, P. J. Brennan, and M. C. Pessolani. 2001. Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J. Med. Microbiol.* **50**:23–28.
- Medina, E., and R. J. North. 1998. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp1* genotype. *Immunology* **93**:270–274.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. J. Janeway. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394–397.
- Ng, V., G. Zanazzi, R. Timpl, J. F. Talts, J. L. Salzer, P. J. Brennan, and A. Rambukkana. 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell* **103**:511–524.
- Noss, E. H., R. K. Pai, T. J. Sellati, J. D. Radolf, J. Belisle, D. T. Golenbock, W. H. Boom, and C. V. Harding. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **167**:910–918.
- O'Brien, A. D., D. L. Rosenstreich, I. Scher, G. H. Campbell, R. P. MacDermott, and S. B. Formal. 1980. Genetic control of susceptibility to *Salmonella typhimurium* in mice: role of the LPS gene. *J. Immunol.* **124**:20–24.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* **282**:2085–2088.
- Rambukkana, A. 2001. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:21–27.
- Rambukkana, A., J. L. Salzer, P. D. Yurchenco, and E. I. Tuomanen. 1997. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell* **88**:811–821.
- Rambukkana, A., G. Zanazzi, N. Tapinos, and J. L. Salzer. 2002. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science* **296**:927–931.
- Ridley, D. S. 1972. The pathogenesis of the early lesions in leprosy. *J. Pathol.* **111**:191–206.
- Ridley, D. S., and W. H. Jopling. 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr.* **34**:255–273.
- Ryan, J. J., K. A. Klein, T. J. Neuberger, J. A. Leftwich, E. H. Westin, S. Kauma, J. A. Fletcher, G. H. DeVries, and T. F. Huff. 1994. Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J. Neurosci. Res.* **37**:415–432.
- Sarno, E. N., and M. C. Pessolani. 2001. Leprosy. Oldest and most feared disease. *Lancet* **358**(Suppl.):S39.
- Spierings, E., T. de Boer, B. Wiele, L. B. Adams, E. Marani, and T. H. Ottenhoff. 2001. *Mycobacterium leprae*-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. *J. Immunol.* **166**:5883–5888.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, and S. Akira. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol.* **165**:5392–5396.
- Thoma-Uzynski, S., S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 2001. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. *Science* **291**:1544–1547.
- Wang, X., C. Moser, J. P. Louboutin, E. S. Lysenko, D. J. Weiner, J. N. Weiser, and J. M. Wilson. 2002. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to *Haemophilus influenzae* infection in mouse lung. *J. Immunol.* **168**:810–815.
- Weinstein, D. L., C. R. Lissner, R. N. Swanson, and A. D. O'Brien. 1986. Macrophage defect and inflammatory cell recruitment dysfunction in *Salmonella* susceptible C3H/HeJ mice. *Cell. Immunol.* **102**:68–77.
- Wooten, R. M., Y. Ma, R. A. Yoder, J. P. Brown, J. H. Weis, J. F. Zachary, C. J. Kirschning, and J. J. Weis. 2002. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* **168**:348–355.
- Yamamura, M., X.-H. Wang, J. D. Ohmen, K. Uyemura, T. H. Rea, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 1992. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* **149**:1470–1475.

Editor: J. M. Mansfield

Smile
on my mac

RESULTADOS

CAPÍTULO 2

INDUCTION OF APOPTOSIS IN A HUMAN SCHWANN CELL LINE *IN VITRO*: A ROLE FOR CYTOKINES AND *M. LEPRAE* INFECTION.

O *Mycobacterium leprae* é uma bactéria neurotrópica afetando os nervos sensitivos e autonômicos. As alterações neurológicas motoras e sensitivas progressivas são as principais causas de incapacidade e estigma característicos da Hanseníase. A apoptose de células de Schwann pode ser um dos fatores críticos na remielinização e na regeneração do nervo. Neste estudo, nós demonstramos pela primeira vez, a expressão de TNF-R1 e TNF-R2 na superfície da linhagem de células de Schwann humana (ST88-14) não estimuladas, assim como a secreção destes receptores. As citocinas têm sido implicadas como agentes citotóxicos em uma variedade de doenças inflamatórias que danificam o sistema nervoso central ou periférico, e ao mesmo tempo que causam dano, podem levar ao reparo no tecido danificado. Nós investigamos os efeitos de TNF α /TGF β na linhagem ST88-14 e demonstramos que estas citocinas atuaram sinergisticamente para induzir apoptose nestas células. Os resultados demonstraram uma taxa aumentada do apoptose nas células cultivadas na presença de TNF α /TGF β o que não aconteceu quando as citocinas foram utilizadas separadamente. Finalmente, investigamos a possibilidade do *M. leprae* induzir apoptose nesta linhagem e observamos que uma taxa aumentada de apoptose foi observada quando a linhagem foi infectada com *M. leprae* vivo ou morto. Os dados indicaram que TNFRs estão presentes na superfície desta linhagem humana de células de Schwann e que uma resposta específica pode estar implicada na pathogênese do dano no nervo. E o presente estudo indicou também que a linhagem de células de Schwann ST88-14 pode ser considerada como um modelo para o estudo da interação bactéria-célula e que poderia reproduzir outros estudos da mesma natureza. .

INDUCTION OF APOPTOSIS IN A HUMAN SCHWANN CELL LINE *IN VITRO*: A ROLE FOR CYTOKINES AND *M. LEPRAE* INFECTION. 2003. Manuscrito em preparação.



**INDUCTION OF APOPTOSIS IN A HUMAN SCHWANN CELL LINE
IN VITRO: A ROLE FOR CYTOKINES AND *M. leprae***

Rosane B. Oliveira¹, Elizabeth P. Sampaio¹, , Paulo R.Z. Antas¹,
Fernando Aarestrup², Euzenir N. Sarno¹

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;

²Laboratory of Immunopathology and Experimental Pathology, Reproduction Biology Center, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, 36036-330, Minas Gerais, MG, Brazil;

Send correspondence to: Dr. Euzenir Nunes Sarno

Leprosy Laboratory
Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ

Avenida Brasil 4365, Manguinhos

21045-900 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Phone/Fax: 55 (21) 2270-9997

E-mail: euzenir@fiocruz.br

Key words: TNF α , Schwann cell, Apoptosis, *M. leprae*, TGF β

Running title: Cytokine and *M. leprae*-induced apoptosis in a SC line

Total pages: 26 **Figures:** 4

Number of words: Whole manuscript = 6725; Abstract = 248;

Introduction = 495

ABSTRACT

The development of deformities during the course of leprosy disease is a major public health concern worldwide. It is possible that cytokine production and apoptosis of Schwann cells (SCs) directly affect nerve degeneration and regeneration leading to injury of the myelin sheath and axon. In the present study, the expression of TNFalpha, TGFbeta, and their receptors, in addition to cell death triggered by cytokines or whole *Mycobacterium leprae* were investigated in a human SC line. The results showed the presence of TNF-Rs and TGF-RII on the SC membrane and the shedding of TNF-Rs during the culture period. Evaluation of cell death was performed through TUNEL and flow cytometry techniques. TNFalpha/TGFbeta combination as well as *M. leprae* infection triggered an increase in the apoptosis rate in the cultured SC. Moreover, reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay revealed that *M. leprae* upregulated the expression of such cytokines and their receptors on the SC line. Despite the detection of TNFalpha mRNA, no protein was found in the culture supernatants. The data indicate that induction of SC death after cell interaction with *M. leprae* may, in fact, be implicated in the pathogenesis of nerve damage, which can most likely be modulated by in vivo cytokine production..

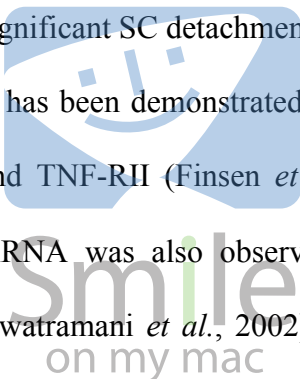


INTRODUCTION

Leprosy is the leading cause of non-traumatic peripheral neuropathies worldwide. The development of neuropathy following *M. leprae* infection is the result of injury to the Schwann cells (SC, the myelin forming cells of the peripheral nervous system), demyelination, and axonal degeneration, a series of events that frequently lead to deformities. The neurotropism of *M. leprae* may be attributed to the binding of the phenolic glycolipid I (PGL-I) and/or the Hlp (histone-like protein) present on the surface of the bacteria, to the laminin-2, which complex binds to the α -dystroglycan present on the SC surface (Ng *et al.* 2000; Marques *et al.*, 2001).

Cytokines such as interferon γ (IFN γ) and tumor necrosis factor α (TNF α) play a fundamental role in granuloma formation and killing of the bacteria both in vivo and in vitro (Chensue *et al.*, 1994). They are also involved in peripheral neuropathies by inducing nerve lesion and tissue repair (Lindenlaub & Sommer, 2003). On one hand, apoptosis in mature SC has been described in inflammatory demyelination and in transection or crush of immature nerves (Thompson *et al.*, 1995), and it may represent the final outcome of tissue/cell injury and/or an attempt at regeneration of the damaged nerve. In rat SC, the combination of TNF α and transforming growth factor β (TGF β) has been reported to cause significant SC detachment and lysis (Skoff *et al.*, 1998).

It has been demonstrated that neurons and glia cells express both TNF receptors, TNF-RI and TNF-RII (Finsen *et al.*, 2002). Similarly, the expression of TNF-Rs and TGF β -Rs mRNA was also observed in human and rat SC, respectively (Bonnetti *et al.*, 2000; Awatramani *et al.*, 2002). TGF β is known to exert proliferative and phenotypic changes



(Mirsky & Jessen, 1996), to direct a demyelinated phenotype on the SC (Awatramani *et al.*, 2002), as well as to induce death during the embryonic and neonatal phases of SC development (Parkinson *et al.*, 2001).

The expression of TNF α and TGF β mRNA and protein as detected in the skin and nerves (Khanolkar-Young *et al.*, 1995; Sampaio *et al.*, 1998) of reactional leprosy patients points to such cytokines as performing a pivotal function in the pathophysiology of tissue and nerve damage in leprosy. Although pro-inflammatory cytokines seem to have a predictable pattern of expression during immune-mediated demyelination of the PNS (Lisak *et al.*, 1997; Gillen *et al.*, 1998), the impact *M. leprae* might have on SC remains controversial (Rambukkana *et al.*, 2002; Hagge *et al.*, 2002). Apoptosis was not observed when SC-neuron co-cultures were infected with the bacteria (Rambukkana *et al.*, 2002). On the other hand, the presence of Toll-like receptor (TLR) 2 and of apoptotic SC has been demonstrated in leprosy lesions (Oliveira *et al.*, 2003).

In the present study, the human Schwannoma cell line ST88-14 was used as a model to determine whether cytokines and *M. leprae* were capable of triggering human SC apoptosis *in vitro* and, as such, to contribute to nerve damage in leprosy. Additionally, characterization of cytokine production by this cell line was performed.



MATERIAL AND METHODS

Schwann cell line and culture: The ST88-14 Schwannoma cell line was established from a neurofibromatosis type I (NF1) patient (Fletcher *et al.*, 1991),(26) and it was gently donated by Dr. J.A. Fletcher (Harvard University, Boston, MA). The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 2mM L-glutamine, and 15% fetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Gaithersburg, MD), at 37°C, in a humidified CO₂ incubator. Cell viability was evaluated by Tripan blue staining. The purity of Schwann cells (SC) in culture was assessed via microscopic examination of cytocentrifuged preparations (Cytospin 2; Shandon, Sewickley, PA) stained with Wright-Giemsa and Toluidine blue, and after immunostaining with anti-S-100 antibody as described elsewhere (Fletcher *et al.*, 1991). For the experimental assays, the attached ST88-14 cells were released by using trypsin/EDTA (0.25%/1mM), 1min, the cells were washed in RPMI-FCS, suspended in complete medium, and cultured further (7×10^4 cells/well) onto 24-well plates (Costar Corporation, Cambridge, MA) for in vitro stimulation.

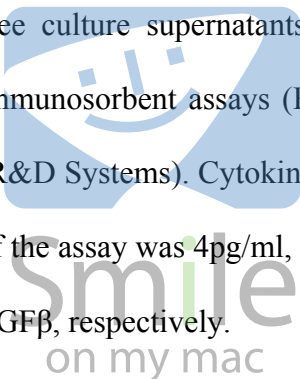
Reagents: Recombinant human TNF α (rhTNF α) prepared in *E. coli* and rhTGF β 1 prepared form 293 cells were purchased (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN). Monoclonal antibodies (mAbs) anti-TNF-RI, -TNF-RII and -TGF-RII (R&D Systems), rabbit anti-S-100 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark), biotinylated goat anti-rabbit, conjugate goat anti-mouse-FITC, conjugate goat anti-rabbit-FITC (Caltag, Burlingame, CA), mouse IgG1 and rabbit IgG antibodies (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) were used for immunohistochemical and flow cytometry studies. In addition, anti-CD64, anti-CD32 and anti-CD16 antibodies were purchased (Becton & Dickinson, Mountain

View, CA). Actinomycin D (ActD), bovine serum albumin (BSA), sodium azide, and fluorescein diacetate (FDA) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

M. leprae: Irradiated armadillo-derived *Mycobacterium leprae* was provided by Dr. P. Brennan (Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, CO). All reagents used for the in vitro cultures were shown to contain < 0.1U/ml endotoxin as measured by the *Limulus* amoebocyte lysate assay (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD).

In vitro experimental conditions: SC was cultured in 24-well plates in the presence of TNF α (10ng/ml), and/or TGF β (40ng/ml) for 1 or 2 days. The cells were infected with 100 live/dead *M. leprae* and exposed to these bacteria for 24 hours at either 33C or 37C. The parameters were chosen on the basis of experiments reported by Hagge et al, 2002. Subsequently, either ActD (10ug/ml) was added or the were placed in a waterbath and subjected to heat treatment at 65C after which the cells were switched to dry ice. Control cells were cultured with medium alone. The attached cells was released via trypsinization.

Cytokine determination: Concentration of TNF α , soluble TNF-Rs and TGF β 1 in cell free culture supernatants was determined by using commercial specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), processed according to the manufacturer's specifications (R&D Systems). Cytokine levels were expressed as pg/ml of protein and the detection limit of the assay was 4pg/ml, 3pg/ml, 10pg/ml and 15 pg/ml for TNF α , sTNF-RI, sTNF-RII and TGF β , respectively.



RNA isolation and PCR conditions: For analysis of mRNA expression, cultured SC were suspended in 1mL Trizol™ (Gibco BRL), and RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. One µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA (Sampaio *et al.*, 1998) and the samples stored at -20°C until use. Cytokine-specific oligonucleotide primer pair sequences for β-actin, interleukin (IL-) 8 and TNFα were used as published (Moraes *et al.*, 1999) and synthesized (Gibco BRL). Sequences for TNF-RI were 5'-ATTTGCTGTACCAAGTGCCACAAAGGAACC-3' and 5'-GTCGATTTCCCA CAAACAATGGAGTAGAGC-3'; TNF-RII were 5'-GAATACTATGGACCAGACAGT CCAGATGTGC-3' and 5'-TATCCGTCGATGAAGTCGTGTTGGAGAACG-3'; TGFβ1 were 5'-CTACTACGCCAAGGAGGTCAC-3' and 5'-TTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-3'; TGF-RI were 5'-TGTTGTGAAGGTCTCTCCTGCG-3' and 5'-GGATTGAGGCGT TCTTGG-3'; TGF-RII were 5'-CTGTGTCGAAAGCATGAAGG-3' and 5'-GGTAGTGT TTAGGGAGCCGTC-3'. The primers were designed to avoid genomic DNA amplification. PCR was performed as detailed elsewhere (Moraes *et al.*, 1999) and the samples amplified in a DNA thermocycler 2400 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR products were subjected to electrophoresis on agarose gels where specificity of the amplified bands was validated by their predicted size (β-actin, 661bp; IL-8, 291bp; TNFα, 355bp; TGFβ, 326bp; TNF-RI, 586bp; TNF-RII, 402bp; TGF-RI, 371bp; TGF-RII, 402bp). Densitometer analysis was performed by scanning the images from the gels (Video Documenting System, Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ) and densitometric values obtained through the ImageMaster software.

Real time RT-PCR: Expression of TNFα message was determined by using a Taqman real time PCR and the Taqman PCR kit (Perkin Elmer), processed following the manufacturer's specifications, and the spectra detected in the ABI Prism 7700 sequence detection system (Perkin Elmer). PCR amplification was carried out by using 100ng cDNA added to triplicate tubes with 20µl of the master mixture consisting of the forward and reverse primers to β-actin and TNFα, and the labelled cytokine probes. The amplification parameters consisted of a hold cycle of 50°C for 5min to activate the uracil N'-glycosylase followed by 95°C for 10min to inactivate N'-glycosylase and release the activity of the DNA polymerase and finally 50 cycles of 95°C/15sec to separation of strands, 60°C/1min

to annealing of primers and probes and extension of the new strand. The relative expression of TNF α is compared continuously during the log phase of PCR in terms of DCT (mean CT of three replicate cytokine cDNA minus the mean CT of three replicate β -actin cDNA). Samples were defined as negative when the signal did not attain threshold levels up to 50 cycles.

Flow cytometry: To confirm the gate setting for viable SC, samples were initially stained with 20 μ g/ml FDA (15min, at room temperature, in the dark) for determination of cell viability, and with anti-S-100 antibody. Intracellular staining procedure for S-100 was performed following cell fixation with 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma) for 10min. The cells were washed in PBS and suspended in Hanks balanced salt solution (HBSS; Gibco) plus 0.1% saponin and 0.05% sodium azide. During permeabilization, cells were incubated with rabbit anti-S-100 Ab, washed twice, and the appropriate conjugate goat anti-rabbit-FITC added for 30min. After washing, the cells were suspended in 1% PFA for immediate analysis. For further evaluation of cell surface expression of the cytokine receptors, SC were stained with anti-TNF-RI, -TNF-RII (50 μ g/ml), and -TGF-RII (2 μ g/ml) mAbs for 20min at 4°C. Following washing, the samples were incubated with phycoerythrin (PE)-labeled goat anti-mouse IgG (20min, 4°C), when the cells were finally fixed in 2% PFA before analysis on a FacsCalibur flow cytometer (Becton & Dickinson). A total of 10,000 events were recorded per sample. Thresholds for positivity were set up by employing irrelevant isotype mouse IgG1 and rabbit IgG antibodies, respectively, as negative controls. All data are expressed as percentage of positive bright cells.

7-Amino Actinomycin D (7-AAD) staining: SC cultured in the experimental wells were gently suspended in 20 μ g/ml 7-AAD (Sigma) in 1% BSA, 0.1% sodium azide and PBS, at

4°C, in the dark, for 20min. Acquisition was performed immediately afterwards and a total of 10,000 events per sample was collected and analyzed in the flow cytometer. The relative fluorescence intensity of cells was analyzed in a dot plot using logarithmic scale for FL-3, and statistical markers were set using unlabeled negative control cells as reference. Cells without 7-AAD labeling were considered viable, while apoptotic and dead cells showed low and high 7-AAD staining, respectively (Philpott *et al.*, 1996).

TUNEL assay: The presence of apoptosis was investigated in the cells attached onto silanized glass coverslips (4% silane; Sigma) and fixed with 0.5% PFA for 20min. Detection of apoptotic cells was assessed by direct immunoperoxidase of digoxigenin-labeled genomic DNA. The reaction procedure was performed accordingly to the Apoptag Plus in situ detection kit (Oncor, Inc., Gaithersburg, MD). The apoptosis rate (%) was determined by counting at least 100 cells per slide (5 slides/experiment). Control of the procedure was obtained by omitting the anti-digoxigenin antibody (negative control).

Statistical analysis: Results are reported as mean \pm SD (standard deviation) for each group of experiments. For comparison of data among the experimental groups, the unpaired *T*-test was used. Multiple comparisons were evaluated by the Dunnett's *t* test using the SPSS 11.5 for Windows statistical software. The significance level adopted was $p < 0.05$.



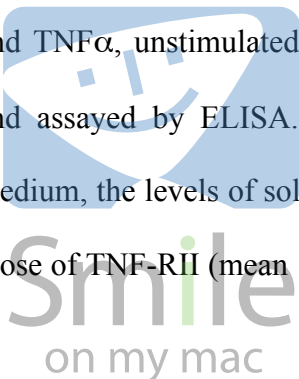
RESULTS

Expression of cytokines and their receptors in the human SC line.

To determine whether SC ST88-14 synthesized pro-inflammatory cytokines, evaluation of gene expression was performed initially by RT-PCR. As shown in Figure 1A, messages for IL-8, TNF α , TNF-RI, and TNF-RII were detected in the unstimulated cultured cells.

The expression of both TNF receptors on the Schwann cell membrane was then evaluated in vitro by flow cytometry. Firstly, a gate was set up around the viable SC, which were stained with both FDA and S-100 antibody (Figure 1B, left panel). Secondly, the expression of human Fc gamma-receptors (Fc γ -R) was investigated by using antibodies to detect CD16 (Fc γ -RIII), CD32 (Fc γ -RII), and CD64 (Fc γ -RI). Once all three Fc γ -Rs were absent in the SC line (not shown), an additional step for blocking the Fc γ -R was not necessary, and staining for TNF-RI and TNF-RII was proceeded as described in the Methods. The data presented in Figure 1B (right panel) confirmed the constitutive expression of such molecules on the SC surface (% positive cells = $50 \pm 9.7\%$ and $34 \pm 10.7\%$, respectively) when compared to the cells treated with the isotype negative control antibody.

In order to determine whether the SC ST88-14 was capable of secreting the TNF receptors and TNF α , unstimulated culture supernatants were harvested at different periods of time and assayed by ELISA. Notwithstanding the detection of both TNF-Rs in the culture medium, the levels of soluble TNF-RI were much higher after 12 and 24h (Figure 1C) than those of TNF-RII (mean $172 \pm 36.3\text{pg/ml}$ vs. $36.8 \pm 5\text{pg/ml}$, 24h of culture), and were even



augmented after 48h. As related to $\text{TNF}\alpha$, no protein was detected in the supernatants at any moment (data not shown).

Similarly, messages for $\text{TGF}\beta$, TGF-RI and TGF-RII were detected in the unstimulated SC cultures (Figure 1D). Moreover, the constitutive expression of TGF-RII on the cell membrane, as evaluated by flow cytometry, showed a total of $93 \pm 2\%$ cells that present the molecule on the SC surface (Figure 1D, right panel). Nevertheless, very low, if any, $\text{TGF}\beta$ protein was observed in the cell culture supernatants ($3 \pm 1\text{pg/ml}$).

Cytokine-induced cell death of SC ST88-14.

Upon the initial observation of cell death induction in rat SC (Skoff *et al.*, 1998) and the expression of both TNF-Rs on the SC membrane (Figure 1), it appeared imperative to determine whether such cytokines exerted a similar effect on the human SC lineage. As previously described (Hernandez *et al.*, 2003), standardization of the 7-AAD staining method was established by using SC cultured in the presence of actinomycin D (ActD, $20\mu\text{g/ml}$). Figure 2A shows one representative experiment in which the fluorescence intensity of 7-AAD vs. forward scatter was employed to define the early apoptotic cells (a, 7-AAD^{dim} staining), and the late dead cell population (d, 7-AAD^{bright} incorporation - necrosis) induced by treatment with ActD. Negligible 7-AAD staining was seen in the live cells (v, viable).

The effect of cytokines on SC viability was then assessed. As showed in Figure 2B, when the SC were treated for 24h with $\text{TNF}\alpha$ alone (10ng/ml) a low rate of apoptosis (early apoptotic cells, 7-AAD^{dim} staining) was observed (mean = $9.3 \pm 2.4\%$). Addition of $\text{TGF}\beta$ (40ng/ml), increased significantly ($p < 0.05$) the rate of SC death (mean \pm SD = $15.3 \pm$

3.6%) when compared to the cells cultured in medium alone ($4.9 \pm 0.6\%$). Incubation of the cells with ActD resulted in an apoptosis rate of $23.8 \pm 0.14\%$ ($p < 0.01$).

Quantification of dead cells was also performed via TUNEL staining in the SC cultured onto glass coverslips. When evaluated separately, $\text{TNF}\alpha$ (but not $\text{TGF}\beta$) induced death ($8.7 \pm 2.6\%$) of the cultured SC ($p = 0.017$ vs. the untreated cells), even though at a lower extent than the effect induced by the combination of cytokines. A total of $20.6 \pm 2.3\%$ apoptotic cells was identified in the $\text{TNF}\alpha/\text{TGF}\beta$ -treated cultures when compared to $2.2 \pm 0.5\%$ found in the untreated wells ($p < 0.01$; Figure 2B). Figure 2C illustrates the cells that stained positively following cell incubation with $\text{TNF}\alpha$ and $\text{TGF}\beta$.

Induction of SC death by *M. leprae*.

In order to determine whether whole *M. leprae* was able to induce death of the human SC line in vitro, the cells (7×10^4 per ml), plated onto 24-well plates, were cultured with the irradiated *M. leprae* (100:1 bacteria per cell) for a total period of 24h at 37°C . When evaluated by way of 7-AAD staining, a $14.5 \pm 1.5\%$ apoptosis rate was detected in the stimulated wells as compared to $5.7 \pm 1.6\%$ ($p = 0.0011$) observed among the control cells (Figure 3A). Similar data were noted when the SC were maintained at 33°C ($12.4 \pm 1.4\%$ in the *M. leprae* treated vs. $4.1 \pm 1.6\%$ in the untreated cells, $p = 0.017$). Induction of SC death by *M. leprae* was dependent on the bacterial load (Figure 3A) since a significant rate of apoptosis was achieved at 100:1 ($14.5 \pm 1.5\%$) as compared to 50:1 ($7.5 \pm 1.5\%$) and 5:1 bacteria:cell ratio ($4.6 \pm 0.7\%$). Moreover, similar apoptosis rate was observed when live *M. leprae* was added to the SC instead of the dead bacilli (not shown). As showed in Figure 3B (right panel), SC appeared heavily infected and presented morphological alterations resembling apoptotic features, not observed when in the absence of the bacteria (Figure 3B, left panel).

***M. leprae*-induced expression of cytokines and their receptors in the human SC line.**

To determine whether *M. leprae* up-regulated inflammatory cytokines in the ST88-14 cells, evaluation of gene expression was performed by RT-PCR (Figure 4). Even though at very low levels, TNF α message was observed in these cultures (as assessed by real time RT-PCR) already after 1h in the presence of *M. leprae* (100 bacteria/cell) when compared to the control wells, it peaked after 3h, and decreased sharply thereafter (Figure 4A). Even so, no protein was detected in the culture supernatants. As for TNF-RI, expression of mRNA was noted after 3h and was even augmented 6h after *M. leprae* stimulation (Figure 4B). On the other hand, messages for TGF β 1, TGF-RI and TGF-RII were observed in the cultures already 1h following *M. leprae* interaction (Figures 4C and 4D). Detection of TGF β protein in the supernatants was assessed by ELISA and showed augmented cytokine levels (32 ± 13.6 pg/ml) as compared to the unstimulated wells (3 ± 1 pg/ml).

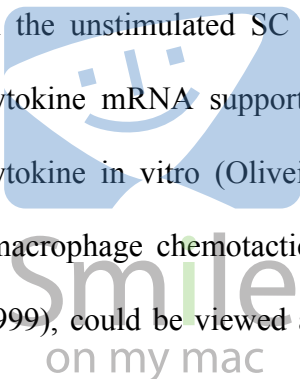


DISCUSSION

In the present study, the human Schwann cell line ST88-14 was used as a model to evaluate both the expression/production of cytokines *in vitro*, and the induction of cell death triggered by cytokines as well as following its subsequent interaction with whole *M. leprae*, the only bacterial pathogen known to invade Schwann cells (SC). To our knowledge, this is the first time that the expression and release of both TNF receptors have been reported as regard to this particular cell line. These data also confirm a prior observation made by Bonetti *et al.* (2000), who demonstrated the presence of TNF-R on the human SC surface both in benign schwannoma and in normal primary cultured SC.

It has been previously shown that the phenotypical and functional features expressed by the ST88-14 SC line are similar to those referred to normal SC (Ryan *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2001). Moreover, accumulating evidence attests to the ability of SC to secrete inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, and TGF β) and to act as secondary antigen-presenting cells via MHC class I and class II (Steinhoff *et al.*, 1999; Spierings *et al.*, 2001; Deprez *et al.*, 2001), which clearly reinforces their potential role in modulating immune responses under both pathological and non-pathological conditions.

In the current study, the expression of IL-8, TNF α , and TNF-Rs was initially investigated in the unstimulated SC via RT-PCR (Figure 1A). As related to IL-8, the detection of cytokine mRNA supports the recently described ability of the cell line to secrete this cytokine *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2003). In that sense, the release of IL-8 and MCP-1 (macrophage chemotactic protein-1), detected following SC infection (Rutkowski *et al.*, 1999), could be viewed as an important event at the onset of the inflammatory response,

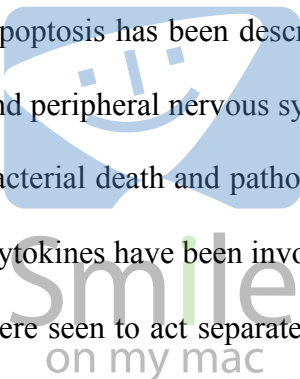


which implies their possible role in cell recruitment and the initiation of local immune responses up to the generation of nerve damage.

With respect to TNF α , expression of the message was detected in the unstimulated cells while further induction was seen as a result of *M. leprae* stimulation. In this instance, very small quantities of TNF α mRNA that could only be captured by real time RT-PCR were observed in the cellular lineage (Figure 4A). Even so, at no time, the protein was identified in the culture supernatants. The lack of evidence in demonstrating TNF α secretion in the SC cultures is concomitant with the findings from other studies (Rutkowski *et al.*, 1999). However, it is also in contrast to the observation reported elsewhere (Wagner & Myers, 1996) where TNF α was identified by way of immunohistochemistry, thereby indicating the ability of these cells to produce TNF but not necessarily to secrete the active protein. On the other hand, it is also possible that very low amounts of the cytokine may be released into the culture medium, which could then bind to the soluble TNF-Rs and be undetectable under the present culture conditions. As related to TNF-R, both mRNA and protein were identified in the ST88-14 cultures. Even though expression of TNF-RII was evidenced in vitro, higher amounts of sTNF-RI were released during the whole culture period (Figure 1C), a fact that supports the notion that each of the receptors is independently regulated (Spinas, 1992).

Apoptosis has been described in many of the pathological conditions related to the central and peripheral nervous systems. It can also function as a protective mechanism that leads to bacterial death and pathogen clearance in the absence of inflammation (Oddo *et al.*, 1996).

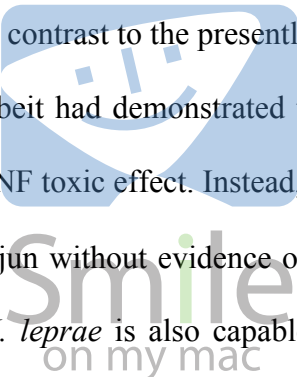
Cytokines have been involved in the induction of SC death, namely, IL-1 β and IFN γ , which were seen to act separately in triggering proliferation and apoptosis, respectively (Conti *et*



al., 2002). Similarly, the participation of TGF β in the induction of cell death and proliferation has been previously reported in developing nerves (Parkinson *et al.*, 2001), and it has been demonstrated that a preserved axon-SC interaction seems to regulate the expression of TGF-R in vivo (Awatramani *et al.*, 2002). The binding of TNF α to the TNF-R1 triggers cell death, a phenomenon that within the nervous system seems to be controlled by factors that guarantee cell survival. It is also worth to speculate that signals coming from the nerve milieu can regulate the secretion of TNF α by these cells. Accordingly, it has been demonstrated that low concentrations of TNF α reduced the capacity of the insulin like growth factor (IGF-1) to promote neuronal survival (Venters *et al.*, 1999).

The present study shows that TNF α when added to the SC cultures was able to induce a low rate of cell death, a condition that was enhanced by the addition of TGF β (Figure 2). Additionally, the expression of TGF-R1 and TGF-R2 was confirmed by RT-PCR and flow cytometry analysis (Figure 1D). The data suggest that common apoptotic signalling pathways have been triggered downstream through the stimulation of both cytokines receptors. Alternatively, TGF β could be capable of i) altering the rate of TNF α binding to the cell receptors; ii) favoring one particular signalling pathway triggered by TNF α via TNF-R1 over TNF-R2; iii) affecting the extent of expression of one or both TNF-Rs; or iv) interfere with intracellular TNF signaling.

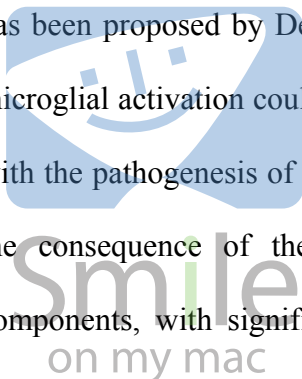
In contrast to the presently described effect TNF had on SC viability, Bonnetti *et al.* (2000), albeit had demonstrated the presence of TNF-R on human SC, were unable to detect any TNF toxic effect. Instead, the authors showed that TNF α led to the activation of NF-kB and c-jun without evidence of cell death. An ongoing study from our group has indicated that *M. leprae* is also capable of triggering NF-kB translocation within the ST88-14 SC line



(Pereira *et al.*, manuscript in preparation). As such, both the mycobacteria and/or the cytokine could influence SC function by activating transcriptional pathways and most probably modulating their phenotype.

The further observation on the *M. leprae*-induced SC apoptosis (Figure 3) is in agreement with the data recently published by Oliveira *et al.* (2003), who reported the induction of SC death by the 19kDa of *M. leprae* (through the TLR-2) and the presence of apoptotic SC in leprosy skin biopsies, which co-localized with the positively-stained N-CAM cells. The fact that *M. leprae* triggers apoptosis in a dose-dependent manner had been previously demonstrated by using monocyte-derived macrophage cultures (Hernandez *et al.*, 2003). In that system, apoptosis seemed to be a TNF α -mediated phenomenon (Sampaio *et al.*, 2002; Hernandez *et al.*, 2003). Furthermore, induction of SC death as showed herein was achieved by adding both live and dead bacteria to the cultures. However, whether both trigger the same intracellular pathways in the SC requires further clarification.

When taking into consideration that the neural lesion is specifically related to *M. leprae* infection, the release of mediators induced by this pathogen either from the SC or from the inflammatory cells present in the tissue milieu would directly or indirectly account for nerve destruction. In this sense, the participation of TNF α /TGF β (and of the TLR) in the *M. leprae*-induced apoptosis of the SC in vivo cannot be excluded. A similar mechanism has been proposed by Depino *et al.* (2003) who pointed out that cytokine production and microglial activation could be a process actively involved in neurodegeneration associated with the pathogenesis of Parkinson's disease. It is postulated that nerve injury in leprosy is the consequence of the immune inflammatory response against *M. leprae* and its components, with significant effects on the extracellular matrix. However, even in the

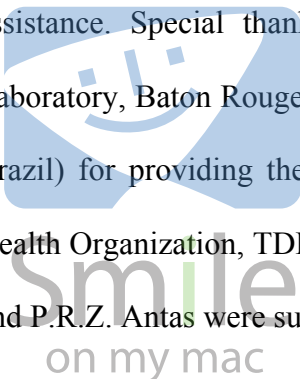


absence of immune cells, *M. leprae* is able to introduce a series of phenotypic changes in the SC, which will then either die or become the primary source of pro-inflammatory signals as components of the innate immunity can be involved in the infectious process. It is also possible that TNF α /TGF β production induced by the bacteria is able to counteract the 'protective' effect *M. leprae* appears to have during its initial interaction with the SC (Rambukana *et al.*, 2002).

The present data indicate that induction of SC death, also observed in primary human SC (Oliveira *et al.*, 2003), can provide an effective mechanism of tissue injury ongoing during *M. leprae* infection, which can be likely modulated further by cell-cell interaction (Sampaio *et al.*, 2000) and cytokine production both in vitro and in vivo. In addition, the human Schwanomma cell line could be considered a useful model to study bacteria-cell interaction since it has been shown to reproduce the major findings from other studies of the same nature.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. S. Antunes for helpful discussion, Dr P. Cabello for guidance on statistical procedures, and A.L. Oliveira, **A.C.C. Silva** and E.B. Oliveira for technical assistance. Special thanks are due to Dr. J. Krahenbuhl (National Hansen's Disease Laboratory, Baton Rouge, LA) and Dr. M.C.V. Pessolani (Leprosy Laboratory, FIOCRUZ, Brazil) for providing the viable live *M. leprae*. This work was supported by the World Health Organization, TDR, UNDP/WORLD BANK/WHO, grant ID A10325. R.B. Oliveira and P.R.Z. Antas were supported by CNPq/ FIOCRUZ Ph.D. program.



REFERENCES

Awatramani, R., Shumas, S., Kamholz, J. & Scherer, S. S. (2002) TGF beta1 modulates the phenotype of Schwann cells at the transcriptional level. *Mol. Cell. Neurosci.*, **19**, 307-319.

Bonetti, B., Valdo, P., Stegagno, C., Tanel, R., Zanusso, G. L., Ramarli, D., Fiorini, E., Turazzi, S., Carner, M. & Moretto, G. (2000) Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: Signalling and phenotype modulation without cell death. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **59**, 74-84.

Chensue, S. W., Warmington, K., Ruth, J., Lincoln, P., Kuo, M. C. & Kunkel, S. L. (1994) Cytokine responses during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation. Production of Th1 and Th2 cytokines and relative contribution of tumor necrosis factor. *Am. J. Pathol.*, **145**, 1105-1113.

Conti, G., De Pol, A., Scarpini, E., Vaccina, F., De Riz, M., Baron, P., Tiriticco, M., Scarlato, G. & Vaccina, M. (2002) Interleukin-1 beta and interferon-gamma induce proliferation and apoptosis in cultured Schwann cells. *J. Neuroimmunol.*, **124**, 29-35.

Depino, A. M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., del Rey, A., Pitossi, F. J. & Oertel, W. H. (2003) Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 2731-2742.

Deprez, M., Lubke, U., Verlaet, M., Debrus, S., Delvenne, P. & Martin, J. J. (2001) Detection of cytokines in human sural nerve biopsies: An immunohistochemical and molecular study. *Acta Neuropathol.*, **101**, 393-404.

Finsen, B., Antel, J. & Owens, T. (2002) TNF α : Kill or cure for demyelinating disease? *Mol. Psychiatry*, **7**, 820-821.

Fletcher, J. A., Kozakewich, H. P., Hoffer, H. A., Lage, J. M., Weidner, N., Tepper, R., Pinkus, G. S., Morton, C. C. & Corson, J. M. (1991) Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft tissue tumors. *N. Engl. J. Med.*, **324**, 436-442.

Gillen, C., Jander, S. & Stoll, G. (1998) Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: Comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. *J. Neurosci. Res.*, **15**, 489-496.

Hagge, D. A., Oby, R. S., Scollard, D., McCormick, G. & Williams, D. (2002) A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. *J. Infect. Dis.*, **18**, 1283-1296.

Hernandez, M. O., Neves, I., Sales, J. S., Carvalho, D. S., Sarno, E. N. & Sampaio, E. P. (2003) Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* *in vitro*: A possible role for tumour necrosis factor alpha. *Immunology*, **109**, 156-164.

Khanolkar-Young, S., Rayment, N., Brickell, P. M., Katz, D. R., Vinayakumar, S., Colston, M. J. & Lockwood, D. N. (1995) Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin. Exp. Immunol.*, **99**, 196-202.

Lindenlaub, T. & Sommer, C. (2003) Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **6**, 593-602.

Lisak, R. P., Skundric, D., Bealmear, B. & Ragheb, S. (1997) The role of cytokines in Schwann cell damage, protection, and repair. *J. Infect. Dis.*, **176**, S173-S179.

Marques, M. A. M., Ant, V., Sarno, E. N., Brennan, P. J. & Pessolani, M. C. V. (2001) Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J. Med. Microbiol.*, **50**, 23-28.

Mirsky, R. & Jessen, K. R. (1996) Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 89-96.

Moraes, M. O., Sarno, E. N., Almeida, A. S., Saraiva, B. C., Nery, J. A., Martins, R. C. & Sampaio, E. P. (1999) Cytokine mRNA expression in leprosy: A possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand. J. Immunol.*, **50**, 541-549.

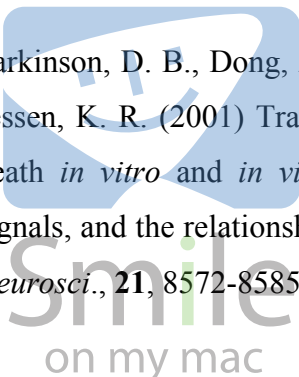
Moraes, M. O., Sarno, E. N., Teles, R. M., Almeida, A. S., Saraiva, B. C., Nery, J. A. & Sampaio, E. P. (2000) Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 935-941.

Ng, V., Zanazzi, G., Timpl, R., Talts, J. F., Salzer, J. L., Brennan, P. J. & Rambukkana, A. (2000) Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*, **103**, 511-524.

Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., Macdonald, H. R & Meylan, P. R. A. (1998) Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, **160**, 5448-5454.

Oliveira, R. B., Ochoa, M. T., Sieling, P. A., Rea, T. H., Rambukkana, A., Sarno, E. N. & Modlin, R. L. (2003) Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: A mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect. Immun.*, **71**, 1427-1433.

Parkinson, D. B., Dong, Z., Bunting, H., Whitfield, J., Meier, C., Marie, H., Mirsky, R. & Jessen, K. R. (2001) Transforming growth factor beta (TGF beta) mediates Schwann cell death *in vitro* and *in vivo*: Examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGF beta-mediated death to Schwann cell differentiation. *J. Neurosci.*, **21**, 8572-8585.



Philpott, N. J., Turner, A. J. C., Scopes, J., Westby, M., Marsh, J. C. W., Gordon-Smith, E. C., Dalgleish, A. G., Gibson, F. M. (1996) The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: Simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood*, **87**, 2244-2251.

Rambukkana, A., Zanazzi, G., Tapinos, N. & Salzer, J. L. (2002) Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*, **296**, 927-931.

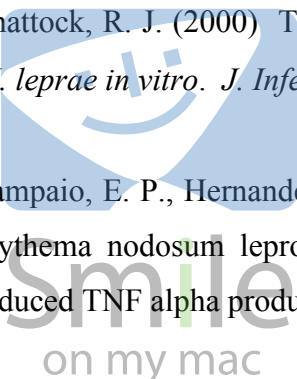
Rutkowski, J. L., Tuite, G. F., Lincoln, P. M., Boyer, P. J., Tennekoon, G. I. & Kunkel, S. L. (1999) Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J. Neuroimmunol.*, **1**, 10147-10160.

Ryan, J. J., Klein, K. A., Neuberger, T. J., Leftwich, J. A., Westin, E. H., Kauma, S., Fletcher, J. A., DeVries, G. H. & Huff, T. F. (1994) Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J. Neurosci. Res.*, **37**, 415-432.

Sampaio, E. P., Moraes, M. O., Nery, J. A., Santos, A. R., [Matos, H. C. & Sarno, E. N.](#) (1998) Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin. Exp. Immunol.*, **111**, 300-308.

Sampaio, E. P., Oliveira, R. B., Warwick-Davies, J., Faria Neto, R. B., Griffin, G. E. & Shattock, R. J. (2000) T cell-monocyte contact enhances TNF α production in response to *M. leprae* in vitro. *J. Infect. Dis.*, **182**, 1463-1472.

Sampaio, E. P., Hernandez, M. O., Carvalho, D. S. & Sarno, E. N. (2002) Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit *M. leprae*-induced TNF alpha production in vitro. *Biomed. Pharmacother.*, **56**, 13-19.



Skoff, A. M., Lisak, R. P., Bealmear, B., Benjamins, J. A. (1998) TNF-alpha and TGF-beta act synergistically to kill Schwann cells. *J. Neurosci. Res.*, **53**, 747-756.

Spierings, E. T., de Boer, B. & Wieles, L. B. (2001) *Mycobacterium leprae*-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: A novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. *J. Immunol.*, **166**, 5883-5888.

Spinas, G. A., Keller, U. & Brockhaus, M. (1992) Release of soluble receptors for tumor necrosis factor (TNF) in relation to circulating TNF during experimental endotoxemia. *J. Clin. Invest.*, **90**, 533-536.

Steinhoff, U., Schoel, B. & Kaufmann, S. H. (1999) Lysis of interferon-gamma activated Schwann cell by cross-reactive CD8+ alpha/beta T cells with specificity for the mycobacterial 65 kD heat shock protein. *Int. Immunol.*, **2**, 279-284.

Thompson, C. B. (1995) Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Venters, H. D., Tang, Q., Liu, Q., VanHoy, R. W., Dantzer, R. & Kelley, K. W. (1999) A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 9879-9884.

Wagner, R. & Myers, R. R. (1996) Schwann cells produce TNF-alpha: Expression in injured and non-injured nerves. *Neurosci.*, **73**, 625-629.

Yan, N., Ricca, C., Fletcher, J., Glover, T., Seizinger, B. R. & Manne, V. (1995) Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type I (NF1) malignant phenotype. *Cancer Res.*, **55**, 3569-3575.



FIGURE LEGENDS

Figure 1. Expression of cytokines and cytokine receptors in the ST88-14 SC line. (A) Detection of mRNA expression in the SC line was performed by qualitative RT-PCR as described in the Methods. Total RNA was extracted from the cultures, reverse transcribed, and subjected to PCR by using specific primers. Visualization of PCR products after ethidium bromide staining of 1.7% agarose gels was obtained by UV transillumination. β -act = β -actin; (B) For detection of TNF-R by flow cytometry, a gate was set up to define SC based on the immunoreactivity for S-100 and FDA for viable cells (left panel). Staining with the specific mAbs (50 μ g/ml), anti-TNF-RI (■), and anti-TNF-RII (▲) showed the presence of both receptors on the SC surface (right panel). In the control wells (---), only the secondary antibody was added. A histogram obtained from one representative experiment out of four is presented; (C) For quantification of TNF-R proteins, soluble TNF-RI (■) and TNF-RII (▲) were assessed in the culture supernatants by specific ELISA. Supernatants from unstimulated cultures were harvested after different periods as indicated. Data are expressed as pg/ml of protein. Each point represents mean values \pm SD of 3 individual experiments; (D) Detection of TGF β and TGF-Rs mRNA in the SC line was performed by qualitative RT-PCR (left panel) as described above and PCR products were visualized after staining of agarose gels. Identification of TGF-RII on the cell membrane was assayed by flow cytometry (right panel) as detailed in (B). One representative experiment out of three is shown.

Figure 2. Cytokine-induced cell death in the ST88-14 human SC. (A) Flow cytometry histograms demonstrate standardization of 7-AAD staining from one representative experiment. SC treated with ActD for 24h were used to set up the gates for viable (v), apoptotic (a, 7-AAD^{dim} staining), and dead cells (d, 7-AAD^{bright}). Negligible 7-AAD staining was seen in the live cells (v). Untreated cells (left panel) were used as controls and comprised cells cultured in medium alone; (B) Evaluation of apoptosis was then assessed in the SC cultures after treatment with TNF α (10ng/ml) and TGF β (40ng/ml) for 24h. Values in the graphic represent mean % apoptotic cells \pm SD of 4 different experiments when assayed through flow cytometry (7-AAD staining) or the TUNEL technique. A significant rate of response (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$) was detected when the cells were treated with (▨) TNF/TGF, (■) ActD or (▩) TNF α alone vs. the (□) untreated cells (Untr) and between the TNF/TGF (*) vs. the TNF treated wells; (C) TUNEL staining of SC cultures treated (right panel) or not (left panel) with TNF α /TGF β . The cells were counterstained with methyl green. Negative control of the procedure was obtained by omitting the anti-digoxigenin antibody. Positively stained apoptotic cells are indicated (arrows).

Figure 3. *Mycobacterium leprae* induces apoptosis of SC in vitro. (A) Cultured SC (7×10^4 cells/well) were stimulated or not (unst) with dead *M. leprae* (ML, 50:1 or 100:1 bacteria:cell ratio) for 24h, when following 7-AAD staining, the apoptosis rate was assessed by flow cytometry. Cultures were established either at 33°C or 37°C and values in the graphic represent mean % positive cells \pm SD of 3 individual experiments. */** Indicates significant differences ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) when compared to the unstimulated

wells (Unst); (B) SC cultured onto glass coverslips and maintained in the absence (left) or presence (right panel) of *M. leprae* for 24h, were Ziehl-Nielsen stained (100x amplification). Mycobacteria were found in abundance in SC cytoplasm (arrows) and cells with apoptotic features were observed.

Figure 4. *M. leprae*-induced cytokine mRNA expression in the ST88-14 SC line. (A) For detection of TNF α mRNA, the human cell line was cultured with (■) or without (□) *M. leprae* (ML) for different periods, when RNA was extracted and processed for real-time RT-PCR as described in the Methods section. Amplification of TNF message was evidenced in the stimulated wells mainly after 3h. Results represent mean \pm SD of 3 different experiments, all assayed in parallel; (B) Expression of TNF-RI, (C) TGF β 1 and TGF-Rs mRNA were assessed in these same cultures by semi-quantitative RT-PCR. PCR products generated from unstimulated (unst; or C = control) and *M. leprae*-stimulated ST88-14 cells were visualized from the agarose gels and the constitutive gene (β -actin) was used in order to normalize the exact levels of input cDNA present among the different samples tested. Values represent the relative amount of PCR product present in an individual sample expressed as the ratio between the tested genes, (B) TNF-RI, (C) TGF β 1, (D) TGF-RI and TGF-RII, and β -actin.



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho indicam que:

1. A linhagem de célula de Schwann humana ST88-14 assim como a cultura primária de célula de Schwann humana expressam TLR2 .
2. A linhagem ST88-14 produz e secreta as citocinas IL-8 e IL-6. A produção destas citocinas o que foi inibido pelo anti-TLR2.
3. A linhagem ST88-14 expressa MHC-classe I e MHC-classe II.
4. A linhagem ST88-14 expressa receptores de TNF (TNF-R1 e TNF-R2).
5. *M. leprae* induziu a produção de TNF na linhagem ST88-14.
6. O lipopeptídeo 19 kDa *M. leprae* induziu apoptose na linhagem ST88-14 o que foi inibido pelo anti-TLR2.
7. *M. leprae* aumentou a taxa de apoptose na linhagem ST88-14.
8. TNF α associado a TGF β 1 induziram apoptose na linhagem ST88-14.
9. TLR2 foi identificado por imunohistoquímica em células de Schwann em nervos cutâneos nas lesões de hanseníase.
10. Células apoptóticas foram identificadas em nervos cutâneos em lesões de hanseníase.

4. DISCUSSÃO

A interação entre o bacilo e o hospedeiro que define a permissividade ou restrição ao crescimento do *M. leprae* nas células infectadas (macrófago e células de Schwann) é um ponto crucial para o entendimento da dicotomia infecção x doença. A complexidade desta interação é expressa no fato da hanseníase apresentar-se clínica e patologicamente em dois pólos distintos, caracterizados por também distintos padrões de resposta imune. No pólo tuberculóide, as lesões cutâneas são limitadas e ricas em granulomas epitelióides, associadas à resposta imune adquirida do tipo Th1, e nas lesões disseminadas da forma lepromatosa predominam os marcadores de resposta imune Th2 com ausência de granulomas epitelióides (Yamamura et al., 1992). O perfil da resposta imune específica ao *M. leprae* parece ser fortemente influenciado pela ativação da resposta imune inata via receptor Toll. Recentemente foi demonstrado que biópsias de pacientes da forma tuberculóide exibem acentuada expressão deste receptor no infiltrado de células mononucleares, contrastando com a quase ausência destes nas formas lepromatosas (Krutzik et al., 2003). Além disso, estes autores demonstraram que IFN γ aumenta a expressão de TLR1 em monócitos, enquanto IL-4 reduziu a expressão de TLR2. Em ambas as formas clínicas da doença, a lesão neural está presente, sugerindo uma via complexa de mecanismos patogénicos que incluem não só os mediadores da resposta imuno-inflamatória como também mediadores específicos produzidos pelos componentes neurais. O presente estudo é o primeiro a demonstrar a presença de TLR2 em CS tanto em linhagem celular como em cultura primária humana. Sabe-se que Toll 2, embora não tenham especificidade, reconhecem PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos), que são estruturas presentes na superfície de patógenos, fungos, DNA não metilado, produtos de bactérias gram-positivas tais como LPS, peptidoglicanas e lipoproteínas presentes na membrana das micobactérias. Embora receptores Toll sejam encontrados predominantemente em células do sistema imune já foram identificados em queratinócitos da pele participando do sistema imune inato cutâneo (Baker et al., 2003). No presente estudo (Oliveira et al., 2003 / Capítulo 1), foi possível demonstrar que a ativação de TLR2 por uma lipoproteína do ML desencadeou apoptose nas CS confirmando, pela primeira vez, a funcionalidade destes receptores nestas células. A ativação deste receptor por seus ligantes induz uma série de acontecimentos intracelulares assim como a ativação de genes

ligados a apoptose. A ativação da CS com o agonista de TLR2, um lipopeptídeo sintético que abrange a porção N-terminal putativa da lipoproteína 19 kDa de *M. leprae*, determinou a produção de pequenas quantidades de IL-6 e IL-8, produção esta, que foi bloqueada com o anticorpo monoclonal anti-TLR2, confirmando que a secreção destas proteínas foi, pelo menos em parte, mediada por este receptor. Além disso, foi observado que as CS normalmente aderentes mostravam sinais de desprendimento da placa quando o lipopeptídeo sintético 19 kDa era adicionado, resultando num aumento no número de células com características de células apoptóticas. Este evento também foi bloqueado pela adição de anticorpo monoclonal anti-TLR2, confirmando mais uma vez a funcionalidade deste receptor. Expressão de TLR2 foi observado ainda em células de Schwann em lesões de pele de pacientes com hanseníase através da técnica de imunohistoquímica com dupla marcação utilizando anticorpo anti-NCAM para identificar a CS e seu anticorpo específico anti-TLR2. Aplicando-se a técnica do TUNEL foi também possível identificar células de Schwann nas lesões com características de apoptose. A capacidade de ligantes de ML induzirem apoptose em células de Schwann através da ativação de TLR2 sugere um mecanismo pelo qual a resposta imune inata poderia contribuir para a lesão de nervo periférico na hanseníase, ainda que na ausência de um processo inflamatório instalado.

Vários mecanismos parecem contribuir para a lesão neural na hanseníase. A expressão de MHC classes I e II nestas células descrita por alguns autores sugeriu que CS contendo ML poderia apresentar antígenos dependentes de ambas as classes de MHC e desta forma ativar linfócitos CD8 ou CD4. Spierings e cols. (2000) demonstraram que as CS humanas processaram e apresentaram antígenos de ML restritos a classe II e foram eficientemente destruídas por células Th1 ativadas. Resultados semelhantes foram descritos por Steinhoff et al. (1997) em que CS apresentando antígeno de ML sofreram lise por linfócitos CD8+ citotóxicos via MHC classe I. Um outro mecanismo proposto baseou-se no fato de que ML foi capaz de aumentar a expressão de N-CAM em linfócitos periféricos CD8+ de pacientes com eritema nodoso (ENL), sugerindo que estas células citotóxicas lisem CS expressando a molécula N-CAM independente da presença da micobactéria, de forma semelhante ao mecanismo descrito na esclerose múltipla (Spierings et al., 2000). Estes autores identificaram linfócitos CD8+/NCAM+ em amostras de nervo de ENL o que fortalece esta hipótese (Spierings et al., 2000). Em nosso presente estudo foi possível mostrar que a

linhagem de células de Schwann (ST88-14) obtida de pacientes com neurofibromatose (Fletcher, 1991; Glover, 1991), expressava constitutivamente tanto MHC classe I como II, com predomínio de classe I. Dados na literatura mostraram que a proteína 19 kDa, homóloga a utilizada neste estudo, reduz a expressão de MHC classe II em macrófagos (Noss et al., 2002); essa redução da expressão em CS, no entanto, precisa ser verificada.

O modelo de neurite autoimune experimental (EAN) tem sido largamente utilizado já que mimetiza os acontecimentos da síndrome de Guillan-Barré humana permitindo documentar o papel das citocinas na evolução da lesão inflamatória do SNP. Neste modelo, a lesão neural pode ser induzida em animal susceptível tanto pela imunização ativa com componentes da mielina como através da transferência de clones de células T autoreativas. A desmielinização ocorre rapidamente após a infiltração de linfócitos e macrófagos em contraste com a degeneração Walleriana onde não se encontra infiltração linfocitária (Rott et al, 1993; Fujimoto et al, 1999).

Na lesão neural da hanseníase, macrófagos e linfócitos são observados no infiltrado inflamatório embora as especificidades imunológicas destes linfócitos ainda não tenham sido caracterizadas. A resposta imune mediada por células constitui a principal resposta protetora contra bactérias intracelulares, como o *M. leprae*. Esta imunidade depende, primariamente, de uma apresentação do antígeno para as células efetoras do sistema imune, o que inclui a participação de monócitos e linfócitos T. Os primeiros exercem função efetora de eliminação da bactéria, fagocitando e apresentando fragmentos antigênicos para as células T aferentes, responsáveis pela especificidade dessa resposta, e cuja principal função na imunidade mediada por células será ativar os macrófagos, aumentando as funções fagocítica e microbicida dessas células, levando a um aumento da morte de bactérias. Essa ativação dos monócitos pelos linfócitos pode ocorrer tanto via citocinas, como por exemplo IFN γ , quanto pelo contato célula-célula, através de proteínas presentes na membrana dos linfócitos, capazes de se ligarem a receptores na membrana de monócitos, e influenciar na produção de citocinas por essas células. TNF- α apresenta-se como uma citocina amplamente investigada, estando relacionada aos quadros reacionais e a lesão de nervo nesta doença. Ela é uma das principais proteínas designadas a mediar as atividades em um grande número de células, exercendo funções biológicas importantes em reações inflamatórias de resposta do hospedeiro. Assim, a influência de linfócitos T na

produção de TNF por monócitos foi evidenciada paralelamente à culturas de PBMC. Foi observado que, quando o estímulo é o *M. leprae*, a produção de TNF- α é bem menor nas culturas de monócitos. Experimentos subsequentes, onde células T foram reconstituídas em culturas de monócitos, confirmaram a necessidade da presença de linfócitos para uma amplificação da produção de TNF- α em resposta a micobactéria. Experimentos foram direcionados para a análise da interferência do contato célula-célula nesse fenômeno, e demonstrou-se que esse está intimamente relacionado com amplificação da produção de TNF- α . Com a fixação das células T, observou-se que a produção de TNF- α por monócitos, mediante estímulo por *M. leprae*, voltava a aumentar quando essas células fixadas foram reconstituídas nas culturas de monócitos. Para confirmar se contato célula-célula era primordial para amplificação da produção de TNF α , demonstrou-se que quando o contato entre as duas populações celulares (monócitos e células T) foi “interrompido”, há uma queda na produção de TNF- α aos níveis produzidos nas culturas de monócitos purificados. Estudos evidenciaram ainda que células T de pacientes reacionais são capazes de amplificar a produção de TNF- α por monócitos mediante estímulo com *M. leprae*, porém isso não ocorre quando células T de pacientes não reacionais são reconstituídas em culturas de monócitos de pacientes reacionais (Sampaio et al., 2000). Essas observações leva-nos à hipótese de que células de pacientes reacionais possam apresentar-se sob um estado pré-ativado, adquirido in vivo, que influencia diretamente a produção de TNF α . Do mesmo modo, a interação célula T-CS compreende um mecanismo adicional de lesão tecidual ainda a ser explorado em nosso sistema *in vitro*.

A capacidade das células de Schwann produzirem citocinas, pode conferir a estas células a propriedade de modular a resposta imune sobre condições patológicas e não patológicas. Foi demonstrado que IL-6, por exemplo, exerce uma função essencial na defesa contra micobactérias (Appelberg, 1994; Ladel et al., 1997) e outros parasitas (Kopf et al., 1994). A IL-6 é produzida no estágio inicial da infecção micobacteriana e inibe o crescimento bacteriano em macrófagos (Flesch e Kaufmann 1990; Orme et al., 1993). Sua principal ação parece ser o efeito na parede vascular contribuindo para o acúmulo de leucócitos (Eugster et al., 1998). A citocina IL-8 que também é produzida por CS é capaz de recrutar várias células inflamatórias principalmente neutrófilos e também participa da resposta imune local (Oliveira et al., 2003).

O TNF α parece ser um agente anti-infeccioso natural envolvido na resistência bacteriana, resultando em efeitos colaterais no sítio onde esta citocina alcança concentrações elevadas. Dados do nosso laboratório indicam que na hanseníase, o TNF α parece ser um mediador de lesão nervosa através de todo o espectro da doença, e em particular durante os estados reacionais. Esta citocina tem sido predominantemente detectada no soro de pacientes tuberculóides além de ser detectada no soro de pacientes reacionais (ENL e RR). Os pacientes MB e PB com neurite, como esperado, apresentam níveis mais elevados de TNF (Sarno & Sampaio, 1996), sugerindo que a produção em excesso desta proteína pode estar envolvida na lesão tecidual da hanseníase como também em suas manifestações locais e sistêmicas. O papel do TNF na lesão do nervo foi também sugerido por outros autores que detectaram esta proteína e seu RNA em biópsias de nervo de pacientes com reação reversa através da expressão imunohistoquímica e PCR respectivamente (Khanolkar-Young et al., 1995). RNAm de TNF α foi detectado na linhagem celular ST88-14 em quantidades pequenas somente captadas por PCR em tempo real (Capítulo 2; Oliveira et al., manuscrito em preparação). Ensaios preliminares sugerem que após alcançar um pico em 3 horas de cultura, o RNA progressivamente reduziu e desaparece em 24 horas.

Por outro lado, TNF α não foi identificado no sobrenadante de cultura de CS em nenhum momento, o que poderia ser explicado pela rápida degradação do mesmo, ou por secreção de pequenas quantidades. Uma rápida captura do TNF pelos seus receptores presentes na superfície das células não pode ser afastada. Embora outras citocinas pró-inflamatórias tenham sido descritas na literatura, não encontramos trabalhos que tivessem demonstrado a secreção desta proteína por células de Schwann. Entretanto, a molécula de TNF foi identificada por método de imunohistoquímica e por hibridização *in situ* em nervo ciático de rato, confirmando a capacidade desta citocina ser produzida pela CS (Wagner & Myers, 1996). A expressão de RNAm de TNF foi também detectada por PCR em células de Schwann primárias e linhagem celular de rato após estímulo com IFN- γ (Murwani et al., 1996) e em biópsias de nervo de pacientes com neuropatias desmielinizantes, hereditárias, tóxicas ou metabólicas (Deprez et al., 2001). Os receptores de TNF foram descritos primeiramente em CS primária de rato (Skoff et al., 1998) e também em linhagem de CS benigna, assim como em biópsias de nervo de pacientes com CIPD através de imunohistoquímica (Bonetti et al., 2000). No nosso estudo, receptores de TNF foram

detectados na linhagem ST88-14 através de citometria de fluxo e no sobrenadante de cultura através do método de ELISA. Nos trabalhos de Bonetti e cols. 2000, foi demonstrado que tratamento de CS com TNF assim como IFN- γ levaria a hiperexpressão de Fas Ligante e perforina, confirmando a existência de ambos receptores nas CS humanas. Por outro lado, o efeito do TNF foi também demonstrado em experimento onde se adicionou TNF e TGF em cultura de células Schwann de rato, verificando-se a indução de apoptose contrastando com o efeito da citocinas isoladamente. No presente estudo foi possível confirmar este achado utilizando a linhagem de células de Schwann humana ST88-14. TNF em combinação com TGF aumentou a taxa de apoptose, sugerindo que o receptor TNFR1 foi ativado neste ensaio, constituindo mais um mecanismo atuando na lesão neural da hanseníase (Manuscrito em preparação).

Nos últimos anos, estudos realizados no nosso laboratório confirmaram que a linhagem ST88-14, originária de lesões neoplásicas da neurofibromatose humana, interage com ML e que é capaz de internalizar este bacilo tanto vivo quanto morto. Por outro lado, ficou caracterizado que estas células, da mesma forma que as CS normais, produzem as proteínas S100, P0 e MBP. Interessantemente, a linhagem ST88-14 expressa também laminina 2 na superfície o que permite a sua utilização em ensaios de infecção pelo ML *in vitro* (revisto por Pessolani et al., 2003).

Alguns estudos prévios têm tentado esclarecer o papel da apoptose na hanseníase. Neutrófilos isolados de pacientes com ENL mostram maior taxa de apoptose quando comparado com pacientes não reacionais, aspecto este também observado em neutrófilos (Oliveira et al., 1999; Hernandez et al., 2003). Analisando a taxa de apoptose em células mononucleares de sangue periférico nas diferentes formas clínicas foi encontrada uma taxa aumentada em multibacilares quando comparadas com paucibacilares e pessoas normais (Oliveira et al., 1999). Foi também evidenciado que células mononucleares de pacientes com RR mostraram aumento de apoptose (Gupta., 1999). Entretanto, nenhuma diferença na frequência de células apoptóticas foi observada quando se avaliou a biópsia de diferentes formas clínicas (Hatari et al., 1998).

O entendimento a respeito da indução do fenômeno de apoptose da célula hospedeira por diferentes patógenos vem crescendo nos últimos anos e suas conseqüentes implicações no desenvolvimento de diversas doenças vêm sendo amplamente investigadas. Bactérias como

a *S. flexneri*, *Salmonella*, *Legionella pneumophilla*, *Bordetella pertusis* e protozoários como o *Trypanosoma cruzi* são capazes de induzir apoptose. Micobactérias patogênicas para o homem foram também descritas capazes de causar a morte de macrófagos *in vivo* e *in vitro* (Plácido e colaboradores, 1997). Estudos do nosso laboratório tornaram possível determinar a contribuição do *M. leprae* na indução de apoptose *in vitro*, bem como investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos neste processo (Hernandez et al., 2003). Foi observado inicialmente que *M. leprae* induz apoptose de maneira dose-dependente em macrófagos derivados de monócitos *in vitro*. Plácido e colaboradores (1997) descreveram que a indução de apoptose em monócitos por *M. tuberculosis* também ocorre de maneira dose dependente tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Pacientes duplamente infectados com HIV e *M. tuberculosis* apresentam uma maior quantidade de bactérias do que pacientes infectados apenas com *M. tuberculosis* e um maior percentual de apoptose no granuloma. Desta forma, como na tuberculose associada ao HIV, a taxa de apoptose pode ser maior nas lesões dos pacientes lepromatosos do que nas lesões dos pacientes tuberculóides, já que o número de bacilos presentes nas lesões dos lepromatosos é muito maior. No entanto, diversos agentes podem influenciar o processo de morte celular e apoptose observada nas lesões provavelmente é decorrente de um somatório de fatores, incluindo carga bacilar. Molloy e colaboradores (1994) e também Oddo e colaboradores (1996) descreveram que a apoptose, mas não necrose, das células infectadas reduz a viabilidade das micobactérias intracelulares, BCG e *M. tuberculosis*, respectivamente. Desde então, a apoptose começou a ser avaliada como um mecanismo de defesa do hospedeiro, capaz de reduzir a viabilidade do patógeno e ainda limitar a infecção. Entretanto na hanseníase, ainda não foi investigado o impacto deste processo na viabilidade do bacilo. Os resultados relativos à redução de viabilidade das bactérias não são unânimes. Santucci e colaboradores (2000) não observaram queda de viabilidade do *M. tuberculosis* mesmo com altas taxas de apoptose *in vitro*. Os autores sugeriram que as diferentes vias de ativação de apoptose (ativação dos receptores de morte ou dano ao DNA, por exemplo) podem ou não favorecer a morte de patógenos intracelulares. Concordantemente, micobactérias virulentas parecem apresentar mecanismos para impedir o processo de apoptose da célula hospedeira, ao contrário das micobactérias não virulentas (Keane e colaboradores, 2000). A capacidade de inibir este processo pode facilitar a sobrevivência do patógeno, sua multiplicação e a manutenção da

infecção crônica da doença. Alguns dados obtidos em experimentos *in vivo* dão suporte a esta idéia. Além do TNF α , outros mediadores podem estar envolvidos na indução e/ou manutenção do processo ativo de morte celular *in vitro*. Bermudez e colaboradores (1999) observaram que a adição de anticorpos neutralizantes anti-TNF α ou anti-Fas inibiram parcialmente a morte de células infectadas com *M. tuberculosis*. Ainda mais, adição simultânea dos dois anticorpos reduziu o percentual de morte a níveis semelhantes ao das culturas não estimuladas. A participação do Fas e do FasL necessita ainda ser investigada em nosso sistema.

O TNF α pode induzir um amplo espectro de resposta através de sua interação com os receptores TNFR1 e TNFR2. A ativação destes receptores induz ativação dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B, que regulam a expressão de diversos genes responsivos ao TNF α . No entanto, ativação destes mesmos receptores pode induzir ativação das caspases, levando as células à morte por apoptose. Esta dupla capacidade de induzir ativação e morte parece ser uma característica comum dos receptores da superfamília do TNFR e vem sendo observada também nos TLRs. Foi sugerido, e parece coerente, que o processo de ativação confere resistência ao processo de morte.

Nenhum dos genes ativado através de NF- κ B ou AP-1 parece ser necessário para a apoptose induzida pelo TNF α , uma vez que este processo ocorre mesmo na presença de inibidores da síntese protéica. O bloqueio das vias de ativação do NF- κ B aumenta o efeito citotóxico do TNF α , sugerindo que genes induzidos por este fator têm uma função protetora. Chu e colaboradores (1997) descreveram que a proteína c-IAP2, cuja expressão pode ser controlada pelo NF- κ B, está envolvida com a proteção contra apoptose induzida pelo TNF α em linfócitos T. No entanto, o mecanismo preciso que determina a morte ou a sobrevivência da célula em resposta ao TNF α e porque, em determinadas situações, macrófagos sintetizam grandes quantidades de TNF α (como em resposta ao LPS) sem a indução de apoptose ainda não é conhecido. Perera e colaboradores (2000) descreveram que macrófagos ativado por LPS ou lisado solúvel de *M. leprae* apresentam dessensibilização a apoptose e reduzida expressão da caspase 8. A regulação dos processos de ativação ou apoptose foi altamente dependente de RIP. Na ausência desta proteína, NF- κ B era ativado em resposta ao TNF α mas quando ela estava presente, apoptose das células era observada (Pimentel-Muinos e Seed 1999). Foi demonstrado que IKK β é essencial para

a proteção dos timócitos a apoptose induzida por TNF α . Os mecanismos pelo quais determinados estímulos favorecem associação das proteínas ativadoras do processo de morte aos receptores de morte, enquanto outros não, ainda são desconhecidos. Embora a presença do NF- κ B tenha sido detectada em células estimuladas com *M. leprae* (Hernandez et al., manuscrito em preparação), a participação deste fator na indução de apoptose e da síntese de TNF α ainda está sendo investigada. O efeito das diferentes concentrações de *M. leprae* na ativação do NF- κ B também será alvo de investigação, já que vem sendo sugerido que diferentes concentrações deste fator podem favorecer respostas celulares diversificadas. O efeito do ML na taxa de apoptose das CS provenientes de linhagem celular foi avaliado adicionando-se ML vivo ou morto. Foi observado que ML foi capaz de aumentar a taxa de apoptose de CS quando comparada com a cultura não estimulada (Capítulo 2, Manuscrito em preparação). As vias que estão ativadas neste processo porém, necessitam ainda ser esclarecidas. Este resultado discorda dos experimentos realizados com culturas mistas de CS-axônio em que a adição de ML induziu a desmielinização após ligação do ML à CS porém não induziu apoptose. Não se pode afastar a possibilidade de que mediadores liberados pelo axônio protejam as CS de efeitos citopáticos do ML (Rambukkana et al., 2002). No modelo utilizado neste estudo utilizou-se uma lipoproteína putativa de ML 19 kDa que se liga a TLR2, assim ativando uma via específica de apoptose.

Recentemente, estudos têm mostrado que lipoproteínas bacterianas podem induzir apoptose em monócitos através de TLR2 (Aliprantis et al, 1999). O mecanismo de apoptose dependente de TLR2 ocorre via MyD88 e envolve o domínio FADD (Fas-associated death domain protein) e caspase 8 (Aliprantis, et al, 2000). Será portanto interessante determinar o mecanismo de apoptose em resposta a TLR2 no nosso sistema, assim como verificar se as citocinas inflamatórias estão envolvidas na apoptose mediada por TLR2, fato não esclarecido até o presente momento.



ANEXO 1

T Cell-Monocyte Contact Enhances Tumor Necrosis Factor- α Production in Response to *Mycobacterium leprae*

¹Elizabeth P. Sampaio, ¹Rosane B. Oliveira, ²Jan Warwick-Davies, ¹Renato B. Faria Neto, ²George E. Griffin, and ²Robin J. Shattock

¹*Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil;*
²*Department of Infectious Disease, St. George's Hospital Medical School, London, United Kingdom*

The Journal of Infectious Diseases 2000;182:1463–72



Smile
on my mac

T Cell–Monocyte Contact Enhances Tumor Necrosis Factor– α Production in Response to *Mycobacterium leprae*

Elizabeth P. Sampaio,¹ Rosane B. Oliveira,^{1,a}
Jan Warwick-Davies,^{2,a} Renato B. Faria Neto,¹
George E. Griffin,² and Robin J. Shattock²

¹*Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ),
Rio de Janeiro, Brazil;* ²*Department of Infectious Disease,
St. George's Hospital Medical School, London, United Kingdom*

Tumor necrosis factor (TNF)– α has been implicated as a key factor in inflammatory processes occurring in erythema nodosum leprosum (ENL). In the present study, the roles of soluble factors and contact-mediated interaction in the induction of enhanced TNF– α secretion in leprosy have been investigated. In vitro studies have demonstrated that *Mycobacterium leprae* per se is a poor stimulus for TNF– α production by purified monocytes obtained from normal subjects, although this could be enhanced by either exogenous interferon– γ or cell contact with fixed activated T lymphocytes. Further investigations demonstrated that monocyte–T cell contact enhanced *M. leprae*–induced TNF– α production by peripheral blood mononuclear cells of ENL patients and was modulated by blocking antibodies to CD40L, CD69, and CD18. These results suggest that physical contact with T cells isolated from patients in a particular disease state (ENL) modulates monocyte function and may contribute to the secretion of proinflammatory cytokines described in ENL.

During the clinical course of leprosy, a substantial proportion of patients develop reactional episodes (type I, or reversal reaction [RR], and type II, or erythema nodosum leprosum [ENL]) of acute inflammation affecting skin and nerves [1, 2]. The precipitating factors and pathophysiological mechanisms involved in triggering both types of reaction remain ill defined. Although the prevalence of leprosy is declining because of the broad coverage of multidrug therapy (MDT), a significant impact on the incidence and development of reactional episodes has not been achieved. Therefore, understanding mechanisms governing the induction of reactional episodes is likely to facilitate novel strategies to prevent or treat these clinical inflammatory complications, which occur during and even after MDT.

Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor [TNF]– α , interferon [IFN]– γ , and interleukin [IL]– 1β) are known to be released in vivo and ex vivo during episodes of RR and ENL [3–5]. Convincing data indicate that TNF– α is likely to be a marker of tissue injury throughout the leprosy spectrum [6, 7],

mediating local and systemic inflammatory manifestations during reactional states (e.g., ENL, RR, and neuritis). Previous studies have demonstrated elevated concentrations of TNF– α in plasma during ENL and enhanced TNF– α secretion following in vitro stimulation of ENL patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [8–10]. Furthermore, we have observed that TNF– α release from PBMC cultures from ENL patients, following in vitro exposure to *Mycobacterium leprae*, was far higher than that observed from highly purified monocytes prepared simultaneously from the same patient [9]. These data suggest that cognate interaction between mononuclear cells in PBMC from ENL patients is required for maximal TNF– α production in response to *M. leprae*. Such effects may be mediated through release of soluble factors and/or cell-cell contact.

Previous studies have demonstrated that monocyte/macrophage TNF– α production can be enhanced by synergistic cytokines [11, 12]. The appearance of ENL in lepromatous patients after intradermal injections of IFN– γ strongly suggests that this cytokine is likely to play a key role in the regulation of cytokine production in leprosy [13]. In addition, IFN– γ priming of leprosy patients' peripheral blood monocytes has been demonstrated to enhance TNF– α production, both in vivo and in vitro [13].

Monocyte cytokine production is also modulated by contact-mediated interactions with cell matrices and other cells. Engagement of specific adhesion molecules on monocytes results in the transduction of cellular signals, nuclear translocation of NF– κ B, and cytokine secretion [14, 15]. This process quantitatively enhances expression of inflammatory mediators by these cells in vitro. Direct contact with activated peripheral blood T cells, human T cell lines, or membrane preparations

Received 17 November 1999; revised 10 July 2000; electronically published 9 October 2000.

Informed consent was obtained from patients enrolled in the study, and the human experimentation guidelines of FIOCRUZ were followed in the conduct of the clinical study.

Financial support: Wellcome Trust (0499929/2/92/2/MEP/JPS/CRD), London, and World Health Organization (TDR, UNDP/World Bank/WHO [930222]). R.B.O. was supported by the Brazilian Research Council, and R.B.F.N. was a fellow at the Federal Technical School of Chemistry, Rio de Janeiro.

^a These authors contributed equally to this study.

Reprints or correspondence: Dr. Robin J. Shattock, St. George's Hospital Medical School, Dept. of Infectious Diseases, Cranmer Terrace, SW17 0RE, London, United Kingdom (shattock@sghms.ac.uk).

The Journal of Infectious Diseases 2000;182:1463–72

© 2000 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
0022-1899/2000/18205-0023\$02.00

of activated T lymphocytes has been demonstrated to stimulate monocytes and monocytic cell lines, *in vitro*, to produce pro-inflammatory cytokines, including TNF- α , IL-6, and IL-1 β [16–18]. Although previous studies have identified significant modulation in integrin expression during ENL reactions [19, 20], the synergistic or independent role of cell-cell contact in the generation of TNF- α in leprosy has not been characterized.

In the present study, using purified mononuclear cells obtained from peripheral blood of healthy donors and of patients with unreactive lepromatous leprosy or ENL, we investigated the effects of exogenous IFN- γ and cell contact of monocytes with activated T cells on TNF- α production in response to *M. leprae*.

Patients and Methods

Patient population. Patients with leprosy ($n = 15$) from the Leprosy Out-Patient Unit, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, volunteered for this study. Clinical diagnosis was established, following histological examination of skin biopsy samples, according to Ridley and Jopling's classification [21]. Patients (11 men and 4 women, 21–55 years of age [mean \pm SD, 31 \pm 11 years]) were given diagnoses of lepromatous leprosy (LL; $n = 7$) or borderline lepromatous leprosy (BL; $n = 8$) and then were treated with MDT, as recommended by the World Health Organization [8]. MDT was continued throughout the study.

Ten patients experienced a type II (ENL) reaction during the course of MDT, and 5 were unreactive. ENL was diagnosed on presentation of painful, isolated, or disseminated dermal erythematous nodules, with or without systemic involvement, such as fever, malaise, myalgia, lymphadenitis, arthralgia, and/or edema. Biopsy samples were taken from ENL lesions, and clinical diagnosis of ENL was confirmed by an experienced pathologist. After informed consent was obtained, venous blood was drawn from all patients (blood was drawn from ENL patients during an active reactional episode), and assays were performed as described below.

Reagents and antigens. PMA, lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (serotype 0127:B8), polymixin B, indomethacin, phytohemagglutinin (PHA), RPMI 1640 medium, fetal calf serum, antibiotics, and L-glutamine were purchased from Sigma (Poole, UK). Paraformaldehyde (PFA) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Recombinant human IFN- γ and a neutralizing monoclonal anti-human IFN- γ were purchased from R&D Systems (Minneapolis). Anti-CD40, -CD40L, and -CD69 monoclonal antibodies were obtained from Immunotech (Marseille, France). Anti-CD18 and anti-CD11a were from Dakopatts (Copenhagen). Irradiated armadillo-derived whole *M. leprae* (2×10^9 bacteria/mg) and purified lipoarabinomannan of *M. leprae* (LAM-ML) were kindly provided by Dr. P. Brennan (Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins). Irradiated whole *M. tuberculosis* (Mtb; H37Rv) was supplied by J. Dhillon (St. George's Hospital Medical School, London). Mycobacteria were thawed and water-bath sonicated prior to addition to monocyte cultures, as described elsewhere [9]. All reagents and media used for *in vitro* cultures were shown to contain <0.1 U/mL of endotoxin, as mea-

sured by the *Limulus* amoebocyte lysate assay (Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD).

Monocyte isolation and culture (healthy subjects). Monocytes were isolated from donor buffy coats (South Thames Blood Transfusion Center, London) by Ficoll-Hypaque density centrifugation (Pharmacia, Upsala, Sweden), prior to cell separation in a Beckman JE6 elutriator (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The monocyte fraction was recovered, resuspended in RPMI supplemented with 2% autologous human serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin, and cultured in 24-well plates (Costar, Cambridge, MA) at 1×10^6 cells/well for an additional 2-h period. Following adherence, cultures were washed 3 times in warm culture medium.

PBMC isolation (patients with leprosy). PBMC were isolated, under endotoxin-free conditions, from heparinized venous blood by Ficoll-Hypaque density centrifugation. Because blood samples from leprosy patients were too small for processing by elutriation (≤ 40 mL of venous blood), monocyte and lymphocyte purification was carried out by rosetting PBMC suspension with neuraminidase-treated (Calbiochem-Behring, La Jolla, CA) sheep erythrocytes. Nonrosetted cells (monocyte-enriched population) were plated (1×10^6 cells/well) onto 24-well plates (Costar) and were allowed to adhere for 2 h. Nonadherent cells were then removed from such cultures by washing with warm RPMI, and the resultant adherent population (0.95×10^6 cells/well) was cultured in medium supplemented with 10% human AB⁺ serum (Whittaker Bioproducts).

Monocyte cultures (adherent population) were $>95\%$ pure, as judged both from Giemsa and from nonspecific esterase staining (not shown). In addition, the rosetted population (lymphocyte-enriched cells) was collected and treated with sheep erythrocyte lysis solution, and, following an adherence culture step onto 6-well plates (37°C, for 2 h), for further exclusion of contaminating monocytes, nonadherent cells (T lymphocytes) were recovered, washed in PBS, and suspended at 2×10^6 cells/mL in medium containing 10% AB⁺ serum. Purified T cells were $>95\%$ CD3⁺ and $<1\%$ CD14⁺, as assessed by flow cytometry.

T cell activation and fixation. HUT-78, a human cutaneous CD4⁺ T cell lymphoma line [22], was obtained from the American Type Culture Collection (Bethesda, MD). For *in vitro* experiments, HUT-78 cells or primary T cells were either cultured in medium alone or stimulated with 1 μ g/mL PHA and 5 ng/mL PMA (PHA/PMA) for 18 h at 37°C. After the incubation period, unstimulated and PHA/PMA-stimulated T cells were washed 3 times with PBS and were fixed under gentle agitation with freshly prepared 1% PFA in PBS for 2 h at 4°C. Fixed cells were washed again and suspended at 4×10^6 cells/mL in culture medium. Where indicated, primary T cells were fixed immediately following isolation from PBMC. PFA-fixed (stimulated or unstimulated) T cells showed no detectable cytokine release (TNF- α or IFN- γ) into culture medium (data not shown). Unless specified, T cells were cocultured with monocytes at a 1:2 T cell:monocyte ratio.

Cytokine assays. Concentrations of TNF- α and IFN- γ in cell-free culture supernatants were determined by commercial ELISA, using specific pairs of monoclonal antibodies (R&D Systems), and were processed according to the manufacturer's specifications. Time course experiments demonstrated that maximal TNF production varied between donors but occurred within 12–18 h, and

TNF production remained elevated at 24 h. Therefore, to control for donor variability, TNF production was measured at $T = 18$ – 24 h in all experiments, unless otherwise stated. TNF- α concentrations are expressed as picograms per milliliter of protein, and the detection limit of the assay was 4 pg/mL.

Statistical analysis. Results are reported as pooled data from the entire series of experiments. All experimental data are mean \pm SE. For analysis of variation of cytokine concentrations in culture samples and for comparison of paired samples, the Friedman analysis of variance (ANOVA) and Kendall coefficient of concordance test and the Wilcoxon signed-rank test (Statistica for Windows, computer program manual; Statsoft [1995], Tulsa, OK) were used whenever appropriate. The statistical significance level adopted was $P < .05$.

Results

***M. leprae* induction of TNF- α production by human monocytes in vitro.** *M. leprae* and LAM-ML demonstrated a concentration-dependent ability to induce secretion of TNF- α by human monocytes obtained from healthy donors (individuals not exposed to leprosy; figure 1A). For *M. leprae*, this ranged from low, if any, TNF- α — 61.6 ± 49.3 pg/mL, at a bacillus:cell ratio of 1:1—up to 1619 ± 273 pg/mL at a concentration of $10 \mu\text{g/mL}$ (equivalent to 30 bacilli per monocyte). LAM-ML ($10 \mu\text{g/mL}$) induced 2954 ± 380 pg/mL of TNF- α , although lower concentrations of LAM-ML (100 ng/mL) released amounts of TNF- α (mean \pm SE, 1649 ± 527 pg/mL) equivalent to $10 \mu\text{g/mL}$ *M. leprae* (figure 1B).

The potency of irradiated *M. leprae* (30 bacilli per monocyte) as a trigger of monocyte TNF- α production was demonstrated to be far less than that of irradiated *M. tuberculosis* (Mtb, 1 bacillus per monocyte), which induced 3983 ± 397 pg/mL TNF, or LPS (10 ng/mL), which induced 7000 ± 314 pg/mL (figure 1C). Indeed, at a comparative 1:1 bacteria: cell ratio, monocyte TNF- α production in response to *M. tuberculosis* was ~60-fold that induced by *M. leprae*. Moreover, in vitro culture of monocytes further reduced the production of TNF- α induced by *M. leprae* or LAM-ML ($10 \mu\text{g/mL}$ of each; $P < .05$, Friedman ANOVA and Kendall coefficient of concordance test; figure 2).

Additional experiments performed in the presence of indomethacin (1 or $10 \mu\text{g/mL}$) demonstrated that prostaglandin production did not account for the low level of TNF- α production triggered by *M. leprae* in vitro (table 1). Furthermore, control experiments carried out in the presence of polymixin B ($5 \mu\text{g/mL}$) demonstrated that TNF- α production did not result from contaminating endotoxin in any of the described experimental conditions (data not shown).

IFN- γ enhances *M. leprae*-induced TNF- α secretion by human monocytes in vitro. Monocytes obtained from healthy subjects were exposed to either *M. leprae* or Mtb, in the presence or absence of an optimal dose of IFN- γ (100 U/mL). Although IFN- γ treatment induced no significant TNF- α production per se, it significantly enhanced monocytes' secretion of TNF- α in

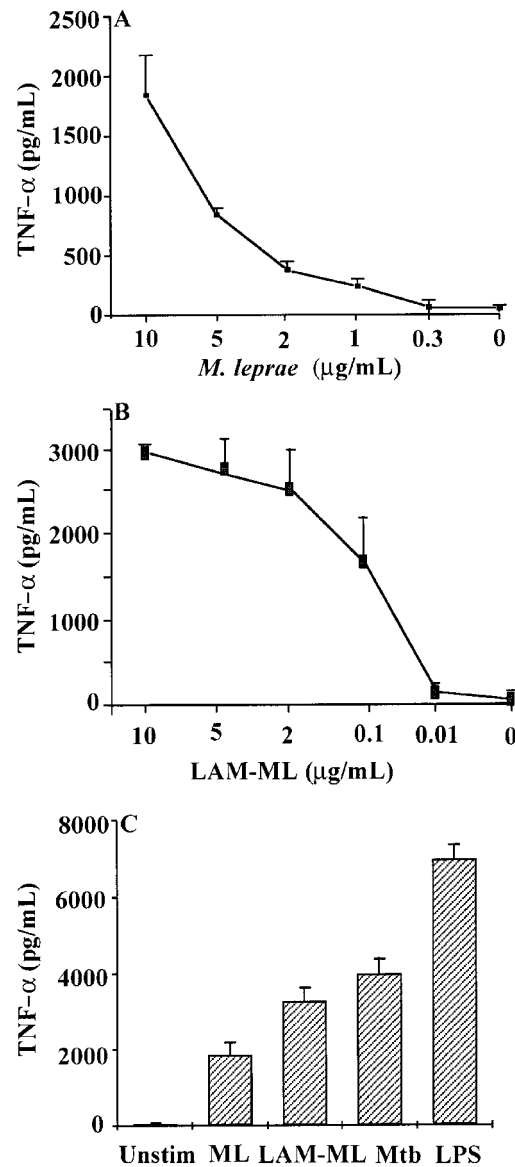


Figure 1. Mycobacteria inducing tumor necrosis factor (TNF)- α production by purified monocytes. Monocytes obtained from healthy donors were exposed to titrated concentrations of (A) *Mycobacterium leprae* or (B) purified lipoarabinomannan of *M. leprae* (LAM-ML), and, after 18–24 h, levels of TNF- α in culture supernatants were determined by ELISA. C, Amounts of TNF- α released in vitro in the same monocyte cultures after stimulation with *M. leprae* (ML; $10 \mu\text{g/mL}$), LAM-ML ($10 \mu\text{g/mL}$), lipopolysaccharide (LPS; 10 ng/mL), or *M. tuberculosis* (Mtb; $0.4 \mu\text{g/mL}$). Data are expressed as picograms per milliliter of protein and represent the mean \pm SE of 10 individual experiments. TNF- α levels in unstimulated cultures (Unstim) were undetectable.

response to both stimuli (*M. leprae*, 4668 ± 304 pg/mL; Mtb, 6487 ± 488 pg/mL) in comparison with that to either stimulus alone (1619 ± 273 and 3003 ± 275 pg/mL, respectively; $P = .007$ and $.0027$, Wilcoxon signed-rank test; figure 3A). In ad-

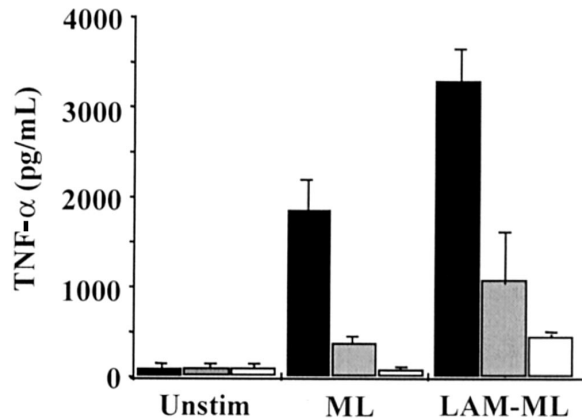


Figure 2. Effects of in vitro culture on monocyte tumor necrosis factor (TNF)- α production induced by *Mycobacterium leprae*. Monocytes from healthy subjects were stimulated on the day of isolation (solid bars) or after 24 (shaded bars) or 48 (open bars) h of culture with *M. leprae* (ML; 10 μ g/mL) or purified lipoarabinomannan of *M. leprae* (LAM-ML; 10 μ g/mL). Supernatants were harvested and assayed for the presence of TNF- α . Data are expressed as picograms of TNF- α per milliliter of protein and represent the mean \pm SE of 5 individual experiments. Significantly lower TNF- α values were detected following 24- and 48-h cultures ($P < .05$, Friedman analysis of variance and Kendall coefficient of concordance test). Unstim, unstimulated cultures.

dition, the concentration-dependent ability of *M. leprae* to induce TNF- α production was augmented in the presence of IFN- γ , even at very low bacterial exposure (0.3 μ g/mL, equivalent to 1 bacterium per cell; figure 3B). Such enhancing effects of IFN- γ were also observed with monocytes exposed to *M. leprae* or LAM-ML on consecutive days of cell culture ($P < .05$, Wilcoxon signed-rank test; figure 3C).

Effect of monocyte-T cell contact on *M. leprae*-induced TNF- α production. Adherent monocytes were cocultured at a 2:1 ratio with PFA-fixed resting or activated HUT-78 T cells, in the presence or absence of *M. leprae*. Resting HUT-78 T cells, in the absence or presence of *M. leprae*, had little effect on monocyte TNF- α production. Coculture with activated HUT-78 T cells alone, however, resulted in enhanced monocyte TNF- α production, which was further increased in the presence of *M. leprae*. Such experiments demonstrated that coculture with activated, but not resting, HUT-78 T cells induced enhancement of TNF- α secretion in response to *M. leprae* exposure (figure 4A). To determine whether such an effect was dependent on the concentration of interacting fixed activated T cells, monocytes were cocultured with a titrated ratio of such T cells in the absence and presence of *M. leprae*. These experiments (figure 4B) demonstrated that optimal enhancement of *M. leprae*-induced TNF- α production occurred at a monocyte:activated T cell ratio of 8:1 ($P < .05$, Wilcoxon signed-rank test). In contrast, a 1:1 ratio produced no enhancement of *M. leprae*-induced TNF- α secretion. These data indicate that, at a

high monocyte:T cell ratio, monocyte response to *M. leprae* is enhanced, whereas such effects are abolished at a low ratio (1:1).

The effect of cell-cell interaction on the monocyte response to other mycobacteria was also investigated. Parallel experiments were carried out, using Mtb as the stimulus. A different pattern of response was observed with Mtb, with maximal enhancement of TNF- α production occurring at a 1:1 monocyte:T cell ratio and decreasing when lower numbers of fixed activated T cells were used (figure 4C). Thus, although monocyte-T cell contact enhanced TNF- α production in response to both types of mycobacteria, the mechanisms involved are apparently not identical.

***M. leprae* induction of TNF- α release by PBMC and purified monocytes from leprosy patients with reaction (ENL).** PBMC and purified monocyte and lymphocyte subpopulations were isolated from patients during symptomatic ENL. Whole PBMC, isolated monocytes, and monocyte cultures reconstituted with autologous T lymphocytes (monocytes and lymphocytes) were exposed to *M. leprae* for a total period of 18–20 h, after which supernatants were harvested and assayed for the presence of TNF- α by ELISA. As shown in figure 5A, PBMC isolated from ENL patients and cultured in the absence of *M. leprae* produced no detectable TNF- α , whereas exposure to *M. leprae* induced significant TNF- α secretion into the medium (mean \pm SE TNF- α , 2370 \pm 513 pg/mL). In contrast, purified monocytes released less TNF- α (1108 \pm 75 pg/mL) when stimulated with identical *M. leprae* ($P = .015$, Friedman ANOVA and Kendall coefficient of concordance). Such diminished response, however, was reversed after reconstituting monocyte cultures with autologous purified T cells (monocytes and lymphocytes, 2954 \pm 734 pg/mL).

These findings strongly suggest that TNF- α secretion is augmented by interaction of monocytes and T cells. IFN- γ production was not detected in supernatants from such cultures (not shown). Furthermore, addition of neutralizing antibody to IFN- γ (0.25 μ g/mL, sufficient to neutralize 240 ng/mL of IFN- γ) had no effect on TNF- α production (figure 5B). Such data demonstrate that IFN- γ played no part in the amplification of TNF- α response in this ex vivo system.

Role of monocyte-T cell contact in the amplification of TNF-

Table 1. Effect of indomethacin treatment on monocyte tumor necrosis factor (TNF)- α production induced by *Mycobacterium leprae* in vitro.

Stimulator	Indomethacin		
	Nil	1 μ g/mL	10 μ g/mL
Unstimulated	50 \pm 43	72 \pm 43	54 \pm 17
<i>M. leprae</i>	1769 \pm 509	1439 \pm 263	1500 \pm 403
Irradiated <i>M. tuberculosis</i>	2842 \pm 527	2461 \pm 436	3099 \pm 70

NOTE. Monocytes were stimulated with *M. leprae* (10 μ g/mL) or Mtb (4 μ g/mL) in the absence (medium) or presence of indomethacin (1 or 10 μ g/mL). TNF- α production is expressed as mean \pm SE of 3 independent experiments. Unstimulated cells were kept in culture in the absence of any stimulus.

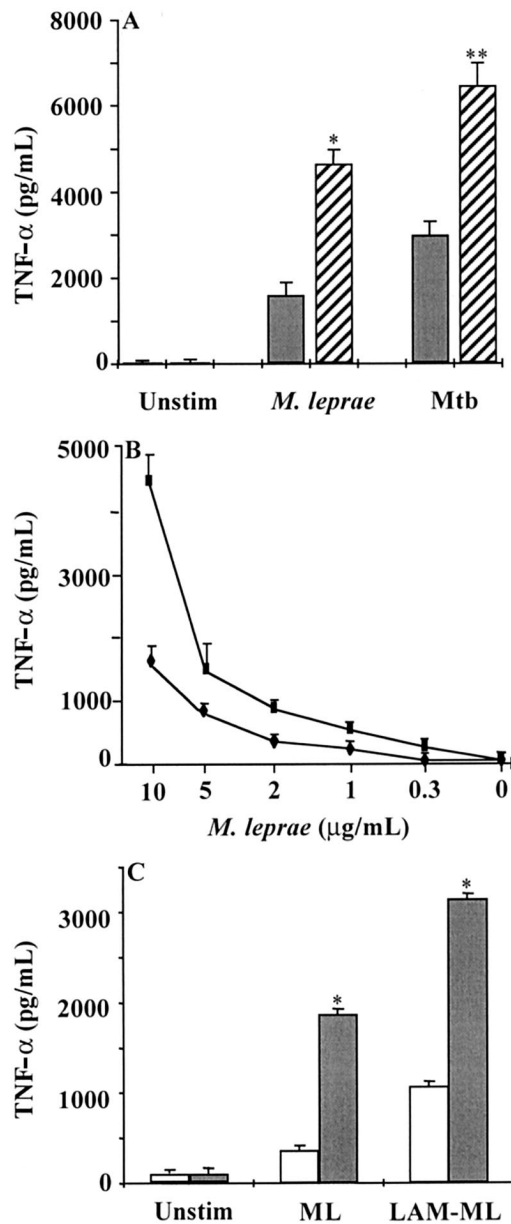


Figure 3. Interferon (IFN)- γ enhances tumor necrosis factor (TNF)- α production from mycobacteria-stimulated monocytes in vitro. *A*, Monocytes obtained from healthy subjects were stimulated on the day of isolation with either *Mycobacterium leprae* (30:1 bacteria:cell ratio) or *M. tuberculosis* (Mtb; 1:1 bacterium:cell ratio), in the absence (shaded bars) or presence (diagonally striped bars) of IFN- γ (100 U/mL). *B*, Monocytes were exposed to a titrated concentration of *M. leprae* in the absence (◆) or presence (■) of IFN- γ (100 U/mL). *C*, Monocytes were cultured in vivo for 24 h before stimulation with *M. leprae* (ML) or purified lipoarabinomannan of *M. leprae* (LAM-ML; 10 μ g/mL), either in the presence (shaded bars) or absence (open bars) of IFN- γ . Data are expressed as picograms of TNF- α per milliliter of protein and represent the mean \pm SE of 7 individual experiments. * P < .05 and ** P < .005, which represent a significant difference (Wilcoxon signed-rank test) versus values in the absence of IFN- γ . Unstim, unstimulated cultures.

α response in cells from patients with ENL. Subsequent experiments were carried out to determine the role of monocyte-T cell contact in the amplification of TNF- α secretion observed in cells from patients with ENL. Isolated monocytes were cultured alone or directly cocultured with either viable isolated autologous T lymphocytes or paraformaldehyde-fixed autologous T lymphocytes. In additional cultures, fixed and unfixed T cells were cocultured in the same wells as isolated monocytes but were physically separated from monocytes by using transwell inserts (0.4- μ m pore size), which prevented cell-cell contact but allowed diffusion of soluble factors.

As shown in figure 6*A*, *M. leprae*-induced TNF- α release from isolated monocytes (1450 \pm 283 pg/mL) was enhanced when either viable (3231 \pm 660 pg/mL) or fixed (2895 \pm 124 pg/mL) autologous T lymphocytes were added back to the cultures (P = .01, Friedman ANOVA test). Such enhancement, however, was not observed after physical separation of identical monocytes and T cells (figure 6*A*), which indicates that cell-cell contact, rather than the release of soluble factors, was crucial for this phenomenon. As expected, it was noted in some experiments that unstimulated monocyte/lymphocyte cocultures, in the absence of *M. leprae*, released detectable TNF- α , in the range of 50–200 pg/mL (figure 6*A*–6*C*). Nonetheless, such variable TNF- α induction was markedly lower than the levels induced by *M. leprae* in these same experiments.

Further studies were carried out to determine whether the activation state of mononuclear cells obtained from ENL patients influenced their in vitro behavior. Monocytes obtained from patients with ENL were cultured in the absence or presence of *M. leprae* (10 μ g/mL), either alone or cocultured with (1) fixed autologous lymphocytes or (2) fixed lymphocytes obtained from unreactive lepromatous patients. In addition, monocytes obtained from unreactive leprosy patients were either cultured alone or cocultured with (1) fixed autologous lymphocytes or (2) fixed lymphocytes from ENL patients.

It was observed that isolated monocytes from ENL patients (figure 6*B*) released significantly more TNF- α in response to *M. leprae* in vitro (939 \pm 83.1 pg/mL) than did monocytes from unreactive patients (261 \pm 16.2 pg/mL; P < .05, Wilcoxon signed-rank test), which confirms our previous observations [9, 13]. Moreover, fixed lymphocytes obtained from ENL patients increased *M. leprae*-induced TNF- α secretion in monocytes obtained from unreactive patients (648 \pm 137 vs. 261 \pm 16 pg/mL TNF- α ; P < .01, Wilcoxon rank test). In contrast, T cells obtained from unreactive lepromatous patients had no effect on the induced TNF- α secretion by monocytes from ENL patients (939 \pm 83 vs. 933 \pm 28 pg/mL, respectively). Similar effects were observed when unfixed T cells were used, despite their potential for allogenic stimulation. Such cells cultured in the absence of *M. leprae*, however, expressed little or no TNF- α (data not shown).

Interestingly, the data shown in figure 6*C* indicate that T cells obtained from unreactive lepromatous patients (LL/BL) have

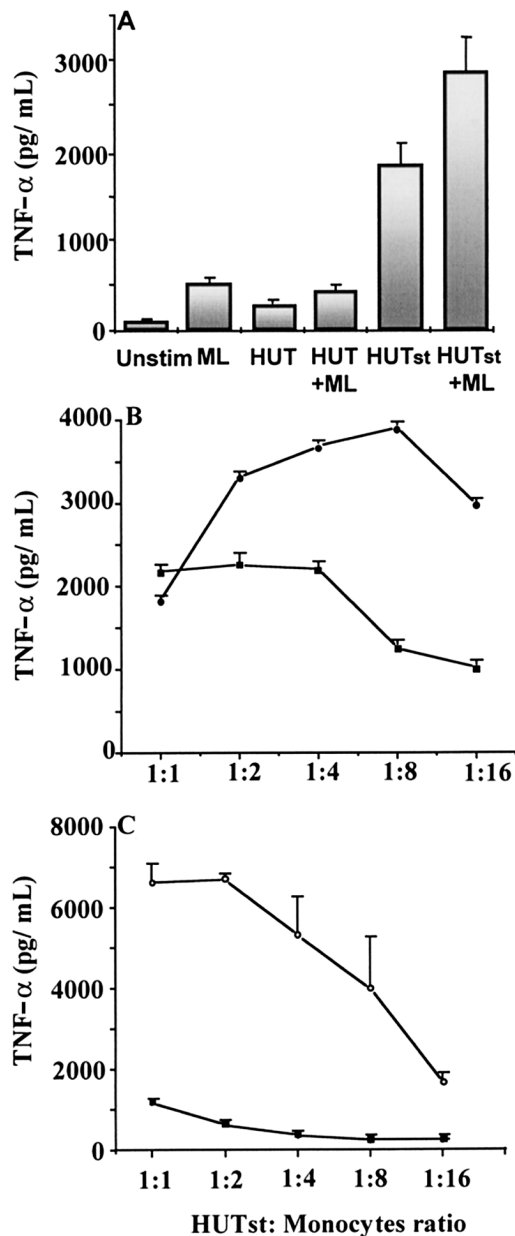


Figure 4. Monocyte-T cell contact enhances *Mycobacterium leprae*-induced tumor necrosis factor (TNF)- α secretion in vitro. A, Monocytes obtained from healthy donors were cocultured with fixed phytohemagglutinin/PMA-stimulated HUT-78 T cell line (HUTst) or unstimulated HUT-78 T cell line (HUT), at a 1:2 T cell:monocyte ratio, in the presence or absence of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *M. leprae*. Data are expressed as picograms of TNF- α per milliliter of protein and represent the mean \pm SE of 7 pooled experiments. Monocytes were cocultured with a titrated ratio of HUTst in the presence (●) or absence (■) of *M. leprae* (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (B) or *M. tuberculosis* (C) (○; 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 18 h, after which culture supernatants were assayed for TNF- α . Data are the mean of 4 and 2 experiments, respectively, and error bars represent SE. A significant difference ($P < .05$, Wilcoxon matched pairs test) was found in comparison with cells (monocytes and HUTst) cultured in the absence of the stimulus.

the potential to enhance *M. leprae*-induced monocyte TNF- α production subsequent to in vitro stimulation with PHA/PMA. Accordingly, in these cultures, unstimulated T cells fixed immediately following isolation from blood did not routinely induce monocyte TNF- α production. Concentrations of TNF- α in cocultures of monocytes and unstimulated fixed T cells, in the presence of *M. leprae*, were 506 ± 81 pg/mL, versus 521 ± 27.5 pg/mL in monocyte cultures and 947 ± 109 pg/mL in monocyte-stimulated T cell cultures ($P < .05$, Friedman ANOVA).

Preliminary experiments were carried out to ascertain the potential contribution of candidate T cell-surface molecules to the observed enhancement of *M. leprae*-induced monocyte TNF- α production. Monocytes from ENL patients were cocultured with autologous PFA-fixed T cells in the presence or absence of blocking antibodies to candidate surface molecules involved in enhancement of TNF- α production (table 2). These data demonstrate that blockade of CD40L, CD18, or CD69 modulates TNF- α release by $\leq 58\%$. Furthermore, parallel studies in which monocytes from unreactive patients were cocultured with PFA-fixed activated autologous T cells demonstrated a similar but reduced effect on blockade of CD40L or CD69.

Discussion

M. tuberculosis and *M. leprae* enter into macrophages through receptors of the complement pathway (CR), mainly CR1, CR3, and CR4 [23, 24]; however, involvement of other cell-surface receptors [25] in cell binding, phagocytosis, cytokine production, and induction of cell activation has been demonstrated, mostly for Mtb and some of its components. For example, engagement of CD11b/CD18 [26]—as well as activation of CD14, scavenger receptor A, and the mannose receptor [27, 28]—has been reported to enhance both TNF- α mRNA expression and protein secretion in vitro. In addition, induction of TNF- α and IL-1 β by LAM of Mtb seems to be mediated through binding to the CD14 molecule on human monocytes [29]. Whether any of these molecules is involved in triggering TNF- α production in response to *M. leprae* is currently not known.

This study demonstrates that *M. leprae*, in contrast to other bacterial products such as LPS, LAM-ML, or Mtb, is per se a relatively poor inducer of monocyte TNF- α production in vitro in monocytes from healthy subjects (individuals not exposed to *M. leprae*). The observed low induction of TNF- α was shown to be independent of the suppressive effects of PGE2, described elsewhere [30]. Even at a high bacteria:cell ratio (30:1), which may approximate that seen in untreated lepromatous leprosy lesions, the levels of TNF- α induced by irradiated *M. leprae* were considerably lower than those induced by irradiated Mtb at a 1:1 bacterium:cell ratio.

This study utilized irradiated mycobacteria, and we cannot

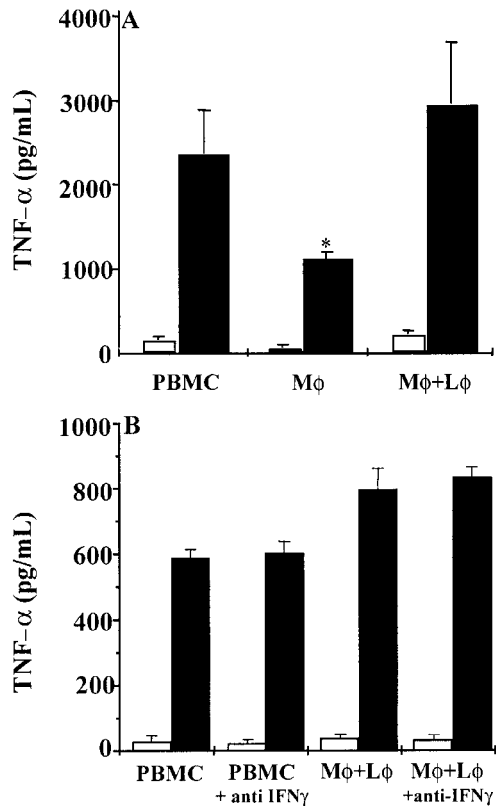


Figure 5. T lymphocytes obtained from patients with erythema nodosum leprosum (ENL) enhance *Mycobacterium leprae*-induced tumor necrosis factor (TNF)- α production in vitro. *A*, Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), purified monocytes (M ϕ), and cocultures of monocytes and T lymphocytes (M ϕ + L ϕ) obtained from ENL patients ($n = 10$) were cultured in the presence (■) or absence (□) of *M. leprae* for 18–20 h, after which supernatants were recovered and assayed for the presence of TNF- α by ELISA. *Significant difference in TNF- α values (mean \pm SE) in comparison with PBMC or M ϕ + L ϕ cultures ($P < .05$, Friedman analysis of variance and Kendall coefficient of concordance). *B*, Mononuclear cells obtained from ENL patients were cultured as PBMC, purified monocytes, or monocytes reconstituted with autologous T cells (M ϕ + L ϕ) and were stimulated with (■) or without (□) *M. leprae*, in the presence or absence of a neutralizing monoclonal anti-IFN- γ antibody (0.25 μ g/mL), for 20 h. Supernatants were assessed for the presence of TNF- α . Results, expressed as picograms of TNF- α per milliliter of protein, represent the mean of 3 independent experiments for each culture condition.

exclude the possibility that live *M. leprae* could induce different levels of monocyte TNF- α production. We observed no difference, however, in the amount of monocyte TNF- α induced by live versus irradiated Mtb (data not shown). The differences we now report between the abilities of *M. leprae* and Mtb to induce monocyte TNF- α production are likely to reflect particular features of the 2 mycobacteria species and may help to explain differences in the clinical pathophysiology of diseases caused by these 2 organisms. Such differences are likely to be related to the type of receptors and/or to distinct secondary pathways triggered in monocytes by each bacterial species.

The observation that monocyte responsiveness to *M. leprae* was further reduced following a 48-h in vitro culture may be related to down-regulation of cell-surface receptors (e.g., CD14 and CR3) required for triggering TNF- α production associated with cellular differentiation. The low expression of these receptors in highly parasitized unreactive lepromatous leprosy lesions might contribute to the very low levels of TNF- α production detected in such lesions (not shown). In contrast, acute inflammatory states are frequently observed in reactive lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. In particular, ENL is associated with increased CD4 T cell infiltration in lesions, increased expression of adhesion molecules, including intercellular adhesion molecule 1 and leukocyte function antigen 1 [3], and enhanced IL-12 and IFN- γ mRNA expression [31, 32], consequent with enhanced TNF- α expression [5, 8, 33].

The role of soluble factors in induction of ENL is strongly supported by our previous observation of the appearance of ENL in leprosy patients following intradermal injection of IFN- γ [13]. Moreover, we recently demonstrated reciprocal coexpression of enhanced TNF- α and IFN- γ mRNA expression within inflammatory lesions during ENL [31, 33]. In vitro data from this study demonstrate that recombinant human IFN- γ (100 U/mL), when added to monocyte cultures from healthy individuals (or leprosy patients [13]), enhanced both *M. leprae*- and *M. tuberculosis*-induced TNF- α production.

Monocyte TNF- α production can also be modulated by cell-cell interaction. Data from this study demonstrate that, in healthy individuals, monocyte contact with activated, but not resting, T cells (at a 1:1 ratio) enhanced TNF- α production induced by both *M. leprae* and Mtb. These data indicate that the activation state of the T cell is critical to the expression of ligands required to enhance TNF- α secretion induced by the mycobacteria. This is in keeping with previous observations that monocyte contact per se with a high ratio (1:8) of activated and not resting T cells can trigger monocyte TNF- α production [18].

It is interesting that, in this study, the kinetics of T cell enhancement of TNF- α production were different for *M. leprae* and *M. tuberculosis*. Such differences may be key to the distinct pathophysiology caused by these 2 related microorganisms. Although such data clearly indicate that both IFN- γ and monocyte-T cell contact modulate monocyte TNF- α production induced by *M. leprae*, the relative contributions of such mechanisms to enhanced TNF- α production associated with ENL are not known.

Ex vivo experiments carried out using PBMC from reactive (ENL) patients demonstrated that, although enhanced TNF- α production in response to *M. leprae* is augmented by monocyte-T cell contact, it is independent of IFN- γ production. Such data suggest that peripheral blood T cells from ENL patients already express activation ligands required to trigger enhanced TNF- α secretion in response to *M. leprae*. Likewise, inability of T lymphocytes from unreactive patients to modify TNF- α levels suggests that they lack expression of the required li-

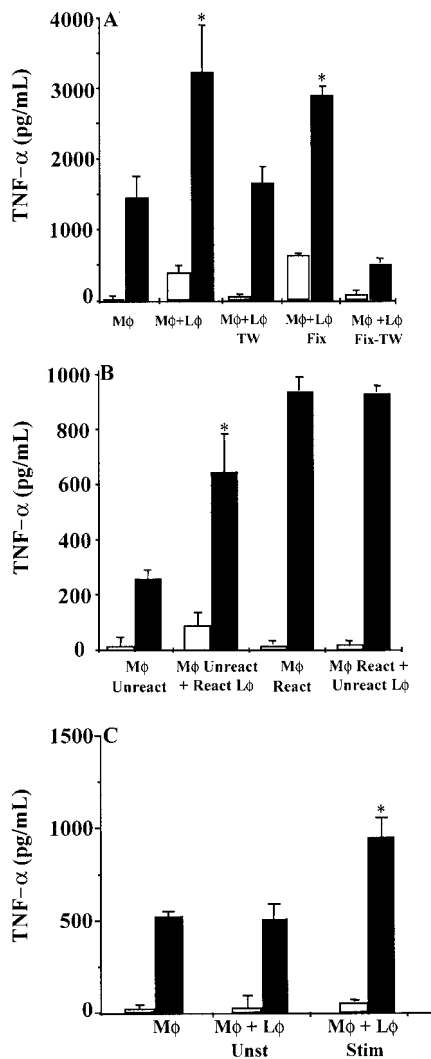


Figure 6. Enhancement of *Mycobacterium leprae*-induced tumor necrosis factor (TNF)- α production in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with erythema nodosum leprosum (ENL) is modulated by T cell-macrophage contact. *A*, Monocytes obtained from patients with ENL were cultured alone (M ϕ) or cocultured (M ϕ + L ϕ) with fixed (L ϕ Fix; n = 3) or unfixed (L ϕ ; n = 6) autologous T lymphocytes in the presence (■) or absence (□) of *M. leprae*. In some cultures (n = 6), M ϕ and T cells were physically separated through transwell (TW) inserts. *B*, Monocytes obtained from reactional (React; n = 3) and unreactal (Unreact; n = 3) patients were cultured either alone or in the presence of fixed unstimulated T cells obtained from unreactal (Unreact L ϕ) and reactional (React L ϕ) patients, respectively, with (■) or without (□) *M. leprae*. *C*, Monocytes, obtained from unreactal lepromatous patients (n = 3), were cultured in the presence or absence of autologous phytohemagglutinin (PHA)/PMA-stimulated (L ϕ Stim) or unstimulated (L ϕ Unst) T lymphocytes, with (■) or without (□) *M. leprae*. In all experimental conditions, supernatants were harvested 18 h later and were assayed for TNF- α production. Data are expressed as picograms of TNF- α per milliliter of protein and are shown as mean \pm SE of the pooled experiments. *Significant differences in TNF- α values were observed between M ϕ /M ϕ + L ϕ -TW and M ϕ + L ϕ cultures (P < .05, Wilcoxon signed-rank test).

gands, which were gained only after in vitro activation with PHA/PMA (figure 6C).

Several candidate T cell-surface molecules (CD11c, CD2, CD18, CD69, CD40L, CD44, and CD45), up-regulated on T cell activation, have been demonstrated to modify monocyte TNF- α production in vitro [17, 18, 34–40]. In preliminary experiments, we have demonstrated that blocking antibodies to CD40L, CD69, or CD18 modulate T cell enhancement of *M. leprae*-induced monocyte TNF- α production. It is highly likely, however, that the potentiating effects of activated T cells are dependent upon the sum effect of multiple ligand pairs rather than a single ligand pair. Thus, it is not unsurprising that blockade of individual ligand pairs was insufficient to completely inhibit such a phenomenon. Further elucidation of the ligands involved in the described mechanism is the goal of ongoing investigations.

The observation that isolated monocytes from ENL patients release significantly more TNF- α in response to *M. leprae* than do monocytes from unreactal patients suggests a difference in their activation status. The use of neutralizing antibodies excludes the possibility that endogenous production of IFN- γ could account for such differences. We cannot, however, exclude the possibility that raised plasma IFN- γ levels in ENL patients could have preactivated monocytes prior to venesection.

The results from this model of cognate interaction suggest that monocyte-T cell contact enhances TNF- α production in PBMC of ENL patients in response to *M. leprae*. This is potentiated by the activation state of both cell types. Elevated expression of cell-surface activation markers and IFN- γ within ENL lesions indicates that such a mechanism could also contribute to the enhanced TNF- α expression observed within the lesions themselves; however, macrophages in lepromatous lesions are highly parasitized. Previous studies have demonstrated that such a high bacillary load has clear and substantial

Table 2. Effects of blocking monoclonal antibodies (MAbs) to candidate T cell-surface molecules involved in enhancement of tumor necrosis factor (TNF)- α production induced by *Mycobacterium leprae*.

MAbs against cell-surface proteins ^a	Inhibition (ENL), ^b %		Inhibition (unreactal), ^c %	
	M ϕ /L ϕ	M ϕ /L ϕ /ML	M ϕ /L ϕ	M ϕ /L ϕ /ML
CD11a	7.6	0	0	0
CD18	5	54.3	0	0
CD40	0	12.2	0	0
CD40L	0	43	0	32.6
CD69	16.6	58.7	0	41

NOTE. Results are expressed as percentage of inhibition in comparison with TNF- α production in coculture with a control mouse IgG and are the mean of 3 independent experiments. ENL, erythema nodosum leprosum; M ϕ /L ϕ , monocytes and lymphocytes; M ϕ /L ϕ /ML, monocytes, lymphocytes, and *M. leprae*.

^a Fixed T cells were preincubated with MAbs (10 μ g/mL final concentration) for 30 min at 37°C before use in coculture experiments.

^b Monocytes from ENL patients were cocultured with autologous paraformaldehyde (PFA)-fixed T cells.

^c Monocytes from unreactal leprosy patients were cocultured with autologous PFA-fixed T cells preactivated with phytohemagglutinin/PMA.

effects on immunological functions of macrophages, including antigen presentation, which suggests a lack, or even suppression, of cellular activation of both macrophages and T cells. Such effects were induced only by viable bacilli [41]. Thus, during the course of MDT, the decrease in the number of viable bacilli, and hence in their immunosuppressive effects, may trigger a change in the activation state of monocytes and T cells, consequent with the enhanced TNF- α production observed during ENL.

Acknowledgments

We would like to thank Drs. J. A. C. Nery and A. M. Salles, as the attending physicians at the Leprosy Out-Patient Unit, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), and Dr. E. N. Sarno, Leprosy Laboratory, FIOCRUZ, for helpful discussion during the development of this work and for critically reading the manuscript. Thanks are also due to M. O. Hernandez and D. M. Vieira for technical assistance, H. J. Matos for helping with the statistical analysis, and E. R. Leite for efficient secretarial help.

References

- Scollard DM, Smith T, Bhoopat L, Theetranont C, Rangaeng S, Morens DM. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1994**;62:559–67.
- Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy reactions: current and future approaches to management. *Baillieres Clin Infect Dis* **1997**;4:1–23.
- Cooper CL, Mueller C, Sinchaisri T, et al. Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *J Exp Med* **1989**;169:1565–81.
- Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery JAC. Serum levels of tumor necrosis factor- α and interleukin- β during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* **1991**;84:103–8.
- Parida SK, Grau GE, Zahfer SA, Mukherjee R. Serum tumor necrosis factor and interleukin 1 in leprosy and during lepra reactions. *Clin Immunol Immunopathol* **1992**;63:23–7.
- Sampaio EP, Sarno EN. Role of inflammatory cytokines in tissue injury in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1996**;64:268–73.
- Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell P, et al. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol* **1995**;99:196–202.
- Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunological manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* **1993**;168:408–14.
- Sampaio EP, Duppre NC, Moreira AL, Nery JAC, Sarno EN. Development of giant reaction in response to PPD skin test in lepromatous leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1993**;61:205–13.
- Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. *Infect Immun* **1992**;60:1441–6.
- Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* **1996**;62:61–130.
- Ozmen L, Pericin M, Hakimi J, et al. Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J Exp Med* **1994**;180:907–15.
- Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med* **1992**;175:1729–37.
- Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor- α secretion: signal integration and NF- κ B translocation. *J Clin Invest* **1995**;95:2297–303.
- Shattock RJ, Rozzardi GP, Hayes P, Griffin GE. Engagement of adhesion molecules (CD18, CD11a, CD45, CD44, and CD58) enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in monocytic cells through a tumor necrosis factor-modulated pathway. *J Infect Dis* **1996**;174:54–62.
- Dayer J-M, Isler P, Nicod LP. Adhesion molecules and cytokine production. *Am Rev Respir Dis* **1993**;148(Suppl):S70–4.
- Isler P, Vey E, Zhang J-H, Dayer J-M. Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: a possible role of CD69. *Eur Cytokine Netw* **1993**;4:15–23.
- Vey E, Zhang J-H, Dayer J-M. IFN γ and 1,25(OH) $_2$ D $_3$ induce on THP-1 cells distinct patterns of cell surface antigen expression, cytokine production, and responsiveness to contact with activated T cells. *J Immunol* **1992**;149:2040–6.
- Sullivan L, Sano S, Pirmez C, et al. Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect Immun* **1991**;59:4154–60.
- Rieckmann P, Scholze G, Weichselbraun I, Ganapati R, Prange HW. Soluble adhesion molecules in sera of patients with leprosy: levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) rapidly decrease during multidrug therapy. *Clin Exp Immunol* **1996**;105:65–8.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **1966**;34:255–73.
- Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA. Mitogen requirements for the in vivo propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* **1980**;55:409–15.
- Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol* **1991**;147:1983–94.
- Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* **1997**;277:1091–3.
- Zimmerli S, Edwards S, Ernst JD. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1996**;15:760–70.
- Sutterwala FS, Noel G, Clynes R, Mosser DM. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med* **1997**;185:1977–85.
- Dentener MV, Brazil V, Von Asmuth EJU, Ceska M, Burman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* **1993**;150:2885–91.
- Polat GL, Laufer J, Fabian I, Passwell JH. Cross-linking of monocyte plasma membrane Fc alpha, Fc gamma or mannose receptors induces TNF production. *Immunology* **1993**;80:287–92.
- Zhang Y, Doerfler M, Lee TC, Guillemain B, Rom WN. Mechanism of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J Clin Invest* **1993**;91:2076–83.
- Misra N, Selvakumar M, Singh S, et al. Monocyte derived IL-10 and PGE2 are associated with the absence of Th1 cells and in vivo T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett* **1995**;48:123–8.
- Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BCC, Nery JAC, Sampaio EP. Cytokine gene expression in leprosy: a possible role for IFN-gamma and IL-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* **1999**;50:541–9.
- Sreenivasan P, Misra RS, Wilfred D, Nath I. Lepromatous leprosy patients show T helper 1-like cytokine profile with differential expression of interleukin-10 during type 1 and 2 reactions. *Immunology* **1998**;95:529–36.
- Sampaio EP, Moraes MO, Nery JAC, Santos AR, Matos HC, Sarno EN. Pentoxifylline decreases in vivo and in vivo tumour necrosis factor- α (TNF α) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin Exp Immunol* **1998**;111:300–8.

34. Dayer J-M, Isler P, Nicod LP. Adhesion molecules and cytokine production. *Am Rev Respir Dis* **1993**;148(Suppl):S70-4.
35. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol* **1996**;156:3952-60.
36. Webb DSA, Shimizu Y, van Sventer GA, Shaw S, Gerrard TL. LFA-3, CD44, and CD45: physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* **1990**;249:1295-301.
37. Shu U, Kuniwa M, Wu CY. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* **1995**;25:1125-8.
38. Wagner DH Jr, Stout RD, Suttles J. Role of the CD40-CD40 ligand interaction in CD4⁺ T cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur J Immunol* **1994**;24:3148-54.
39. Burger D, Rezzonico R, Li JM. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* **1998**;41:1748-59.
40. Briscoe DM, Henault LE, Geehan C, Alexander SI, Lichtman AH. Human endothelial cell constimulation of T cell IFN-gamma production. *J Immunol* **1997**;159:3247-56.
41. Krahenbuhl JL. Role of mycobacterial constituents in regulation of macrophage effector function. In: Roth JA, et al. *Virulence mechanisms of bacterial pathogen*. 2d ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, **1995**:97-114.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WATSON, J. D. 1994. Cell adhesion, cell junction and the extracellular matrix. Molecular Biology The Cell. In Robertson, M. (ed). Garland Publishing, Inc., New York & London. P.991.

ALIPRANTIS, A. O., R. B. YANG, D. S. WEISS, P. GODOWSKI, AND A. ZYCHLINSKY. 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J.* 19:3325-3336.

ALIPRANTIS, A. O., R.-B. YANG, M. R. MARK, S. SUGGETT, B. DEVAUX, J. D. RADOLF, G. R. KLIMPEL, P. GODOWSKI, AND A. ZYCHLINSKY. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2. *Science.* 285:736-739.

ALVARENGA FBF. Imunidade celular na reação reversa da hanseníase: caracterização imunohistoquímica evolutiva das lesões cutâneas. PhD thesis, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1995, 115p.

ALVES L., AMARAL V.W.A. & Pessolani M.C.V. Intracellular Signals Triggered During association of *Mycobacterium leprae* with Schwann cells. 16th International Leprosy Congress. Período de 04 a 09 de Agosto de 2002. Resumo pág. 253

ANSSELIN AD, CORBEIL SD, DAVEY DF.1995. Culture of Schwann cells from adult animals. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 31:253-4.

ANTIA N.H. & SHETTY V.P. 1997. The peripheral nerve in leprosy and other neuropathies. Oxford University Press, Deli. 79-137.

APPELBERG R., 1992. T cell regulation the chronic peritoneal neutrofilia during mycobacterial infections *Clin. Exp. Immunol.* 89: 120-125.

ARBOUR NC, LORENZ E, SCHUTTE BC, ZABNER J, KLINE JN, JONES M, FREES K, WATT JL, & SCHWARTZ DA. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat. Genet.* 25:187.

ARGALL KG, ARMATI PJ, POLLARD JD, WATSON E, BONNER J. 1992. Interactions between CD4+ T-cells and rat Schwann cells in vitro. 1. Antigen presentation by Lewis rat Schwann cells to P2-specific CD4+ T-cell lines. *J Neuroimmunol.* 40:1-18.

ARMATI, P. J. & POLLARD, J. D. Immunology of the Schwann cell. Bailliers 1996. *Clin. Neurol.* 5: 47-64.

AWATRAMANI R, SHUMAS S, KAMHOLZ J, SCHERER SS. 2002. TGFbeta1 modulates the phenotype of Schwann cells at the transcriptional level. *Mol Cell Neurosci.* 19:307-19.

BAEULER PA. & HENKEL T. Functional and activation of NF-kappa B in immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994. 12: 141.

BAUER S, KIRSCHNING CJ, HACKER H, REDECKE V, HAUSMANN S, AKIRA S, WAGNER H, LIPFORD GB. 2001. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9237-42.

BECKER MN, DIAMOND G, VERGHESE MW, RANDELL SH. 2000. CD14 dependent LPS-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. *J Biol Chem.* 275: 29731-29736.

BERMUDEZ, L.E. PARKER, A., PETROFSKY, M. (1999) Apoptosis of Mycobacterium avium-infected macrophages is mediated by both tumour necrosis factor (TNF) and Fas, and involves the activation of caspases. *Clin. Exp. Immunol.* 116, 94-9.

BOCHUD P-Y, HAWN TR, & ADEREM A. Cutting Edge: A Toll-Like Receptor 2 Polymorphism That Is Associated with Lepromatous Leprosy Is Unable to Mediate Mycobacterial Signaling mycobacterial infections. *Journal of Immunol.* 2003, 170: 3451-3454.

BONETTI B, VALDO P, STEGAGNO C, TANEL R, ZANUSSO GL, RAMARLI D, FIORINI E, TURAZZI S, CARNER M, MORETTO G. 2000. Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000. 59:74-84.

BRENNAN PJ, E NIKAIDO H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 64: 29-63.

BRIGHTBILL HD, LIBRATY DH, KRUTZIK SR, YANG R-B, BELISLE JT, BLEHARSKI JR, MAITLAND M, NORGARD MV, PLEVY SE, SMALE ST, BRENNAN PJ, BLOOM BR, GODOWSKI PJ, MODLIN RL. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* 285:732-36.

BROWNE SG. Erythema nodosum in leprosy. *J. Chronic Dis.* 16:23-30.

BUNGE MB & BUNGE RP. 1986. Linkage between Schwann cell extracellular matrix production and ensheathment function. *Ann. New York Acad. Sci.* 486: 241-247.

BUNGE MB, CLARK, M.B., DEEN, A.C., EIDRIDGE, C.F., AND BUNGE, R.P. 1990 Schwann-cell function depends upon axonal signals and basal lamina components. *Ann. NY Acad. Sci.* 580, 281-287.

BUNGE RP & BUNGE MB. 1990. Evidence that contact with connective tissue matrix is required for normal interaction between Schwann cells and nerve fibers. *J. Cell Biol.* 78, 943-950.

BUNGE, M.B. 1993. Schwann cell regulation of extracellular matrix biosynthesis and assembly. Peripheral Neuropathy. Vol. 1. P.J. Dyck, P.K. Thomas, P.A. Low, and J.F. Poduslo, editors. W.B. Saunders, Philadelphia. 299–316.

CALDERWOOD DA, SHATTIL SJ, GINSBERG MH. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 275:22607-10.

CARIO E, PODOLSKY DK. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of Toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68:7010–17.

CASSATELA MA, MEDA L., GASPERINI LS, D'ANDREA A, MA, X. TRINCHIERI. 1995. Interleukin-12 production by human Polymorphonuclear Leukocytes. *Eur. J. Immunol.* 25: 1-5.

CHAPLIN, D. D. 2003. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 111: S442-59.

CHAUDHARY PM, FERGUSON C, NGUYEN V, NGUYEN O, MASSA HF, EBY M, JASMIN A, TRASK BJ, HOOD L & NELSON PS. 1998. Cloning and characterization of two/toll/Interleukin –1 receptor-like genes TIL3 e TIL4: Evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* 91, 4020–4027.

CHENG L, MUDGE AW. 1996. Cultured Schwann cells constitutively express the myelin protein P0. *Neuron.* 16:309-19.

CHIMELLI L, FREITAS M, NASCIMENTO. 1997. Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. *J Neurol.* 244:318-23.

CHU ZL, MCKINSEY TA, LIU L, GENTRY JJ, MALIM MH, BALLARD DW. 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10057-62.

CHUANG T-H, ULEVITCH RJ. 2001. Identification of hTLR10: a novel human Toll like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1518:157–61

CONTI, G., A. DE POL, E. SCARPINI, F. VACCINA, M. DE RIZ, P. BARON, M. TIRITICCO, AND G. SCARLATO. 2002. Interleukin-1 beta and interferon-gamma induce proliferation and apoptosis in cultured Schwann cells. *J. Neuroimmunol.* 124:29-35.

CREANGE A, LEFAUCHEUR JP, AUTHIER FJ, GHERARDI RK. 1998. Cytokines and peripheral neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*. 1998. 154:208-16.

CRÉANGE A, LEFAUCHEUR JP, AUTHIER FJ, GHERARDI RK. 1998. Cytokines and peripheral neuropathies. *Rev Neurol (Paris)*.154: 208–216

CREE IA, GARDINER CA, BECK JS, MEHTA J. 1986. Studies of cell death (apoptosis) and cell division in leprosy granulomas. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 54:607-13.

DeClue, J. E., PAPAGEORGE, A. G, FLEATHER, J.A., DICHL, S. R., RATNER, N., VASS, W. C, LOWY, D. R. 1992. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Reckling hausen (type 1) neurofrimatosi. *Cell* 69:265-273.

DUNCAN ME AND PEARSON JM. 1982. Neuritis in pregnancy and lactation. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 50:31-8.

EHRING GR, ZAMPIGHI G, HORWITZ J, BOK D, HALL JE.1990. Properties of channels reconstituted from the major intrinsic protein of lens fiber membranes. *J Gen Physiol*. 96:631-64.

FELTRI, M.L., D.G. PORTA, S. PREVITALI, A. NODARI, B. MIGLIAVACCA, A. CASSETTI, A. LITTLEWOOD-EVANS, L.F. REICHARDT, A. MESSING, A. Conditional disruption of $\beta 1$ integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol*. 156:199–209.

FORD AL, BRITTON WJ, ARMATI PJ. 1993. Schwann cells are able to present exogenous mycobacterial hsp70 to antigen-specific T lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 43:151-9.

GATFIELD J, PIETERS J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000. 288:1647-50.

GILLEN C, JANDER S, STOLL G. 1998. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res*. 15:489-96.

GOMEZ-GOMEZ L, BOLLER T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5:1003–11.

GUINTO RS, TOLENTINO JB, MALABY MC. 1993. Observations in erythema nodosum leprosum. *Int. J. Leprosy*. 31:81-94.

GUPTA A, SHARMA VK, VOHRA H, GANGULY NK. 1999. Inhibition of apoptosis by ionomycin and zinc in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of leprosy patients. *Clin Exp Immunol.* 117:56-62.

HACKER H, VABULAS RM, TAKEUCHI O, HOSHINO K, AKIRA S, WAGNER H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med.* 2000. 192:595-600.

HAGGE DA, OBY ROBINSON S, SCOLLARD D, MCCORMICK G, WILLIAMS DL. 2002. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. *J Infect Dis.* 186:1283-96.

HAJJAR, A. M., D. S. O'MAHONY, A. OZINSKY, D. M. UNDERHILL, A. ADEREM, S. J. KLEBANOFF, AND C. B. WILSON. 2001. Cutting edge: functional interactions between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol soluble modulins. *J. Immunol.* 166:15.

HARTUNG HP, KIESEIER BC. 2000. The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system *J Neuroimmunol.* 107:140-147.

HAYASHI, F., K. D. SMITH, A. OZINSKY, T. R. HAWN, E. C. YI, D. R. GOODLETT, J. K. ENG, S. AKIRA, D. M. UNDERHILL, AND A. ADEREM. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099.

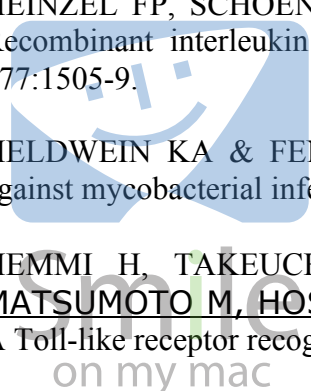
HAZIOT, A., TSUBERI, BEN-ZION & GOYERT. 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- α in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 150: 5556-5565.

HEGUY A, BALDARI CT, MACCHIA G, TELFORD JL & MELLI M. 1992. Amino acids conserved in interleukin-1 receptors (IL-1Rs) and Drosophila toll protein are essential for IL-1R signal transduction. *J Biol Chem.* 267: 2605.

HEINZEL FP, SCHOENHAUT DS, RERKO RM, ROSSER LE, GATELY MK. 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med.* 177:1505-9.

HELDWEIN KA & FENTON MJ. 2002. The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes and Infection.* 4: 937-944.

HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T, KAISHO T, SATO S, SANJO H, MATSUMOTO M, HOSHINO K, WAGNER H, TAKEDA K, AKIRA S. et al. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-45.



HERNANDEZ MO, NEVES I, SALES JS, CARVALHO DS, SARNO EN AND SAMPAIO EP. 2003. Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* *in vitro*: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. *Immunology*. 109:156-164.

HERSH D, WEISS J, ZYCHLINSKY A. 1998. How bacteria initiate inflammation: aspects of the emerging story. *Curr Opin Microbiol*. 1:43-8.

HERTZ CJ, KIERTSCHER SM, GODOWSKI PJ, BOUIS DA, NORGARD MV, ROTH MD, MODLIN RL. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J. Immunol*. 166:2444-50.

HERTZ CJ, MODLIN RL. 2003. Role of toll-like receptors in response to bacterial infection. *Contrib Microbiol*.10:149-63.

HEUMANN, 2001. CD14 and LBP in endotoxemia and infections caused by Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res*. 7:439-41.

HIRANO T., AKIRA S., TAGA T., KISHIMOTO T. 1990. Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today*. 11:443-9.

HOFFMAN JA & REICHHART JM. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. 2002. *Nature*. 3: 121-126.

HOSHINO K., TAKEUCHI O., KAWAI T., SANJO H., OGAWA T., TAKEDA Y., AKIRA S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR as the Lps gene product. *J. Immunol*. 162: 3749-3752.

HOU L, SASAKI H & STASHENKO P. 2000. Toll-Like Receptor 4-Deficient Mice Have Reduced Bone Destruction following Mixed Anaerobic Infection. *Infection and Immunity*. 68: 4681-4687.

JANEWAY CA & MEDZHITOV R. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol*. 20:197.

JANEWAY CA JR, MEDZHITOV R. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol*. 10:349-50.

JARDIM MR, ANTUNES SL, SANTOS AR, NASCIMENTO OJ, NERY JA, SALES AM, ILLARRAMENDI X, DUPPRE N, CHIMELLI L, SAMPAIO EP, SARNO EP. 2003. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol*. 250:806-9.

JENSEN & MIRSKY, 2002. Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat*. 200:367-76.

JESSEN E MIRSKY, 2000. MIRSKY R, JESSEN KR, BRENNAN A, PARKINSON D, DONG Z, MEIER C, PARMANTIER E, LAWSON D. 2002. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris*. 96:17-24.

JESSEN KR, MIRSKY R. 1999. Developmental regulation in the Schwann cell lineage. *Adv Exp Med Biol*. 468:3-12.

JESSEN KR, MIRSKY R. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci*. 22:402–410.

JOB CK. 1989 Nerve damage in leprosy. 1989. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 57:532-539.

JOHNSON MR, DECLUE JE, FELZMANN S, VASS WC, XU G, WHITE R, LOWY DR.1989 Neurofibromin can inhibit Ras-dependent growth by a mechanism independent of its GTPase-accelerating function. *Mol Cell Biol*. 1994. 14:641-5.

JOLLIFE, D.S. 1977. Leprosy reactional states and their treatment. *Brit. J. Dermatol*. 97: 345-352.

KALLEN KJ. 2002. The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1592:323-43.

KANG TJ, SEONG-BEOM LEE, GUE-TAE CHAE a polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. 2002. *Cytokine*. 20:56–62.

KANG, TJ & CHAE G T. 2001. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 31:53.

KEANE J, REMOLD HG, KORNFEL H. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol*. 164:2016-2020.

KHANOLKAR-YOUNG, S., RAYMENT, N., BRICKELL, P.M., KATZ, D.R., VINAYAKUMAR, S., COLSTON, M.J., AND LOCKWOOD, D.N.J. 1995. Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin. Exp. Immunol*. 99, 196-202.

KHANOLKAR-YOUNG, S., RAYMENT, N., BRICKELL, P.M., KATZ, D.R., VINAYAKUMAR, S., COLSTON, M.J., AND LOCKWOOD, D.N.J. 1995. Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin. Exp. Immunol*. 99:196-202.

KIM J, OCHOA MT, KRUTZIK SR, TAKEUCHI O, UEMATSU S, LEGASPI AJ, BRIGHTBILL HD, HOLLAND D, CUNLIFFE WJ, AKIRA S, SIELING PA, GODOWSKI PJ & MODLIN RL. Activation of Toll-Like Receptor 2 in Acne Triggers Inflammatory Cytokine Responses. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 1535–1541.

KIMURA, H., FISHER W. H. & SCHUBERT, D. 1990. Structure, expression and function of a schwannoma-derived growth factor. *Nature*. 348: 257-348.

KOBE & DEISENHOFER.1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol*. 5: 409-16.

KOBE & KAJAVA, 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*. 11:725-32.

KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, LIU PT, COLE ST, GODOWSKI PJ, MAEDA Y, SARNO EN, NORGARD MV, BRENNAN PJ, AKIRA S, REA TH, MODLIN RL. 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Med*. 9:525-32.

LAAL, S., MISHRA, R. S., NATH, I. 1987. Type I reactions in leprosy: Heterogeneity in T-cell functions related to the background leprosy type. *Int. J. Lepr*. 55: 481-487.

LAOCHUMROONVORAPONG P, PAUL S, ELKON KB, KAPLAN G. 1996. H2O2 induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* within cultured human monocytes. *Infect Immun*. 64:452-9.

LEMAITRE B, NICOLAS E, MICHAUT L, REICHHART J-M, HOFFMANN JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/ Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-83.

LILJE O, ARMATI PJ. The distribution and abundance of MHC and ICAM-1 on Schwann cells in vitro. 1997. *J Neuroimmunol*. 77:75-84.

LIMA C.S., RIBEIRO, M.L., SOUZA, L.A., SARDELLA, A.B., WOLF, V.M.A., AND PESSOLANI, M.C.V. (2001) Intracellular signals triggered during association of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* BCG with human monocytes. *Microbial Pathogenesis* 31, 37-45.

LISAK RP, SKUNDRIC D, BEALMEAR B, RAGHEB S. The role of cytokines in Schwann cell damage, protection, and repair. *J Infect Dis*. 1997. 176:S173-9.

LEE BH, MURUGASU-OEI B, DICK T. 1998. Upregulation of a histone-like protein in dormant *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Gen Genet*.260:475-9.

LIEN E, SELLATI TJ, YOSHIMURA A, FLO TH, RAWADI G. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem*. 274:33419-25.

LORENZ E, MIRA JP, CORNISH KL, ARBOUR NC, SCHWARTZ DA. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect Immun.* 2000. 68:6398-401.

MAEDA A, SOBEL RA. 1996 Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:300-9.

MARQUES MA, MAHAPATRA S, SARNO EN, SANTOS S, SPENCER JS, BRENNAN PJ, PESSOLANI MC. 2001; Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins. *Braz J Med Biol Res.* 2001.34:463-70.

MARQUES, M.A., CHITALE, S., BRENNAN, P.J. & PESSOLANI, M.C.V. (1998). Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. *Infection and Immunity.* 66:2622 – 2631.

MARQUES, M.A.M., MAHAPATRA, S., SARNO, E.N., NANDAN, D., DICK, T., BRENNAN, P.J., PESSOLANI, M.C.V. 2000. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes and Infection.* 2:1407-1417.

MARTINI, R. & SCHACHNER, M. 1988. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J. Cell Biol.* 106. 1735-1746.

MARTINO G, GROHOVAZ F, BRAMBILLA E, CODAZZI F, CONSIGLIO A, CLEMENTI E, FILIPPI M, COMI G, GRIMALDI LM. 1998. Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol.* 43:340-9.

MATSUMOTO S, YUKITAKE H, FURUGEN M, MATSUO T, MINETA T, YAMADA T. 1999. Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Microbiol Immunol.* 43:1027-36.

MEANS TK, LIEN E, YOSHIMURA A, WANG S, GOLENBOCK DT, et al. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J. Immunol.* 163:6748–55.

MEANS TK, WANG S, LIEN E, YOSHIMURA A, GOLENBOCK DT, et al. 1999. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 163:3920–27.

MEDZHITOV R & JANEWAY CA JR. 1997b. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell.* 91:295-8.

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA JR. 1997a. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388:394-7.

MEDZHITOV R. 2001 Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001. 1:135-45.

MEIER C, PARMANTIER E, BRENNAN A, MIRSKY R, JESSEN KR (1999) Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving IGF, NT-3, and PDGF-BB. *J Neurosci* 19:3847–3859.

MELLIN, G.W. AND KATZENSTEIN, M. 1962. The saga of thalidomide. *N. Engl. J. Med.* 267: 1184-1193.

MERJA SOILU-HA NNINEN, PAUL EKERT, TAMARA BUCCI, DANIEL SYROID, PERRY F. BARTLETT, AND TREVOR J. KILPATRICK. 1999. Nerve Growth Factor Signaling through p75 Induces Apoptosis in Schwann Cells via a Bcl-2-Independent Pathway. *J Neuroscience*. 19:4828–4838.

MILDRONI G. & BILBAO J.M. 1995. Biopsy diagnosis of peripheral neuropathy. Butterworth-Heinamann.

MILNER R, WILBY M, NISHIMURA S, BOYLEN K, EDWARDS G, FAWCETT J, STREULI C, PYTELA R, FFRENCH-CONSTANT C. 1997. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev Biol*.185:215-28.

MIRSKY R & JESSEN KR, 1996. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol*. 6:89-96. Review.

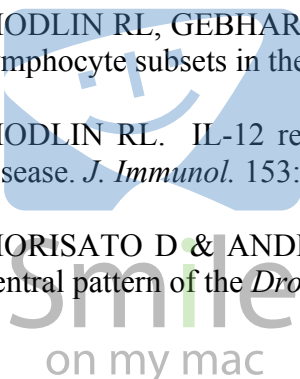
MIRSKY, R., AND K.R. JESSEN. 1999. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol*. 9:293–311.

MODLIN RL, BRIGHTBILL HD, GODOWSKI PJ. 1999. The toll of innate immunity on microbial pathogens. *N Engl J Med*. 340:1834-5.

MODLIN RL, GEBHARD JF, TAYLOR CR, REA TH. 1983. *In situ* characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. *Clin Exp Immunol*. 53:17-24.

MODLIN RL. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J. Immunol*. 153: 3639-47, 1994.

MORISATO D & ANDERSON KV. 1995. Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* Embryo. *Annu. Rev. Genetics*. 29: 371-379.



MORRISSEY TK, KLEITMAN N, BUNGE RP. 1991. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci.* 11:2433-42.

MUELLER-ORTIZ SL, WANGER AR, NORRIS SJ. Mycobacterial protein HBHA binds human complement component C3. *Infect Immun.* 2001. 69:7501-11.

MUJA N, BLACKMAN SC, LE BRETON GC, DEVRIES GH. 2001. Identification and functional characterization of thromboxane A2 receptors in Schwann cells. *J Neurochem.* 78:446-56.

MOLLOY A, LAOCHUMROONVORAPONG P, KAPLAN G, 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular *Bacillus Calmett-Guérin*. *J. Exp. Med.* 180:1499–1509.

MURWANI R., HODGKINSON S., ARMATI P. 1996. Tumor necrosis factor α and interleukin-6 mRNA expression in neonatal Lewis rat Schwann cells and a neonatal rat Schwann cell line following interferon γ stimulation. *J. Neurol* 71:65-71.

MUSTAFA T, BJUNE TG, JONSSON R, PANDO RH, NILSEN R. Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. *Scand J Immunol.* 2001 54(6):630-9.

NERY JA. Reação na hanseníase: uma descrição epidemiológica. Niterói, 1995. 129p Tese (Mestrado em Dermatologia). Universidade Federal Fluminense.

NG, V., ZANAZZI, G., TIMPL, R., TALTS, J.F., SALZER, J.L., BRENNAN, P.J., AND RAMBUKKANA, A. (2000) Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 103:511-524.

ODDO, M., RENNO, T., ATTINGER, A., BAKKER, T., MACDONALD, H.R., MEYLAN, P.R.A. (1998) Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 160, 5448-54.

OLIVEIRA RB, MORAES MO, OLIVEIRA EB, SARNO EN, NERY JA, SAMPAIO EP. 1999. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol.* 65:364-71.

OSHIUMI H, MATSUMOTO M, FUNAMI K, AKAZAWA T, SEYA T. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol.* 2003. 4:161-7.

OZINSKY A, UNDERHILL DM, FONTENOT JD, HAJJAR AM, SMITH KD, WILSON CB, SCHROEDER L, ADEREM A. 2000. The repertoire for pattern recognition of

pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13766–71

PARKINSON DB, DONG Z, BUNTING H, WHITFIELD J, MEIER C, MARIE H, MIRSKY R, JESSEN KR. 2001. Transforming growth factor beta (TGF beta) mediates Schwann cell death *in vitro* and *in vivo*: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGF beta-mediated death to Schwann cell differentiation. *J Neurosci.* 21:8572-85.

PLÁCIDO, R., MANCINO, G., AMENDOLA, A., MARIANI, F., VENDETTI, S., PIANCENTINI, M., SANDUZZI, A., BOCCHINO, M.L., ZEMBALA, M., COLIZZI, V. (1997) Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Pathol.* 181, 31-8.

PEARSON JM AND ROSS WF.1975. Nerve involvement in leprosy-pathology, differential diagnosis and principles of management. *Lepr Rev.* 46:199-212.

PERERA, L.P., WALDMANN, T.A. (1998) Activation of human monocytes induces differential resistance to apoptosis with rapid down regulation of caspase-8/FLICE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14308-13.

PEÑATE M. AND PEÑA AS. 2001. Relevance of the innate immune system. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid).* 93.731-739.

PESSOLANI, M.C., RUMJANEK, F.D., GOMES H.M., DE MELO MARQUES, M.A., DE MELO, F.S.F., SARNO, E.N. . 1989. Serological response of patients with leprosy to a 28-30 kilodalton protein doublet from early cultures of *Mycobacterium bovis* *J. Clin. Microbiol.* 27: 2184- 2189.

PESSOLANI, M.C.V., MARQUES, M.A., REDDY, V.M., LOCHT, C. & MENNOZZI, T.D. 2003. Systemic dissemination in tuberculosis and bacterial adhesins play a role? *Microbes and Infection.* 5:677-84.

PETHE K, ALONSO S, BIET F, DELOGU G, BRENNAN MJ, LOCHT C, MENOZZI FD. 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature.* 412:190-4.

PETHE K, PUECH V, DAFTE M, JOSEPHANS C, DROBECQ H, LOCHT C, MENOZZI FD. 2001. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 39:89-99.

PETHE K, PUECH V, DAFTE M, JOSEPHANS C, DROBECQ H, LOCHT C, MENOZZI FD. 2001. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 2001 39:89-99.

PETHE K, PUECH V, DAFTE M, JOSEPHANS C, DROBECQ H, LOCHT C, MENOZZI FD. 2001. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutini. *Mol Microbiol.* 39:89-99.

PIETERS J 2001 Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect.* 3:249-55.

PIMENTEL MIF. Neurites na hanseníase significado de parâmetros clínicos e epidemiológicos na indução e agravamento das incapacidades físicas em pacientes multibacilares. Rio de Janeiro, 1998. 100p. Tese (Doutorado em Dermatologia). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

PIMENTEL-MUINOS, F.X., SEED, B. 1999. Regulated commitment of TNF receptor signaling: A molecular switch for death or activation. *Immunity* 11, 783-93.

POLTORAK A, HE X, SMIRNOVA I, LIU MY, HUFFEL CV, Du X, BIRDWELL D, ALEJOS E, SILVA M, GALANOS C, FREUDENBERG M, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, LAYTON B, BEUTLER B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in *Tlr4* gene. *Science* 282:2085–88.

PORTUGAL M.L. 2003 Estudos funcionais das adesinas “heparin-binding hemagglutinin adhesin” (HBHA) e “histone-like protein” (Hlp) na interação do *Mycobacterium leprae* com as células de Schwann. Monografia. Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

QURESHI, ST, LARIVIERE L, LEVEQUE G, CLERMONT S, MOORE KJ, GROS P, & MALO D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J. Exp. Med.* 189:615.

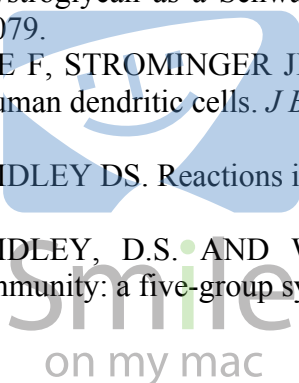
RAMBUKKANA, A., SALZER, J.L., YURCHENCO, P.D., AND TUOMANEN, E.I. (1997) Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell* . 88: 811-821.

RAMBUKKANA, A., YAMADA, H., AND ZANAZZI, G. 1998. Role of alpha dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science.* 282: 2076-2079.

RE F, STROMINGER JL. 2001. Toll-like receptor 2 (tlr2) and tlr4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 276: 37692-9.

RIDLEY DS. Reactions in leprosy. *Lepr. Rev.* 40: 77-81,1969.

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



ROCK FL, HARDIMAN G, TIMANS JC, KASTELEIN RA, BAZAN JF. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:588-93.

ROMANI L., PUC CETI P. & BISTONI F. 1997. Interleukin-12 in Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Reviews*. 10:611-636.

RUTKOWSKI JL, TENNEKOON GI, MCGILLICUDDY JE. 1992. Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves. *Ann Neurol*. 31:580-6.

RUTSCHMANN S, JUNG AC, ZHOU R, SILVERMAN N, HOFFMANN JA, FERRANDON D. 2000. Role of *Drosophila* IKK gamma in a toll-independent antibacterial immune response. *Nature Immunol*. 1:342-347.

RYAN, J. J., K. A. KLEIN, T. J. NEUBERGER, J. A. LEFTWICH, E. H. WESTIN, S. KAUMA, J. A. FLETCHER, G. H. DEVRIES, AND T. F. HUFF. 1994. Role for the stem cell factor/KIT complex in Schwann cell neoplasia and mast cell proliferation associated with neurofibromatosis. *J. Neurosci. Res*. 37:415-432.

SATOH J, KUROHARA K, YUKITAKE M, KURODA Y. Cytokine-inducible expression of prion protein gene in human neural cell line. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 57: 132-139.

SALGAME P, ABRAMS JS, CLAYBERGER C, GOLDSTEIN H, CONVIT J, MODLIN RL, BLOOM BR. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 254:279-82

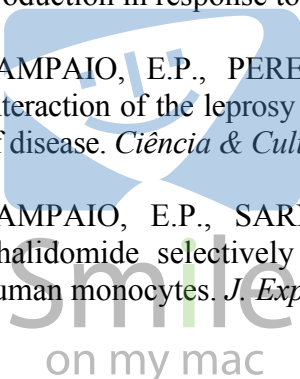
SAMPAIO EP., MOREIRA AL., SARNO EN., MALTA AM., KAPLAN G. 1992. Prolonged treatment with recombinant interferon γ induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J. Exp. Med*. 175: 1729-1737.

SAMPAIO, E.P., KAPLAN G., MIRANDA A., NERY J.A.C., MIGUEL C.P., VIANA S.M., SARNO E.N. 1993. "The influence of thalidomide on the clinical and immunological manifestation of erythema nodosum leprosum". *J. Infect Dis*. 168: 408-414.

SAMPAIO, E.P., OLIVEIRA, R.B., WARWICK-DAVIES, J., FARIA NETO, R.B., GRIFFIN, G.E., AND SHATTOCK, R.J. 2000. T cell-monocyte contact enhances TNF α production in response to *M. leprae* in vitro. *J. Infect. Dis*. 182, 1463-1472.

SAMPAIO, E.P., PEREIRA, G.M.B., PESSOLANI, M.C.V. & SARNO, E.N. 1994. Interaction of the leprosy bacillus and the human host: Relevant components and mechanism of disease. *Ciência & Cultura*. 46: 462-471.

SAMPAIO, E.P., SARNO, E.S., GALILLY, R., COHN, Z.A & KAPLAN. 1991 Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor-alpha production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med*. 699-703.



SAMUEL, N. M., JESSEN, K. R., GRANGE, J. M. & MIRSKY, R. 1987a. Gamma interferon, but not *Mycobacterium leprae*, induces major histocompatibility class II antigens on cultured rat Schwann cells. *J. Neurocytol.* 16: 281-287.

SAMUEL, N. M., MIRSKY, R., GRANGE, J. M. & JESSEN, K. R., 1987b. Expression of major histocompatibility complex class I and II antigens in human Schwann cell cultures and effects of infection with *Mycobacterium leprae*. *Clin. Exp. Immunol.* 68: 500-509.

SANTUCCI, M.B., AMICOSANTE, M., CICONI, R., MONTESANO, C., CASARINI, M., GIOSUÈ, S., BISETTI, A., COLIZZI, V., FRAZIANO, M. (2000) *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis in monocytes/macrophages: early membrane modification and intracellular mycobacterial viability. *J. Infect. Dis.* 181, 1506-9.

SARNO, E.N., GRAU, E., VIEIRA, L.M.M. & NERY, J.A.C. 1991 Serum levels of TNF alpha and IL-1 beta during leprosy reactional states. *Clin. Exp. Immunol.* 84: 103-108.

SAROSDY MF. 1993. Bropiramine in bladder cancer: clinical studies. *Ann N Y Acad Sci.* 685:301-8.

SATOH, J-I, KUROHARA, K., YUKITARE, M. & KURODA, Y. 1998. Constitutive and SCHERER SS, SALZER JL (1996) Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. In: Glial cell development (Jessen KR, Richardson WD, eds), pp 165–196. Oxford: Bios Scientific.

SCHNARE M, HOLT AC, TAKEDA K, AKIRA S, MEDZHITOV R. 2000. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Curr Biol.* 10:1139-42.

SCHNEIDER DS, HUDSON KL, LIN TY & ANDERSON KV. 1991. Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 5: 797.

SCOLLARD DM, MCCORMICK G, ALLEN JL. 1999. Localization of *Mycobacterium leprae* to endothelial cells of epineurial and perineurial blood vessels and lymphatics. *Am J Pathol.* 154:1611-20.

SELMAJ, K. W. & RAINE, C. S. 1988. Anti-tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage *in vitro*. *Ann Neurol.* 23: 339-346.

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

SHEPARD, C.C. (1962). Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *International Journal of Leprosy.* 3, 291 – 306.

SHEPARD, C.C. & Chang YT. Effect of DDS on established infections with *Mycobacterium leprae* in mice. 1967. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 35:52-7.

SHEPARD, C.C. & McRae, D.H. (1968). A method for counting acid-fast bacteria. *International Journal of Leprosy*. 36, 78 - 82.

SHESKIN, J. 1965. Thalidomide in the treatment of leprosy reactions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 6: 303-306.

SHETTY VP & ANTIA NH. 1996. A semi quantitative analysis of bacterial load in different cell types in leprosy nerves using transmission electron microscope. *Indian J Lepr.* 1996. 68:105-8.

SHETTY VP & ANTIA NH. 2002. Light and ultrastructural study of sciatic nerve lesions induced using intraneural injection of viable *Mycobacterium leprae* in normal and immunosuppressed Swiss white mice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 70:25-33.

SHIMOJI Y, NG V, MATSUMURA K, FISCHETTI VA, RAMBUKKANA A. 1999. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9857-62.

SHUBAYEV VI & MYERS R.R. 2001. Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J Neuroimmunol.* 114:48-56.

SIELING PA, ABRAMS JS, YAMAMURA M, SALGAME P, BLOOM BR, REA TH, MODLIN RL. 1993. Immunosuppressive roles for interleukin-10 and interleukin-4 in human infection: in vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J. Immunol.* 150: 5501-5510, 1993.

SIELING PA, WANG XH, GATELY MK, OLIVEROS JL, MCHUGH T, BARNES PF, WOLF SF, GOLKAR L, YAMAMURA M, YOGI Y, UYEMURA K, REA TH, MODLIN RL. 1994. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *J. Immunol.* 153: 3639-47.

SINGH N., BIRDI T.J. & ANTIA N.H. 1996. *M. leprae* and macrophage secretory products modulate the expression of NgCAM on Schwann cell surface. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 64:449-51.

SKOFF, A.M., LISAK, R.P., BEALMEAR, B., AND BENJAMINS, J. A. 1998. TNF α and TGF β act synergistically to kill Schwann cells. *J. Neurosci. Res.* 53, 747-756.

SPIES, J. M., WESTLAND, K. W., BONNER, J. G. & POLLARD, J. D. 1995. Intraneural activated T cells cause focal breakdown of the blood-nerve barrier. *Brain.* 118: 857-868.

STASKAWICS BJ., AUSUBEL FM., BAKER BJ., ELLIS & JONES JD. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science.* 268: 661.

STEINHOFF U, SCHOEL B, KAUFMANN SH. 1990. Lysis of interferon-gamma activated Schwann cell by cross-reactive CD8+ alpha/beta T cells with specificity for the mycobacterial 65 kd heat shock protein. *Int Immunol.* 2:279-84.

STEWART HJ, CURTIS R, JESSEN KR, MIRSKY R. 1995a. TGF-beta s and cAMP regulate GAP-43 expression in Schwann cells and reveal the association of this protein with the trans-Golgi network. *Eur J Neurosci.* 7:1761-72.

STEWART HJ, ROUGON G, DONG Z, DEAN C, JESSEN KR, MIRSKY R. 1995. TGF-betas upregulate NCAM and L1 expression in cultured Schwann cells, suppress cyclic AMP-induced expression of O4 and galactocerebroside, and are widely expressed in cells of the Schwann cell lineage in vivo. *Glia.* 15:419-36.

STEWART HJS. 1995a. Expression of c-jun, Jun B, Jun D and cAMP response element binding protein by Schwann cells and their precursors *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Neurosci:* 1366-1375.

SULLIVAN, L., SANO, S., PIRMEZ, C., SALGAME P., MULLER, C., HOFMAN, F., UYEMURA, K., REA, T., BLOOM, B. R. & MODLIN, R. L. 1991. Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect. Immun.* 59: 4154-4160.

SUZIKI A., YOSHIDA M., HAYASHI, K., MIZUNO Y., HAGIWARA Y. & OZAWA E. 1994. Molecular organization at the glycoprotein-complexo-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur. J. Biochem.* 220: 283-292.

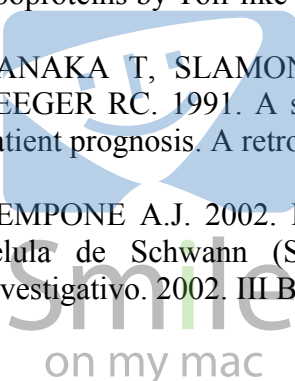
TAKEDA K, KAISHO T & AKIRA S. 2003. TOLL-LIKE RECEPTORS. *Annu. Rev. Immunol.* 2003. 21:335-76.

TAKEUCHI O, HOSHINO K, KAWAI T, SANJO H, TAKADA H, ET AL. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive cell wall components. *Immunity* 11:443-51.

TAKEUCHI O, KAWAI T, MUHLRADT PF, MORR M, RADOLF JD, ZYCHLINSKY A, TAKEDA K, AKIRA S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 13:933-40.

TANAKA T, SLAMON DJ, SHIMADA H, SHIMODA H, FUJISAWA T, IDA N, SEEGER RC. 1991. A significant association of Ha-ras p21 in neuroblastoma cells with patient prognosis. A retrospective study of 103 cases. *Cancer.* 68:1296-302.

TEMPONE A.J. 2002. Estudo Molecular da interação do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann (SC): utilização da linhagem celular ST88-14 como modelo investigativo. 2002. III Bienal de Pesquisa. FIOCRUZ/ Rio de Janeiro.



THANGARAJ H, LAAL S, THANGARAJ I, NATH I. 1988. Epidermal changes in reactional leprosy: keratinocyte Ia expression as an indicator of cell-mediated immune responses. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 56:401-7.

THOMA-USZYNSKI S, STENGER S, MODLIN RL. 2000. CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol.* 165:5773-9.

THOMPSON CB. 1995. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science.* 10: 1456-1462.

THOMPSON CB. 1995. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science.* 267. 1456-1462.

TRACHTENBERG JT & THOMPSON WJ. 1995. Schwann cell apoptosis developing neuromuscular junction is regulated by glial growth factor. *Nature.* 379. 174-177.

TRANTAFILOU M & TRIANTAFILOU K., 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23:301-4.

UNDERHILL DM, OZINSKY A, SMITH KD, ADEREM A. 1999. Toll-like receptor 2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:14459-63

VAN DEN BERG LH, BAR PR, SODAAR P, MOLLEE I, WOKKE JJ, LOGTENBERG T. 1995. Selective expansion and long-term culture of human Schwann cells from sural nerve biopsies. *Ann Neurol.* 38:674-8.

VENTERS HD, TANG Q, LIU Q, VANHOY RW, DANTZER R, KELLEY KW.1999. A new mechanism of neurodegeneration: a proinflammatory cytokine inhibits receptor signaling by a survival peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. 96:9879-84.

VERHAGEN CE, VAN DER POWW KRAAN TCTM, BUFFING AAM, CHAND MA, FABER WR, AARDEN LA, DAS PK. Type 1- and Type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are characterized by co-expression of IFN γ /TNF α and IL-4/IL-5/IL-13 respectively. *J. Immunol.* 160:2380-7, 1998.

VERHAGEN CE, WIERENGA EA, BUFFING AA, CHAND MA, FABER WR, AND DAS PK. (1997) Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T cell reactivity in lesional skin: A follow-up study. *J. Immunol.* 159, 4474-4483.

VISKOCHIL D., BUCHBERG A.M., XU G., CAWTHON R.M., STEVENS J., WOLFF R.K., CULVER M., CAREY J.C., COPELAND N.G., JENKINS N.A.1990. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis

type
Cell. 62:187-92.

1

locus.

WAGNER C, DEPPISCH R, DENEFLER B, HUG F, ANDRASSY K & HÄNSCH GM. 2003. Expression patterns of the lipopolysaccharide receptor CD14, and the Fc_γ receptors CD16 and CD64 on polymorphonuclear neutrophils: data from patients with severe bacterial infections and lipopolysaccharide-exposed cells. *Shock*. 19. 5–12.

WALLACE ET AL., 1990; WALLACE MR, ANDERSEN LB, FOUNTAIN JW, ODEH HM, VISKOCHIL D, MARCHUK DA, O'CONNELL P, WHITE R, COLLINS FS. 1990. A chromosome jump crosses a translocation breakpoint in the Von Recklinghausen neurofibromatosis region. *Genes Chromosomes Cancer*. 2:271-7.

WANG CY, MAYO MW, KORNELUCK RG, GOEDFEL DV and BALDWIN AS Jr. 1998. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 281. 1680-1683.

WATERS, M. F. R. 1974. Treatment of reactions in leprosy. *Lepr. Rev.* 45: 337-340.

WEBSTER H.D., MARTIN J.R. & O'CONNELL M.F. 1973. The relationship between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. *Dev. Biol.* 32: 401-416.

WEINBERG RA. 1991. Tumor suppressor genes. *Science*. 254:1138-46.

WEINSTEIN DE, FREEDMAN VH, KAPLAN G. 1999. Molecular mechanism of nerve infection in leprosy. *Trends Microbiol.* 7:185-6.

WEKERLE H, SCHWAB M, LININGTON C, MEYERMANN R. 1986. Antigen presentation in the peripheral nervous system: Schwann cells present endogenous myelin autoantigens to lymphocytes. *Eur J Immunol.* 16:1551-7.

WEMAMBU, S. N. C., TURK, J. L., WATERS, M. F. R. & REES, R. J. W. 1969. Erythema nodosum leprosum: A clinical manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet*. 2: 933-935.

WERTS C, TAPPING RI, MATHISON JC, CHUANG T-H, KRAVCHENKO V, et al. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2:346–52.

WINDER SJ. 2001. The complexities of dystroglycan. 26:118-24. *Trends Biochem Sci.* 2001. 26:575.

WRIGHT S. 1995. CD14 and innate recognition of bacteria. *J Immunol* 155:6–8.

WYLLIE DH, KISS-TOTH E, VISINTIN A, SMITH SC, BOUSSOUF S, SEGAL DM, DUFF GW, DOWER SK. 2000. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 165:7125-32.

XU GF, O'CONNELL P., VISKOCHILL D., CAWTHON R., ROBERTSON M, CULVER M., STEVENS J., GESTELAND R., WHITE R 1990. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell.* 62:599-608.

YAMADA H., SHIMIZU T., TANAKA T., CAMPBELL, K.P. & MATSUMURA K. 1994. Dystroglican is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett.* 352: 49-53.

YAMAMURA M UYEMURA K, DEANS RJ, WEINBERG K, REA TH, BLOOM BR, MODLIN RL. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profile in leprosy lesions. *Science.* 254, 277-279.

YAMAMURA M, WANG XH, OHMEN JD, UYEMURA K, REA TH, BLOOM BR, MODLIN RL. 1992. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol.* 149:1470-5.

YAN N, RICCA C, FLETCHER J, GLOVER T, SEIZINGER BR, MANNE V. 1995. Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type I (NF1) malignant phenotype. *Cancer Res.* 55:3569-75.

ZHANG FX, KIRSCHNING CJ, MANCINELLI R, XU XP, JIN Y, FAURE E, MANTOVANI A, ROTHE M, MUZIO M, ARDITI M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem.* 1999. 274:7611-4.

ZHANG, JIAN-HUA, FERRANTE, A., ARRIGO, ANDRE-PATRICK, & DAYER, JEAN-MICHAEL. 1994. Neutrophil stimulation and priming by direct contact with activated human T lymphocytes. *J. Immunol.* 148: 177-181.

ZYCHLINSKY A, PREVOST MC, SANSONETTI PJ. 1992. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature.* 358:167-9.

ZYCHLINSKY A, THIRUMALAI K, ARONDEL J, CANTEY JR, ALIPRANTIS AO, SANSONETTI PJ. 1996. *In vivo* apoptosis in *Shigella flexneri* infections. *Infect Immun.* 64:5357-65.

Endereços da Internet apresentados nesta dissertação:

1. <http://www.who.int/lep/stat2002/global02.htm>

2. http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis
3. <http://www.jdaross.cwc.net/intronerv2.htm>
4. www.bioagency.com.br



Smile
on my mac