



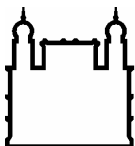
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado em Biologia Celular e
Molecular

**ESTUDO DA INTERAÇÃO *IN VITRO* DO
MYCOBACTERIUM LEPRAE COM A CÉLULA DE
SCHWANN: ANÁLISE MORFOLÓGICA E AVALIAÇÃO
DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS FUNCIONAIS**

LUCINEIA ALVES KONTOS

Rio de Janeiro

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

LUCINEIA ALVES KONTOS

Estudo da interação *in vitro* do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann: análise morfológica e avaliação da expressão de moléculas funcionais

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadores:

Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

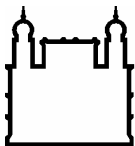
Laboratório de Microbiologia Celular – IOC – FIOCRUZ

Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes

Laboratório de Hanseníase – IOC – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTORA: LUCINEIA ALVES KONTOS

Estudo da interação *in vitro* do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann: análise morfológica e avaliação da expressão de moléculas funcionais

Orientadores:

Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes

Aprovada em: 22 de junho de 2009

EXAMINADORES:

Dra. Leila Mendonça de Lima - Instituto Oswaldo Cruz – Presidente /Revisora

Dr. Wagner Baetas da Cruz - Universidade Federal do Rio de Janeiro – Titular

Dra. Helene Santos Barbosa - Instituto Oswaldo Cruz – Titular

Dr. Milton O. Moraes - Instituto Oswaldo Cruz - Suplente

Rio de Janeiro, 22 de junho de 2009

RESUMO

A hanseníase é uma doença sistêmica infecto-contagiosa crônica causada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele e nervos periféricos dos seres humanos. Apesar dos intensos e bem controlados programas de terapia multidroga, a transmissão desta doença continua ocorrendo e um grande número de indivíduos acometidos permanece em risco de desenvolver dano ao nervo. A lesão neural na hanseníase é decorrente da capacidade do *M. leprae* infectar os nervos periféricos, alojando-se preferencialmente no interior de células de Schwann (CS). O presente trabalho teve como objetivo geral contribuir para o entendimento da interação *M. leprae* – CS, e como objetivos específicos: 1) estabelecer e caracterizar fenotipicamente culturas de CS de rato (CSPR) e humanas primárias (CSHP), comparando com a linhagem de CS humana ST88-14; 2) determinar a cinética de associação do *M. leprae* a estas células; 3) analisar aspectos morfológicos da interação do *M. leprae* com a CS; e 4) estudar o efeito do *M. leprae* sobre a expressão da cadeia α -2 da laminina-2, β -dístroglicana, Desert Hedgehog (Dhh) e gangliosídeo 9-O-acetil GD3 pela CS. Os resultados deste trabalho mostraram que as CS ST88-14, as CSPR e as CSHP apresentam características de CS com fenótipo amielínico. Através de microscopia eletrônica de varredura foi observado que as CS ST88-14 tratadas ou não com o *M. leprae* formaram monocamada e que 50% destas células apresentaram *M. leprae* aderidos com 2 horas de tratamento. As bactérias apresentavam-se aderidas, envolvidas ou não por filopódios, e em processo de internalização. O grau de associação do *M. leprae* às CSPR e CSHP foi semelhante ao observado nas CS ST88-14. Uma baixa porcentagem de CS ST88-14 mostraram expressão constitutiva do gangliosídeo 9-O-Acetil GD3. Quando tratadas com o *M. leprae* letalmente irradiado estas células apresentaram uma modulação positiva para esta molécula e seu padrão de expressão, inicialmente difuso tornou-se pontual com o curso temporal do tratamento com as bactérias. A análise do efeito do *M. leprae* sobre a expressão da cadeia α -2 da laminina-2 em CSHP mostra que o bacilo não modula a expressão desta molécula tanto ao nível traducional como transcricional. Já o *M. leprae* modulou negativamente a expressão de RNAm de β -dístroglicana em CSHP. Entretanto não afetou o nível da proteína nas condições experimentais utilizadas. O *M. leprae* também modulou negativamente a expressão de RNAm de Dhh nestas células. Como camundongos “knockout” para o gene *dhh* apresentam microfasciculação no nervo e 20 % das biopsias de nervo de pacientes com hanseníase apresentam microfasciculação, investigamos a expressão de Dhh em nervos de hanseníase com e sem microfasciculação. Biopsias com microfasciculação apresentaram uma considerável diminuição na expressão de RNAm de Dhh quando comparados com pacientes que apresentaram nervo sem microfasciculação. Com os resultados obtidos nesse trabalho mostramos que o *M. leprae* é capaz interagir com a CS *in vitro* e que moléculas potencialmente relevantes nesta interação são afetadas por esta bactéria, podendo isso desencadear e/ou promover a patogenia observada na hanseníase.

SUMMARY

Leprosy is an infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular parasite. The disease affects predominantly the skin and the peripheral nerves in humans. Despite the control programs implemented and the establishment of multidrug treatment (MDT), the transmission of the disease still occurs in high levels. Individuals affected by the disease are at risk of developing severe disabilities and deformities. The nerve damage observed in leprosy is caused by the presence of *M. leprae* in the nerves, mainly inside Schwann cells (SCs). The present study aimed to investigate the *M. leprae*-Schwann cell interaction, consisting of the following objectives: i) establishment and phenotypic characterization of cultures from primary rat Schwann cells (PRSC) and primary human Schwann cells (PHSC); ii) analysis of the capacity of *M. leprae* to associate these cells; iii) morphological analysis of *M. leprae* interaction with the ST88-14 human SC cell line by electron microscopy; and iv) investigation of the effect of *M. leprae* on the Schwann cell expression of α 2-laminin, β -dystroglycan, desert hedgehog (Dhh) and 9-O-acetyl-GD3. The results showed that ST88-14 SC, PRSC, and PHSC display a non-myelinating phenotype. Scanning electron microscopy showed that ST88-14 SC cultures treated or not with *M. leprae* formed a monolayer and that 50% of these cells displayed *M. leprae* on their surface after a two-hour treatment with the bacteria. The bacteria were in contact with the cell surface, amid filipodia or lying on smooth membrane regions; some of them were in the course of being internalized. A similar degree of association of *M. leprae* to PRSC and to PHSC was observed. A low percentage of the ST8814 SC constitutively expressed the 9-O-acetyl GD3. After treatment with lethally irradiated *M. leprae* these cells exhibited an upregulation of this ganglioside, with an additional change in the expression pattern, which was initially diffuse and became spotty. The results obtained also suggest that *M. leprae* is unable to modulate the expression of laminin- α 2 in PHSC, both at the transcriptional and at the translational level. In contrast, live *M. leprae* was able to downregulate the levels of β -dystroglycan mRNA to in PHSC cultures, although protein levels were unaffected. Moreover, *M. leprae* stimulus induced downregulation of Dhh mRNA in PHSC. As *dhh* knockout mice present minifascicles in the nerves, and about 20% of leprosy biopsies display microfasciculation, we ascertained the Dhh expression in leprosy nerve biopsies with microfasciculation, comparing it with the ones without this morphological pattern. Nerve biopsies with microfasciculation exhibited significantly lower levels of this factor, speculatively related to the structural disarrangement usually found in the leprosy nerves. The results of this study showed the possible utilization of Schwann cells *in vitro* models to study *M. leprae*-Schwann cell interaction. *M. leprae* was able to affect the expression of relevant SC molecules involved in the interaction with the bacillus, with a potential link of this modulation with the pathogenesis of the leprosy nerve damage.

"Deus, conceda-me a serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar, a coragem para mudar as coisas que posso e a sabedoria para distinguir entre elas. "

Reinhold Niebuhr (1892 - 1971)
- teólogo americano

Aos meus pais Francisco Alves (*in memorian*) e Dolores Maria J. Alves (*in memorian*)

Aos meus irmãos Luiz Alves (*in memorian*), Alcineia Alves de Souza e Elias Alves

A minha tia Neolina Maria da Silva

Ao meu marido Andonios Vasilios Mohr Kontos

**Aos meus queridos e inesquecíveis professores e orientadores: Célia A. de Brito,
Eliane M. dos Santos, Marília de C. B. Sato, Hércio B. Resende e Mark D. Perkins**

A minha estagiária e amiga Renata Zardo

**Aos anjos que Deus colocou no meu caminho em momentos
muito especiais: Harrison M. Gomes e Josué L. de Castro**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por proteger, guiar e conduzir-me pelo caminho maravilhoso da vida e da Ciência.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento da minha tese.

Aos meus familiares, especialmente ao meu marido Andonios, pelo amor, carinho e compreensão.

A Dra. Maria Cristina e ao Dr. Sérgio, pela orientação da tese.

À Renata, minha ex-estagiária e atual mestrande, pela amizade, ajuda sempre presente, atenção e por ter contribuído com a minha formação de Doutora em Ciências, em vários aspectos.

A Cristiana, pela amizade, ajuda e incentivo, mesmo à distância.

A Dra. Rosália (IBCCF - UFRJ), Dra. Helene (LBE - IOC) e Dr. Flávio (LMC - IOC), por tornarem possível a realização de alguns dos experimentos.

A Dra. Ximena, pela doação da foto que mostra a deformidade em paciente com hanseníase.

A Andréa, Ariane, Cíntia, Íris, Ísis, Luciana, Marcelo, Mariele, Pedro Paulo, Tércia e Vitor, pela ajuda na realização de alguns dos experimentos.

Ao Dr. Patrick Wood, Linda e Yelena e a todos do “The Miami Project to Cure Paralysis” – Universidade de Miami, por me ensinarem e acolherem.

A todos do Laboratório de Microbiologia Celular: Adriano, Agatha, Aline, André, Elisa, Fernanda, Júlio, Katherine, Leonardo, Lívia, Márcia, Michele, Roberta e Viviane, pelas ajudas e cordialidades no dia-a-dia.

A Érika, Patrícia e Bianca, que um dia foram do Laboratório, pela ajuda e amizade naquele período e sempre.

Ao Harrison, meu querido “dindo”, pela amizade, incentivo, alegria, força, por ter feito mais que um amigo nos momentos difíceis.

A Elza, pela boa vontade de sempre.

Ao Júlio Fava, Augusto, Daniel e Sr. Sales, pela amizade, carinho e gentilezas.

A Aline, Ilem, Inês, Mara, Sâmara e Sérgio Pereira, pelo apoio e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho, os quais neste momento confino seus nomes ao anonimato, mas que foram de fundamental importância e sem a participação dos quais provavelmente esta pesquisa não seria concluída tão bem...

... a todos meu muitíssimo obrigada.

SUMÁRIO

CONTEÚDO	PÁGINA
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
I - INTRODUÇÃO	01
1.1 - A hanseníase	01
1.1.1 - Hanseníase - um problema de saúde pública global	05
1.2 - O <i>Mycobacterium leprae</i>	08
1.2.1 - O cultivo do <i>M. leprae</i> em animais	14
1.3 - O nervo periférico	16
1.4 - A célula de Schwann	18
1.4.1 - A lâmina basal da célula de Schwann	22
1.4.2 - A membrana da célula de Schwann	24
1.5 - A interação do <i>M. leprae</i> com a célula de Schwann	26
1.6 - Mecanismos de patogenicidade do <i>M. leprae</i> no sistema nervoso periférico	28
1.7 - Relevância do estudo	31
II - OBJETIVOS	33
2.1- Geral	33
2.2- Específicos	33
III - MATERIAIS	34
3.1 - Meio de cultura RPMI 1640 suplementado	34
3.2 - Meio de cultura DMEM-3M (DMEM 1x acrescentado dos 3 mitógenos) ..	34
3.3 - Meio de cultura D-10 (DMEM 1x acrescentado de soro fetal bovino)	34
3.4 - Meio D-10/Mitógenos	35

3.5 - Solução de dispase/colagenase	35
3.6 - Salina tamponada com fosfato (PBS)	35
3.6.1 - PBS 1x com cálcio	35
3.7 - Solução de poli-L-lisina (200 µg/mL)	36
3.8 - Tripsina/EDTA 1 x	36
3.9 - Silane a 4%	36
3.10 - Bis-benzemida 1,25 mg/mL	36
3.11 - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 100 µg/mL	36
3.12 - Brometo de etídio 20 µg/mL	37
3.13 - Solução de cloreto de sódio (NaCl) 5 M	37
3.14 - Tampão de lise celular RIPA (“Radioimmuno Precipitation Assay”)	37
3.15 - Tampão de lise celular para ELISA direto	37
3.16 - Soluções para eletroforese	38
3.16.1 - Acrilamida 30% - bis-acrilamida 0,8%	38
3.16.2 - Tris-HCl 1,5 M – pH 8,8	38
3.16.3 - Tris-HCl 1,0 M – pH 8,0	38
3.16.4 - Tris-HCl 0,5 M – pH 6,8	39
3.16.5 - Solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%	39
3.16.6 - Solução de persulfato de amônia – APS 10%	39
3.16.7 - Solução amido “black”	39
3.16.8 - Tampão de corrida 5x – pH 8,3 a 8,6	39
3.16.9 - Tampão de corrida 1x com SDS	40
3.16.10 - Tampão de transferência	40
3.16.11 - Salina tamponada com Tris/Tween 20 (TBS/T)	40
3.16.12 - Tampão de amostra (6x)	40
3.16.13 - Gel de empilhamento (contendo 4% de acrilamida)	41
3.16.14 - Gel de corrida (contendo 15% de acrilamida)	41
3.17 - Tampão cacodilato de sódio 0,2 M – pH 7,2	41
3.18 - Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i>	42
3.18.1 - Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i> de tatu	42
3.18.2 - Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i> de nude	43
3.19 - Células de Schwann	43

3.19.1 - Células de Schwann da linhagem ST88-14	43
3.19.2 - Células de Schwann primárias de rato	44
3.19.3 - Células de Schwann primárias humanas	44
3.20 - cDNA de biópsia	44
3.21 - Anticorpos	45
IV - MÉTODOS	47
4.1 - Preparo de meios de cultura e soluções	47
4.1.1 - Preparo de meios de cultura	47
4.1.2 - Preparo de soluções	47
4.2 - Marcação do <i>M. leprae</i> com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e PKH26	48
4.3 - Teste de viabilidade do <i>M. leprae</i> proveniente de camundongo nude	49
4.3.1 - Respirometria	49
4.3.2 - Teste de viabilidade por coloração	49
4.4 - Limpeza de lamínulas e tratamento com silane	50
4.5 - Manutenção das células de Schwann da linhagem ST88-14	50
4.6 - Purificação e cultivo de células de Schwann primárias	51
4.6.1 - Obtenção e purificação de células de Schwann primárias de rato ...	52
4.6.1.1 - Tratamento de placa com poli-L-lisina	53
4.6.2 - Cultura de células de Schwann primárias humanas	54
4.6.2.1 - Tratamento de placa com laminina	55
4.7 - Ensaio de interação do <i>M. leprae</i> com células de Schwann	55
4.8 - Índice de associação bacteriana	56
4.9 - Obtenção de lisado total de células de Schwann	57
4.10 - Quantificação de laminina- α 2 e β -dístroglicana através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	57
4.11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	58
4.12 - “Western blot”	59
4.13 - Imunocitoquímica	60
4.14 - Microscopia	60

4.14.1 - Microscopia de campo claro, fluorescência convencional e confocal	61
4.14.2 - Microscopia eletrônica de varredura	61
4.15 - Extração e purificação de RNA total de células de Schwann	62
4.16 - Síntese de DNA complementar (cDNA) de células de Schwann	63
4.17 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) em tempo real	63
4.18 - cDNA de biópsia	64
4.19 - Análise gráfica e estatística	65
V – RESULTADOS	67
5.1 – Isolamento e caracterização fenotípica de células de Schwann	67
5.1.1 - Caracterização fenotípica das células de Schwann da linhagem ST88-14	67
5.1.2 - Caracterização das células de Schwann primárias obtidas a partir de explantes de nervos ciáticos de rato e definição de seu uso em nossos estudos	69
5.1.3 - Caracterização fenotípica das células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação de nervo ciático de rato	71
5.1.4 - Caracterização fenotípica das células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação de nervo da cauda eqüina humana	73
5.2 - Análise da interação do <i>M. leprae</i> com a célula de Schwann da linhagem ST88-14 através de microscopia eletrônica de varredura	75
5.3 - Cinética de associação do <i>M. leprae</i> às células de Schwann	82
5.3.1 - Cinética de associação do <i>M. leprae</i> letalmente irradiado às células de Schwann - linhagem ST88-14	83
5.3.2 - Cinética de associação do <i>M. leprae</i> letalmente irradiado às células de Schwann primárias de rato	84
5.3.3 - Cinética de associação do <i>M. leprae</i> vivo e letalmente irradiado às células de Schwann primárias humanas	86
5.4 - Efeito do <i>M. leprae</i> sobre a expressão de moléculas potencialmente relevantes na manutenção da homeostasia do nervo periférico	88
5.4.1 - O <i>M. leprae</i> modula positivamente e altera o padrão de expressão	

do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14	88
5.4.2 - Expressão da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann tratadas com <i>M. leprae</i>	91
5.4.3 – Expressão de distroglicana em células de Schwann tratadas com <i>M. leprae</i>	95
5.4.4 - Expressão de Dhh em células de Schwann e em nervo de pacientes com hanseníase	101
VI - DISCUSSÃO	104
VII - CONCLUSÕES	114
VIII - BIBLIOGRAFIA	116
IX – ANEXOS	130
9.1 - Artigo em preparação	130
9.1.1 - Artigo 1	130
9.1.2 - Artigo 2	130
9.2 - Artigos realizados em colaboração durante o doutorado	131
9.2.1 - Artigo 1	131
9.2.2 - Artigo 2	131
9.2.3 - Artigo 3	132

I - INTRODUÇÃO

1.1 - A hanseníase

A hanseníase ou doença de Hansen é uma doença sistêmica infecto-contagiosa crônica causada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae*, que afeta as mucosas das vias aéreas superiores, os olhos, as vísceras abdominais, linfonodos, medula óssea, testículos, ovários, mas afeta principalmente a pele e nervos periféricos dos seres humanos. Ela tem sido documentada desde a Antigüidade pelas civilizações da Índia, China e Egito, sendo considerada nos tempos bíblicos do Antigo Testamento como uma “punição divina pelo pecado”. É citada, como a doença infecciosa mais antiga do homem e por toda a história ela tem sido temida como uma doença que causa severas incapacidades e deformidades (**Figura 1.1**). Estas deformidades resultam em estigmatização, sofrendo o doente tanto das conseqüências da doença em si quanto da discriminação pública (revisto por Modlin, 1994). Até há pouco tempo, o termo utilizado para hanseníase era “lepra” que é originado da palavra latina *lepros*, que significa “desonra”. A substituição do termo no Brasil foi feita justamente visando minimizar o forte estigma social que até hoje se faz presente e que confina os portadores desta doença.

A hanseníase afeta sem distinção ambos os sexos e os adultos jovens consistem na faixa etária mais acometida. Os indivíduos com hanseníase lepromatosa, forma da doença caracterizada por apresentar grande quantidade de bacilos, constituem-se em principais fontes de bactérias para disseminação da infecção a outros indivíduos, no entanto, o preciso mecanismo de transmissão ainda é desconhecido.

Embora a pele e o trato gastrointestinal tenham sido propostos como rota de entrada (Bryceson & Pfaltzgraff, 1990), a descarga de bacilos na atmosfera por indivíduos lepromatosos indica o trato respiratório como porta de entrada principal para o *M. leprae*. Evidências de uma disseminação sistêmica da bactéria em camundongos imunologicamente suprimidos sugerem que o *M. leprae* é capaz de escapar dos pulmões provavelmente via vasos sangüíneos ou linfáticos e subseqüentemente proliferar em nichos susceptíveis dentro do corpo (Fine, 1982). Torna-se interessante

INTRODUÇÃO

ressaltar que os pulmões não constituem órgãos alvos em nenhuma forma de hanseníase.



Figura 1.1. Deformidade em decorrência da hanseníase. Deformidade devido ao dano ao nervo - neuropatia periférica hanseniana: garra fixa, amiotrofia e reabsorção óssea. Foto fornecida por Ximena Illarramendi.

O resultado de muitos passos na cadeia de infecção, que vai da exposição ao *M. leprae* ao estabelecimento da infecção subclínica e a expressão da doença, é determinado por um número de fatores de risco associados, tais como: contato, fatores genéticos, fatores sócio-econômicos, vacinação por BCG, entre outros (Beers *et al.*, 1996).

O período de incubação da infecção varia de alguns meses a anos, mas o aparecimento da sintomatologia clínica normalmente acontece entre o segundo e quinto ano após a infecção (Hastings, 1989). Acredita-se que mais que 90% da população desenvolva imunidade protetora adequada na infecção e não apresente sintomas clinicamente detectáveis (Godal *et al.*, 1972). É bem estabelecido que a imunidade do indivíduo ao *M. leprae* dita o resultado clínico da hanseníase. A maioria dos indivíduos que desenvolvem a hanseníase clínica pode ser posicionada em um dos cinco grupos do espectro da hanseníase, dependendo da disseminação da doença e do nível de imunidade celular como ilustra a **Figura 1.2** (Ridley & Jopling, 1966). Em um pólo do espectro está a hanseníase lepromatosa (LL), apresentando os indivíduos deste grupo uma alta resposta imune humoral e uma baixa resposta imune celular. Estes indivíduos demonstram uma não responsividade celular ao *M. leprae*, apresentando, assim, uma

INTRODUÇÃO

grande carga bacilar, pois falham em eliminar os bacilos. No outro pólo do espectro está a hanseníase tuberculóide (TT), apresentando os indivíduos deste grupo uma baixa resposta imune humoral, porém forte imunidade celular adquirida. Eles desenvolvem uma hipersensibilidade contra o *M. leprae* e tipicamente possuem baixa carga de bacilos. A maioria dos indivíduos hansênicos, entretanto, estão posicionados entre esses dois pólos apresentando hanseníase “borderline”, subdividida em “borderline” lepromatosa (BL), “borderline- borderline” (BB) e “borderline” tuberculóide (BT).

Formas da Hanseníase	Paucibacilar(PB)		Multibacilar (MB)		
	tuberculóide	Boderline tuberculóide	Boderline boderline	Boderline lepromatosa	Lepromatosa
Carga Bacilar					
Imunidade Humoral					
*	← 3 a 5 anos →		← 8 a 10 anos →		
Imunidade Celular					
Lesões de pele	1	2	2	3	3
Dano Neural	1 - 2	1 - 3	2 - 3	2 - 3	1 - 3

Figura 1.2. Representação esquemática do espectro clínico e imunopatológico da hanseníase. * Tempo de aparecimento da sintomatologia clínica. Níveis: 1- Leve, 2- Moderado e 3- Severo (Modificado de Ridley & Jopling, 1966).

A maioria dos pacientes diagnosticados recentemente, entretanto, vive em países onde recursos médicos não são suficientemente disponíveis. Visto que o sistema de classificação de Ridley – Jopling não é prático nesses países, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um sistema mais simplificado de classificação que consiste apenas duas categorias: paucibacilar (PB) que é definida pela presença de cinco ou menos lesões de pele com esfregaço de pele negativo, e multibacilar (MB) que é definida pela presença de seis ou mais lesões e apresenta

INTRODUÇÃO

esfregaço de pele positivo (WHO, 1998). As formas TT e BT são consideradas paucibacilares devido à baixa carga bacilar; já as formas LL, BL e BB são classificadas como multibacilares por apresentarem alta carga de bacilos.

Um agravante do estado clínico dos pacientes com hanseníase é a ocorrência de episódios de inflamação aguda, geralmente sistêmicos, denominados “episódios reacionais”. Os dois principais tipos de reações observadas na hanseníase são o eritema nodoso ou reação lepromatosa tipo 2, predominantemente ocorrendo em indivíduos hansênicos lepromatosos, e a reação reversa, também conhecida como reação lepromatosa tipo 1, que particularmente afeta indivíduos com hanseníase “borderline”, especialmente durante o tratamento (Lockwood *et al.*, 1993). Durante as reações, a resposta imune mediada por células ao *M. leprae* é fortemente aumentada, resultando em uma resposta inflamatória nas áreas da pele e nervo afetados pela doença (Modlin *et al.*, 1983). Estas reações podem ocorrer antes do tratamento, mas são principalmente observadas durante ou após o tratamento (Naafs & Wheate, 1978). Portanto, um grande número de hansenianos permanece em risco de desenvolver dano ao nervo durante o curso da doença, apesar de existir uma terapia eficaz contra o bacilo. Assim sendo, a hanseníase é mundialmente considerada a principal causa de neuropatia periférica não traumática (Nations *et al.*, 1998).

Richardus e colaboradores (1996) em um estudo realizado com 786 pacientes registrados para o programa MDT em Bangladesh demonstrou que o envolvimento neural clinicamente detectável ocorre em aproximadamente 10% dos indivíduos hansênicos paucibacilares e em 40% dos indivíduos hansênicos multibacilares, particularmente em indivíduos com reação reversa. Porém acredita-se que o envolvimento neural subclínico ocorra em todos os indivíduos hansênicos e que 30% das fibras nervosas necessitam ser destruídas antes que prejuízo sensorial seja detectável (Pearson & Ross, 1975). Segundo dados de Nations e colaboradores, 1998, estima-se que aproximadamente dois milhões de indivíduos no mundo são portadores de deficiência física decorrentes da hanseníase.

1.1.1 - Hanseníase - um problema de saúde pública global

Programas de controle da hanseníase desenvolvidos em muitos países endêmicos estão mantendo suas atividades com sucesso, segundo a OMS (2008), porém, embora esses programas já existam há décadas e a hanseníase seja conhecida desde a Antigüidade, esta doença continua sendo um importante problema de saúde pública ao nível mundial (**Figura 1.3**).

O programa de terapia multidroga (MDT), que combina os antibióticos rifampicina, dapsona e clofazimina, introduzido em 1982, também chamado de poliquimioterapia, foi responsável pelo declínio na prevalência global da hanseníase. Em 1985 havia no mundo 122 países considerados endêmicos para esta doença, com uma prevalência global de 12 casos por 10.000 habitantes (WHO, 2002). No fim do ano 2000, a hanseníase foi considerada problema de saúde pública em 15 países somente, com uma prevalência global estimada em menos que 1 caso por 10.000 habitantes. A Índia, neste mesmo ano, ocupava o primeiro lugar na lista dos principais países endêmicos, enquanto o Brasil ocupava o segundo lugar com uma prevalência de 4,6 casos por 10.000 habitantes (WHO, 2002).

Embora a prevalência global da hanseníase tenha declinado bruscamente nestas duas últimas décadas, e desde 1985 mais de 14 milhões de pacientes globalmente tenham sido curados em consequência do programa MDT, o declínio da prevalência não corresponde à redução da carga da hanseníase no mundo. O declínio na taxa de prevalência é artificial, devido à mudança na administração do registro de casos de hanseníase após a introdução do programa de MDT. No programa de MDT, que proporciona um regime de tratamento de 6 meses para indivíduos paucibacilares e dois anos para indivíduos multibacilares, os pacientes após completarem o tratamento, são removidos do registro e não contribuem mais como dado para a prevalência. O número de casos novos detectados, que é um indicador da incidência da hanseníase, é mais importante que a prevalência registrada, quando se refere a avaliar o problema da doença (Beers *et al.*, 1996).

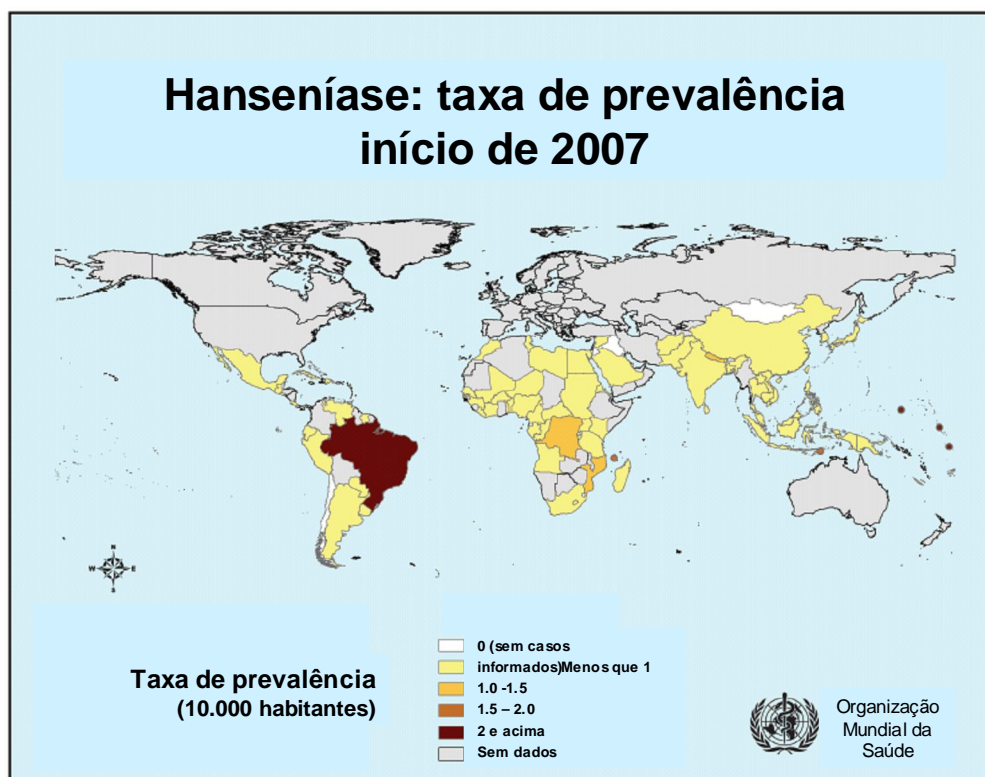


Figura 1.3. Situação global da hanseníase.
<http://www.who.int/lep/situation/PrevStart2007a.pdf>

Torna-se importante mencionar que o número de novos casos notificados certamente não representa a totalidade dos casos realmente existentes, pois muitos casos permanecem sem diagnóstico devido a múltiplos fatores.

No que se refere à incidência mundial da doença, esta se manteve constante até aproximadamente o ano de 2002. No ano 2000 foram detectados aproximadamente 720 mil novos casos. O Brasil ocupava também o segundo lugar na lista global de países com os maiores números de novos casos detectados, com aproximadamente 41 mil novos casos detectados neste mesmo ano (WHO, 2002). Entretanto, a estratégia para eliminar a hanseníase como um problema de saúde pública global tem ajudado países a reduzir o número de novos casos da doença. Em 2004 foram registrados 407.791 novos casos, no ano de 2005 foram registrados 299.036 casos e em 2006 foi observado 33.375 novos casos a menos. Esta diminuição é devida principalmente à redução do número de novos casos detectados na Índia (WHO, 2008).

INTRODUÇÃO

A prevalência da hanseníase no início de 2008 foi de 212.802 casos, enquanto que o número de novos casos detectados durante o ano de 2007 foi de 254.525, excluindo-se o pequeno número de casos na Europa (WHO, 2008). O número de novos casos detectados globalmente teve uma queda de apenas 4%, quando comparado ao ano de 2006 e a situação ainda é muito preocupante.

A hanseníase continua sendo hoje um grave problema de saúde pública especialmente na Índia, seguida pelo Brasil, Indonésia, República Democrática do Congo, Bangladesh, Nigéria, Nepal e Etiópia, que unidos totalizam 221.998, mais de 87% dos casos novos registrados no ano de 2007 (**Tabela 1.1**).

Tabela 1.1. Principais países endêmicos para a hanseníase em 2007 (WHO, 2008).

País	Prevalência	Novos casos
Índia	87.228	137.685
Brasil	45.847	39.125
Indonésia	21.430	17.723
Rep. Dem. do Congo	6.502	8.820
Bangladesh	4.463	5.357
Nigéria	5.381	4.665
Nepal	3.329	4.436
Etiópia	4.611	4.187
Total	178.791	221.998

Ainda, segundo dados da OMS, o Brasil, segundo lugar na lista dos países com maior número de novos casos, registrou 39.125 novos doentes somente neste mesmo ano (WHO, 2008), número que tem se mantido mais ou menos constante na última década.

Com os vários dados apresentados é possível inferir que a transmissão continua ocorrendo, apesar dos intensos e bem controlados programas de terapia multidroga aplicada com sucesso para controlar a infecção e um grande número de pacientes

permanece em risco de desenvolver dano ao nervo durante o curso da doença.

1.2 - O *Mycobacterium leprae*

Gerhard Henrik Armauer Hansen (**Figura 1.4**) nascido na Noruega em 1841, formado em Medicina pela Universidade de Christiana no ano de 1866, foi o identificador do agente etiológico causador da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*. Em sua primeira publicação científica, resultado de estudos de linfonodos normais e patológicos, ele descreveu a observação de “massas granulares amarelas” dentro de linfonodos e nódulos na pele de indivíduos com hanseníase e sugeriu que isto era uma consequência específica da doença. Após adquirir instrução em histopatologia, ele descreveu: “...em muitos tubérculos leprosos retirados de um indivíduo vivo... corpos pequenos, muito parecidos com bactérias, falsamente dentro das células; não em todas, mas em muitas delas”. Em 1874, a Sociedade Médica de Christiana publicou essas observações notáveis, que estabeleceu, pela primeira vez, uma etiologia infecciosa para a doença (Tan & Graham, 2008).

O *M. leprae*, então primeiro patógeno bacteriano identificado como agente etiológico de uma doença infecciosa humana, é uma bactéria intracelular obrigatória que infecta principalmente o endotélio vascular, fagócitos mononucleares e apresenta especial afinidade por células de Schwann no sistema nervoso periférico. Ele consiste no único, entre os patógenos bacterianos, com a habilidade de invadir e sobreviver nas células de Schwann, tornando esta a característica notória deste organismo (revisto por Band *et al.*, 1986).

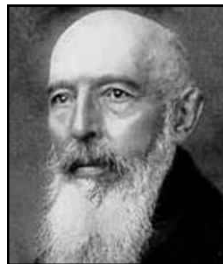


Figura 1.4. Gerhard Henrik Armauer Hansen. Identificador do *Mycobacterium leprae*, agente etiológico da hanseníase. <http://www.gefor.4t.com/arte/hansen.htm>

INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* pertence à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e se caracteriza por não apresentar micélios ou apresentá-los de forma rudimentar. Os membros deste gênero apresentam forma de bastonete reto ou levemente curvado de 1,5 à 8 micrômetros de comprimento por 0,2 à 0,5 micrômetros de diâmetro, com extremidades arredondadas. São imóveis, não formam endosporo ou cápsula, são considerados Gram-positivo, embora não sejam bem corados por este método (Rees, 1985).

O *M. leprae* faz parte do grupo dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), característica peculiar marcante desse grupo, que consiste na resistência à descoloração por solventes orgânicos acidificados após coloração com corante básico. Esta característica é devida à grande quantidade de lipídios em sua parede celular que retém o corante mesmo sob a ação de solventes orgânicos acidificados (revisto por Brennan & Nikaido, 1995).

A espessa parede celular (**Figura 1.5**) que recobre a membrana plasmática do *M. leprae* é composta de peptidoglicana ligado a galactana, a qual se ligam cadeias ramificadas de arabinana formando com a camada peptidoglicana uma zona eletrodensa em torno do *M. leprae*. Ácidos micólicos estão ligados na extremidade das cadeias de arabinana para formar o folheto interno de uma falsa bicamada lipídica. O folheto externo é formado por uma rica variedade de ácidos micólicos e ácidos micoserosóicos, bem como de glicolípido fenólico, formando uma zona eletrotransparente. Lipoglicanas como lipomanana e lipoarabinomanana, conhecidos por ser ancorados na membrana plasmática, também são encontradas na parede celular desse microorganismo (Scollard *et al.*, 2006).

Dentre os lipídios que compõem a parede celular do *M. leprae* está o glicolípido fenólico I (PGL – I), um dos glicolipídios mais abundantes em sua superfície e que confere especificidade imunológica à bactéria, por ser específico deste microorganismo. O lipoarabinomanana (LAM), outro lipídio importantes na parede celular do *M. leprae*, é um lipopolissacarídeo encontrado em todas as micobactérias (revisto por Brennan & Nikaido, 1995). Tem sido demonstrado que o LAM inibe a ativação de macrófagos mediada por γ -interferon (Sibley & Krahenuhl, 1988) e constitui o principal imunógeno para células B na hanseníase (Misaki *et al.*, 1977).

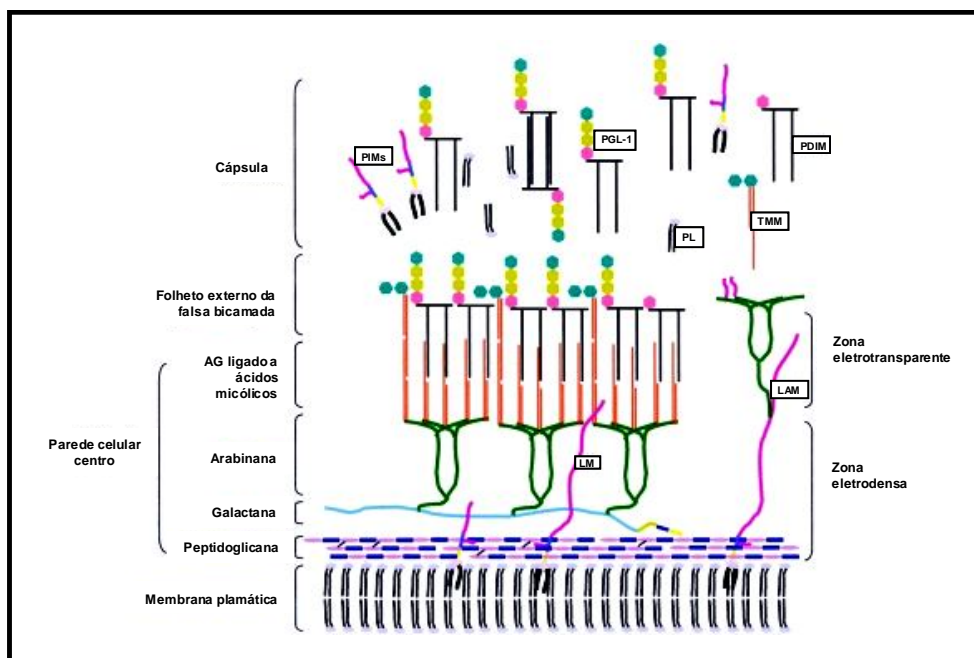


Figura 1.5. Modelo esquemático da parede celular do *Mycobacterium leprae*. A parede celular do *M. leprae* é composta por: glicolipídio fenólico I (PGL-I), ácidos micólicos (TMM), ácidos micocerosóicos (PDIMs), fosfatidilinositol manosídeo (PIMs), lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM) (adaptado de Vissa & Brennan, 2001).

O *M. leprae* multiplica-se lentamente *in vivo*, por divisão binária, apresentando um tempo de geração de aproximadamente duas semanas e não é cultivável *in vitro*, o que resulta na dificuldade de se estabelecer estudos que elucidariam vários aspectos da patogenia causada por este microrganismo (revisado por Levy & Ji, 2006).

Um marco bastante importante no conhecimento da biologia do *M. leprae* foi o seqüenciamento do genoma deste microrganismo por S. T. Cole e seus colaboradores em 2001 (**Figura 1.6**). Eles obtiveram *M. leprae*, proveniente de lesões de pele de um paciente hansênico multibacilar de Tamil Nadu, na Índia (cepa TN), expandiram os bacilos em tatu de nove bandas, purificaram os bacilos de tecidos do fígado do tatu e extraíram o DNA para o seqüenciamento (Cole *et al.*, 2001).

Com o seqüenciamento completo do genoma do *M. leprae*, ficou demonstrado que este sofreu uma evolução genômica redutiva, quando comparado com o *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose humana (**Tabela 1.2**).

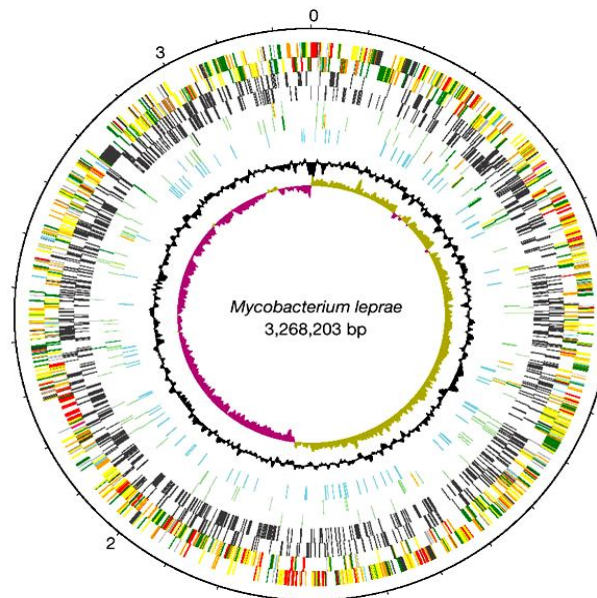


Figura 1.6. Mapa genômico circular do *Mycobacterium leprae* mostrando a posição e orientação de genes, pseudogenes e seqüências repetitivas conhecidas. De fora para dentro: círculos 1 e 2 - genes; 3 e 4 - pseudogenes; 5 e 6 genes específicos do *M. leprae*; 7 - seqüências repetitivas; 8 conteúdo G+C; e 9 – (G+C)/(G-C). As diferentes cores designam as várias categorias funcionais dos genes (Cole *et al.*, 2001).

Tabela 1.2. Comparação de características genômicas entre o *M. leprae* e o *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001).

Característica	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Tamanho do genoma (pares de base)	3. 268.203	4.411.532
Porcentagem de codificação de proteínas	49,5	90,8
Número de genes codificadores de proteínas	1.604	3.959
Número de pseudogenes	1.116	6
Densidade gênica (pb/gene)	2.037	1.114

INTRODUÇÃO

O processo de evolução genômica redutiva envolve a perda de muitos genes e suas funções associadas e resulta no encolhimento do genoma devido à perda de DNA desses genes inativos e regiões genômicas (Gómez-Valero *et al.*, 2004). O mais marcante caso de evolução genômica redutiva entre os patógenos conhecidos provavelmente ocorreu com o *M. leprae*. Não somente por apresentar o menor genoma, de 3,2 Mb, quando comparado com outras espécies micobacterianas, mas também pelo menor número de genes ativos, aproximadamente 1600, quando comparado com o *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001).

O *M. leprae* incrivelmente contém o maior número de pseudogenes entre os genomas publicados e acredita-se que a deleção gênica em massa e expressiva quantidade de pseudogenes seriam a causa da incapacidade de cultivo *in vitro* e a lenta taxa de crescimento do *M. leprae* (Hangmann, 2000).

A construção de uma árvore filogenética entre as espécies micobacterianas com seqüenciamento completo (**Figura 1.7**) mostrou que *M. leprae* e *M. tuberculosis* estão estritamente relacionadas, devido a terem um ancestral comum, o que não acontece com o *Mycobacterium avium* e mostrou ainda que no ramo do *M. leprae* dois períodos são considerados: primeiro um período com genes ativos e um segundo período com pseudogenes (Gómez-Valero *et al.*, 2007).

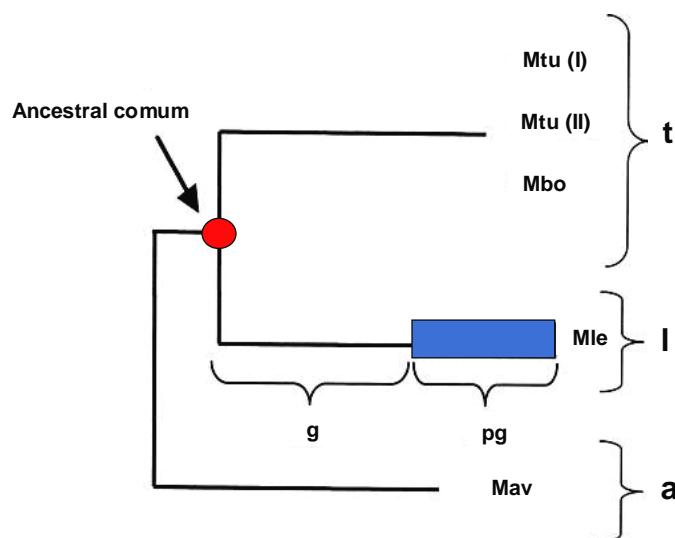


Figura 1.7. Árvore filogenética do *Mycobacterium avium* (a), *Mycobacterium leprae* (l) e do grupo *Mycobacterium tuberculosis* (t). O ancestral comum entre l e t é mostrado (em vermelho). Dois períodos são considerados no ramo do *M. leprae*: o primeiro período com genes ativos (g) e o segundo período com pseudogenes (em azul) (Gómez-Valero *et al.*, 2007).

INTRODUÇÃO

O seqüenciamento do genoma constitui uma poderosa ferramenta para o entendimento da patologia causada pelo *M. leprae*, pois através deste é possível identificar proteínas potencialmente envolvidas na patogênese que poderão constituir-se em alvos para a prevenção ou tratamento da hanseníase.

Apesar das diferenças mostradas na **Tabela 1.2**, existem regiões muito conservadas entre os genomas dessas duas espécies de micobactérias, porém é de especial atenção o fato que existem aproximadamente 150 genes em *M. leprae* não compartilhados com *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001). Torna-se importante a identificação de proteínas expressas *in vivo* pelo *M. leprae*, pois provavelmente a expressão de alguns desses genes possa ser direta ou indiretamente responsável por características peculiares da patogênese causada pelo *M. leprae*.

Recentemente Marques e colaboradores (2008) identificaram pela primeira vez 218 proteínas sintetizadas pelo *M. leprae* obtido de infecção em tatu, sendo, muitas destas, enzimas cuja identificação contribui para uma mais ampla visão das atividades metabólicas deste patógeno. Outras proteínas identificadas compõem a membrana e parede celular do bacilo. Este estudo elevou de 66 para 284 o número de proteínas identificadas que são sintetizadas pelo *M. leprae*, contribuindo significativamente para os conhecimentos desta bactéria.

Foi visto ainda por Marques e colaboradores (2008) que somente 4 das 158 proteínas do envelope celular do *M. leprae* não tenham ortólogos com *M. tuberculosis*. Entretanto, a comparação entre o perfil proteômico do envelope celular dessas duas espécies micobacterianas revelou somente 66 produtos em comum, isto poderia indicar diferenças na composição do envelope celular. Esta diferença poderia pelo menos parcialmente explicar diferenças na virulência e especificidade do hospedeiro desses micobactérias. Portanto, a mais significativa contribuição deste estudo foi a identificação de um grande número de proteínas associadas à parede celular, o que possibilita um melhor entendimento da composição e fisiologia de um componente conhecido por desempenhar um papel importante na patogênese bacteriana.

1.2.1 - O cultivo do *M. leprae* em animais

A infecção em animais tem sido utilizada para obter *M. leprae* viável para estudos, tentando contornar, assim, o fato deste não ser cultivado *in vitro*. O tatu de nove bandas, *Dasyus novemcinctus* (**Figura 1.8**), é altamente susceptível à infecção com *M. leprae*. Kirchheimer & Storrs conseguiram infectar essa espécie animal e verificaram comprometimento de pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos (Kirchheimer & Storrs, 1971). Por isso, esses animais têm se constituído uma valiosa ferramenta no estudo da hanseníase. Seus órgãos internos, principalmente fígado e baço, podem conter mais que 10^{10} *M. leprae* por grama de tecido, sendo estes obtidos com relativo grau de pureza, constituindo-se, este tipo de cultivo, a base para avanços recentes e rápidos em estudos visando o entendimento da fisiologia e constituição molecular deste organismo (Colston, 1993).



Figura 1.8. Tatu de nove bandas (*Dasyus novemcinctus*). Animal usado para cultivo do *M. leprae*.
http://www.sms.si.edu/irlSpec/Dasyus_novemcinctus.htm

Embora possamos obter um grande número de *M. leprae* provenientes de tatus infectados, a viabilidade dos bacilos proveniente de camundongos é muito superior (Truman & Krahenbuhl, 2001). A utilização desta técnica é conhecida há anos, desde o trabalho do pioneiro Charles Shepard (Shepard, 1960). Ela consiste em inocular 5×10^3 a 1×10^4 bacilos no coxim plantar de camundongos e após um período de

INTRODUÇÃO

aproximadamente dois meses, há um período de crescimento de 6 a 10 meses em que o número de bacilos aumenta exponencialmente até um limite de aproximadamente 1×10^6 bacilos no sítio de inoculação. Após este limite de multiplicação ter sido alcançado, existe pouca mudança no número total de organismos e começa a acontecer perda da viabilidade destes (revisto por Colston, 1993).

Um aperfeiçoamento da técnica de Shepard para a obtenção de bacilos viáveis para estudo é a utilização de camundongos “nude” (**Figura 1.9**) congenitamente atímicos infectados com *M. leprae*. Camundongos “nude” são imunodeficientes e parece que o *M. leprae* requer, para ótimo crescimento, um grau acentuado de imunodeficiência do hospedeiro.



Figura 1.9. Camundongo nude. Animal usado para cultivo do *M. leprae*. <http://caf.iisc.ernet.in/mouse.htm>

Os camundongos congenitamente atímicos não sobrevivem mais do que poucos meses, pois são mais frágeis que os camundongos experimentalmente atímicos devido a total falta de linfócitos T maduros. São susceptíveis a muitas infecções por bactérias e vírus que não são patogênicos para camundongos imunologicamente intactos e conseqüentemente não sobrevivem quando criados sob condições convencionais para animais comuns. O trabalho com camundongo timectomizados experimentalmente é um pouco mais fácil do que o trabalho com camundongos congenitamente atímicos, pois estes exigem muito mais cuidados (Colston & Hilson, 1976; Lancaster *et al.*, 1983). 2×10^7 bacilos inoculados no coxim plantar de camundongos nude experimentalmente atímicos permitirá a colheita de 0,5 a 1×10^{10} bacilos aproximadamente seis meses após

o inóculo do sítio de inoculação (Truman & Krahenbuhl, 2001).

1.3 - O nervo periférico

Em um processo conhecido por neurulação, a placa neural, originada a partir do ectoderma e observada ao longo da superfície dorsal do embrião, se invagina formando uma calha ou goteira neural, que acaba por se fechar completamente originando o tubo neural. Este, por sua vez, sofre intensas modificações morfogênicas, e origina o encéfalo e a medula espinhal, componentes do sistema nervoso central. Enquanto isso, as extremidades da goteira neural, ao se fecharem, formam a chamada crista neural, que dá origem, entre outras células, aos neurônios e células de Schwann do sistema nervoso periférico (Carvalho & Collares-Buzato, 2005).

O sistema nervoso periférico é responsável por recolher informações de toda parte do corpo e levá-las ao sistema nervoso central, assim como levar mensagens deste para os órgãos, músculos e para as glândulas do corpo. Ele é formado por gânglios nervosos e nervos periféricos (**Figura 1.10**), estes últimos geralmente contêm diversos fascículos mantidos juntos por um tecido conectivo de revestimento: o epineuro. Cada fascículo é circundado por uma bainha de tecido conectivo, o perineuro, composto de fibroblastos, fibras colágenas e células perineurais com sua lâmina basal, constituindo-se em uma barreira relativamente impermeável entre o espaço extra-neural e o endoneuro, tecido conectivo mais frouxo que mantém juntas as unidades axônio - célula de Schwann.

Os vasos sanguíneos que suprem um nervo terminam em um plexo capilar: as arteríolas correm em paralelo ao fascículo neural e emitem ramos perpendiculares que atravessam o perineuro e se capilarizam. Esses vasos são revestidos por células endoteliais e formam, em conjunto com a lâmina basal que as revestem, a barreira hemato-neural que é seletivamente permeável a proteínas e outros constituintes do sangue (Scollard, 2000). Uma pequena quantidade de fluido intersticial está normalmente presente entre o pequeno vaso sanguíneo e as células de Schwann no

endoneuro, com um pequeno contingente de macrófagos residentes (Landes, 1994).

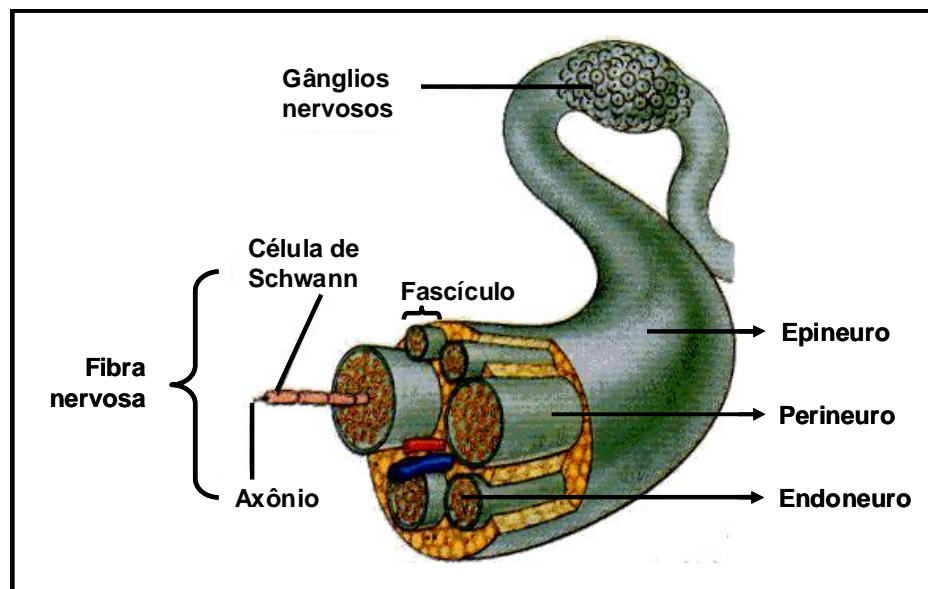


Figura 1.10. Componentes estruturais do nervo periférico. <http://www.esec-lousa.rcts.pt/imagens/nervo.jpg> (modificado).

As unidades axônio – células de Schwann, chamadas de fibras nervosas, podem ser não mielinizadas, onde vários axônios, que são a unidade condutora do impulso nervoso, são individualmente envolvidos por uma mesma célula de Schwann não mielinizante, sendo estas fibras preferidas pelo *M. leprae* para infecção; ou ainda, as fibras nervosas podem ser mielinizadas, onde cada axônio é envolvido por uma sucessão de células de Schwann, de 200 a 2.000 μm , arranjadas ponta a ponta para formar uma bainha até que o nervo alcance seu órgão alvo, por exemplo, pele ou músculo. Os axônios, neste tipo de fibra, encontram-se isolados dentro de uma bainha de mielina compacta, produzida e mantida por células de Schwann mielinizantes. Cada célula de Schwann mielinizante encontra sua vizinha adjacente em junções chamadas de nódulos de Ranvier, que são estruturas organizadas para assegurar que a bainha de uma célula esteja em contato com a da outra célula de Schwann (Scollard, 2000).

1.4 - A célula de Schwann

A identificação das células de Schwann foi feita por um dos fundadores da Teoria Celular: Theodor Schwann (1810 - 1882) em 1839, um anatomista e fisiologista alemão, professor em Louvain (Carvalho & Collares-Buzato, 2005). As células de Schwann são consideradas as células da glia, ou de suporte, do sistema nervoso periférico. São usualmente comparadas aos oligodendrócitos do sistema nervoso central, por formarem, tal como estes, a bainha de mielina dos axônios. Entretanto, diferem desses em vários aspectos.

As células de Schwann têm origem na crista neural. Essa crista é formada por um aglomerado de células que se dispõem longitudinalmente de cada lado do tubo neural. As células aí presentes irão migrar e originar as células pertencentes ao sistema nervoso periférico, inclusive as células de Schwann, e outros tipos celulares (Carvalho & Collares-Buzato, 2005). Os neurônios fornecem sinais através das neuroregulinas, proteínas produzidas em altos níveis pelo sistema nervoso periférico, que direcionam as células multicompetentes da crista neural para a linhagem de glia (Bunge, 1993). Sinais vindo do axônio são extremamente importantes no direcionamento da linhagem de células de Schwann. Um exemplo disso é o fato de que P0, a principal proteína da mielina da célula de Schwann, retorna ao nível basal após a célula imatura ser privada do contato com o axônio, mostrando que a célula precursora da célula de Schwann não sobrevive sem um sinal neural. Já a célula de Schwann madura sobrevive normalmente sem esse contato (Jessen & Mirsky, 2005). Uma outra atuação importante dos axônios sobre o desenvolvimento das células de Schwann é evidenciada em um estágio mais tardio, quando os sinais associados ao axônio direcionam as células de Schwann imaturas a se diferenciarem em células de Schwann formadoras ou não formadoras de mielina, sendo cada uma destas caracterizadas por marcadores, moléculas próprias, que as identificam (**Figura 1.11**).

Enquanto os neurônios formam a base do sistema nervoso, as células de Schwann são essenciais para a sobrevivência e função destes no nervo periférico. Elas circundam, com raríssimas exceções, todas as fibras nervosas, desempenhando um papel vital na manutenção deste sistema (Bhatheja & Field, 2006). Em nervos

INTRODUÇÃO

desenvolvidos, axônios sinalizam para determinar a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células de Schwann. Células maduras mielinizadas e não mielinizadas reverterem a um fenótipo imaturo e se desdiferenciam, se os axônios com os quais elas fazem contato sofrem degeneração por transecção do nervo (Mirsky & Jessen, 1999). Um circuito autócrino de sobrevivência permite que as células de Schwann sejam capazes de bloquear a sua apoptose pela liberação de fatores de crescimento e sobrevivam na ausência de axônios. Esta característica das células de Schwann constitui em uma condição vital para o sucesso da regeneração do nervo seguido à injúria, pois as células de Schwann persistem sem o axônio, no segmento distal do nervo após a injúria, para que o axônio entre neste segmento e cresça ao longo dele, sendo guiado corretamente até seu alvo (Jessen & Mirsky, 1999).

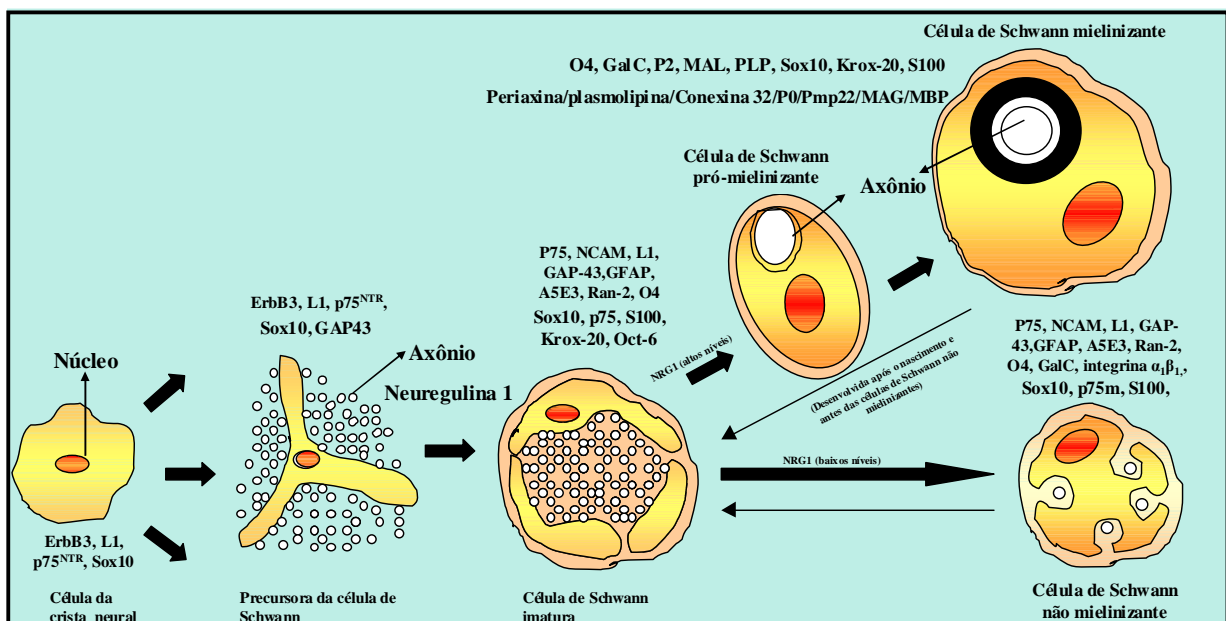


Figura 1.11. O desenvolvimento das células de Schwann e seus marcadores. A última das três principais transições nesta linhagem é prontamente reversível como indicado pelas setas finas (modificado de Mirsky *et al.*, 2008 e Bhatheja & Field, 2006).

Os componentes mais importantes para a sobrevivência autócrina incluem o fator de crescimento semelhante a insulina 2 (IGF-2), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-BB) e neurotrofina 3 (NT3) que sinergisticamente bloqueiam a morte das células de Schwann (Meier *et al.*, 1999). A transdução do sinal de sobrevivência é

INTRODUÇÃO

feito pela via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP quinase). Curiosamente, a sobrevivência a longo prazo requer um sinal inicial adicional que é provido pela laminina, que sozinha não constitui um fator de sobrevivência. Um outro fator relacionado para promover a sobrevivência das células de Schwann em combinação com outros sinais de sobrevivência é o fator inibidor de leucemia, conhecido por ser regulado positivamente após transecção do nervo. A regeneração do nervo, portanto, depende de um mecanismo que permite células de Schwann sobreviverem na ausência de axônios (revisto por Mirsky *et al.*, 2002).

Uma vez que o contato com o axônio seja re-estabelecido, as células de Schwann que se desdiferenciaram progridem para um fenótipo maduro e tornam-se novamente células de Schwann maduras mielinizante ou não mielinizante, dependendo do sinal axonal (Jessen & Mirsky, 2005). De um modo geral, as células não formadoras de mielina se associam com os axônios menores e as células formadoras de mielina envolvem axônios de maior calibre (**Figura 1.12**). O estabelecimento da bainha de mielina em torno de axônios de maiores diâmetros proporciona uma rápida condução saltatória do impulso ao longo do nervo (Martini, 1995).

As células de Schwann e seus precursores são também importantes fontes de sinais de desenvolvimento em nervos embrionários e neonatais. Esses sinais regulam a sobrevivência e diferenciação de outras células no nervo prematuro. Sinais derivados da glia são necessários para a sobrevivência neuronal em períodos cruciais do desenvolvimento regulando a especialização molecular e funcional dos axônios e controlando a maturação da bainha perineural que protege os nervos de inflamação e moléculas indesejáveis produzidas no tecido que os circunda (revisto por Jessen & Mirsky, 1999).

A sinalização promovida pela célula de Schwann e seus precursores durante o desenvolvimento do sistema nervoso periférico envolve “desert hedgehog” (Dhh), um membro da família de moléculas de sinalização Hedgehog, expresso por células de Schwann, que é requerido para a correta formação não somente do perineuro, mas também do tecido conectivo do endoneuro e perineuro (Parmantier *et al.*, 1999). Estas estruturas são essenciais para a integridade funcional do nervo periférico, pois nervos que não expressam Dhh exibem múltiplas anormalidades que afetam as células de

Schwann mielinizantes e não mielinizantes, axônios, células vasculares e imunes (Sharghi-Namini *et al.*, 2006).

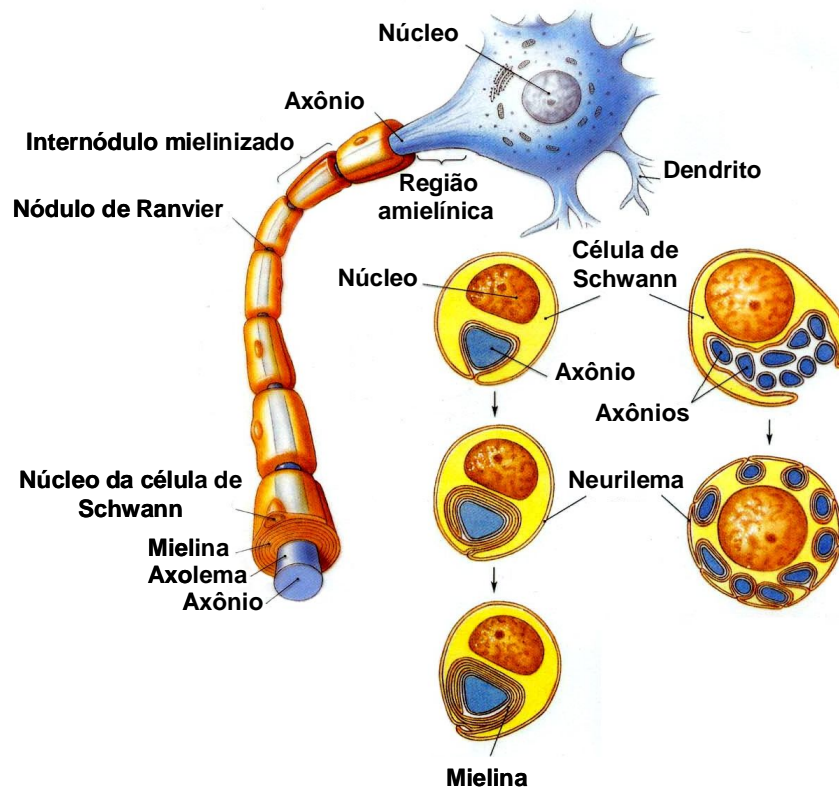


Figura 1.12. A célula de Schwann e os axônios periféricos. Numa fibra nervosa mielinizada uma única célula de Schwann contorna uma porção de um único axônio formando a bainha de mielina, enquanto numa fibra nervosa não mielinizada ou amielínica uma única célula de Schwann envolve vários axônios (Martini, 1995).

A glicoproteína associada à mielina (MAG) está implicada na sinalização, por células de Schwann, que regula a estrutura axonal (Yin *et al.*, 1998). NT3 e fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) estão envolvidos em vias de sinalização que controlam a sobrevivência dos neurônios. Por último, a sinalização para a agregação dos canais de sódio que é vital para função de axônios mielinizados constitui também um evento importante para o desenvolvimento promovido pelas células de Schwann (revisado por Jessen & Mirsky, 1999).

1.4.1 - A lâmina basal da célula de Schwann

As fibras nervosas mielinizadas e amielinizadas são cobertas por uma lâmina basal justaposta à membrana plasmática da célula de Schwann muito semelhante às outras lâminas basais formada por lamininas, colágeno tipo IV, nidogênio e proteoglicanas (**Figura 1.13**) (Alberts, *et al.*, 1997). A presença desta lâmina basal nas células de Schwann as diferencia de fibroblastos e macrófagos (revisado por Rambukkana *et al.*, 1997).

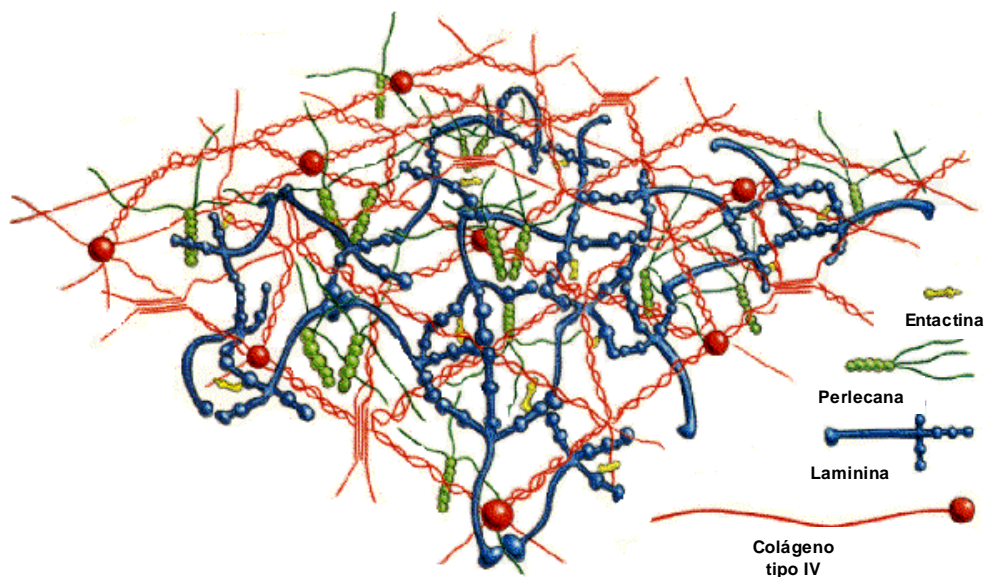


Figura 1.13. Lâmina basal. A lâmina basal é formada por interações específicas entre as proteínas de colágeno tipo IV, laminina, entactina e a proteoglicana perlecano (Alberts *et al.*, 1997).

A lâmina basal, além da importância estrutural, por constituir-se substrato para muitos tipos celulares, influencia no comportamento celular através de interações com receptores que desencadeiam muitos sinais intracelulares diferentes para controlar características celulares tais como: proliferação, sobrevivência, diferenciação, polarização e morfogênese (revisado por Chernousov *et al.*, 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram que as células de Schwann dependem de sinais provenientes do axônio para formar a lâmina basal, pois quando estas são cultivadas sem

INTRODUÇÃO

neurônios não formam a típica lâmina basal sobre a sua superfície e que a presença do axônio e da lâmina basal é necessária para a formação da mielina (Bunge *et al.*, 1993).

Uma peculiaridade da lâmina basal da célula de Schwann é a abundância de laminina-2, que constitui seu principal componente. Lamininas são proteínas heterotriméricas, críticos componentes da lâmina basal. Atualmente, 5 cadeias α , 4 cadeias β e 3 cadeias γ tem sido identificadas e 15 isoformas de lamininas foram descritas (revisão por Chernousov *et al.*, 2008). A laminina-2, isoforma de laminina observada nas células de Schwann e também em células de músculo estriado e trofoblastos (Patton, 2000) 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 da molécula (Ehring *et al.*, 1990). A evidência genética do papel da laminina-2 na mielinização é baseada no estudo de camundongos e pessoas com distrofia muscular congênita: ambos tem mutações no gene da *laminina- $\alpha 2$* e são caracterizados por apresentarem neuropatia periférica (Matsumura, *et al.*, 1997).

Laminina-2 ancora a célula de Schwann na lâmina basal através dos receptores de lamininas, tais como integrina $\alpha 6 \beta 1$, integrina $\alpha 6 \beta 4$ e distroglicana (Previtali *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 1996), e regula a proliferação, sobrevivência, morfogênese destas células, bem como a dinâmica da actina no citoesqueleto, que é passo essencial para distribuição e mielinização de axônios no nervo periférico por células de Schwann (Chernousov *et al.*, 2008).

Yu e colaboradores (2008) mostraram que camundongos que tiveram interrupção da expressão da laminina nas células de Schwann no estágio imaturo foram incapazes de ter células de Schwann não mielinizante no nervo adulto. A falta desse tipo celular resultou em reduzida resposta ao calor e uma diminuição do número de neurônios sensitivos fibra C, mostrando assim, importância da laminina também no desenvolvimento de células de Schwann não mielinizante e na função sensorial nociceptiva normal.

1.4.2 - A membrana da célula de Schwann

A membrana da célula de Schwann (**Figura 1.14**) é formada por um complexo de várias moléculas, muitas destas interagindo entre si, com o citoesqueleto ou com a lâmina basal. Destacam-se, entre essas moléculas, a distroglicana que se liga à utrofina, uma isoforma pequena de distrofina (Dp116) e à proteína 2 relacionada a distroglicana (DRP2). A utrofina se liga, por sua vez, à actina do citoesqueleto e DRP2 se liga à periaxina, uma proteína com domínio protéico PDZ associado à membrana celular (Scherer & Arroyo, 2002). Todas estas proteínas fazem parte de um complexo macromolecular e estudos mostram que mutações ou deleções nos genes que codificam estas moléculas implicam em importantes anomalias no nervo periférico (Shermam *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2003).

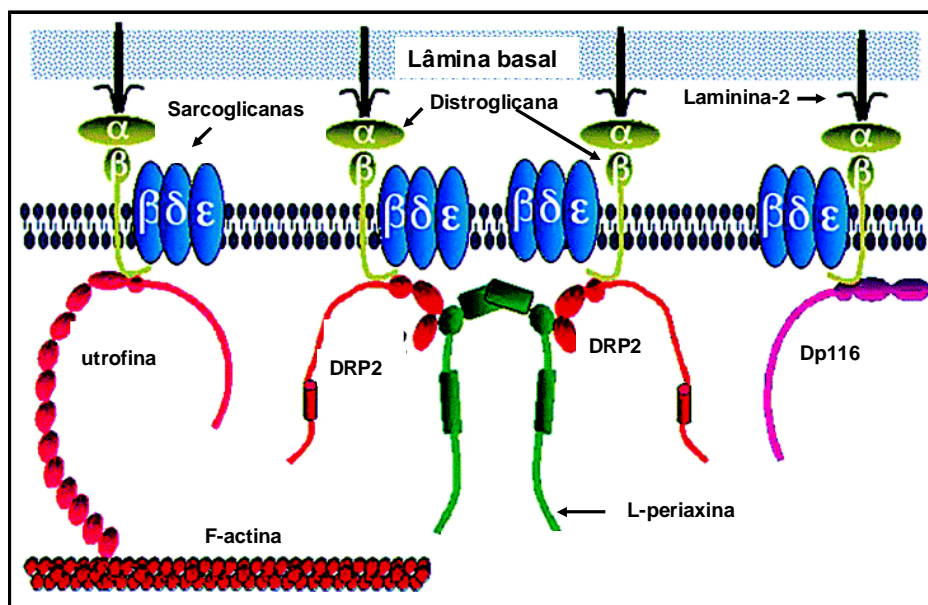


Figura 1.14. Membrana plasmática da célula de Schwann mielinizante. O receptor distroglicana se liga a três membros da família distrofina em célula de Schwann mielinizante: utrofina, DRP2 e Dp 116. Destes somente a utrofina possui um domínio de ligação à actina, enquanto DRP2 liga-se à periaxina, que é mostrada ligando-se a si mesma através do domínio PDZ. Três sarcoglicanas associam-se à distroglicana. Todas essas proteínas formam um complexo macromolecular na membrana da célula de Schwann mielinizante (Scherer & Arroyo, 2002).

O complexo distroglicana, mostrado em 1998 por Rambukkana e colaboradores como um importante receptor de laminina não integrina, é codificado por um único gene

INTRODUÇÃO

e clivado em duas proteínas: α -distroglicana, uma proteína que fica ancorada na membrana e que se liga ao domínio G da cadeia α -2 da laminina-2 e β -distroglicana, uma proteína transmembrana que se liga à proteína do citoesqueleto distrofina (Henry & Campbell, 1999). A distroglicana é super expressa juntamente com a laminina-2 durante a mielinização do nervo periférico em ratos (Masaki *et al.*, 2002) e sua expressão é regulada em paralelo com a laminina-2 durante o processo de degeneração e regeneração após lesão do nervo (Masaki *et al.*, 2000). A deleção seletiva de distroglicana em células de Schwann resulta em severa disfunção neurológica e amplo espectro de anormalidades morfológicas na mielinização e arquitetura nodal, resultando em defeito de condução do nervo (Saito *et al.*, 2003).

Uma outra molécula de interesse na membrana da célula de Schwann, não mostrado na figura anterior, é o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 (**Figura 1.15**). Os gangliosídeos são glicoesfingolípídios constituintes característicos da membrana plasmática de praticamente todas as células eucarióticas, sendo, no entanto, particularmente abundantes nas células de origem neuronal, tendo sua expressão modulada durante o desenvolvimento do sistema nervoso. Dentre os diferentes tipos de gangliosídeos, o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 têm sido correlacionando com diferenciação e sobrevivência celular. Este apresenta um ou mais resíduos de ácido siálico ligado a um grupo acetil, expresso somente durante o desenvolvimento neural, com presença muito limitada em tecidos adultos (Levine *et al.*, 1984). Entretanto, trabalhos mostram um aumento da expressão deste gangliosídeo em células de Schwann desdiferenciadas (Vaudano *et al.* 1992). Essas células de Schwann apresentam também um aumento na produção de moléculas de adesão neural como L1 e N-CAM (Martini *et al.*, 1986), além de moléculas de matriz extracelular como laminina (Doyu *et al.*, 1993), mudanças importantes para o processo de regeneração nervosa (Mirsky *et al.*, 2008).

Malisan e colaboradores (2002) demonstraram que glioblastomas convertem o gangliosídeo GD3 em gangliosídeo 9-O-acetil GD3 para prevenir a apoptose, pois a acetilação reprimiria a atividade pro-apoptótica do GD3 e Kniep e colaboradores (2006) também demonstraram que o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 protege células tumorais da

INTRODUÇÃO

apoptose, sugerindo assim a acetilação do GD3 como um novo mecanismo pelo qual estas células escapariam deste tipo específico de morte celular.

O padrão de gangliosídeos expressos em tecidos de tatu infectados com *M. leprae* é bastante diferente dos não infectados e, em especial nos nervos periféricos de tatus infectados, observa-se um significativo aumento na expressão de vários gangliosídeos não identificados, quando comparados a nervos periféricos de tatus não infectados com o bacilo (Harris *et al.*, 1986), entretanto nada se sabe sobre a expressão e função do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 no nervo periférico afetado pelo *M. leprae*.

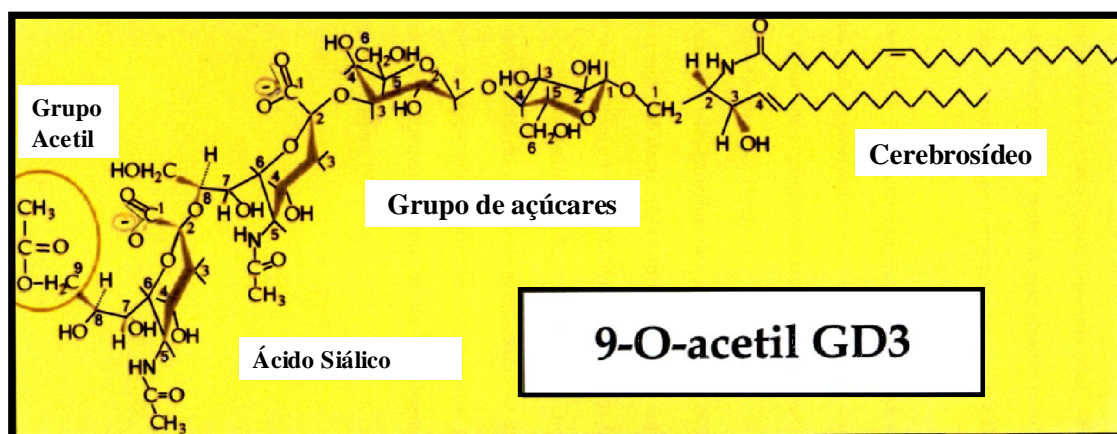


Figura 1.15. Gangliosídeo 9-O-acetil GD3. Diagrama esquemático (Mendez-Otero & Santiago, 2003).

1.5 - A interação do *M. leprae* com a célula de Schwann

A interação de bactérias patogênicas com sua célula hospedeira desencadeia uma série de eventos que resulta na perpetuação do patógeno na célula. Pouco se sabe sobre esses eventos em células de Schwann, quando interagindo com o *M. leprae*, mas estudos mostram que células de Schwann infectadas com *M. leprae* apresentam alterações tanto na morfologia quanto na expressão de moléculas de adesão (Hagge *et al.*, 2002).

Rambukkana e colaboradores (1997) mostraram que o tropismo neural de *M. leprae* envolve a ligação da bactéria ao domínio globular (G) da cadeia α -2 da laminina-

2 (**Figura 1.16A**). Esta isoforma de laminina está presente em abundância na lâmina basal que reveste a célula de Schwann e serviria, assim, como uma ponte inicial entre o *M. leprae* e os receptores de laminina na célula de Schwann. Em 1998, Rambukkana e colaboradores descreveram o complexo distroglicana e Previtali e colaboradores (2003) descreveram as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ como receptores de laminina-2 presentes na célula de Schwann envolvidos na adesão do *M. leprae*.

Na interação *M. leprae* - célula de Schwann, o glicolípido fenólico-I (PGL-I) (Ng *et al.*, 2000) e a proteína ML-LBP21 (Shimoji *et al.*, 1999) presentes na superfície do *M. leprae* seriam as adesinas responsáveis pela ligação do bacilo a laminina-2. Contudo, a descrição na literatura de outras moléculas envolvidas, assim como o fato de que anticorpos anti-distroglicana- α inibem apenas parcialmente a ligação do bacilo à célula de Schwann, reforçam a hipótese da existência de mecanismos alternativos de adesão. Marques e colaboradores (2000) isolaram e caracterizaram, em nosso laboratório, a proteína semelhante à histona (Hlp) de 21 kDa, uma potencial adesina envolvida na interação *M. leprae* – célula de Schwann e mostraram que a adição exógena de Hlp ao *M. leprae* aumentava significativamente sua associação à célula de Schwann. A Hlp mostrou ser idêntica à proteína ML-LBP21 previamente caracterizada (Shimoji *et al.*, 1999), reforçando o possível papel desta proteína como adesina do *M. leprae* (**Figura 1.16B**).

Rambukkana e colaboradores (2002) demonstraram que *M. leprae* promove rápida desmielinização por um mecanismo contato-dependente na ausência de células imune em um modelo de cultura de tecido nervoso *in vitro* e em camundongo *Rag1*-knockout que carecem de linfócitos B e T. Células de Schwann mielinizadas são resistentes à invasão pelo *M. leprae*, mas sofrem desmielinização por ataque micobacteriano. Tapinos e colaboradores (2005) mostrou que a desmielinização promovida pelo *M. leprae* é um resultado da ligação direta da bactéria e ativação do receptor de tirosina quinase ErbB2.

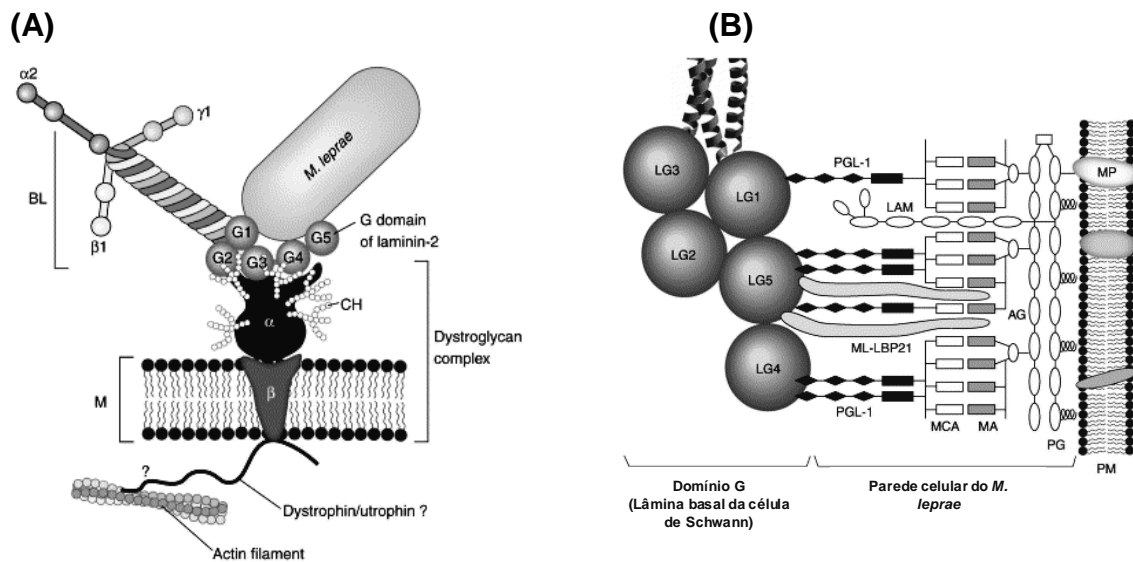


Figura 1.16. Representação esquemática da interação do *M. leprae* com a célula de Schwann. (A): envolvimento do domínio G da cadeia α -2 da laminina-2 e α -dístroglicana nesta interação. Lâmina basal (BL), carboidratos (CH) e Membrana (M). **(B):** modelo de interação dos módulos individuais do domínio G da cadeia α -2 da laminina-2 da lâmina basal da célula de Schwann com o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) e ML-LBP21 na parede celular do *M. leprae*. Os componentes da parede celular lipoarabinomamana (LAM), peptidoglicana (PG), arabinogalactana (AG), ácidos micocerósicos (MA), Membrana plasmática (PM) e proteínas da membrana (MP) são também mostradas (Rambukkana, 2001).

O *M. leprae* preferencialmente invade as células de Schwann de fenótipo não mielinizante, onde se multiplica. Entretanto, o processo de desmielinização sofrido pelas células de Schwann de fenótipo mielinizante promove nestas células desdiferenciação e significativa proliferação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, gerando o fenótipo não mielinizante de sua preferência (Rambukkana *et al.*, 2004).

1.6 - Mecanismos de patogenicidade do *M. leprae* no sistema nervoso periférico

A lesão neural na hanseníase é decorrente da capacidade do *M. leprae* infectar os nervos periféricos, alojando-se preferencialmente no interior de células de Schwann,

INTRODUÇÃO

porém, os mecanismos de patogenicidade utilizados por esta bactéria ainda não são bem conhecidos. O avanço no conhecimento nesta área tem sido prejudicado pela biologia peculiar, já mencionada, desta bactéria, aliada à ausência de um modelo animal que mimetize a doença humana.

A lesão neural ocorre em todas as formas clínicas da doença e avança, muitas vezes, de maneira irreversível, a despeito da cura bacteriológica obtida com a MDT. É concebível que a presença do *M. leprae* no nervo provoca efeitos diretos sobre a célula hospedeira, causando distúrbios na homeostase tecidual, subseqüentemente agravados pelo infiltrado inflamatório que se instala durante a infecção.

Estudos iniciais em culturas de tecido nervoso indicam que a infecção pelo *M. leprae* afeta o metabolismo das células de Schwann em vários aspectos, tais como na sua proliferação, secreção de proteínas da matriz extracelular, e expressão de moléculas de adesão (Antia & Shetty, 1997). Estudos realizados por Hagge e colaboradores (2002) mostraram que células de Schwann infectadas com *M. leprae* apresentam alterações tanto na morfologia quanto na expressão de genes codificadores de molécula de adesão celular, mas estas células são capazes ainda de interagir com neurônios.

Rambukkana e colaboradores (2002) mostraram que a ligação do *M. leprae* à unidade célula de Schwann mielinizante - axônio é suficiente para induzir desmielinização, sem causar apoptose ou morte da célula de Schwann ou do neurônio, por um mecanismo contato-dependente, tanto num modelo de cultura de tecido neural *in vitro* como *in vivo*, ou seja, este estudo mostra que a desmielinização e a degeneração axonal podem ocorrer no início da infecção pelo *M. leprae* ainda na ausência de células imunes, embora a resposta imune desempenhe um papel crítico na manifestação clínica da doença. A identificação de desmielinização não imune-mediada induzida pelo *M. leprae* propõe a existência de mecanismo(s) alternativo(s) para a desmielinização. Rambukkana, 2004, propõe, então, que com a desmielinização da fibra nervosa, seguida de degeneração axonal, há a indução da proliferação de células de Schwann, que por sua vez, resulta em abundantes células de Schwann não mielinizantes para invasão, replicação do *M. leprae* e subseqüente progressão da doença, sendo provável que a perturbação da homeostase do microambiente neural,

INTRODUÇÃO

particularmente a desregulação de redes de sinalização existente que mantenham a integridade da bainha de mielina na célula de Schwann madura, possa ser responsável pela rápida desmielinização.

Estudo realizado por Chen e colaboradores (2003) mostrava que a interrupção da sinalização promovida pelo receptor ErbB em células de Schwann não mielinizante causava progressiva perda sensorial em camundongos transgênicos. Evidências que a desmielinização induzida pelo *M. leprae* é um resultado direto da ligação da bactéria ao receptor tirosina quinase ErbB2 e ativação deste na célula de Schwann, que resulta na ativação da via Ras-Raf-MEK-ERK foram mostradas por Tapinos e colaboradores (2006). Estudos anteriores mostraram que a sinalização por esta via é suficiente para conduzir a desdiferenciação das células de Schwann, parecendo ser esta a via responsável pelo processo de desdiferenciação posterior a injúria ao nervo, visando a sinalização por esta via a proliferação das células de Schwann para reparo da injúria (Harrisingh *et al.*, 2004).

No contexto da infecção pelo *M. leprae* esta sinalização resulta em lesão neural, pois o *M. leprae* se liga à célula de Schwann mielinizante através do receptor ErbB2 e induz a célula à desdiferenciação pela ativação da sinalização Ras-Raf-MEK-ERK (**Figura 1.17A**) e uma vez que a célula de Schwann tenha se desdiferenciado, o *M. leprae* pode usá-la como reservatório para a infecção, sobrevivendo e proliferando dentro dela. Nas células de Schwann não mielinizantes o *M. leprae* intracelular induz a proliferação destas através de uma rota diferente para ERK que envolve PKC ϵ e Lck (**Figura 1.17B**) e que é independente da sinalização através da via Ras-Raf-MEK; esta proliferação serviria para aumentar o tamanho do reservatório hospedeiro. Portanto, ErbB2 tem sido considerado como alvo terapêutico para bloquear a desmielinização precoce induzida pelo *M. leprae* o que preveniria a infecção (Noon & Lloyd, 2007; Wiwanitkit, 2008).

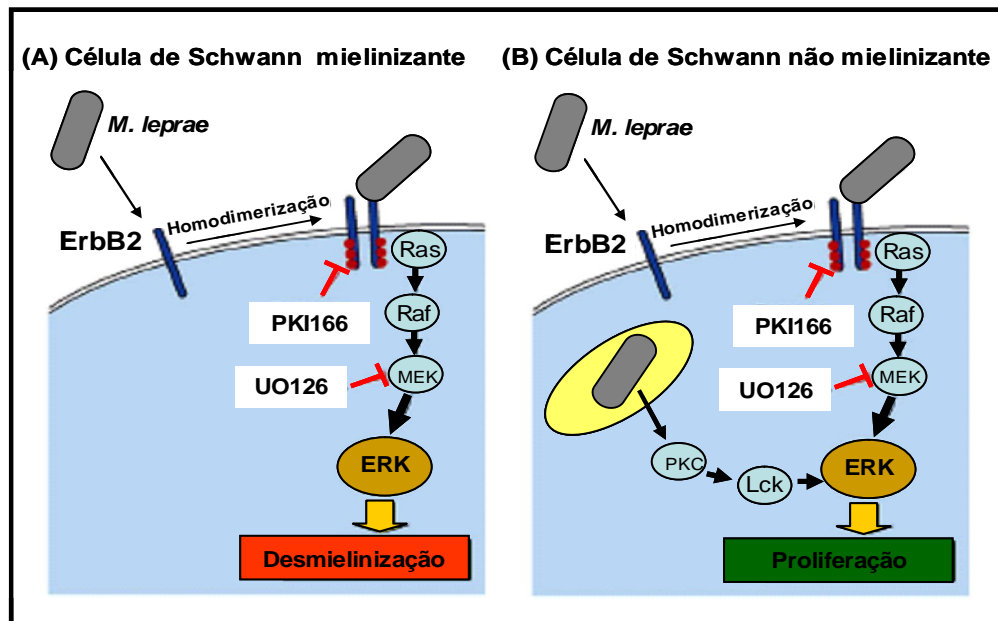


Figura 1.17. *Mycobacterium leprae* se liga ao receptor ErbB2 para induzir desmielinização e proliferação nas células de Schwann. (A) A ligação do *M. leprae* ao ErbB2 na superfície da célula de Schwann desencadeia desmielinização através da via Ras-Raf-MEK-ERK. (B) *M. leprae* intracelular induz proliferação de células não mielinizantes através de uma rota diferente para ERK que envolve PKC ϵ e Lck e que é independente da sinalização através da via Ras-Raf-MEK (Noon & Lloyd, 2007).

1.7 - Relevância do estudo

Os dados da Organização Mundial da Saúde mostram que apesar dos intensos e bem controlados programas de terapia multidroga a transmissão da hanseníase continua ocorrendo. Infelizmente, um grande número dessas pessoas permanece em risco de desenvolver dano ao nervo antes, durante ou após o início do tratamento quimioterápico (Naafs & Wheate, 1978). O número de indivíduos no mundo portadores de deficiências físicas decorrentes da hanseníase é estimado em aproximadamente 2 milhões, tornando a hanseníase a principal causa mundial de neuropatia periférica não traumática (Nations *et al.*, 1998).

A lesão neural na hanseníase é decorrente da capacidade do *M. leprae* infectar os nervos periféricos, alojando-se preferencialmente no interior de células de Schwann. No nervo, o bacilo de Hansen causa desmielinização através de mecanismos pouco esclarecidos. Igualmente, os efeitos primários do *M. leprae* sobre a célula hospedeira, e

INTRODUÇÃO

como estes efeitos estão implicados na injúria neural observada na doença, foram pouco investigados.

Acredita-se que o envolvimento neural subclínico ocorra em todos os indivíduos hansênicos e que 30% das fibras nervosas necessitam ser destruídas antes que alterações possam ser detectáveis (Person & Ross, 1975), mas é provável que a patogenia causada pelo *M. leprae* possa ser desencadeada desde o momento da sua entrada na célula de Schwann. Em estudo realizado por nós (Alves *et al.*, 2004) pudemos observar que a infecção de células de Schwann humana ST88-14 pelo *M. leprae* depende de determinadas proteínas da célula hospedeira, que quando bloqueadas por inibidores afetam consideravelmente a entrada do bacilo. Estas proteínas estão envolvidas em vias de sinalização que determinam vários eventos intracelulares tais como proliferação, sobrevivência e morte.

Apesar dos recentes avanços significativos pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que levam à lesão do nervo na hanseníase, mas, sem dúvida, a interação *M. leprae* - célula de Schwann representa um evento inicial crítico neste processo. Dessa forma, torna-se essencial conhecer quais moléculas da célula de Schwann potencialmente relevantes na interação *M. leprae* - fibra nervosa são afetadas para que este bacilo ganhe acesso, prossiga com a invasão e sustente sua sobrevivência no sistema nervoso periférico, visando entender de que forma essas moléculas, que são extremamente importantes na manutenção da homeostasia da fibra nervosa, são afetadas e promovem o desencadeamento da patogenia observada na hanseníase. Portanto, os resultados deste trabalho poderão contribuir para um melhor entendimento dos efeitos do *M. leprae* sobre o metabolismo e fisiologia da célula de Schwann e da correlação destes efeitos com a lesão neural observada na hanseníase.

II – OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral:

Estudar a interação do *M. leprae* com a célula de Schwann, a fim de compreender a bem sucedida colonização do tecido nervoso por este patógeno, assim como seus efeitos no microambiente neural que podem desencadear o dano ao nervo observado na hanseníase.

2.2 - Objetivos específicos:

- 1- Isolar, cultivar e caracterizar fenotipicamente as células de Schwann primárias de rato e humanas.
- 2- Analisar morfologicamente a interação *M. leprae* - célula de Schwann através de microscopia eletrônica de varredura.
- 3- Determinar a cinética de associação do *M. leprae* às células de Schwann.
- 4- Estudar o efeito do *M. leprae* sobre a expressão da cadeia α -2 da laminina-2, distroglicana, Desert Hedgehog (Dhh) e gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann.

III – MATERIAIS

3.1 - Meio de cultura RPMI 1640 suplementado

✓ Meio RPMI 1640 (pó) (Invitrogen, CA, EUA)	1x
✓ HEPES (Invitrogen)	10 mM
✓ GlutaMAX (Invitrogen)	1 mM
✓ Penicilina (Invitrogen)	100 U/mL
✓ Estreptomicina (Invitrogen)	100 U/mL
✓ Soro fetal bovino (Cultilab, SP, BR)	10%

3.2 - Meio de cultura DMEM-3M (DMEM 1x acrescentado dos 3 mitógenos)

✓ Meio DMEM (líquido) (Invitrogen)	1x
✓ Heregulina (Genentech, CA, EUA)	10 nM
✓ Foscolina (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha)	2 µM
✓ Soro fetal bovino (HyClone, UT, USA)	10%
✓ Penicilina	100 U/mL
✓ Estreptomicina	100 U/mL

3.3 - Meio de cultura D-10 (DMEM 1x acrescentado de soro fetal bovino)

✓ Meio DMEM (líquido)	1x
✓ Soro fetal bovino (HyClone)	10%

3.4 - Meio D-10/Mitógenos

✓ Meio DMEM (Líquido)	1x
✓ Extrato pituitário (Biomedical Technologies, MA, EUA)	1 mg/mL
✓ Foscolina	2 µM
✓ Soro fetal bovino (HyClone)	10%
✓ Penicilina	100 U/mL
✓ Estreptomicina	100 U/mL

3.5 - Solução de dispase/colagenase

✓ Meio DMEM (Líquido)	1x
✓ Colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, NJ, EUA)	0,5 mg/mL
✓ Dispase II (Roche Applied Science, IN, EUA)	1 mg/mL
✓ Soro fetal bovino (HyClone)	10%

3.6 - Salina tamponada com fosfato (PBS) 1x

✓ PBS desidratado (0,45 g de NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O; 3,23 g de NaH ₂ PO ₄ .12H ₂ O e 8 g de NaCl) (Invitrogen)	1 pacote
✓ Água deionizada (q.s.p.)	1 L

3.6.1 - PBS 1x com cálcio

✓ CaCl ₂ (Invitrogen)	0,1 g
✓ PBS 1x (q.s.p.)	1 L

3.7 - Solução de poli-L-lisina (200 µg/mL)

- ✓ Poli-L-lisina (Sigma Chemical Company, MO, EUA) 20 mg
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 100 mL

3.8 - Tripsina/EDTA 1x

- ✓ Tripsina (0,125%) (Invitrogen) 500 µL
- ✓ EDTA (0,2%) (Invitrogen) 100 µL
- ✓ PBS 1x 9,4 mL

3.9 - Silane a 4%

- ✓ Aminopropiltietroxilane (Sigma Chemical Company) 0,2 mL
- ✓ Etanol absoluto (Sigma Chemical Company) 4,8 mL

3.10 - Bis-benzemida 1,25 mg/mL

- ✓ Bis-benzemida (Sigma Chemical Company) 12,5 mg
- ✓ PBS 1 x (q.s.p.) 10 mL

3.11 - Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 100 µg/mL

- ✓ FITC (Sigma Chemical Company) 0,1 mg
- ✓ PBS 1 x (q.s.p.) 1 mL

3.12 - Brometo de etídio 20 µg/mL

- ✓ Brometo do etídio (Sigma Chemical Company) 0,2 mg
- ✓ PBS 1 x (q.s.p.) 10 mL

3.13 - Solução de cloreto de sódio (NaCl) 5 M

- ✓ NaCl (Merck Brasil, RJ, BR) 292,2 g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 L

3.14 - Tampão de lise celular RIPA (“Radioimmuno Precipitation Assay”)

- ✓ Nonidet p40 (Roche Applied Science) 100 mg
- ✓ Deoxicolato de sódio (Sigma Chemical Company) 25 mg
- ✓ SDS (Sigma Chemical Company) 10 mg
- ✓ EDTA 120 mM 41,66 µL
- ✓ NaCl 5 M 30 µL
- ✓ Complete Mini (mistura de inibidores de proteases) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha) 1 comprimido
- ✓ Tris-HCl 50 mM - pH 7,5 (q.s.p.) 10 mL

3.15 - Tampão de lise celular para ELISA direto

- ✓ Triton X-100 (Amersham Biosciences, NJ, USA) 100 µL
- ✓ NH₄OH 0,1 N (Merck Brasil) 400 µL

MATERIAIS

- ✓ Comprimido Complete Mini (mistura de inibidores de proteases) 1 comprimido
- ✓ PBS com cálcio 10 mL

3.16 - Soluções para eletroforese

Foram utilizadas as seguintes soluções para eletroforese:

3.16.1 - Acrilamida 30% - bis-acrilamida 0,8%

- ✓ Acrilamida (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) 30 g
- ✓ Bis- acrilamida (Bio-Rad Laboratories) 0,8 g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 100 mL

3.16.2 - Tris-HCl 1,5 M – pH 8,8

- ✓ Tris-base (Sigma Chemical Company) 36,3 g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 200 mL

3.16.3 - Tris 1 M – pH 8,0

- ✓ Tris-base 121,1g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 L

3.16.4 - Tris-HCl 0,5 M – pH 6,8

- ✓ Tris-base 3 g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 50 mL

3.16.5 - Solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%

- ✓ SDS (Sigma Chemical Company) 5 g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 50 mL

3.16.6 - Solução de persulfato de amônia – APS 10%

- ✓ APS (Bio-Rad Laboratories) 0,1 g
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 mL

3.16.7 - Solução amido “black”

- ✓ Amido Black (Amersham Biosciences) 0,1g
- ✓ Metanol (Merck Brasil) 10 mL
- ✓ Ácido acético(Merck Brasil) 2 mL
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 100 mL

3.16.8 - Tampão de corrida 5x – pH 8,3 a 8,6

- ✓ Tris-base 15,14 g
- ✓ Glicina (Sigma Chemical Company) 72,06 g

- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 L

3.16.9 - Tampão de corrida 1x com SDS

- ✓ Tampão de corrida 5 x 200 mL
- ✓ SDS 10% 10 mL
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 L

3.16.10 - Tampão de transferência

- ✓ Tampão de corrida 5 x 200 mL
- ✓ Metanol 200 mL
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 L

3.16.11 - Salina tamponada com Tris/Tween 20 (TBS/T)

- ✓ NaCl 5 M 30 mL
- ✓ Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- ✓ Twenn 20 100% (Amersham Biosciences)..... 500 µL
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 1 L

3.16.12 - Tampão de amostra (6x)

- ✓ Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 7 mL
- ✓ Glicerol (Sigma Chemical Company) 3 mL
- ✓ DTT (Invitrogen) 0,93 g

MATERIAIS

- ✓ SDS 1 g
- ✓ Azul de bromofenol 0,05% (Sigma Chemical Company) 25 µL
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 10 mL

3.16.13 - Gel de empilhamento (contendo 4% de acrilamida)

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

3.16.14 - Gel de corrida (contendo 15% de acrilamida)

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

3.17 - Tampão cacodilato de sódio 0,2 M – pH 7,2

- ✓ Cacodilato de sódio tri-hidratado (Sigma Chemical 4,28 g

- Company)
- ✓ Água deionizada (q.s.p.) 100 mL

3.18 - Obtenção do *Mycobacterium leprae*

Foram utilizados neste trabalho *M. leprae* proveniente de tatus e de camundongos nude (nu/nu) infectados.

3.18.1 - Obtenção do *Mycobacterium leprae* de tatu

As bactérias provenientes de tatus foram doados pelo Dr. Patrick J. Brennan do Departamento de Microbiologia da Colorado State University, Fort Collins, CO, EUA. As mesmas foram purificadas de tecidos de fígado e baço de animais infectados utilizando o método de Draper (Hunter *et al.*, 1982). Esta metodologia consistia na irradiação dos tecidos contendo os bacilos com $2,5 \times 10^6$ Rad, homogeneização em tampão PBS pH 7,2 (Invitrogen, CA, EUA) por 3 minutos em gelo, centrifugação à 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, ressuspensão do pellet em tampão contendo NaCl 0,135 M, Tris 0,2M e MgSO₄ 0,01 M, filtragem da mistura e centrifugação à 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sedimento era então centrifugado duas vezes em 8 mL de gradiente de Percoll 50% (LGC Biotecnologia, SP, BR) à 27.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Os bacilos eram ressuspensos em PBS e mantidos à -70 °C até o uso.

3.18.2 - Obtenção do *Mycobacterium leprae* de camundongos nude

As bactérias viáveis provenientes do coxim plantar de camundongo atímico (nude) infectado foram doadas pelo Dr. James Krahenbuhl, do National Hansen's Disease Laboratory, School of Veterinary Medicine, Baton Rouge, LA, EUA. Os bacilos eram recolhidos da pata do camundongo aproximadamente 6 meses após inóculo. Eram separados por centrifugação em gradiente de Percol e a suspensão de bacilos frescos era tratada com NaOH 0,1 M. Os bacilos eram ou não marcados com corante verde fluorescente PKH67 (Sigma Chemical Company, MO, EUA) e mantidos à 4° C em meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, MI, EUA) (Truman & Krahenbuhl, 2001). Após sua obtenção, os bacilos eram quantificados pelo método de Shepard & McRae (1968) e eram enviados imediatamente para o Brasil, sendo os mesmos utilizados no máximo quatro dias após a purificação.

3.19 - Células de Schwann

Neste trabalho foram utilizados 3 tipos diferentes de células de Schwann, conforme descrito a seguir.

3.19.1 - Células de Schwann da linhagem ST88-14

A linhagem de células de Schwann denominada ST88-14 foi isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I e doada pelo Dr. Jonathan A. Fletcher do Departamento de Patologia do Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA. Esta linhagem é estocada em alíquotas, em nitrogênio líquido,

em solução de congelamento de células contendo 90% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 10% de DMSO (Sigma).

3.19.2 - Células de Schwann primárias de rato

Células de Schwann de ratos foram purificadas em nosso laboratório a partir de fragmentos de nervos ciáticos de ratos adultos da cepa Wistar. A utilização desses animais em nosso estudo foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ sob o registro: CEUA P0219-04. Após o estabelecimento das culturas, estas foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido em solução de congelamento de células, descrita no item acima.

3.19.3 - Células de Schwann primárias humanas

As células de Schwann humanas foram purificadas durante estágio no “The Miami Project to Cure Paralysis” da Universidade de Miami, FL, EUA e doadas pelo chefe do Projeto Dr. Patrick Wood ao Laboratório de Microbiologia Celular – Fiocruz. As alíquotas de células foram mantidas em nitrogênio líquido até o descongelamento.

3.20 - cDNA de biópsia

Os fragmentos de nervos foram coletados, com o consentimento dos indivíduos, e foram utilizados para investigações histopatológicas de rotina para o diagnóstico da doença. cDNA de nervo humano humano com (N=4) e sem (N=4) microfasciculação,

MATERIAIS

proveniente das biópsias, foram sintetizados junto ao estudo aprovado pelo Comitê Nacional Brasileiro de Ética na Pesquisa humana, segundo o nº 151/01.

3.21 - Anticorpos

Anticorpos	Diluição
✓ Anti-Dhh policlonal feito em coelho (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)	Diluição 1: 50
✓ Anti-gangliosídeo-9-O-acetil GD3 monoclonal feito em camundongo (Sigma Chemical Company)	Diluição 1: 100
✓ Anti-GAP43 policlonal feito em coelho – (Abcam Inc., MA, EUA)	Diluição 1: 40
✓ Anti-GFAP policlonal feito em coelho (DAKO, CA, EUA)	Diluição 1: 100
✓ Anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase feito em coelho (Sigma Chemical Company)	Diluição 1: 20.000
✓ Anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase feito em porco (Sigma Chemical Company)	Diluição 1: 10.000
✓ Anti-laminina monoclonal feito em camundongo (Sigma Chemical Company)	Diluição 1: 100
✓ Anti-laminina α -2 policlonal feito em cabra (Santa Cruz Biotechnology)	Diluição 1: 100
✓ Anti-MBP policlonal feito em coelho (DAKO)	Diluição 1: 200
✓ Anti-NGFr monoclonal feito em camundongo (DAKO)	Diluição 1: 50
✓ Anti-S-100 policlonal feito em coelho (DAKO)	Diluição 1: 100
✓ Anti- β -dístroglicana monoclonal feito em camundongo (Novocasta Laboratories, Benton Lane, UK)	Diluição 1: 80
✓ Cy3 policlonal feito em coelho (Sigma Chemical)	Diluição 1: 400

MATERIAIS

Company)	
✓ Anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado ao FITC feito em coelho (DAKO)	Diluição 1: 40
✓ Anti-imunoglobulinas de coelho conjugado ao FITC feito em porco (DAKO)	Diluição 1: 40
✓ Anti-imunoglobulinas de coelho conjugado ao TRITC feito em porco (DAKO)	Diluição 1: 40

IV – MÉTODOS

4.1 - Preparo de meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções foram preparados das seguintes formas:

4.1.1 - Preparo de meios de cultura

Os reagentes para o preparo do meio de cultura RPMI 1640 suplementado foram misturados, a solução foi esterilizada por filtração e estocada a 4 °C.

Os reagentes para o preparo do meio de cultura DMEM-3M, meio D-10 e meio D-10/Mitógenos foram misturados em seus respectivos recipientes e estocados estéreis a 4 °C.

4.1.2 - Preparo de soluções

A solução de dispase/colagenase foi preparada e usada imediatamente ou congelada em alíquotas concentradas.

As soluções de PBS, PBS com cálcio, PBS/Tween 20 e solução de poli-L-lisina foram esterilizadas por filtração e estocadas a 4 °C.

As soluções de PBS/Tween 20/BSA foram esterilizadas por filtração e estocadas a -20 °C.

A solução de Silane a 4% foi preparada para uso imediato, sendo estocada por até cinco dias.

As soluções de bis-benzemida, FITC, brometo de etídio, tampão de amostra e tampão RIPA foram preparadas, alíquotadas, protegidas da luz e estocadas a -20 °C,

sendo esta última estocada por um período não superior a um mês.

A solução de acrilamida foi preparada, filtrada, protegidas da luz e estocadas a 4 °C.

As soluções de tampão de corrida com SDS, Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8 - ajustado com HCl), Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8 - ajustado com HCl), Tris 1 M (pH 8,0 - ajustado com hidróxido de sódio em pastilhas), SDS (preparado a 68°C), persulfato de amônia e tampão cacodilato de sódio foram preparadas e estocadas a 4 °C.

As soluções de amido black, tampão de transferência e TBS/T foram preparadas e estocadas à temperatura ambiente.

A solução de NaCl foi preparada, autoclavada e estocadas à temperatura ambiente.

As soluções de TBS/T/leite, tampão de lise de proteínas para ELISA direto, gel de empilhamento e gel de corrida foram preparadas e usadas imediatamente.

Todos os tampões tiveram o pH específico acertado, conforme protocolo.

4.2 - Marcação do *M. leprae* com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e PKH26

M. leprae letalmente irradiados proveniente de tatu ou de camundongo foram marcados adicionando-se 100 µg/mL de FITC (isotiocianato de fluoresceína) ou 10 µg/mL de PKH26 (ambos da Sigma Chemical Company, MO, EUA) em PBS (salina tamponada com fosfato) (Invitrogen, CA, EUA), à suspensão bacteriana e incubando-se por uma hora à temperatura ambiente. A suspensão de micobactérias foi centrifugada durante 10 minutos à 14.000 x g a 4 °C. As bactérias foram ressuspensas em 1,5 mL de PBS e centrifugadas novamente. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As micobactérias marcadas foram ressuspensas em PBS, o sedimento foi passado em seringa com agulha 29-gauge por 5 vezes, para desfazer possíveis grumos, e a eficiência da marcação foi monitorada através da observação em microscópio de fluorescência. Após esse procedimento as micobactérias letalmente irradiadas marcadas foram aliquotadas e estocadas no freezer -70°, e as micobactérias vivas

foram estocadas a 4 °C até a sua utilização, sendo uma alíquota de ambas separada para determinação da concentração de bacilos.

4.3 - Teste de viabilidade do *M. leprae* proveniente de camundongo nude

Neste trabalho a viabilidade do *M. leprae* foi verificada por dois métodos, descritos a seguir.

4.3.1 - Respirometria

2×10^7 bacilos foram inoculados em frascos contendo meio Middlebrook 7H12 (Difco Laboratories, MI, EUA) por sete dias, os frascos foram analisados no Sistema BACTEC 460 (Becton Dickinson, NJ, EUA), para determinação do índice respirométrico. O meio Middlebrook 7H12 contém ácido palmítico radioativo que depois de degradado pela bactéria libera carbono radioativo que é quantificado pelo sistema BACTEC 460. Esta quantificação foi usada em nosso trabalho para determinar o índice respirométrico que indicava a viabilidade bacteriana.

4.3.2 - Teste de viabilidade por coloração

Um outro método usado para determinar a viabilidade do *M. leprae* usado em nossos estudos foi a utilização do Kit de viabilidade bacteriana Live/dead BacLight L7012 da Molecular Probes (Invitrogen, CA, EUA). As bactérias foram colocadas em tubo contendo 1 mL de NaCl (Merck Brasil, RJ, BR) 0,85% e centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e foram feitas duas lavagens com PBS. O sedimento foi ressuspensão em 6 µL da mistura dos reagentes A [SYTO 9

MÉTODOS

(3,34 mM em DMSO)] e B [Iodeto de propídio (20 mM em DMSO)] do Kit, misturados em partes iguais. Foi feita a incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro, e após este período foi acrescentado 1 mL de NaCl 0,85% no tubo e o material foi então centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, deixando-se apenas aproximadamente 10 µL no tubo. O sedimento foi passado em seringa com agulha 29-gauge por 5 vezes, para desfazer possíveis grumos. 10 µL da suspensão foram colocados sobre uma lâmina e cobertos com lamínula. Para determinação da viabilidade bacteriana foram contadas 500 micobactérias por lâmina em microscópio de fluorescência (NIKON Eclipse E400, Japão), determinando a percentagem de bactérias viáveis marcadas em verde, e bactérias não viáveis, marcadas em vermelho.

4.4 - Limpeza de lamínulas e tratamento com Silane

As lamínulas (Fisherbrand, PA, EUA) autoclavadas foram colocadas em solução de silane (“aminopropyltietroxylane”) 4% (Sigma Chemical Company) em etanol absoluto(v/v) por 4 minutos. Em seguida, foram colocadas em etanol absoluto durante 2 minutos por 2 vezes. Logo após elas foram lavadas com água destilada estéril durante 2 minutos por 2 vezes, acondicionadas em embalagens estéreis e colocadas na estufa a 37 °C, por 24 horas, para a secagem. As lamínulas foram estocadas em lugar seco e estéril, até o momento do uso.

4.5 - Manutenção das células de Schwann humanas da linhagem ST88-14

A linhagem de células de Schwann denominada ST88-14 foi recebida por doação do Dr. Jonathan A. Fletcher do Departamento de Patologia do Brigham and Women's

Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA e estocadas no Laboratório de Hanseníase da FIOCRUZ em alíquotas no nitrogênio líquido.

Para o início do cultivo, as células foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, adicionadas em um volume de 10 mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de HEPES (Invitrogen), 1 mM de L-Glutamax (Invitrogen) pH 7,4. As células foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4 °C para a retirada do crioprotetor DMSO (dimetil sulfóxido - Sigma Chemical Company) e então $3,5 \times 10^5$ células foram ressuspensas novamente em meio RPMI suplementado, sendo cultivadas em garrafas de 25cm² (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) em 5% de CO₂ a 37 °C até obter uma confluência de 90%. As células de Schwann ST88-14 são aderentes e a sua manutenção foi feita por repiques retirando-se o sobrenadante da cultura, lavando a monocamada com PBS, ressuspendendo-se as células adicionando-se 2 mL de tripsina (0,125%)/EDTA (0,2%) (Invitrogen) e levando-se à estufa por 1 à 2 minutos. Em seguida, 3 mL de meio RPMI suplementado foi adicionado e a suspensão centrifugada à 500 x g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer e $3,5 \times 10^5$ células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI suplementado. Após a sexta passagem, as culturas foram desprezadas e nova alíquota estoque da linhagem foi descongelada e o cultivo reiniciado.

4.6 - Purificação e cultivo de células de Schwann primárias

Neste trabalho foram utilizadas duas diferentes fontes de células de Schwann primárias, conforme descrito a seguir.

4.6.1 - Obtenção e purificação de células de Schwann primárias de rato

Culturas isoladas de células de Schwann de ratos foram estabelecidas em nosso laboratório a partir de fragmentos de nervos ciáticos de ratos adultos da cepa Wistar. A utilização desses animais em nosso estudo foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ sob o registro: CEUA P0219-04. O nervo ciático de rato foi retirado assepticamente e colocado em placa contendo meio L-15 (Invitrogen) para retirada do epineuro. Após este procedimento dois diferentes métodos de obtenção e purificação de células de Schwann primárias de rato foram usados. O primeiro, usado somente no início dos nossos estudos, consistiu em seccionar o nervo ciático em finas fatias transversais com auxílio de um bisturi, depositar cada uma destas sobre BD Matrigel™ (BD Biosciences, CA, USA) em placa (Nunc A/S) com fundo coberto por lamínula e adicionar DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, extrato pituitário (Biomedical Technologies, MA, EUA) 1 mg/mL, forskolina (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) 2 µM, penicilina (Invitrogen) 100 U/mL, estreptomicina (Invitrogen) 100 U/mL, denominado meio D-10/mitógenos. O meio foi trocado duas vezes por semana até que a cultura de células de Schwann apresentasse uma confluência de 90% em torno do explante.

O segundo método de obtenção e purificação de células de Schwann primárias de rato consistiu em transferir o nervo ciático, após a retirada do perineuro, para placa de cultura e mantê-lo por quatro semanas em 5 mL de meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, denominado meio D-10, que foi trocado 2 vezes por semana. Após esse período, o nervo foi colocado em 3 mL de meio D-10 contendo dispase II (Roche Applied Science, IN, EUA) 12,5 U/mL e colagenase tipo I (Worthington Biochemical Corporation, NJ, EUA) 0,5% e foi mantido por cerca de 16 horas em estufa à 37 °C a uma atmosfera de 5% CO₂ para dissociação do tecido. Após este procedimento todo material foi colocado em tubo contendo 2 mL de meio D-10 para centrifugação a 500 x g por 10 minutos a 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 5 mL de meio D-10 e centrifugado à 500 x g por 10 minutos a 4 °C. Este procedimento foi repetido e o sedimento final

ressuspensão em meio D-10/mitógenos, colocado em placa tratada previamente com poli-L-lisina e incubado em estufa a 37 °C/ 5% CO₂. No dia seguinte foi trocado todo o meio para retirada dos debrís celulares e o meio D-10/mitógenos foi então trocado duas vezes por semana até que a cultura de células de Schwann estivesse confluenta. Quando a cultura de células de Schwann primárias de rato atingia uma confluência de aproximadamente 95 – 100% foi feita a expansão. Esta consistia em lavar a cultura 2 vezes com HBSS (Invitrogen) à temperatura ambiente, adicionar 2 mL de tripsina (2,5%)/EDTA (0,2) (Invitrogen) 1x por 1 à 3 minutos a 37 °C, adicionar 5 mL de meio D-10, centrifugar a 500 x g por 10 minutos a 4 °C, ressuspender o sedimento em 5 mL de meio D-10/mitógenos e colocar em placa tratadas previamente com poli-L-lisina. As culturas foram utilizadas até a quinta passagem. O congelamento foi feito em nitrogênio líquido em solução de soro fetal bovino a 10% de DMSO quando as células de Schwann primárias de rato estavam na segunda passagem. Não se admitia recongelamentos de células.

4.6.1.1 - Tratamento de placa com poli-L-lisina

As placas utilizadas para o cultivo das células de Schwann primárias de rato foram pré-tratadas com poli-L-lisina (Sigma Chemical Company). As placas de 100 mm ou de 24 poços (Nunc A/S) foram tratadas com solução de poli-L-lisina (200 µg/mL) diluída em água estéril, à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo, a poli-L-lisina foi retirada e a placa foi lavada com água estéril (Invitrogen); esse procedimento foi repetido e então as células em meio de cultura foram colocadas na placa ou poços para o cultivo.

4.6.2 - Células de Schwann primárias humanas

As células de Schwann humanas foram purificadas durante estágio no “The Miami Project to Cure Paralysis” da Miami University, FL, EUA e doadas pelo chefe do Projeto Dr. Patrick Wood ao Laboratório de Microbiologia Celular – Fiocruz.

Para obtenção das células de Schwann primárias humanas, fragmentos de nervos humanos da cauda eqüina foram dissociados com uma pinça estéril, colocados em 5 mL de meio L-15 (Invitrogen) e centrifugados à 500 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sedimento ressuspense novamente em meio L-15. Este procedimento foi repetido 2 vezes e o sedimento final ressuspense e cultivado em placa de 60 mm (Nunc) por uma semana em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (HyClone, UT, USA), 10 nM heregulina (doação da Genentech, CA, EUA), forskolina 2 µM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, denominado meio DMEM-3M, que foi trocado por uma vez, após 3 dias. Após esse período, o nervo foi colocado em 3 mL de meio D-10 contendo dispase II 12,5 U/mL e colagenase tipo I 0,5% e foi mantido por cerca de 16 horas para dissociação. Após este procedimento todo material foi colocado em tubo contendo 2 mL de meio D-10 para centrifugação à 500 x g por 10 minutos a 4 °C. O sedimento ressuspense em 5 mL de meio D-10 e centrifugado. Este procedimento foi repetido e o sedimento final foi ressuspense em meio DMEM-3M, colocado em placa de 100 mm (Nunc A/S) tratada previamente com laminina e incubado em estufa à 37 °C a uma atmosfera de 5% CO₂. No dia seguinte foi trocado todo o meio para retirada dos debris celulares e o meio DMEM-3M foi então trocado duas vezes por semana até que a cultura de células de Schwann estivesse confluenta para expansão, utilização ou congelamento. Quando a cultura de células de Schwann primária humana atingia uma confluência de aproximadamente 95 – 100% foi feita a expansão. Esta consistia em lavar a cultura 2 vezes com HBSS à temperatura ambiente, adicionar 2 mL de tripsina (2,5%)/EDTA(0,2%) 1x por 1 à 3 minutos à 37 °C, adicionar 5 mL de meio D-10, centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos à 4°C, ressuspender o sedimento em 10 mL de meio DMEM-3M e dividir o material para 2 placas de 100 mm, tratadas previamente com laminina. As culturas foram utilizadas até a quinta passagem. O congelamento foi feito em nitrogênio líquido em solução de soro fetal bovino à 10% de DMSO (Sigma

Chemical Company), quando as células de Schwann primárias humanas estavam na segunda passagem. Não se admitia recongelamento das células.

4.6.2.1 - Tratamento de placa com laminina

As placas (Nunc A/S) utilizadas para o cultivo das células de Schwann primárias humanas foram pré-tratadas com laminina (Invitrogen). As placas de 100 mm e poços de placas de 24 poços foram tratadas com 4 mL e 250 µL, respectivamente, de solução de laminina 10 µg/mL diluída em DMEM puro gelado e deixadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após esse tempo, a laminina foi retirada e então as células em meio de cultura foram colocadas na placa ou poços para o cultivo.

4.7 - Ensaio de interação do *Mycobacterium leprae* com células de Schwann

A cultura foi lavada com PBS com cálcio (Invitrogen), adicionava-se 2 mL de tripsina (2,5%)/EDTA (0,2%), levava-se à estufa a 37 °C por 1 à 2 minutos. Em seguida, 3 mL de meio apropriado para cada tipo celular suplementado foi adicionado e a suspensão, foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas, contadas em câmara de Neubauer. As células de Schwann foram ressuspensas em meio de cultura completo e distribuídas em placas contendo ou não lamínulas previamente tratadas conforme cada tipo celular, foram mantidas em estufa, a uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37 °C. Após a cultura chegar à confluência desejada para o experimento, o meio foi removido e os poços lavados uma vez com PBS com cálcio. As micobactérias foram homogeneizadas em seringa com agulha 29-gauge por

5 vezes antes de sua adição às culturas. A incubação das micobactérias com as culturas foi realizada nas mesmas condições acima com meio completo específico para cada tipo celular. Após incubação, o meio foi removido e as culturas foram lavadas 5 vezes com PBS com cálcio para remoção das bactérias não associadas às células. As células foram encaminhadas para o protocolo específico de cada experimento.

4.8 - Índice de associação bacteriana

Para determinar o índice ou percentagem de associação, que compreende o somatório do número de bactérias aderidas e/ou internalizadas às células de Schwann, estas foram submetidas ao ensaio de interação, descrito no item 4.7 acima. As culturas estabelecidas sobre lamínulas e tratadas ou não com *M. leprae* foram coradas com brometo de etídio (Sigma Chemical Company) 20 µg/mL em meio apropriado para o tipo celular e fixadas em metanol. As lamínulas foram montadas em lâminas com protetor para fluorescência p-fenilenediamina (Sigma Chemical Company) 1 mg/mL e levadas ao microscópio de fluorescência.

A percentagem ou índice de associação foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de associação} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células com bactérias associadas} \times 100}{\text{N}^{\circ} \text{ total de células quantificadas}}$$

As lâminas foram etiquetadas e estas foram vedadas, de modo a obterem-se resultados não tendenciosos durante a leitura.

4.9 - Obtenção de lisado total de células de Schwann

As culturas tratadas, como descrito no item **4.8**, foram lisadas com 500 μL de tampão de lise de proteínas (“Radioimmuno Precipitation Assay” – RIPA), por 20 minutos no gelo. Os extratos celulares foram removidos da placa, passados em seringa com agulha 29-gauge por 5 vezes e centrifugados a 14.000 x g por 15 minutos a 4 °C. Em seguida, o material sedimentado foi descartado e as proteínas contidas no sobrenadante foram dosadas com o ácido bicinconínico (Kit BCA Pierce, IL, EUA), utilizando a albumina bovina sérica (BSA, Sigma Chemical Company, MO, EUA) como proteína padrão. As amostras foram imediatamente aliqüotadas em volume de 50 μL e estocadas a -70 °C.

4.10 - Quantificação de laminina- α 2 e β -dístroglicana através de Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Neste trabalho foram utilizados dois tipos de ELISA, descritos a seguir.

O primeiro consistiu na realização de ELISA a partir de lisado protéico. 10 μg de proteínas, obtidos conforme descrito no item **4.9** acima, foi adicionado a tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,5, num volume final de 100 μL . A solução protéica foi colocada em placa de ELISA (Nunc A/S) e foi incubado a 4 °C por 24 horas. Após esse período, a placa foi lavada 3 vezes com 200 μL de PBS com cálcio pH 7,2 adicionado de 0,3% de Tween 20 [PBS-Tween 20 (0,3%)], foi feito bloqueio com 100 μL de PBS/Tween 20 (0,3%) adicionado de 3% de BSA [(PBS/Tween 20 (0,3%)/ BSA (3%)] por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A placa foi então lavada 3 vezes, foi adicionado anticorpo primário diluído em PBS/Tween 20 (0,3%) adicionado de 1% de BSA [(PBS/Tween 20 (0,3%)/ BSA (1%)] e a placa foi incubada por aproximadamente 16 horas a 4 °C. Após, a placa foi lavada 3 vezes, incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase diluído em PBS/Tween 20 (0,3%)/BSA (1%) por 1 hora a 37°C,

a placa foi lavada 4 vezes e 100 µL de solução de tetrametil benzidina (TMB) (Zymed®) (Invitrogen) foi adicionado. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. A placa foi levada ao leitor de ELISA (Titertek Plus, VA, EUA) e a leitura da densidade óptica foi feita a 450 nm.

O segundo tipo de ELISA utilizado neste trabalho consistiu na lise e realização do ELISA diretamente na placa onde as células foram crescidas. As células de Schwann – linhagem ST88-14 foram submetidas ao ensaio de interação como descrito no item 4.7. Após, as células foram lisadas com 100 µL de tampão de lise celular para ELISA direto (**Materiais 3.15**). Este procedimento foi realizado sobre o gelo e a lise foi monitorada ao microscópio. Após a lise, a placa foi lavada com 200 µL de PBS com cálcio, foi feito o bloqueio com 100 µL de PBS/Tween 20 (0,05%) adicionado de 1% de BSA [(PBS/Tween 20 (0,05%)/ BSA (1%)] por 1 hora a 37°C, foi adicionado anticorpo primário diluído em PBS/Tween 20 (0,05%)/ BSA (1%) e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Após, a placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 20 (0,05%)/BSA (1%), incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em PBS/Tween 20 (0,05%)/BSA (1%) por 1 hora a 37°C, a placa foi lavada 3 vezes e 100 µL de solução de tetrametil benzidina foi adicionado. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 3 N. A placa foi levada ao leitor de ELISA e a leitura da densidade óptica foi feita a 450 nm.

4.11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para a realização de SDS-PAGE 10 µg de cada extrato protéico obtido, como descrito no item 4.10, foram diluídos em tampão de amostra, foram fervidos por 10 minutos e aplicados em gel de 15% de poliacrilamida, foi aplicado também um padrão de peso molecular previamente escolhido e a eletroforese foi conduzida em tampão de corrida Tris/glicina contendo 0,1% de SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%)

sob amperagem constante de 20 mA (cuba S600, Amersham Biosciences Inc., NJ, USA), com tempo de corrida aproximadamente de 1 hora e 30 minutos.

4.12 – “Western blot”

Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) em cuba de transferência (Bio-Rad Laboratories) seguindo instruções do fabricante.

Para a transferência foi utilizada uma corrente de 100V durante 1 hora. Após esta a membrana foi retirada, corada com solução de “amido black” para a identificação do padrão de massa molecular e descorada por 3 lavagens de 5 minutos com salina tamponada com Tris/Tween 20 (TBS/T) (NaCl 150 mM, Tris-HCl pH 8,0 10 mM e Tween 20 0,05%). A membrana foi bloqueada com solução 3% de leite desnatado em TBS/T (TBS/T/leite) por duas hora, a solução foi retirada, a membrana foi incubada com anticorpo primário anti- β -dístroglicana (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, United Kingdom) na diluição 1: 100 em TBS/T por 2 horas. Após este período a membrana passava por 3 lavagens de 10 minutos. A membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma Chemical Company, MO, EUA) na diluição 1: 20.000 em TBS/T/leite. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS por 10 minutos e colocada em um cassete de revelação.

A revelação foi realizada adicionando-se sobre a membrana 1 mL de substrato quimioluminescente (ECL Advance Western Blotting Detection Kit - Amersham Biosciences Inc.). Em uma câmara escura, um pedaço de filme (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences Inc.) foi colocado sobre a membrana por aproximadamente 1 minuto e então o filme foi revelado utilizando-se revelador e fixador (Kodak).

4.13 - Imunocitoquímica

As culturas de células de Schwann foram plaqueadas sobre lamínulas em meio apropriado para cada tipo celular e mantidas em estufa a uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37 °C até atingirem uma confluência de aproximadamente 80 a 90%. O meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS com cálcio, foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos, o fixador foi retirado e foram realizadas 3 incubações em PBS com cálcio por 10 minutos, foi feito o bloqueio com PBS contendo 5% soro normal de cabra, após foi realizada a incubação com anticorpo primário diluído em PBS contendo 5% soro normal de cabra por 1 hora e 30 minutos, omitindo-se anticorpo primário nos poços controles. Após a incubação o anticorpo primário foi retirado, foram realizadas 3 lavagens em PBS com cálcio por 10 minutos, foi feito bloqueio com PBS contendo 5% soro normal de cabra por 40 minutos. Após o bloqueio foi realizada a incubação com anticorpo secundário, conjugado ao FITC ou TRICT (isotiocianato de tetrametilrodamina), por 1 hora. Após a incubação foram realizadas 3 lavagens em PBS com cálcio por 10 minutos, foi realizada a marcação dos núcleos celulares incubando as células com HOECHST 33342 (DAPI) (Sigma Chemical Company) por 3 minutos, para posterior submissão à microscopia de fluorescência convencional, ou com TOPRO-3 (Invitrogen) para microscopia confocal. Foram realizadas 3 lavagens em PBS com cálcio por 3 minutos e as lamínulas foram montadas em lâminas com anti-evanescente *p*-fenilenodiamina (Merck, Darmstadt, Alemanha). Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente.

4.14 - Microscopia

As culturas ou lâminas, montadas de acordo com protocolos específicos foram analisadas através das seguintes técnicas:

4.14.1 - Microscopia de campo claro, fluorescência convencional e confocal

As culturas de células de Schwann foram analisadas ao microscópio invertido (Olympus CK2, Hertfordshire, Reino Unido) e submetidas ao protocolo de imunocitoquímica, descrito no item **4.13**. Após, as lâminas foram levadas para análise ao microscópio de fluorescência convencional (NIKON Eclipse E400, Japão), seguida de captura de imagem (câmera CoolSnap ProCf Color - Media Cybernetics, EUA) pelo programa Image Plus ou microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 META – Zeiss, Baden-Württemberg, Alemanha).

4.14.2 - Microscopia eletrônica de varredura

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram plaqueadas sobre lamínulas em meio RPMI suplementado (ver item **Materiais 3.1**) e mantidas em estufa a uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37 °C. Após 2 dias de cultivo, as células foram infectadas com *M. leprae* irradiado por períodos de 2 e 24 horas e então mantidas em estufa nas mesmas condições. Após a incubação, as células foram fixadas por 30 minutos a temperatura ambiente com 2,5% glutaraldeído (Sigma Chemical Company) diluído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7.2 (Sigma Chemical Company). A seguir, as mesmas foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 30 minutos, a temperatura ambiente, com 1% tetróxido de ósmio (Sigma Chemical Company) diluído em tampão cacodilato de sódio. O material foi desidratado em bateria crescente de acetona (Merk Brasil) e as amostras foram secas pelo método do ponto crítico. As lamínulas foram montadas com cola de prata em suportes de alumínio e revestidos com uma camada de ouro na espessura de 20 nm. As amostras foram analisadas no microscópio Jeol JSM 6390-LV.

A percentagem de adesão foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de adesão} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células com bactérias aderidas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ total de células quantificadas}}$$

4.15 - Extração e purificação de RNA total de células de Schwann

As células de Schwann humanas primárias foram plaqueadas em meio DMEM-3M (ver item **Materiais 3.2**) e mantidas em estufa a uma atmosfera com 5% de CO₂ a 37 °C, após cultivo de 2 dias foram infectadas com *M. leprae* vivo ou irradiado por períodos de 4, 24 e 48 horas e então mantidas em estufa nas condições acima.

Após a incubação, o meio foi retirado e a cultura foi lavada com PBS com cálcio, o RNA total da cultura foi extraído usando 500 µL de reagente Trizol (Invitrogen) por poço em placa de 6 poços (Nunc A/S).

Para a purificação do RNA total foram adicionados 100 µL de clorofórmio para cada 500 µL do reagente Trizol e o material homogeneizado e centrifugado à 14.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi recolhida e adicionou-se 250 µL de isopropanol para precipitação do RNA. O material foi incubado à temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugado à 14.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 75% gelado, sendo centrifugado à 14.000 x g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento final ressuspensão em 40 µL de água DEPC (pirocarbonato de dietileno - Sigma Chemical Company).

Após a purificação, o RNA total (quantidade em 2 µL) foi tratado com DNase I livre de RNase (Kit - Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente com o objetivo de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, de acordo com as recomendações do fabricante.

4.16 - Síntese de DNA complementar (cDNA) de células de Schwann

Foi separado 3 µL do RNA tratado para o controle negativo de reação. Para a síntese de cDNA, à partir de RNAm de células de Schwann, 2 µg do RNA, obtido como descrito no item **4.15**, foi incubado por 5 minutos a 65°C com 1 µL de oligo dt 50 µM (Invitrogen) e 1 µL de dNTPs 10 mM (Invitrogen). Após a incubação o material foi colocado sobre o gelo por 1 minuto, adicionado de 4 µL de tampão da enzima transcriptase reversa Super Script™ III (Invitrogen) 5x, 1 µL de DTT (Invitrogen) 0,1 M, 1 µL de RNase OUT™ inibidor de RNase recombinante (Invitrogen) 40 U/ µL, 1 µL da enzima transcriptase reversa Super Script™ III (Invitrogen) 200 U/ µL. O material foi então incubado por 60 minutos a 50°C e a reação foi interrompida elevando-se a temperatura a 70°C por 15 minutos. O cDNA foi estocado a -20°C.

4.17 - Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real (RT-PCR)

A análise da expressão de RNA mensageiro (RNAm) das moléculas funcionais investigadas neste estudo foi realizada por RT-PCR quantitativo, utilizando como DNA molde os diferentes cDNAs sintetizados, conforme descrito anteriormente. As análises foram realizadas através de um sistema Assay-by-Design (Applied Biosystems, CA, USA) desenvolvido especialmente para a amplificação e discriminação alélica em cDNA dessas moléculas funcionais. O gene GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle constitutivo para os cálculos de expressão relativa do RNA mensageiro das moléculas.

RT-PCR quantitativo foi realizado usando o sistema TaqMan (Applied Biosystems) específico para amplificação de cDNA de laminina-α2 (catálogo: número

Hs01124077), distroglicana (catálogo: número Hs01100021) e Dhh (catálogo: número Hs00928824) e de GAPDH (4333764-F). Reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o equipamento 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), conduzidas de acordo com instruções do fabricante (Applied Biosystems) em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de TaqMan PCR Universal Master Mix 2x (Applied Biosystems), 1 µL de primer, 4 µL de água DEPC e 5 µL do cDNA sintetizado. As condições de ciclagem para amplificação foram: 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Após a PCR, a variação do número de ciclos (ΔC_t) entre os genes específicos e do GAPDH foi calculada para todas as amostras (C_t do gene específico subtraída do C_t GAPDH). A quantidade relativa de RNAm para os genes específicos foi determinados pelos valores $2^{-\Delta C_t}$, que representa quantas vezes a expressão do mRNA do gene específico foi diminuída ou aumentada em relação ao controle.

4.18 - cDNA de biópsia

Para analisar a expressão de Dhh em nervos hansênicos com e sem microfasciculação, cDNA de nervo humano hansênico com (N=4) e sem (N=4) microfasciculação proveniente de biópsia foi sintetizado para a realização de RT-PCR. Os fragmentos de nervos foram coletados, com o consentimento dos indivíduos, e foram utilizados para investigações histopatológicas de rotina para o diagnóstico da doença. As biópsias de nervo são sempre necessárias para o diagnóstico de hanseníase, quando os indivíduos apresentam neuropatia periférica. Este estudo foi realizado junto ao estudo aprovado pelo Comitê Nacional Brasileiro de Ética na Pesquisa humana, segundo o nº 151/01.

As biópsias de nervo foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento das análises. Cada uma das amostras foi processada separadamente em homogeneizador Politron PT-3000 (Brinkmann Instruments Incorporation, Westbury,

NY) em tubos contendo 1 mL do reagente Trizol™. Antes do processamento das biópsias, o homogeneizador passou por cinco lavagem (com SDS 0,1% em água DEPC, outra de etanol absoluto, em seguida, água DEPC e outras duas lavagens com etanol absoluto e água DEPC). Após a extração, a purificação do RNA total das biópsias foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 4.15 e a síntese de cDNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 4.16.

4.19 - Análise gráfica e estatística

Os resultados obtidos para a expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann ST88-14 tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado foram submetidos à análise de variância Kruskal-Wallis ANOVA de acesso gratuito (disponível em <http://cran.r-project.org/>), onde P igual a 0,05. Para a confecção dos gráficos foi utilizando o “software” MicroCal Origin (versão 3.0. 1993).

Para a comparação entre médias de expressão normalizada de RNAm para o gene alvo Dhh entre os grupos de pacientes com hanseníase neural com e sem microfasciculação, aplicou-se o teste T de student. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 4.0, de acesso gratuito (<http://www.softwarepod.com/11624-GraphPad-Prism-download.htm>). As comparações realizadas foram representadas em gráficos contendo os níveis de expressão normalizados de cada grupo com o erro padrão da média. Foi considerada como significativa a diferença de média com P inferior a 0,05. Para a confecção dos gráficos foi utilizando o mesmo programa.

Para a comparação entre médias de quantidade relativa de RNAm para os genes alvo β -dístroglicana, Dhh e cadeia α -2 da laminina-2, células de Schwann humanas primárias tratadas com *M. leprae* vivo – com relação bactéria: célula 50:1, e o controle, sem tratamento, aplicou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas dos pares propriamente ajustadas. As análises foram realizadas no programa R. As comparações realizadas foram representadas em gráficos contendo as quantidades relativas de RNAm de cada grupo com o erro padrão da média. Foram

MÉTODOS

consideradas como significativas diferenças de médias com P inferior a 0,05. Para a confecção dos gráficos foi utilizando o mesmo programa.

V - RESULTADOS

5.1- Isolamento e caracterização fenotípica de células de Schwann

Uma das dificuldades encontradas no estudo da patologia causada pelo *M. leprae* no nervo periférico é a obtenção de células de Schwann. O presente trabalho buscou caracterizar e determinar os parâmetros da interação entre o *M. leprae* e diferentes tipos de células de Schwann, mostrando a relevância desses tipos celulares como modelos para estes estudos. As culturas de células Schwann de diferentes origens foram estabelecidas de acordo com os protocolos já previamente descritos por outros autores e foram caracterizadas utilizando-se anticorpos contra proteínas específicas de células de Schwann e de seus fenótipos.

5.1.1- Caracterização fenotípica das células de Schwann da linhagem ST88-14

A linhagem de células de Schwann ST88-14 constitui uma importante ferramenta no estudo da interação célula de Schwann – patógeno, visto que suas culturas são de fácil manutenção, podendo ser re congeladas e mantidas por um grande número de passagens *in vitro*, embora tenham a desvantagem de constituírem células originárias de um schwannoma.

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram caracterizadas como células de Schwann pela imunomarcção positiva para a proteína S-100 (**Figura 5.1**), proteína que liga cálcio solúvel no citoplasma destas células e que as caracteriza no nervo periférico ou em co-culturas. Estas apresentam fenótipo não mielinizante, determinado pela imunomarcção positiva para GFAP (proteína ácida fibrilar glial) (**Figura 5.2**).

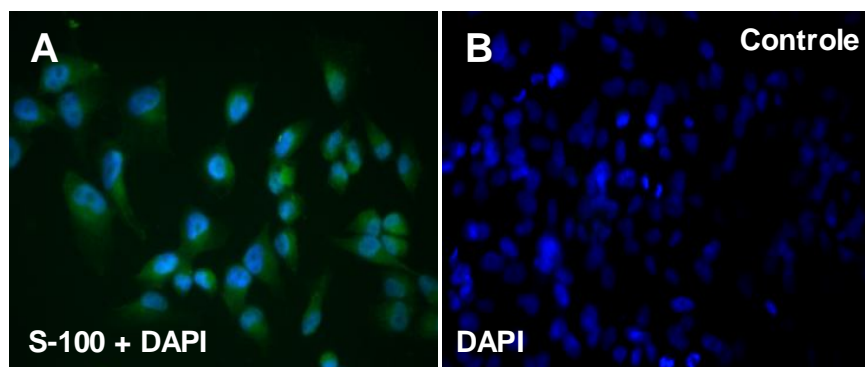


Figura 5.1. Células de Schwann da linhagem ST88-14 expressam a proteína S-100. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando marcação celular da proteína S-100 e núcleos celulares corados com DAPI (A); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (B). O aumento das imagens é de aproximadamente 400x (A) e 200x (B).

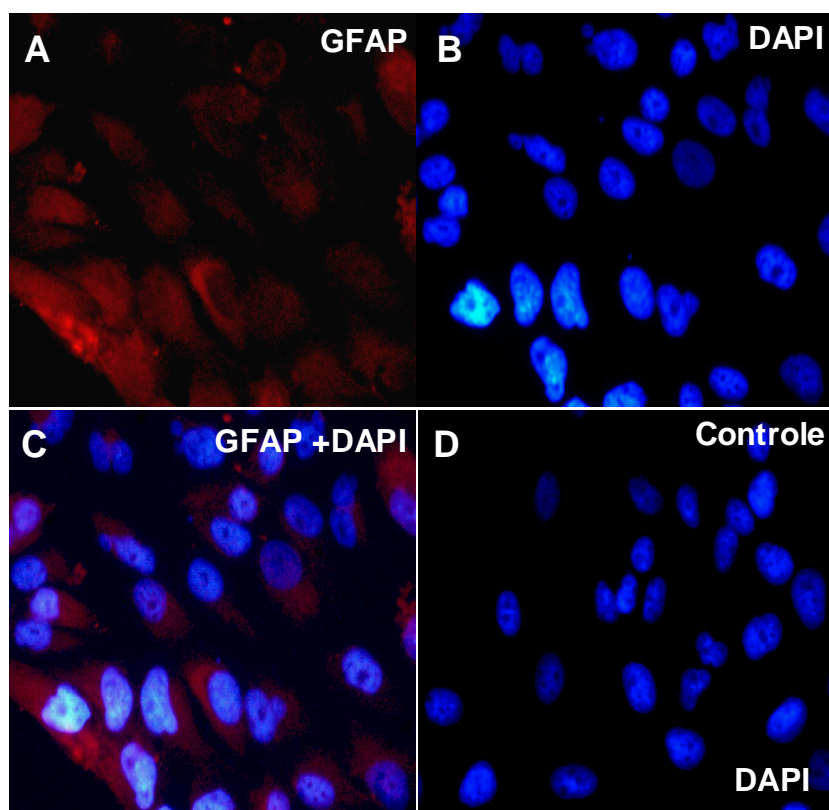


Figura 5.2. Células de Schwann da linhagem ST88-14 expressam proteína GFAP. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando marcação celular da proteína GFAP (A); imagem evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (B); (C) co-localização das imagens (A) e (B); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (D). O aumento das imagens é de aproximadamente 400x.

RESULTADOS

O fenótipo caracterizado das células de Schwann da linhagem ST88-14 respalda o uso desta linhagem celular como ferramenta em estudos. Contudo, embora estas células constituam um modelo de infecção para estudos sobre a interação entre o *M. leprae* e células de Schwann, a utilização de células não tumorais representa um avanço significativo no entendimento dessa interação.

5.1.2- Caracterização das células de Schwann primárias obtidas a partir de explantes de nervo ciático de rato e definição de seu uso em nossos estudos

A necessidade de utilização de um modelo de infecção *in vitro* mais próximo à situação *in vivo* para o estudo da interação com o *M. leprae* levou-nos a estabelecer, em nosso laboratório, culturas primárias de células de Schwann a partir de explantes de nervo ciático de ratos (**Figura 5.3**).

Essas células foram caracterizadas como células de Schwann pela imunomarcagem positiva para a proteína S-100 (**Figura 5.4**).

Embora este método de obtenção de células de Schwann primárias tenha sido estabelecido eficazmente no nosso laboratório, não proporcionou rendimento satisfatório e, portanto, não o empregamos na realização dos estudos propostos.

RESULTADOS

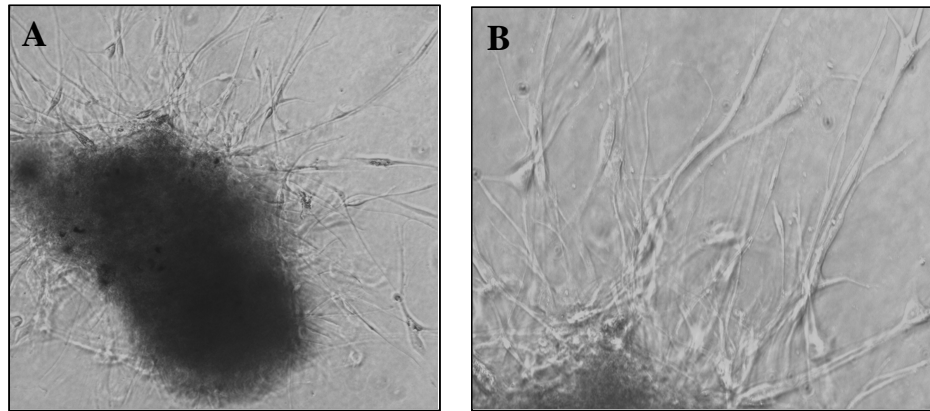


Figura 5.3. Cultura de células de Schwann primárias obtidas a partir de explante de nervo ciático de rato. Imagem do explante do nervo em menor aumento (aproximadamente 40x) (A); imagem em maior aumento (aproximadamente 200x) destacando as células de Schwann crescidas a partir do explante do nervo (B). Contraste de fase.

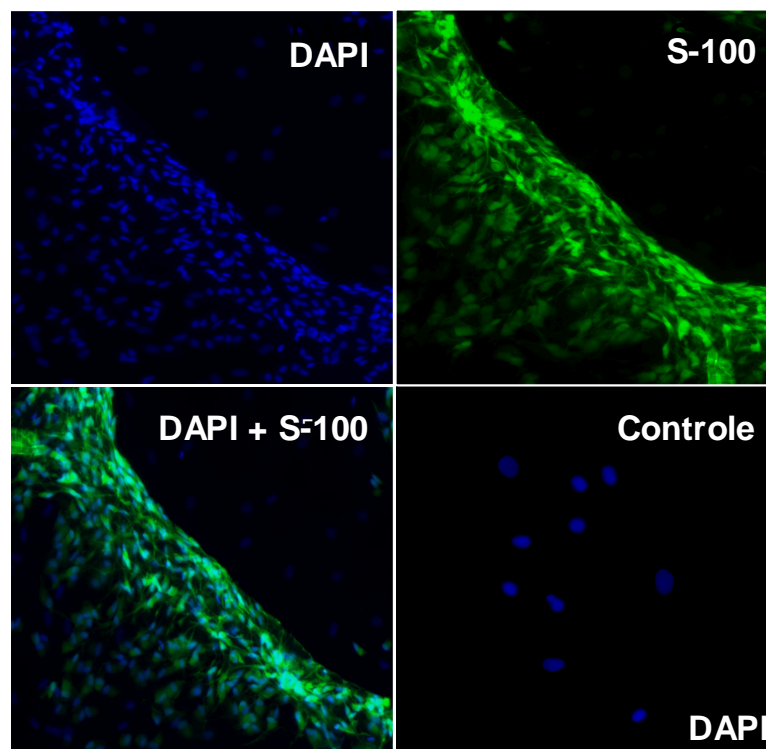


Figura 5.4. Células de Schwann primárias obtidas a partir de explante de nervo ciático de rato expressam a proteína S-100. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando núcleos celulares corados com DAPI (A); imagem evidenciando a marcação celular da proteína S-100 (B); (C) co-localização das imagens (A) e (B); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (D). O aumento das imagens é de aproximadamente 200x.

5.1.3 – Caracterização fenotípica das células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação de nervo ciático de rato

Um outro método de obtenção de culturas de células de Schwann primárias de rato foi estabelecido em nosso laboratório. Esse método constitui-se da obtenção de culturas de células de Schwann primárias a partir da dissociação enzimática de nervo ciático de rato. As células de Schwann obtidas por este método foram caracterizadas como tais por apresentarem imunomarcação positiva para proteína S-100 (**Figura 5.5**). Estas células apresentaram também imunomarcação positiva para a proteína GFAP, proteínas que caracterizam estas como células de Schwann não mielinizante (**Figura 5.6**).

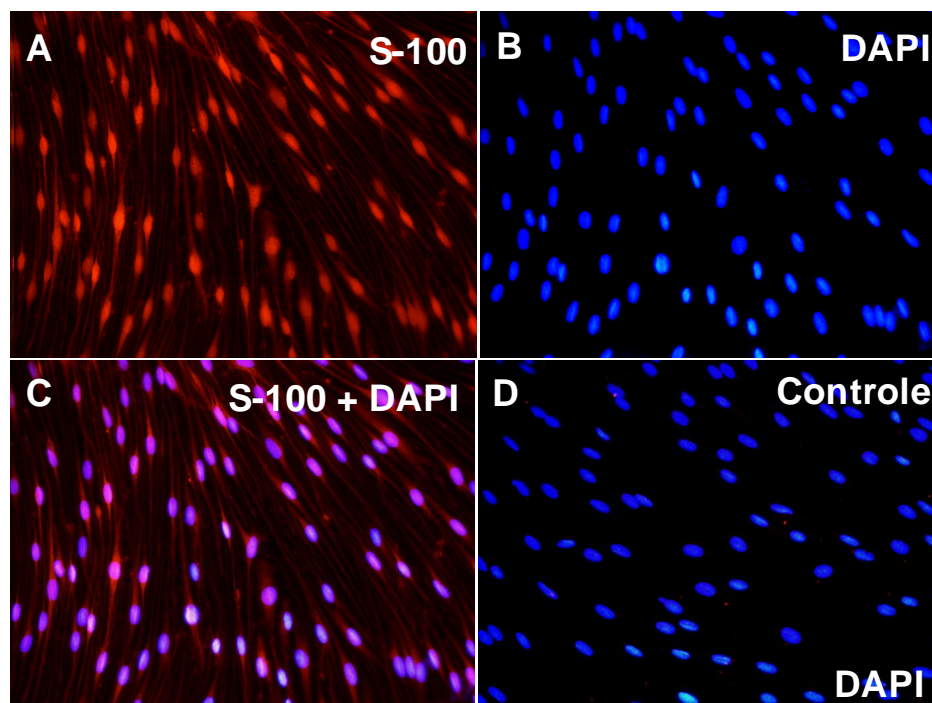


Figura 5.5. Células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação enzimática de nervo ciático de rato expressam proteína S-100. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando a marcação celular da proteína S-100 (**A**); imagem evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (**B**); (**C**) co-localização das imagens (**A**) e (**B**); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (**D**). O aumento das imagens é de aproximadamente 200x.

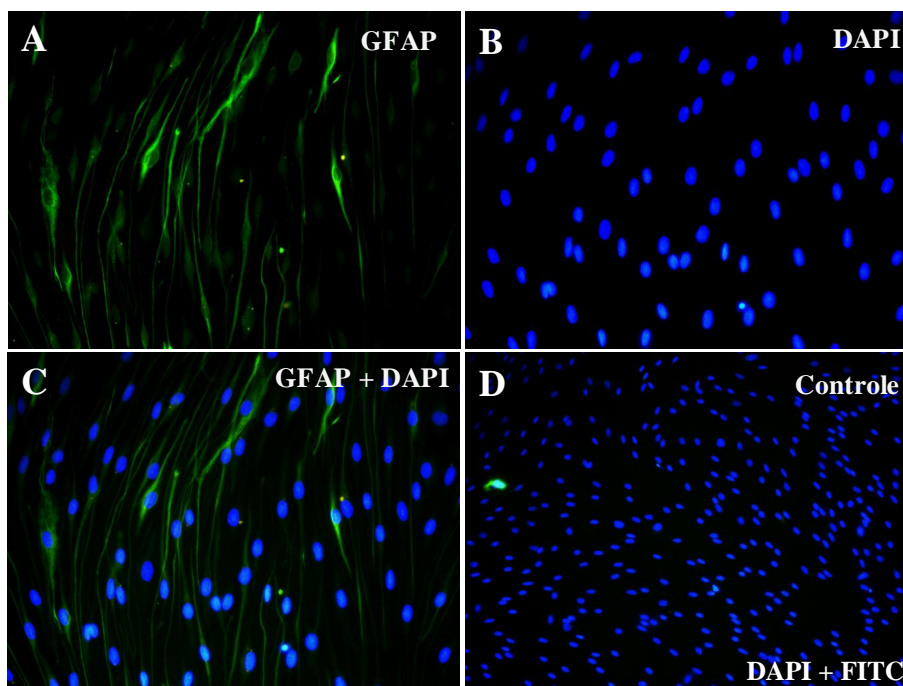


Figura 5.6. Células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação enzimática de nervo ciático de rato expressam proteína GFAP. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando a marcação celular da proteína GFAP (A); imagem evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (B); (C) co-localização das imagens (A) e (B). O aumento das imagens é de aproximadamente 200x. (D) imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração por DAPI. O aumento da imagem é de aproximadamente 40x.

A determinação do grau de pureza das células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação enzimática de nervo ciático de rato foi feita através de imunomarcção com anticorpo anti-S-100. Esta proteína é específica de células de Schwann neste tipo cultura e a determinação consistiu na contagem das células imunomarcadas positivamente para essa proteína em um total de 500 células, em campos aleatórios na lâmina analisada, em dois experimentos (não mostrados). Foi determinado, então, que as culturas de células de Schwann primárias de rato apresentam grau de pureza acima de 95%, percentagem ótima para emprego destas em estudos. Este método também possibilita um bom rendimento no número de células obtidas para a realização de estudos.

5.1.4 - Caracterização fenotípica das células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação de nervo da cauda eqüina humana

Culturas primárias de células de Schwann obtidas a partir da dissociação de nervo da cauda eqüina humana foram estabelecidas no laboratório do Dr. Patrick Wood, Projeto Miami para a Cura da Paralisia - Universidade de Miami – Florida - EUA. Após preparação, as células (**Figura 5.7**) foram trazidas para o nosso laboratório e caracterizadas.

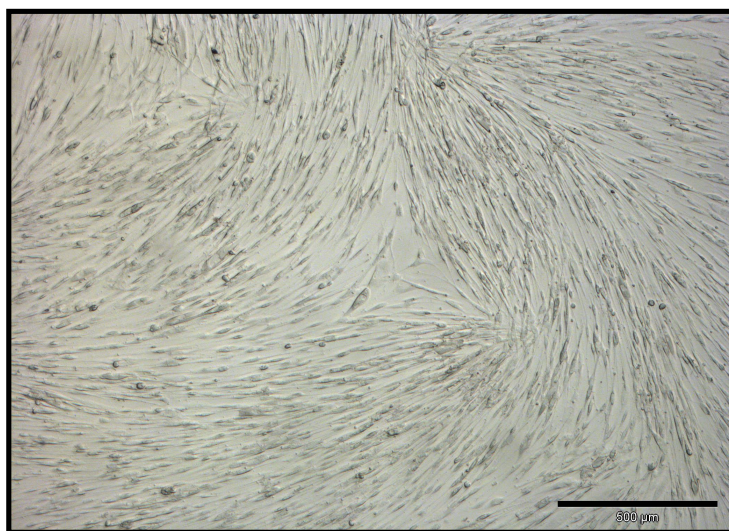


Figura 5.7. Cultura de células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação de nervo da cauda eqüina humana. Microscópio invertido – campo claro. O aumento da imagem é de aproximadamente 40x.

As células foram caracterizadas como células de Schwann por apresentarem imunomarcção positiva para a proteína S-100 (**Figura 5.8**). Estas células apresentaram também imunomarcção positiva para a proteína GFAP, proteína que as caracterizam como células de Schwann não mielinizante (**Figura 5.9**).

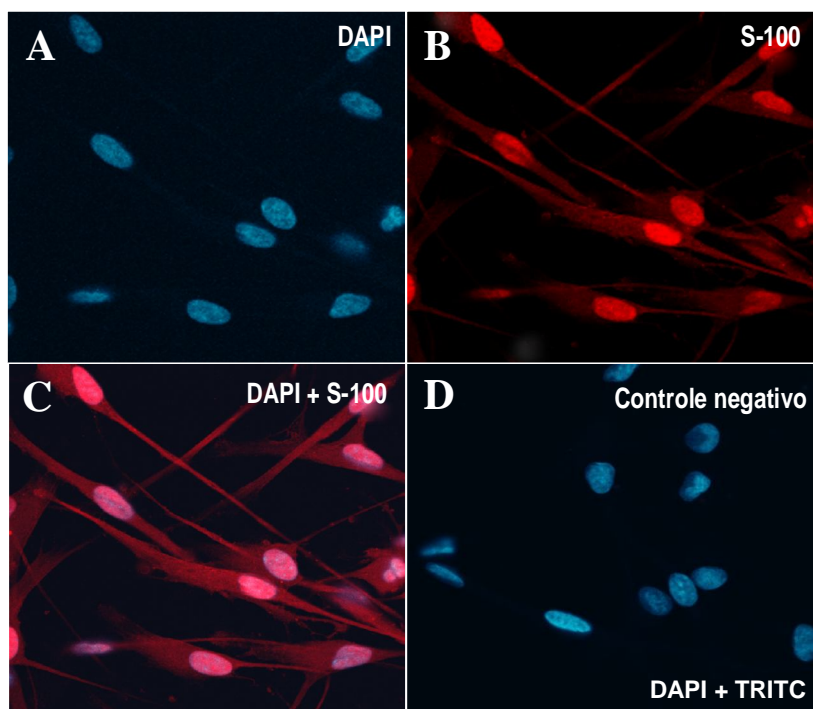


Figura 5.8. Células de Schwann primárias humanas expressam proteína S-100. Imagem de microscopia de fluorescência confocal evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (A); imagem evidenciando marcação celular da proteína S-100 (B); (C) co-localização das imagens (A) e (B); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (D). O aumento da imagem é de aproximadamente 400x.

Estas culturas apresentam grau de pureza acima de 95%, percentagem, como já mencionada, considerada ótima. A determinação do grau de pureza consistiu na contagem das células imunomarcadas positivamente para a proteína S-100 em um total de 500 núcleos marcados com DAPI, em campos aleatórios na lâmina analisada, em dois experimentos.

O fenótipo mostrado pelas células de Schwann humanas primárias validam o emprego destas células em estudos que visam o entendimento da patogenia na hanseníase, embora estas não expressem o fenótipo mielinizante pela ausência do contato com neurônios.

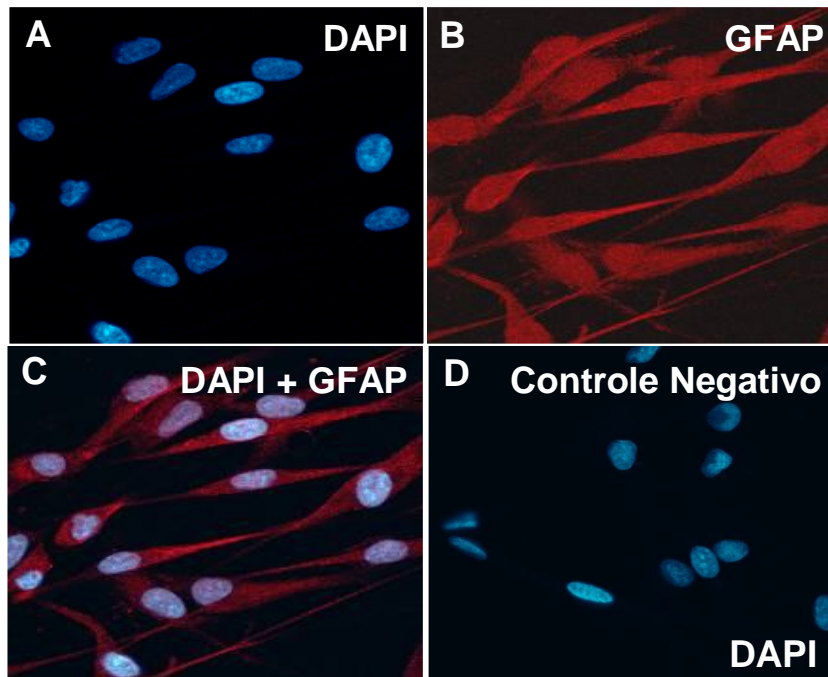


Figura 5.9. Células de Schwann primárias humanas expressam a proteína GFAP. Imagem de microscopia de fluorescência confocal evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (A); imagem evidenciando a marcação celular da proteína GFAP (B); (C) co-localização das imagens (A) e (B); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração por DAPI (D). O aumento da imagem é de aproximadamente 400x.

5.2- Análise da interação do *M. leprae* com a célula de Schwann da linhagem ST88-14 através de microscopia eletrônica de varredura

Células de Schwann humanas da linhagem ST88-14 mantidas por 24 horas *in vitro*, analisadas por microscopia eletrônica de varredura, formam uma monocamada e morfológicamente apresentam uma típica forma fusiforme, com inúmeros filopódios na sua superfície (Figuras 5.10A e B). Essas culturas se caracterizam pelo contato célula-célula, via grandes áreas da membrana plasmática ou através de extensos prolongamentos da membrana celular (filopódios) que estabelecem pontos de adesão focal com células vizinhas e com o substrato (Figuras 5.10B e C).

RESULTADOS

Culturas tratadas por 2 horas com *M. leprae* letalmente irradiado mostraram uma variação no número de bactérias aderidas em cada célula e esse evento foi tempo dependente. Algumas células apresentam 1 (**Figuras 5.11A**), 2 (**Figuras 5.11B**) ou mais de 3 (**Figuras 5.11C**) bactérias aderidas, isoladas ou em grupos de 2 - 4 à sua superfície (**Figuras 5.11C**). A adesão das bactérias às células de Schwann ocorreu por mecanismos distintos: (i) envolvimento de filopódios em torno das bactérias (**Figuras 5.11D**); (ii) sem a participação de filopódios, observando-se as bactérias em contato direto com a superfície da célula hospedeira (**Figuras 5.11E**) ou (iii) ambos os processos (**Figuras 5.11F**).

A análise ultraestrutural da interação *M. leprae* - células de Schwann, durante as 24 horas, mostrou bactérias ainda aderidas em contato estreito com a membrana da célula hospedeira, envolvidas ou não por filopódios (**Figura 5.12A**). Nesse período de interação foi comum observar imagens de bactérias em processo de invasão celular, como demonstrado pela depressão da membrana da célula de Schwann (**Figuras 5.12B e C**) ou ainda, bactérias fortemente envolvidas pelos filopódios (**Figura 5.12C**). Na **Figura 5.12D** é possível verificar que a bactéria está parcialmente no interior da célula hospedeira (**Figura 5.12D e 5.12D'**).

Associado aos estudos morfológicos por microscopia eletrônica de varredura, foi quantificada a adesão do *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann da linhagem ST88-14. Foi observado que a percentagem de bactérias aderidas foi de 50% em 2 horas e que esta percentagem foi reduzida para 28,3% após 24 horas de incubação, devida à interiorização das bactérias (**Figura 5.13**).

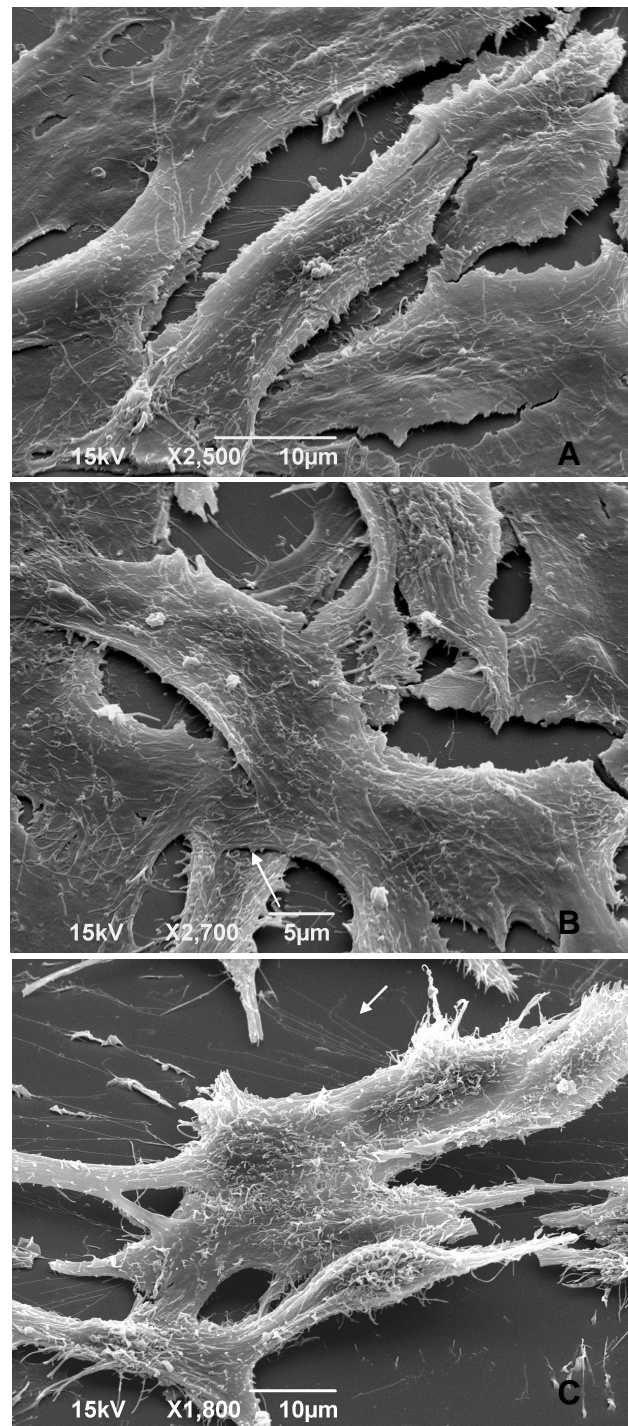
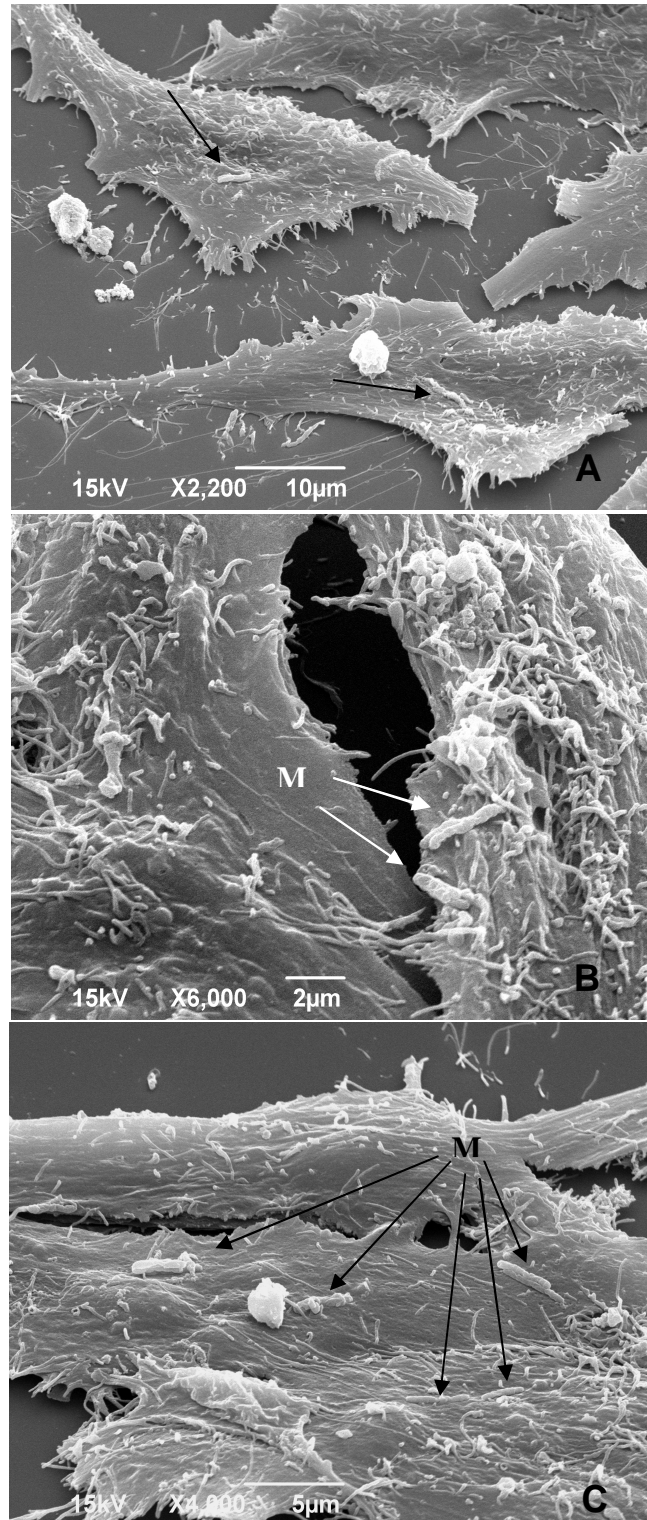


Figura 5.10. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de culturas de células de Schwann da linhagem ST88-14 sem tratamento com *M. leprae*. Células de Schwann da linhagem ST88-14 formam monocamada e apresentam forma fusiforme com inúmeros filopódios na sua superfície (A e B). Contato célula - célula (B e C) – indicados por setas.

RESULTADOS



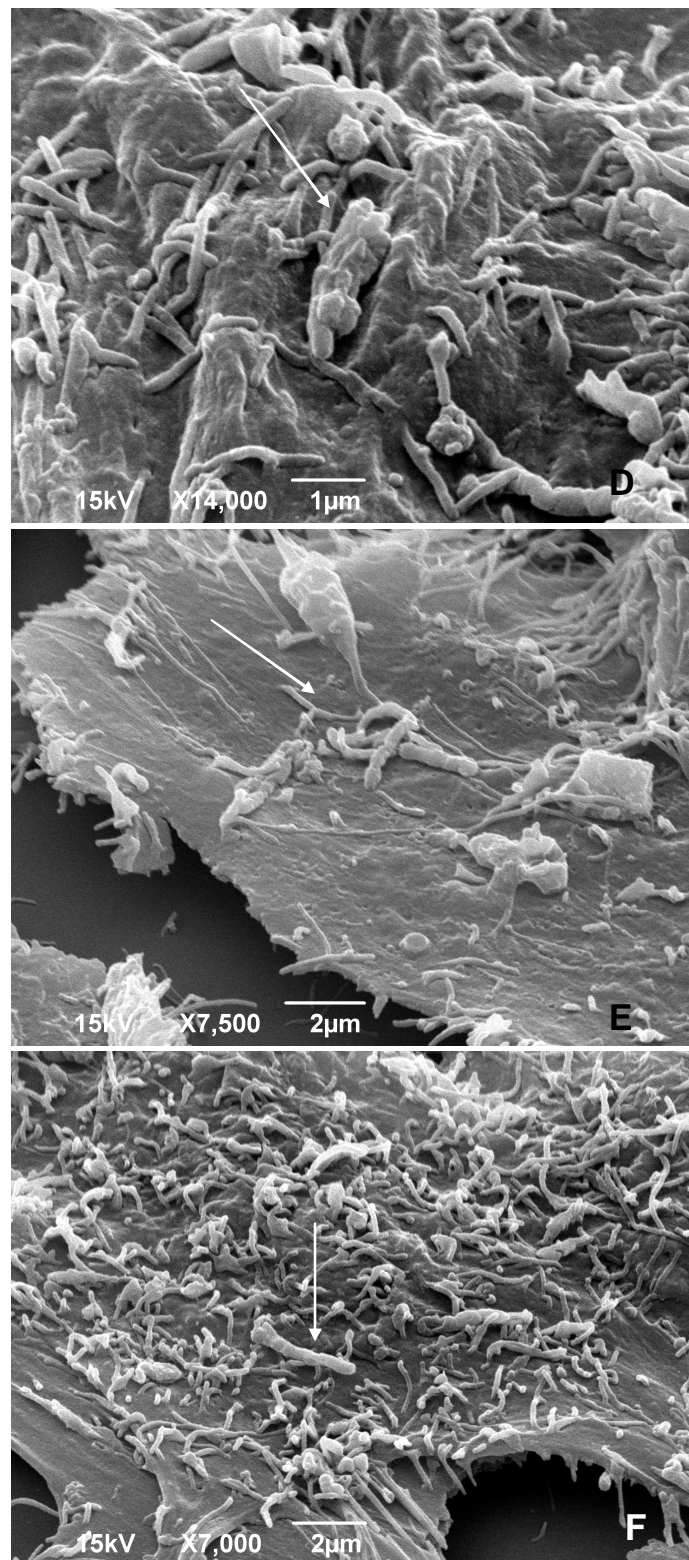
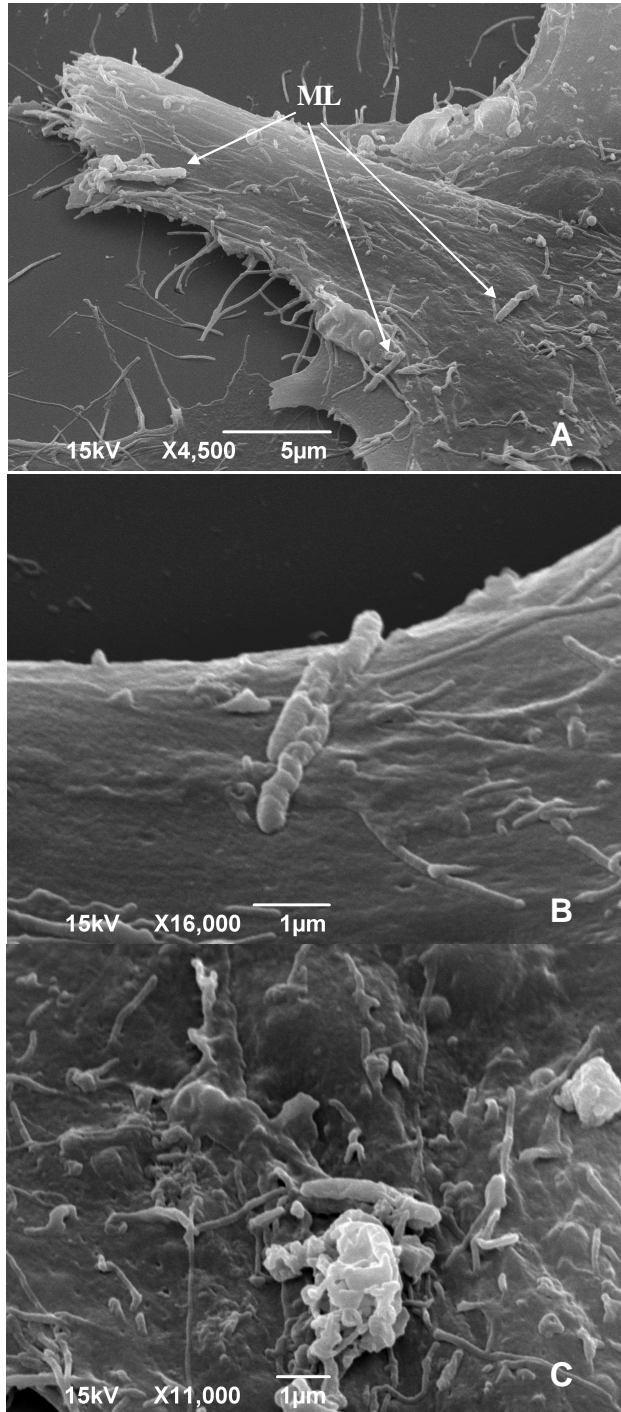


Figura 5.11. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de culturas de células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas por 2 horas com *M. leprae* letalmente irradiados, proporção bactéria: célula 10:1. Cultura tratada com *M. leprae* letalmente irradiado mostrou uma variação no número de bactérias aderidas em cada célula, evento tempo dependente.

RESULTADOS

Células apresentando 1(A), 2 (B) ou mais de 3 (C) bactérias aderidas, isoladas ou em grupos de 2 - 4 à sua superfície (C). A adesão se deu: (i) por envolvimento de filopódios em torno das bactérias (D); (ii) sem a participação de filopódios, observando-se as bactérias em contato direto com a superfície da célula hospedeira (E) ou (iii) por ambos os processos (F).



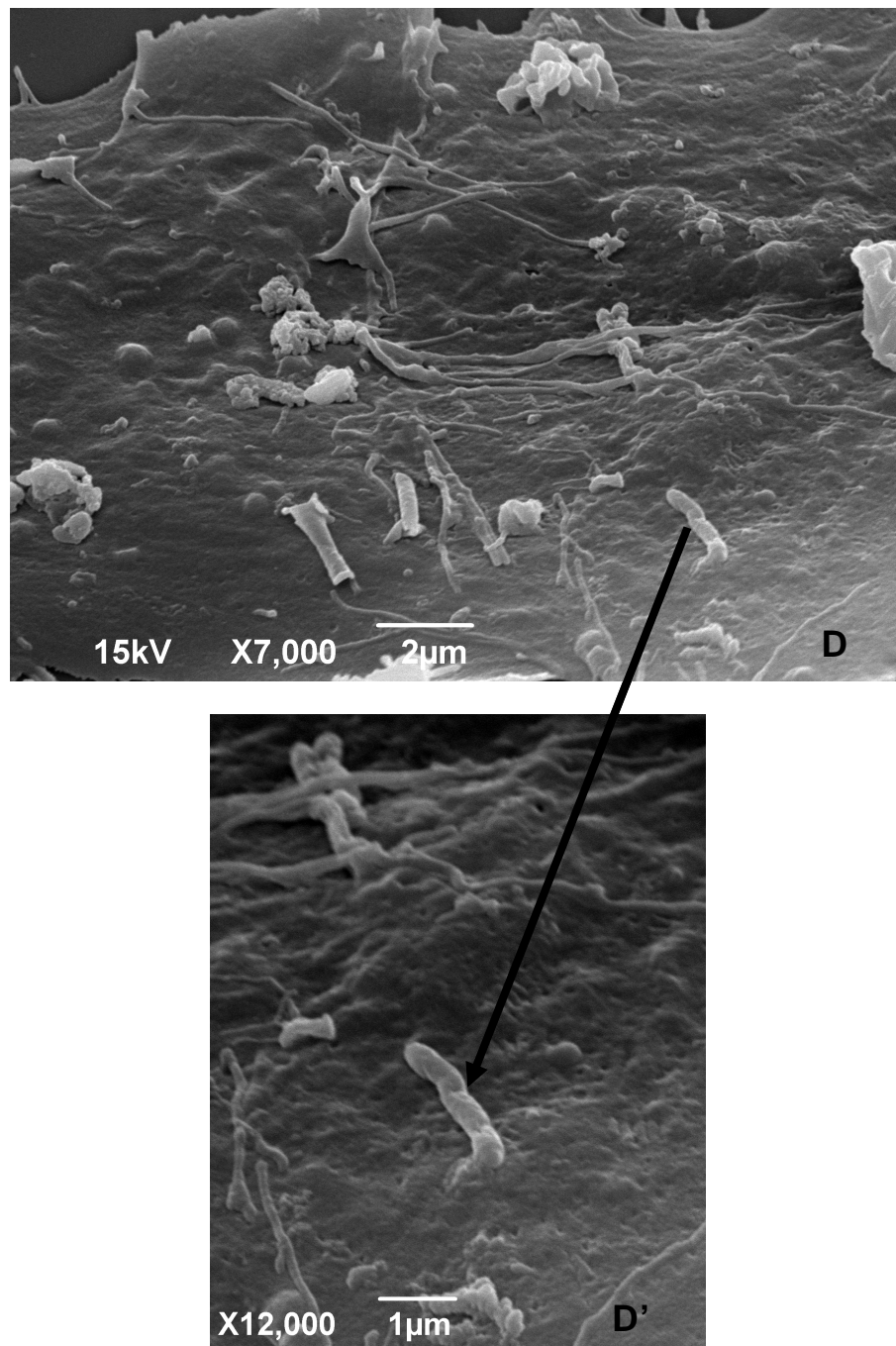


Figura 5.12. Micrografias de microscopia eletrônica de varredura de culturas de células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas por 24 horas com *M. leprae* letalmente irradiados, proporção bactéria: célula 10:1. Cultura tratadas por 24 horas com *M. leprae* letalmente irradiado mostrou bactérias ainda aderidas em contato estreito com a membrana da célula hospedeira envolvidas ou não por filopódios (A). Bactérias em processo de entrada na célula, demonstrado pela depressão local da membrana da célula de Schwann (B e C) ou envolvida fortemente por filopódios (C). Parte do corpo da bactéria no interior da célula hospedeira (D e D').

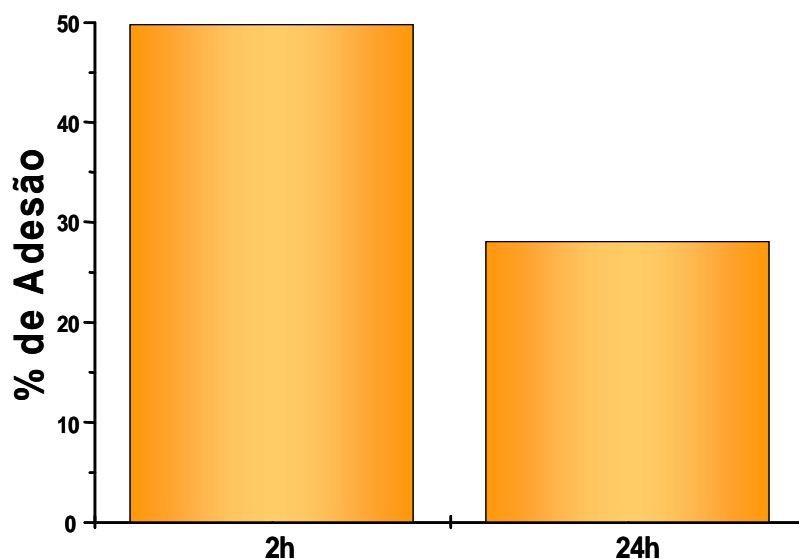


Figura 5.13. Cinética de adesão do *M. leprae* letalmente irradiados às células de Schwann da linhagem ST88-14. A análise da cinética de adesão do *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann da linhagem ST88-14 foi realizada ao microscópio eletrônico de varredura através da determinação da porcentagem de células com bactérias aderidas, em um total de 50 células, proporção bactéria: célula 10:1.

5.3- Cinética de associação do *M. leprae* às células de Schwann

Para estudos que buscam entender a patogenia, ao nível molecular, de uma doença causada por um microrganismo, faz-se necessário também quantificar a interação do microrganismo à célula hospedeira ao longo de um período de tempo, através de uma cinética de associação. Para isso determinamos a porcentagem de associação do *M. leprae* às diferentes células de Schwann preparadas neste estudo. Esta foi feita através de microscopia de fluorescência (**Figura 5.14**), utilizando bactérias letalmente irradiadas previamente marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou bactérias viáveis marcadas com PKH 26. Como esta técnica não permite a distinção entre bactérias aderidas e internalizadas, passamos a adotar a terminologia “bactérias associadas” para nos referirmos ao conjunto de bactérias aderidas e internalizadas.

RESULTADOS

Os resultados obtidos mostram que tanto as células de Schwann da linhagem ST88-14, quanto as células de Schwann primárias de rato e humanas cultivadas *in vitro* são infectadas pelo *M. leprae* e podem ser empregadas em estudos experimentais que visam entender a patogenia observada na hanseníase.

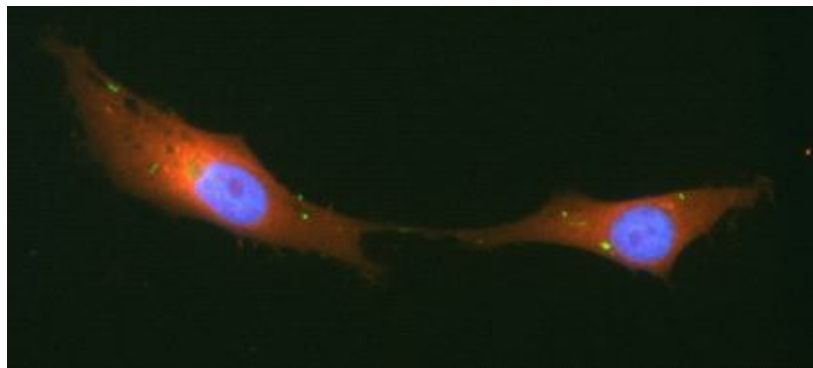


Figura 5.14. Células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae*. Imagem de microscopia de fluorescência convencional mostrando *M. leprae* letalmente irradiados marcados previamente com FITC (verde), na proporção bactéria: célula 10:1, associados por 2 horas às células de Schwann da linhagem ST88-14 coradas com brometo de etídio (cor vermelho-alaranjado) e núcleos celulares corados com DAPI (azul). O aumento da imagem é de aproximadamente 600x.

5.3.1 - Cinética de associação do *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann da linhagem ST88-14

A associação do *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann da linhagem ST88-14 (**Figura 5.15**) foi analisada através de uma cinética temporal onde se observou que em 2 horas de incubação já se obtém o máximo de associação $43,5 \pm 1,73\%$ e ausência de um incremento significativo na percentagem de associação em tempos de até 24 horas de interação.

Os resultados desses experimentos corroboram com os resultados de percentagem de adesão obtidos por microscopia eletrônica de varredura.

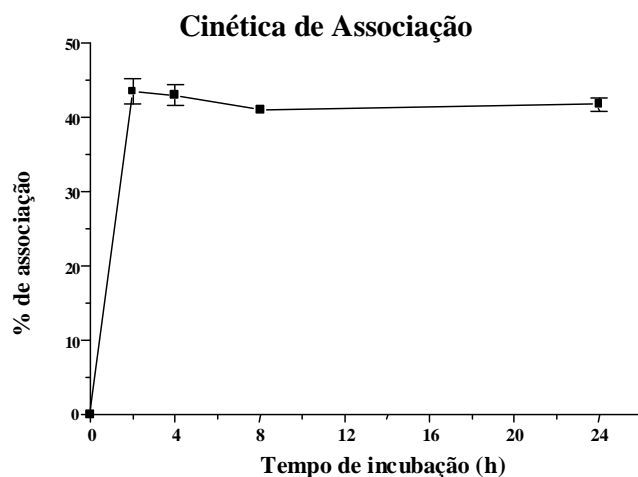


Figura 5.15. Cinética de associação do *M. leprae* às células de Schwann da linhagem ST88-14. A associação do *M. leprae* letalmente irradiado, marcado previamente com FITC, com as células de Schwann da linhagem ST88-14, na proporção bactéria:célula 10:1, durante 2, 4, 8 e 24 horas, foi analisada ao microscópio de fluorescência convencional, onde a percentagem de células associadas a uma ou mais bactérias (% de associação), em um total de 200 células, foi determinada. Os resultados representam a média \pm erro padrão de dois experimentos realizados em duplicata.

5.3.2 - Cinética de associação do *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann primárias de rato

Experimentos mostram que células de Schwann primárias de rato são passíveis de interação com o *M. leprae* letalmente irradiado e a cinética de associação mostra que em 2 horas de incubação, mais de 20% das células estão associadas a pelo menos uma bactéria na relação bactéria:célula de 10:1, enquanto que 50% das células só são infectadas após 4 horas de infecção na mesma relação (**Figura 5.16A**). Quando a relação bactéria: célula é elevada para de 50:1 mais de 50% das células estão associadas a pelo menos um bactéria em 2 horas de incubação (**Figura 5.16B**).

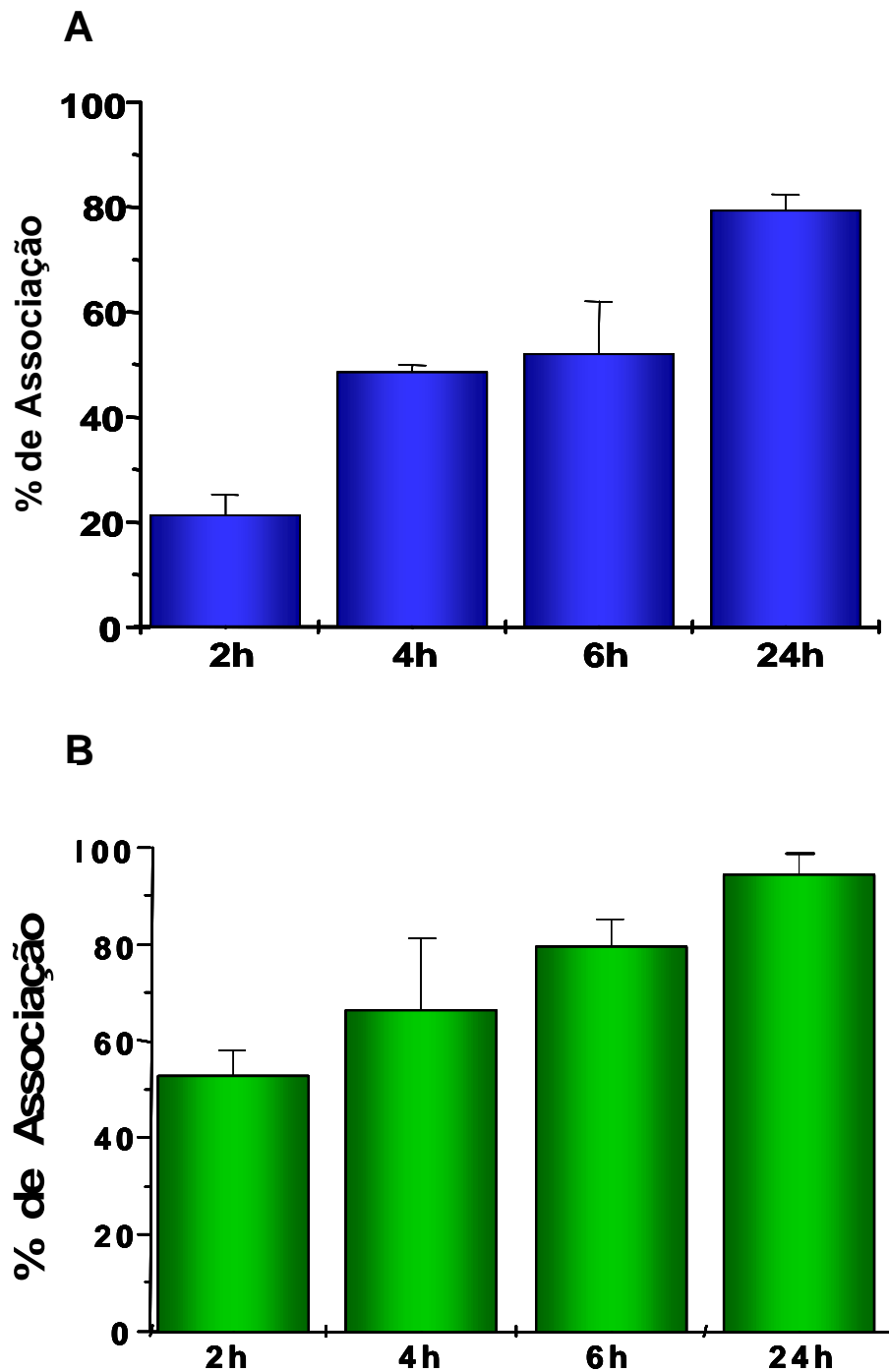


Figura 5.16. Cinética de associação do *M. leprae* às células de Schwann primárias de rato. A associação do *M. leprae* letalmente irradiado marcado previamente com FITC com as células de Schwann primárias de rato, na proporção bactéria:célula 10:1 (A) e 50:1 (B), durante 2, 4, 6 e 24 horas, foi analisada ao microscópio de fluorescência convencional, onde a percentagem de células associadas a uma ou mais bactérias (% de associação) em um total de 300 células, foi determinada. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um experimento realizado em duplicata.

RESULTADOS

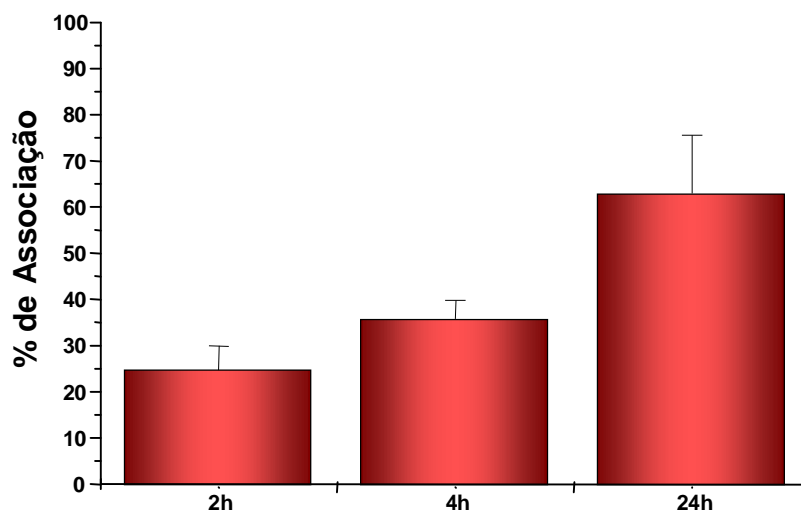
Observa-se que o *M. leprae* letalmente irradiado se associa às células de Schwann primárias de rato e que há um incremento significativo da associação deste a estas células nas duas relações bactéria: célula utilizadas, até o tempo de incubação de 24 horas.

5.3.3 - Cinética de associação do *M. leprae* vivo e letalmente irradiado às células de Schwann primárias humanas

Realizamos também experimentos para determinar se o *M. leprae* vivo ou letalmente irradiado são internalizados por células de Schwann primárias humanas. Os resultados mostraram que estas células internalizam *M. leprae* vivo e letalmente irradiado. Em 2h de incubação destas células com *M. leprae* vivo 25,42% \pm 5,14 das células possuem bactérias associadas e essa porcentagem aumentou consideravelmente para 63,58% \pm 12,66% com a incubação das células com as bactérias pelo tempo de 24 horas (**Figura 5.17A**).

A cinética temporal de associação do *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann humanas primárias mostrou que em 2 horas de incubação se obtém uma porcentagem de associação de 51% \pm 7,77 e essa porcentagem aumentou para 85,25% \pm 4,49 com o tempo de incubação de 24 horas (**Figura 5.17B**). Esses experimentos foram realizados com a relação bactéria-célula de 50:1. A maior associação de *M. leprae* letalmente irradiado às células de Schwann humanas primárias em comparação com o bacilo vivo observado nestes experimentos será futuramente confirmada através da repetição destes ensaios.

A



B

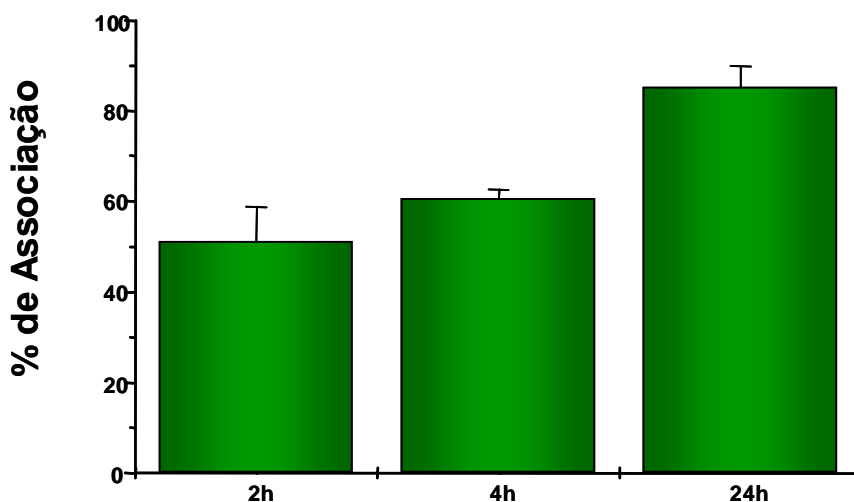


Figura 5.17. Cinética de associação do *M. leprae* às células de Schwann humanas primárias. A associação do *M. leprae* letalmente irradiado marcado previamente com PKH (bactéria viva) **(A)** ou FITC (letalmente irradiada) **(B)** com as células de Schwann humanas primárias, na proporção bactéria:célula 50:1, por 2, 4, e 24 horas, foi analisada ao microscópio de fluorescência convencional, onde a percentagem de células associadas a uma ou mais bactérias (% de associação) em um total de 200 células, foi determinada. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de um experimento realizado em duplicata.

5.4- Efeito do *M. leprae* sobre a expressão de moléculas potencialmente relevantes na manutenção da homeostasia do nervo periférico

Sabe-se que a lesão neural na hanseníase é decorrente da capacidade do *M. leprae* infectar os nervos periféricos, alojando-se preferencialmente no interior de células de Schwann. Infelizmente pouco se sabe sobre o efeito desse patógeno na expressão de moléculas importantes na manutenção da homeostasia da fibra nervosa. Portanto, neste trabalho buscamos avaliar os efeitos do *M. leprae* sobre o metabolismo da célula de Schwann, determinando se a expressão das moléculas estudadas é afetada pela bactéria.

5.4.1 - O *M. leprae* modula positivamente e altera o padrão de expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14

Buscando identificar moléculas da célula de Schwann moduladas pelo *M. leprae* potencialmente relacionadas à patogenia da hanseníase, investigamos a expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann ST88-14 tratadas com *M. leprae* letalmente irradiado.

Os resultados mostraram que o *M. leprae* é capaz de modular positivamente a expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14, embora uma elevação na carga bacilar não tenha causado efeito sobre esta modulação (**Figura 5.18**).

O curso temporal de infecção pelo *M. leprae* das células de Schwann da linhagem ST88-14 é capaz de modular o padrão de expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 nestas células (**Figura 5.19**). O padrão de expressão desse gangliosídeo em

RESULTADOS

células não infectadas (**Figura 5.19A**) ou em tempos precoces de associação (**Figura 5.19B**) é difuso, enquanto que em tempos tardios (**Figura 5.19C a E**) este padrão torna-se pontual em algumas células imunomarcadas positivamente para esta molécula. Uma análise bi e tridimensional por microscopia confocal (**Figura 5.20**) mostram que a marcação positiva para este gangliosídeo ocorre ao longo de toda a célula.

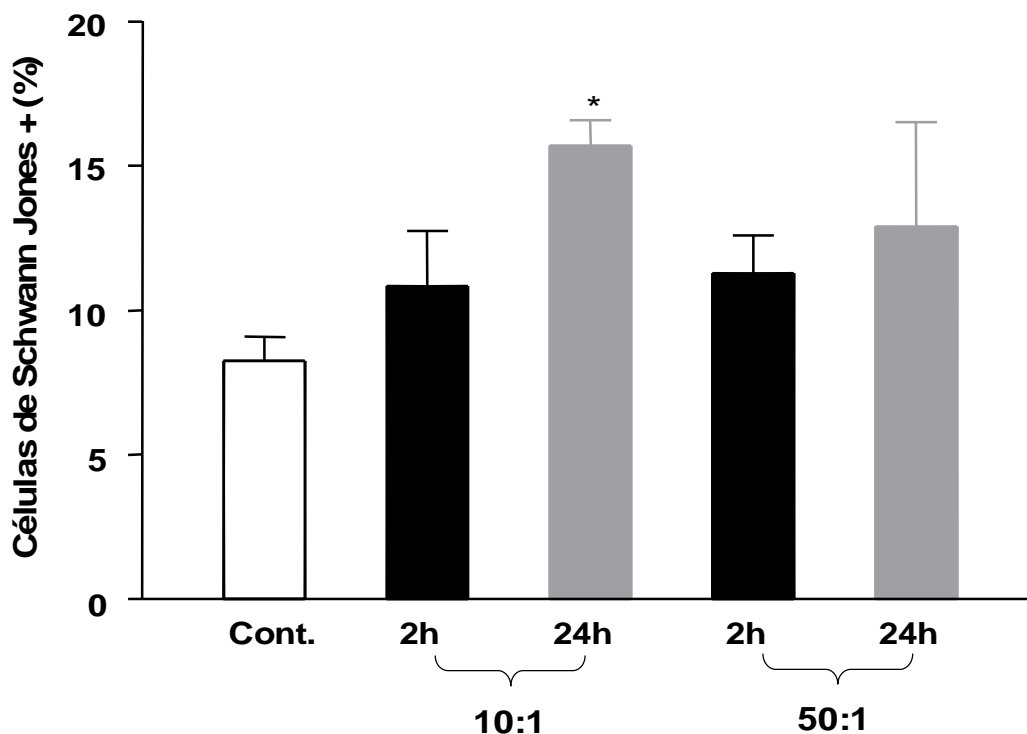


Figura 5.18. Expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae*. Células de Schwann da linhagem ST88-14 foram tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado, na proporção bactéria:célula 10:1 e 50:1 por 2 e 24 horas e marcadas com anticorpo anti-gangliosídeo 9-O-acetil GD3 (Jones+). Através de microscopia de fluorescência convencional o número de células totais e com imunomarcação positiva de 6 campos aleatórios foi quantificado. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 3 experimentos realizados em duplicata. Teste Kruskal Wallis Anova * $p < 0,05$.

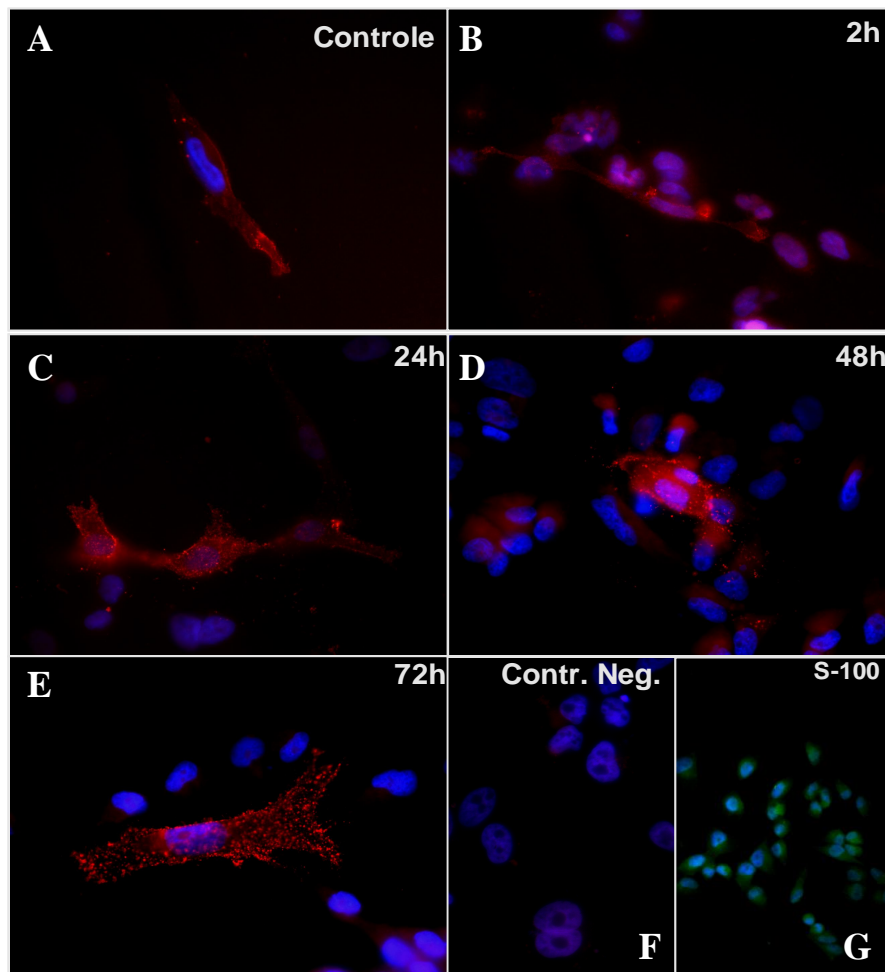


Figura 5.19. Padrão de expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae*. Imagens de microscopia de fluorescência convencional de células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado, marcado previamente com FITC, na proporção bactéria:célula 10:1 por 2 (B), 24 (C), 48 (D) e 72 horas (E). As imagens evidenciam núcleos celulares corados com DAPI (azul) e marcação celular do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 (Jones+) (vermelho); (F) imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI. O aumento das imagens é de aproximadamente 200x. (G) Célula de Schwann - marcação celular da proteína S-100 (verde) e núcleos corados com DAPI. O aumento da imagem é de aproximadamente 40x.

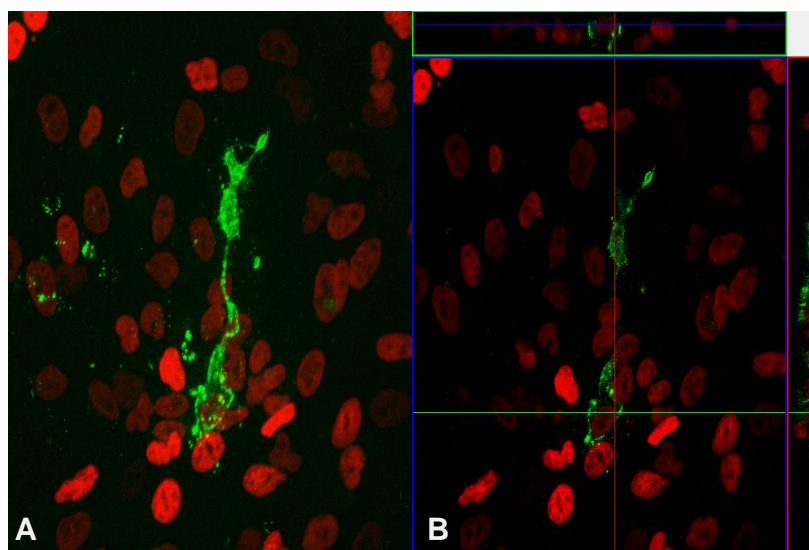


Figura 5.20. Análise da expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae*. Microscopia confocal de células de Schwann da linhagem ST88-14 com marcação para o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 (verde) após tratamento com *M. leprae* por 24h. Os núcleos celulares foram corados com TO-PRO™(vermelho). Reconstruções bi- (A) e tridimensionais (B). O aumento das imagens é de aproximadamente 400x.

5.4.2 - Expressão da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann tratadas com *M. leprae*

Devido ao importante papel da laminina-2, tanto na adesão do *M. leprae* à célula de Schwann, quanto na homeostase da fibra nervosa, resolvemos investigar a expressão de laminina em culturas de células de Schwann tratadas com *M. leprae* vivo e letalmente irradiado. Nossos resultados de imunocitoquímica mostraram que células de Schwann humana da linhagem ST88-14 expressam laminina-2 (**Figura 5.21**). Ensaio de RT-PCR quantitativo realizados com células de Schwann primárias humanas sugerem que o *M. leprae* vivo não é capaz de modular, de forma estatisticamente significativa, a expressão do RNAm da cadeia α -2 da laminina-2 desta, embora mostrando uma leve tendência a modular positivamente esses níveis (**Figura 5.22**). Já o *M. leprae* letalmente irradiado parece modular negativamente a sua

RESULTADOS

expressão nestas células em tempos tardios (**Figura 5.23**). Estes dados, contudo, precisam ser confirmados com a realização de um número adicional de ensaios.

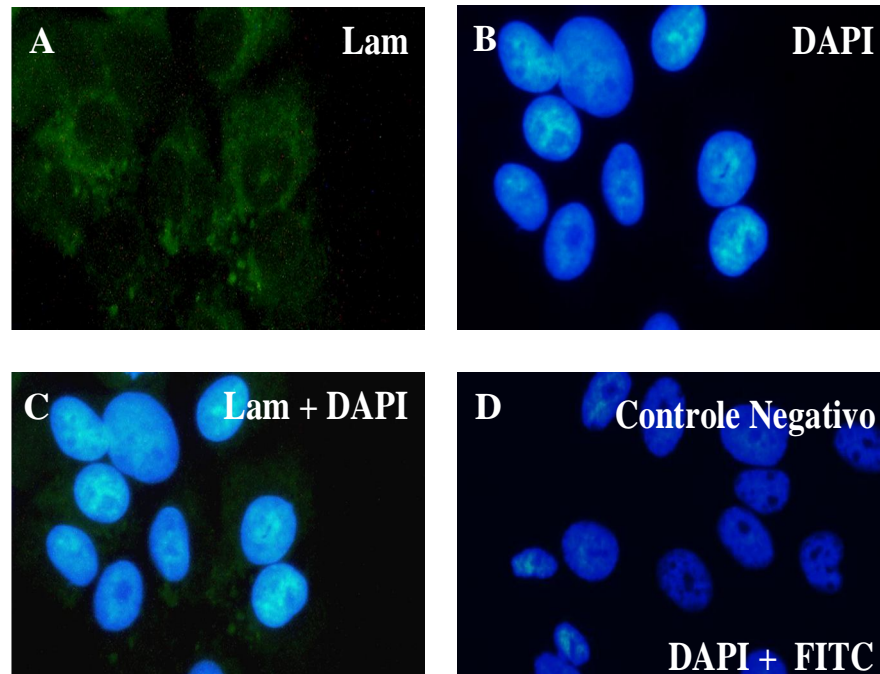


Figura 5.21. Células de Schwann da linhagem ST88-14 expressam laminina-2. Microscopia de fluorescência de células de Schwann da linhagem ST88-14. **(A)** imagem evidenciando marcação celular da proteína laminina-2; **(B)** imagem evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI; **(C)** co-localização das imagens **(A)** e **(B)**; **(D)** imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração por DAPI. O aumento das imagens é de aproximadamente 1.000x.

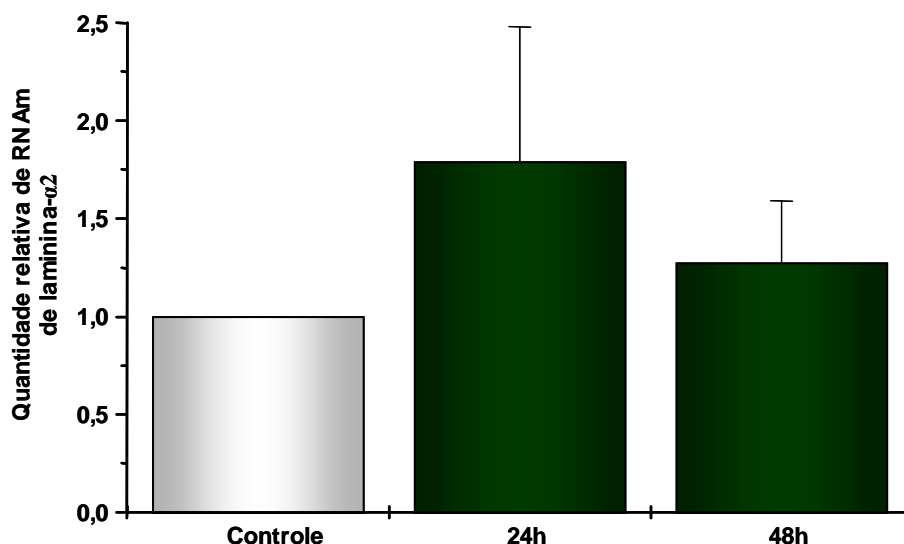


Figura 5.22. Efeito do *M. leprae* vivo sobre a expressão de RNAm da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann primárias humanas. Células de Schwann primárias humanas foram incubadas ou não com *M. leprae* vivo, na proporção bactéria:célula 50:1, por 24 e 48 horas. A quantificação do RNAm da cadeia α -2 da laminina-2 de cada condição foi determinada em relação ao controle (células não infectadas). Média \pm erro padrão de três experimentos realizados em duplicata.

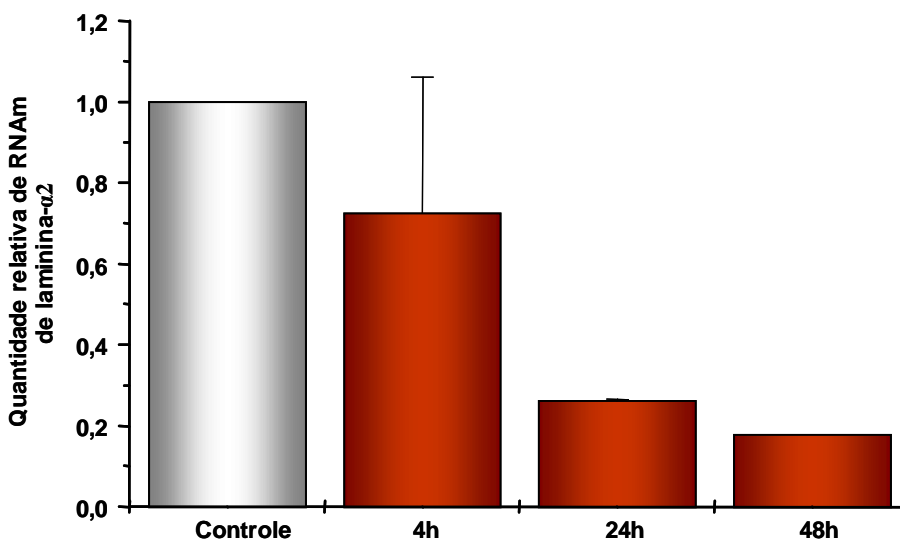


Figura 5.23. Efeito do *M. leprae* letalmente irradiado sobre a expressão de RNAm da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann primárias humanas. Células de Schwann primárias humanas foram incubadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado, na proporção bactéria:célula 50:1, por 4, 24 e 48 horas. A quantificação do RNAm da cadeia α -2 da laminina-2 de cada condição foi determinada em relação ao controle (células não infectadas). Média \pm erro padrão de dois experimentos realizados em duplicata.

RESULTADOS

Analisamos, então, a expressão protéica da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann da linhagem ST88-14 incubadas por 24 horas com *M. leprae* letalmente irradiado através do método de ELISA. Não foi observada modulação da proteína, tanto na relação bactéria: célula 10:1 quanto na 50:1 (**Figura 5.24**).

Analisamos também, através do método de ELISA, a expressão dessa proteína em células de Schwann primárias humanas infectadas com *M. leprae* letalmente irradiado, na relação bactéria: célula de 50:1 por 24, 48 e 72 horas e também não observamos modulação nestes tempos de associação (**Figura 5.25**).

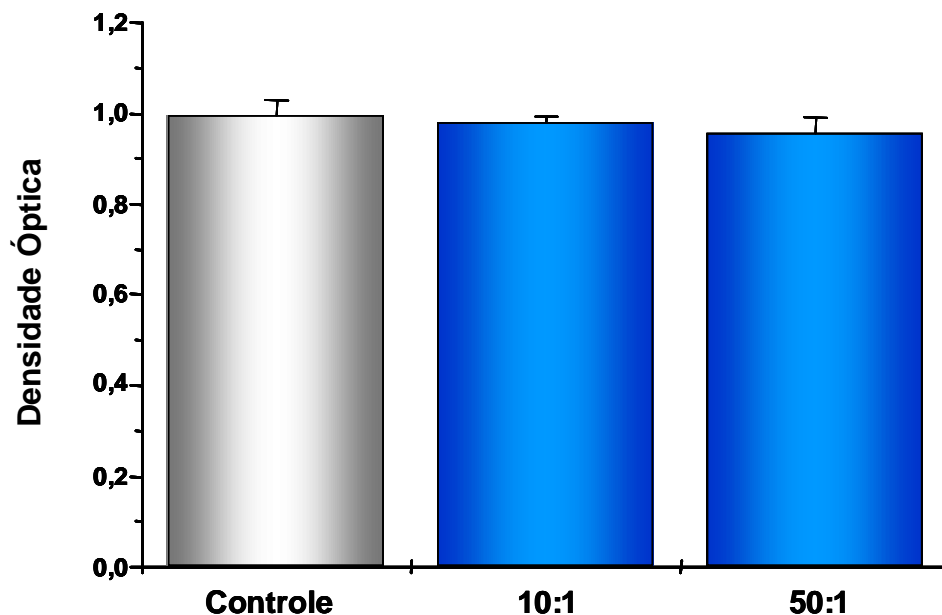


Figura 5.24. Análise por ELISA dos níveis protéicos da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann da linhagem ST88-14 tratadas com *M. leprae* letalmente irradiado. As células de Schwann foram tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado por 24 horas, na proporção bactéria:célula 10:1 e 50:1. Os dados mostram a média \pm desvio padrão das densidades ópticas de um experimento realizado em triplicata.

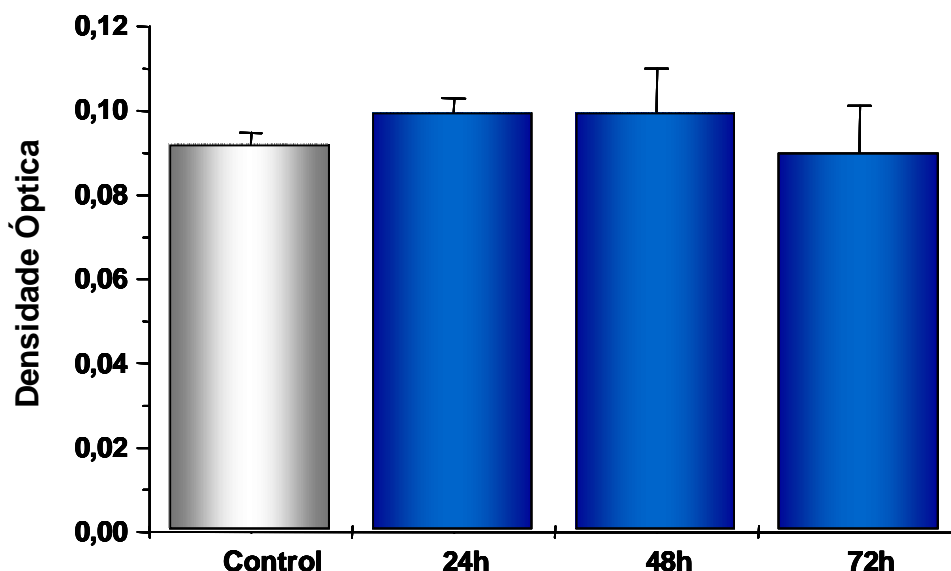


Figura 5.25. Análise por ELISA dos níveis protéicos da cadeia α -2 da laminina-2 em células de Schwann primárias humanas tratadas com *M. leprae* letalmente irradiado. As células de Schwann primárias humanas foram tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado, na proporção bactéria:célula 50:1, por 24, 48 e 72 horas. Os dados mostram a média \pm desvio padrão das densidades ópticas de um experimento realizado em duplicata.

5.4.3 - Expressão de distroglicana em células de Schwann tratadas com *M. leprae*

O complexo distroglicana constitui um dos receptores de laminina-2 presentes na membrana da célula de Schwann envolvidos na adesão desta com o *M. leprae* (Rambukkana *et al.*, 1998). Estudos mostram que deleção seletiva de distroglicana em células de Schwann resulta em mielinização anormal e prejuízos nas funções do nervo periférico (Saito *et al.*, 2003).

Com base nos dados acima e em outros citados na literatura, analisamos a expressão gênica de distroglicana por RT-PCR quantitativo em células de Schwann tratadas com *M. leprae* vivo ou letalmente irradiado.

Resultados de imunocitoquímica mostraram que células de Schwann humana da

linhagem ST88-14 expressam β -dístroglicana (**Figura 5.26**).

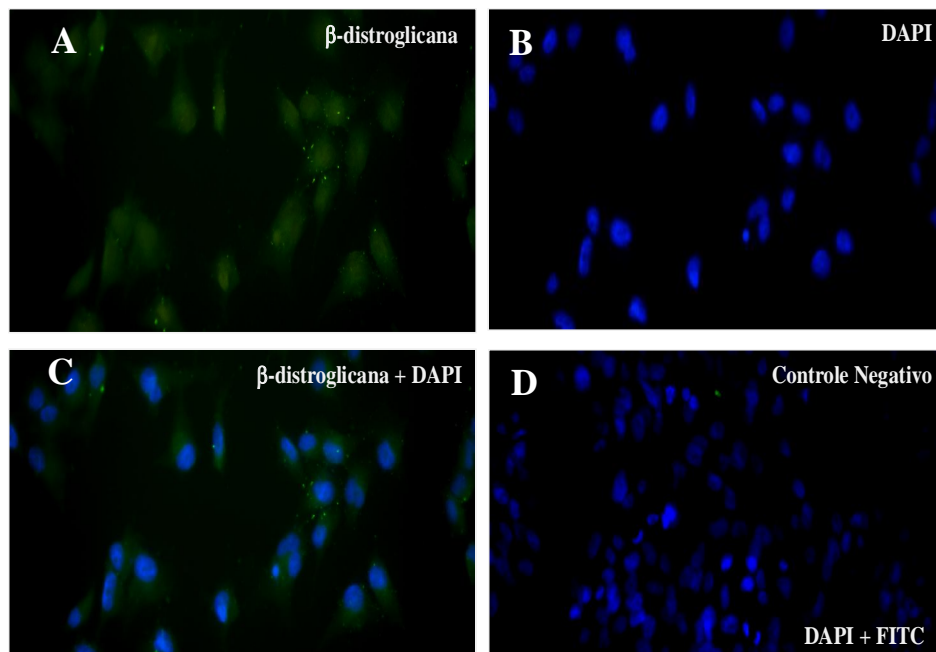


Figura 5.26. Células de Schwann – linhagem ST88-14 expressam a proteína β -dístroglicana. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando a marcação celular da proteína β -dístroglicana (**A**); imagem evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (**B**); (**C**) co-localização das imagens (**A**) e (**B**); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (**D**). O aumento das imagens é de aproximadamente 200x.

A expressão de β -dístroglicana em células de Schwann da linhagem ST88-14 foi confirmada por “western blot” (**Figura 5.27**).

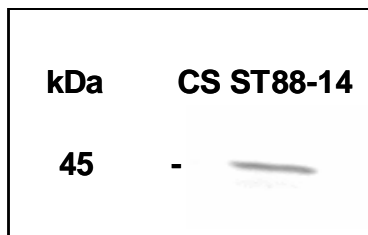


Figura 5.27. Expressão de β -dístroglicana em células de Schwann da linhagem ST88-14. “Western blot” de células de Schwann (CS) da linhagem ST 88-14.

RESULTADOS

Através de “western blot” também podemos observar que as células de Schwann primárias de rato expressam a proteína β -dístroglicana (**Figura 5.28**).

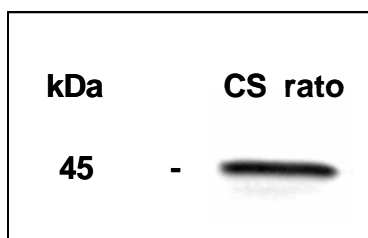


Figura 5.28. Expressão de β -dístroglicana em células de Schwann primárias de rato. “Western blot” de células de Schwann (CS) de rato.

Experimentos realizados mostram que células de Schwann primárias humanas expressam a proteína β -dístroglicana (**Figura 5.29**). A expressão de β -dístroglicana em células de Schwann primárias humanas foi confirmada por “western blot” (**Figura 5.30**).

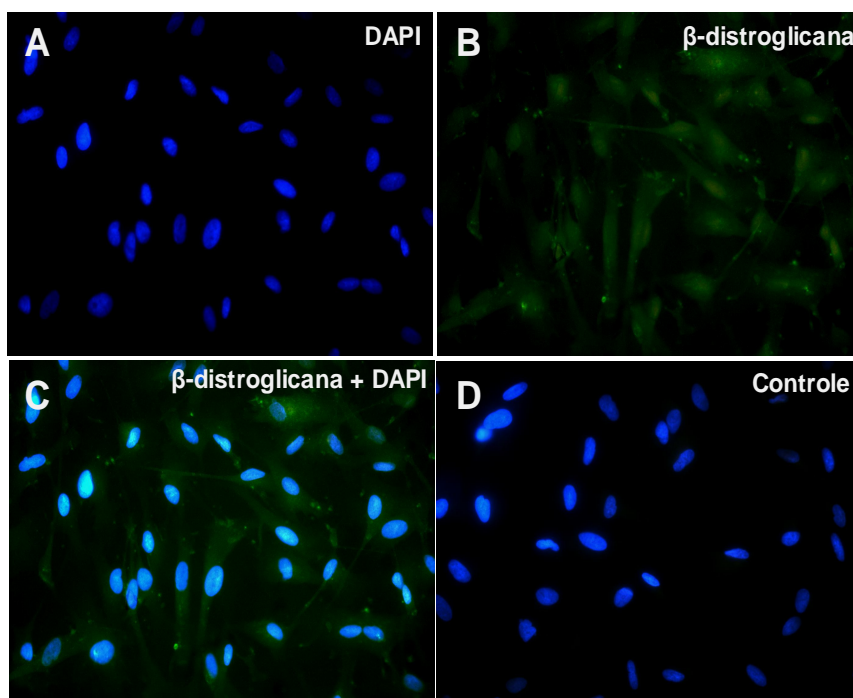


Figura 5.29. Células de Schwann primárias humanas expressam β -dístroglicana. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (**A**); imagem evidenciando a marcação celular da proteína β -dístroglicana (**B**); (**C**) co-localização das imagens (**A**) e (**B**); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (**D**). O aumento das imagens é de aproximadamente 200x.

RESULTADOS

Analisamos a expressão de RNAm de distroglicana em células de Schwann primárias humanas e os resultados mostram que o *M. leprae* vivo modula negativamente sua expressão, de forma estatisticamente significativa (**Figura 5.31**). Já o *M. leprae* letalmente irradiado, ao contrário, parece aumentar os níveis de RNAm já no tempo de 4 horas, voltando aos níveis observados no controle nos tempos de 24 e 48 horas (**Figura 5.32**). Esses dados, contudo, precisam ser confirmados através da realização de um número adicional de ensaios.

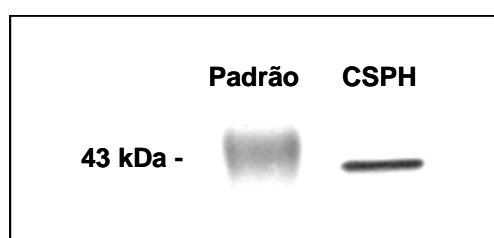


Figura 5.30. Expressão de β-distroglicana em células de Schwann humanas primárias. . “Western blot” de células de Schwann primárias humanas (CSPH).

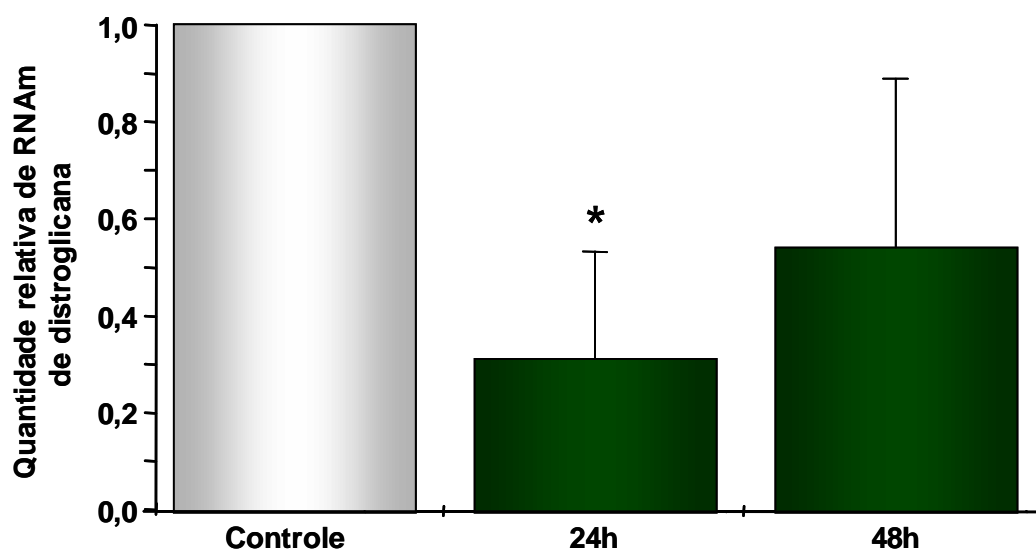


Figura 5.32. *M. leprae* vivo modula negativamente a expressão de RNAm de distroglicana em células de Schwann primárias humanas. Células de Schwann humanas primárias foram infectadas ou não com *M. leprae* vivo, na proporção bactéria:célula 50:1, por 24 e 48 horas. A quantificação do RNAm de distroglicana de cada condição foi determinada em relação ao controle (células não infectadas). Os dados mostram a média ± erro padrão de três experimentos realizados em duplicata. Teste Kruskal Wallis Anova * $p < 0,05$.

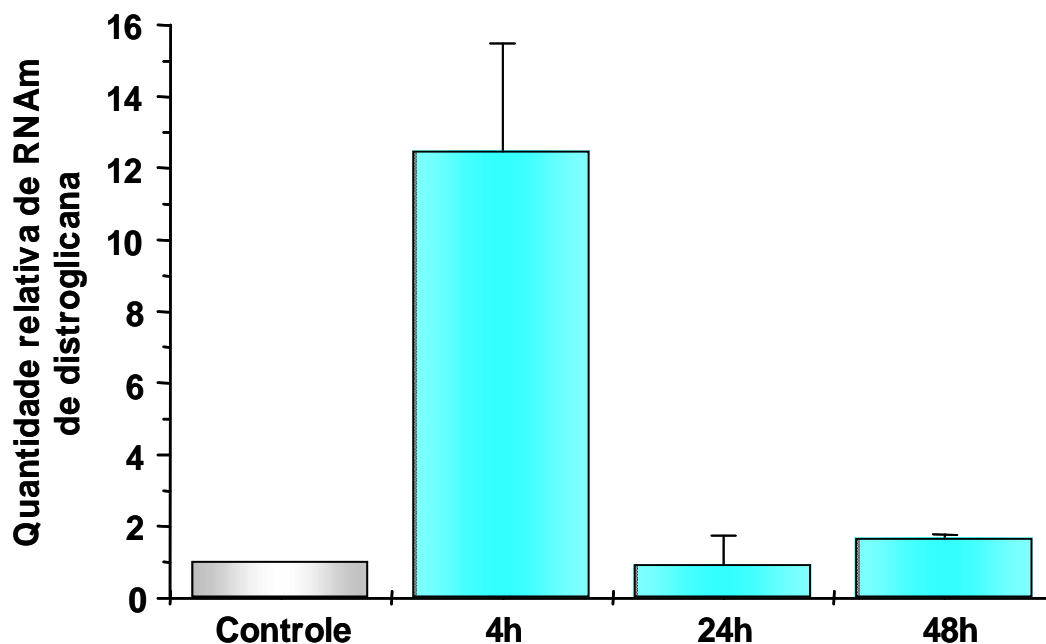


Figura 5.32. Efeito do *M. leprae* letalmente irradiado sobre a expressão de RNAm de distroglicana em células de Schwann primárias humanas. Células de Schwann humanas primárias foram tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado, na proporção bactéria: célula 50:1, por 4, 24 e 48 horas. A quantificação do RNAm de distroglicana de cada condição foi determinada em relação ao controle (células não tratadas). Os dados mostram a média \pm erro padrão de dois experimentos realizados em duplicata.

Analizamos então a expressão da proteína β -distroglicana em células de Schwann associadas com *M. leprae* letalmente irradiado, relação bactéria: célula 10:1 e 50:1 (**Figura 5.33**), mas não observamos modulação desta com 24 e 48 horas de infecção.

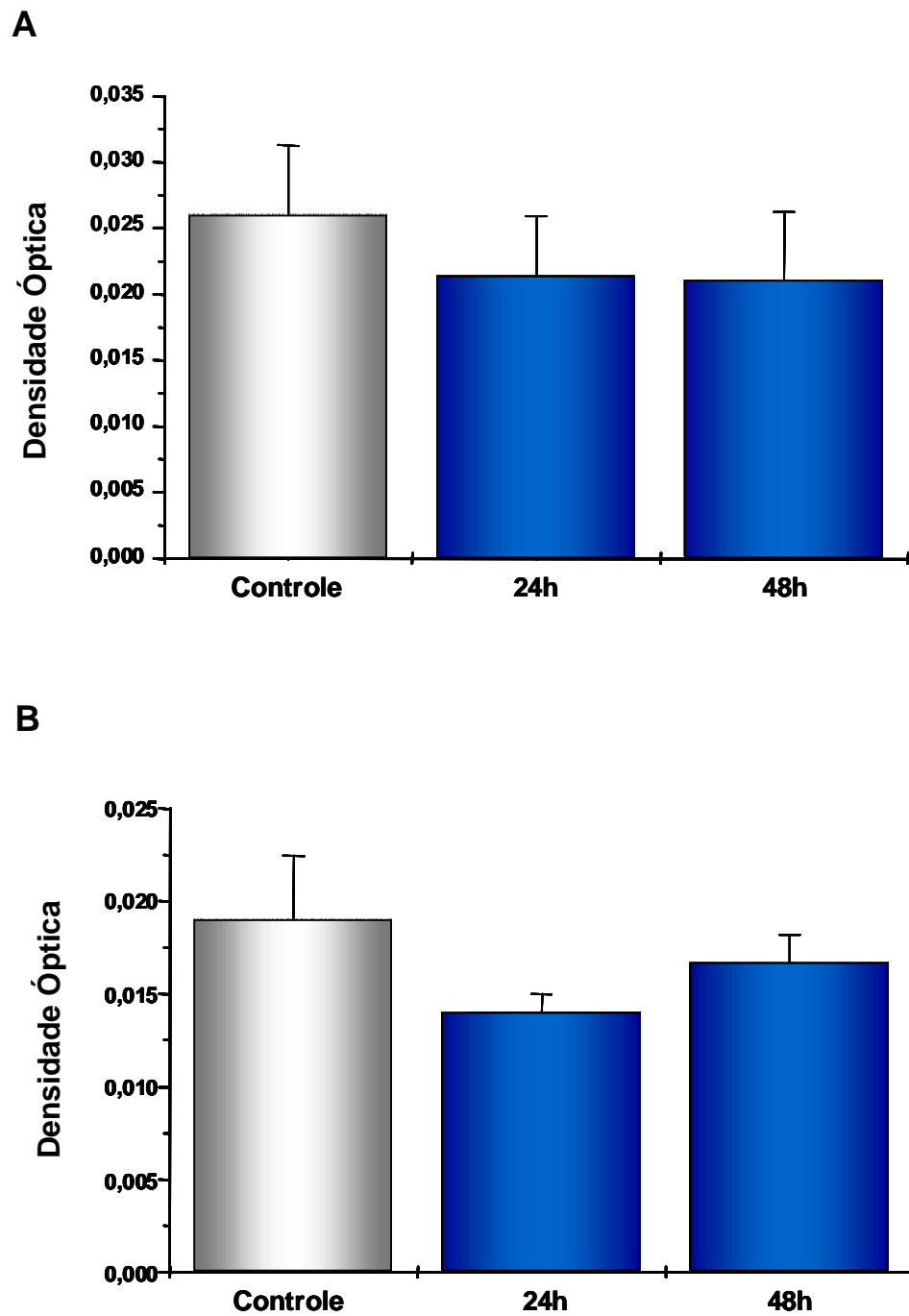


Figura 5.33. Expressão protéica de β -dístroglicana em células de Schwann da linhagem ST-88-14 tratadas com *M. leprae* letalmente irradiado. As células de Schwann foram tratadas ou não com *M. leprae* letalmente irradiado por 24 e 48 horas, na proporção bactéria:célula 10:1 (A) e 50:1 (B). Os dados mostram a média \pm desvio padrão das densidades ópticas de um experimento realizado em triplicata.

5.4.4 - Expressão de Dhh em células de Schwann e em nervo de pacientes com hanseníase

A proteína Dhh (Desert Hedgehog) está envolvida na manutenção do nervo periférico (Sharghi-Namini *et al.*, 2006), além do envolvimento no desenvolvimento deste (Parmantier *et al.*, 1999). Estudo na literatura (Sharghi-Namini *et al.*, 2006) mostra que a proteína Dhh é sintetizada somente em células de Schwann mielinizantes, entretanto, resultados de nossos experimentos mostram, através de imunocitoquímica, que células de Schwann primárias humanas, não mielinizantes, cultivadas *in vitro*, expressam essa proteína (**Figura 5.34**). Estas células apresentam imunomarcação positiva para a proteína Dhh tanto na região citoplasmática quanto na região nuclear.

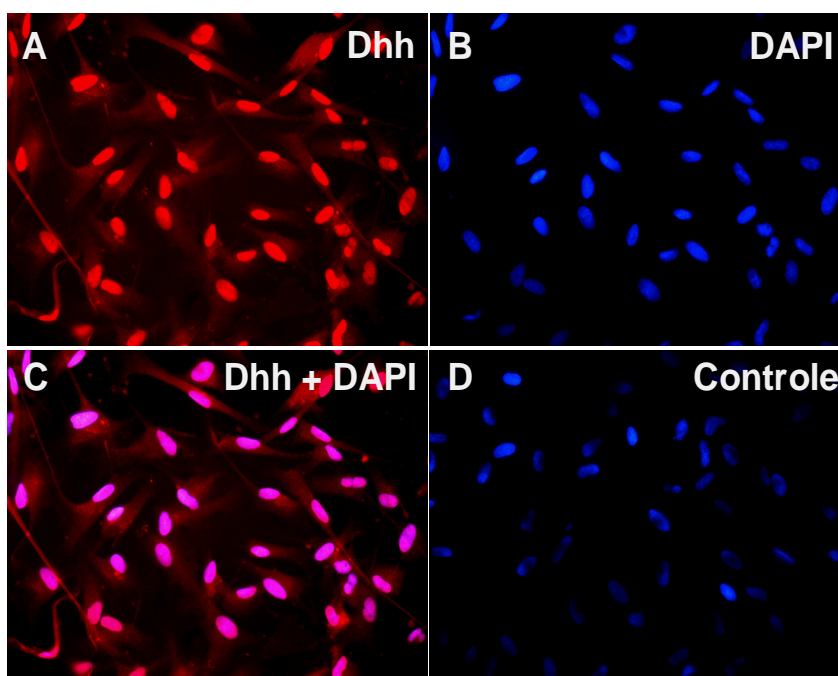


Figura 5.34. Expressão de Dhh em células de Schwann primárias humanas. Imagem de microscopia de fluorescência convencional evidenciando a marcação celular da proteína Dhh (**A**); imagem evidenciando os núcleos celulares corados com DAPI (**B**); (**C**) co-localização das imagens (**A**) e (**B**); imagem mostrando controle do anticorpo secundário; os núcleos celulares são evidenciados pela coloração com DAPI (**D**). O aumento das imagens é de aproximadamente 200x.

Com base nos dados citados na literatura sobre o papel da proteína Dhh no nervo periférico, analisamos a expressão de Dhh em células de Schwann primárias

RESULTADOS

humanas infectadas com *M. leprae* vivo. Os resultados mostram uma modulação negativa, estatisticamente significativa, da expressão de RNAm de Dhh nestas células infectadas, (Figura 5.35).

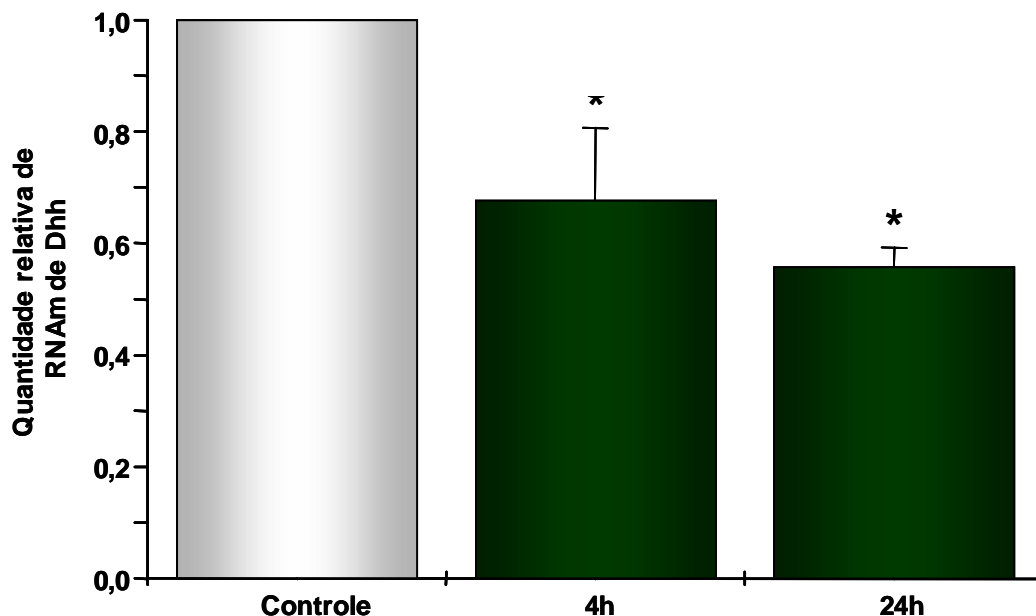


Figura 5.35. *M. leprae* vivo modula negativamente a expressão de RNAm de Dhh em células de Schwann primárias humanas. Células de Schwann humanas primárias foram infectadas ou não com *M. leprae* vivo, na proporção bactéria:célula 50:1, por 4 e 24 horas. A quantificação do RNAm de Dhh de cada condição foi determinada em relação ao controle (células não infectadas). Os dados mostram a média \pm erro padrão de três experimentos realizados em duplicata. Teste Kruskal Wallis Anova * $p < 0,05$.

Jessen e Mirsky (2005) observaram que camundongos nulos para Dhh apresentam microfasciculação, formação de microfascículos a partir de células fibroblastóides-perineurais que circundam grupos de pequenas fibras nervosas mielinizadas ou amielínicas no endoneuro. Vallat e colaboradores (1991) encontraram um padrão de microfasciculação em 21% das biópsias de nervo com hanseníase. Resolvemos, então, analisar a expressão de Dhh em nervos hansenícos com e sem microfasciculação e observamos que, quando comparada à expressão de Dhh em

RESULTADOS

nervos hansênicos sem microfasciculação, a expressão dessa molécula é diminuída de forma acentuada, em nervos hansênicos com microfasciculação (**Figura 5.36**).

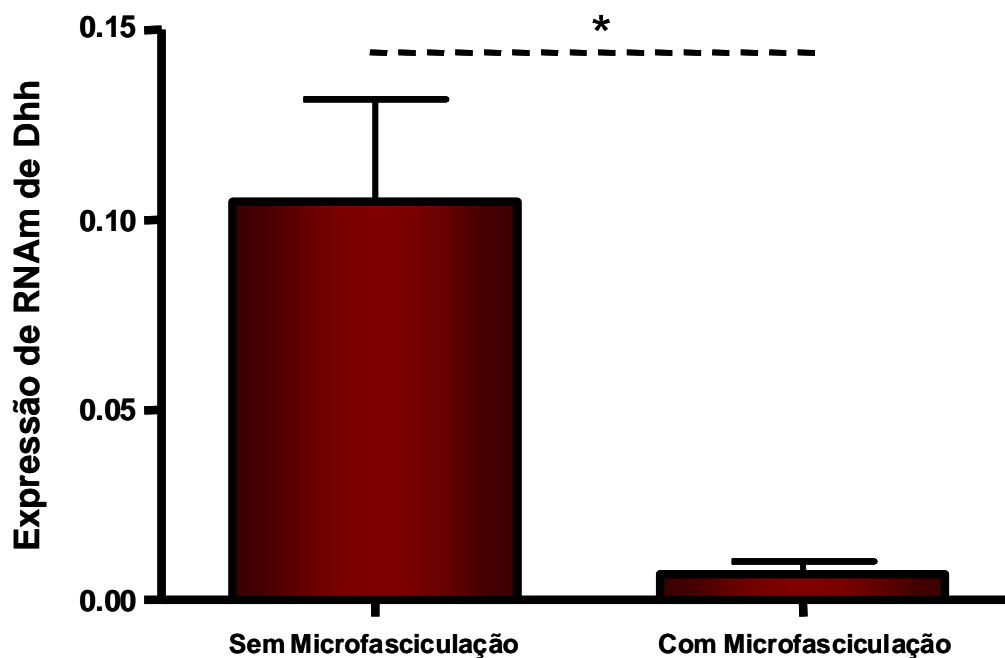


Figura 5.36. Nervo hansênico com microfasciculação expressa menos RNAm de Dhh quando comparado a nervo hansênico sem microfasciculação. RT-PCR quantitativo para RNAm de Dhh à partir de fragmentos de nervo hansênico com (N=4) e sem (N=4) microfasciculação. Os dados representam a média ± desvio padrão de um experimento realizado em duplicata. Teste-t. * $p < 0,05$.

Os resultados obtidos nos nossos experimentos mostram que a infecção pelo *M. leprae* vivo modula negativamente a expressão do RNAm de Dhh em células de Schwann cultivadas *in vitro*. Surpreendentemente, nervos de pacientes com hanseníase com microfasciculação mostraram níveis significativamente menores de RNAm de Dhh que aqueles sem microfasciculação.

VI - DISCUSSÃO

A lesão neural na hanseníase é decorrente da capacidade do *M. leprae* de infectar os nervos periféricos, alojando-se preferencialmente no interior de células de Schwann. No nervo, a presença do bacilo de Hansen causa infiltrado inflamatório, destruição de fibras nervosas por degeneração e desmielinização axonal relacionada ou não ao infiltrado inflamatório, seguidos de fibrose e lesão irreversível do nervo. Igualmente, os efeitos primários do *M. leprae* sobre a célula hospedeira estão implicados na injúria neural observada na doença, sendo esses efeitos, porém, pouco investigados.

A interação *M. leprae* - célula de Schwann representa, sem dúvida, um evento crítico que inicia o desencadeamento dos mecanismos moleculares que levam à lesão do nervo na hanseníase. Alves e colaboradores (2004) mostraram que a célula de Schwann participa ativamente da interação com o *M. leprae* e que a inibição de determinadas quinases nesta célula prejudica a entrada do bacilo. Hagge e colaboradores (2002) mostraram que células de Schwann infectadas com *M. leprae* apresentam alterações tanto na morfologia quanto na expressão de moléculas de adesão celular. Rambukkana e colaboradores (2002) mostraram que o *M. leprae* promove uma rápida desmielinização da fibra nervosa por um mecanismo contato-dependente, tanto em modelo de co-culturas neurônio e células de Schwann *in vitro* e em camundongos sem imunidade adaptativa. Portanto, o conhecimento das moléculas funcionais envolvidas na interação do *M. leprae* - célula de Schwann pode levar ao melhor entendimento dos efeitos deste patógeno sobre o metabolismo e fisiologia da célula de Schwann e da correlação destes efeitos com a lesão neural observada na doença, podendo ser útil no desenvolvimento de novas estratégias para a terapia e prevenção de danos nervosos na hanseníase.

O presente trabalho teve como objetivo geral contribuir para o entendimento da interação do *M. leprae* com a célula de Schwann. Os objetivos específicos do trabalho foram: estabelecer e caracterizar fenotipicamente as culturas de células de Schwann, determinar sua cinética de associação do *M. leprae* às células de Schwann, analisar aspectos morfológicos desta interação e estudar o efeito do *M. leprae* sobre a

DISCUSSÃO

expressão da cadeia α -2 da laminina-2, distroglicana, Desert Hedgehog (Dhh) e gangliosídeo 9-O-acetil GD3 pela célula de Schwann.

Para atender aos objetivos acima, inicialmente foi realizada a caracterização fenotípica das células de Schwann - linhagem ST88-14 e das células de Schwann primárias de rato e humanas, após estabelecimento das culturas. As células de Schwann - linhagem ST88-14 apresentam, de modo geral, características peculiares às células de Schwann primárias como a imunomarcação para a proteína S-100, conforme descrito por Ryan e colaboradores (1994) e proteína GFAP, que é peculiar de células de Schwann com fenótipo não mielinizante. Apesar das células de Schwann - linhagem ST88-14 se tratarem de células de um schwannoma e, portanto apresentarem desvantagens quando comparadas às células de Schwann primárias, sua fácil manutenção as torna um modelo de estudo *in vitro* alternativo.

Uma das maiores dificuldades encontradas para estudar a interação *M. leprae* – célula de Schwann está no isolamento e manutenção de culturas de células de Schwann primárias humanas, pois estas apresentam baixa taxa de proliferação e contaminação freqüente com fibroblastos (revisto por Li, 1998). O nosso laboratório buscou implantar, então, metodologias que minimizassem ou anulassem essas dificuldades.

Inicialmente implantamos o protocolo de cultura de células de Schwann obtidas a partir de explantes de nervos ciáticos de ratos, mas infelizmente o rendimento e o grau de pureza dessas culturas ficaram aquém do esperado para utilização destas nos estudos propostos. As células de Schwann cresceram ao redor do fragmento de nervo, entretanto, a quantidade destas não nos permitiu expandi-las para aplicação nos diversos experimentos a serem realizados. Um outro agravante foi a observação da presença de vários fibroblastos. Através de estágio realizado no “The Miami Project to Cure Paralysis”, Universidade de Miami - EUA, sob a orientação do Dr. Patrick Wood, recebemos treinamento para o estabelecimento de cultura de células de Schwann primárias obtidas a partir da dissociação de nervo. Esse protocolo foi introduzido em nosso laboratório e as culturas de células de Schwann de rato foram estabelecidas. Este método possibilita excelente rendimento no número de células obtidas a partir do nervo e um maior grau de pureza nas culturas.

DISCUSSÃO

Ainda através da colaboração com o Dr. Patrick Wood tivemos a oportunidade de obter o treinamento para o estabelecimento de culturas primárias de células de Schwann obtidas a partir da dissociação fibras nervosas da cauda eqüina humana. As culturas estabelecidas durante o mencionado treinamento foram doadas e trazidas para o nosso laboratório.

Cultivadas sem o contato com axônio, o que torna necessário o suplemento do meio de cultura com alguns fatores que seriam fornecidos por estes, as células de Schwann primárias de rato e humanas obtidas através de métodos que incluem a dissociação enzimática do nervo que as contém, foram caracterizadas como tais através de imunomarcação com anticorpo contra a proteína S-100 que as caracteriza em nervo periférico. As células de Schwann primárias de rato foram imunomarcadas com anticorpo contra a proteína GFAP, caracterizando-as como células de Schwann de fenótipo não mielinizante. As células de Schwann primárias humanas, com a característica disposição em forma de impressões digitais na cultura confluenta, apresentaram imunomarcação positiva para GFAP, peculiares desse fenótipo. O grau de pureza destas culturas foi determinado como sendo acima de 95%, observando-se, portanto, pouquíssimos fibroblastos.

A caracterização realizada dos três diferentes tipos de células de Schwann associado ao alto grau de pureza dessas culturas nos assegurou o uso desses tipos celulares como modelo para nossos estudos. Cabe, contudo, lembrar uma limitação que este modelo apresenta. Esses tipos celulares carecem da lâmina basal, uma vez que a mesma só se organiza *in vitro* em co-cultura com neurônios (Clark & Bunge, 1989). Deste modo, este modelo não reproduz fielmente a condição *in vivo*. A despeito desta limitação, a utilização destes tipos celulares constitui uma opção bastante apropriada para o estudo da interação *M. leprae* – célula hospedeira *in vitro*.

Uma outra limitação é a viabilidade do bacilo. Sabe-se que esta é um fator importante no desencadeamento de diversos processos na célula de Schwann (Hagge *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2004), portanto, o estudo realizado empregou tanto *M. leprae* vivo como morto, objetivando comparar os resultados em função da viabilidade dos bacilos. Entretanto, devido ao fato do *M. leprae* não ser cultivado em meio de cultura artificial e sim em modelos animais, que requerem grandes gastos e despendem longo

tempo para a multiplicação dos bacilos, não foi possível usar *M. leprae* vivo em todos os experimentos.

Através de microscopia eletrônica de varredura foi analisada a morfologia das culturas de células de Schwann tratadas ou não com o *M. leprae* por um período de até 24 horas de incubação. Foi observado que as células de Schwann formam monocamadas quando confluentes e que a morfologia das culturas infectadas aparentemente não difere daquela observada no controle. O curto período de incubação analisado pode justificar a ausência de alterações morfológicas no nosso estudo, já que um trabalho anterior mostrou que culturas de Schwann infectadas com *M. leprae* em longos prazos apresentaram alterações na sua morfologia, principalmente quando estas foram tratadas com *M. leprae* vivo e incubadas a 33 °C (Hagge *et al.*, 2002).

Em culturas tratadas, bactérias são observadas na superfície da célula de Schwann e muitos filamentos são vistos sobre as células. Vários desses recobrem a bactéria dentro de um sulco, tornando-se este, provavelmente o sítio de entrada na célula.

Dados de microscopia eletrônica de varredura mostraram que células de Schwann da linhagem ST88-14 apresentam contato célula-célula via grandes áreas da membrana plasmática ou através de extensos prolongamentos da membrana celular que estabelecem pontos de adesão focal com células vizinhas e com o substrato e que 50% das células de Schwann da linhagem ST88-14 apresentam *M. leprae* letalmente irradiado aderidos com 2 horas de tratamento. Essa adesão ocorreu por dois mecanismos distintos: (i) envolvimento de filopódios em torno das bactérias; (ii) sem a participação de filopódios, ou (iii) ambos os processos. Durante um período de interação de 24 horas foi comum observar imagens de bactérias em processo de invasão celular.

Experimentos realizados com os diferentes tipos de células de Schwann mostram que o *M. leprae* se associa (adesão mais interiorização) às células de Schwann da linhagem ST88-14 tanto quanto às células Schwann primárias de rato e humanas obtidas a partir da dissociação de nervo.

DISCUSSÃO

Estudos mostram que células de Schwann infectadas com *M. leprae* apresentam alterações na expressão de moléculas de adesão celular (Hagge *et al.*, 2002), assim como na transcrição de genes específicos (Tempone *et al.*, 2002). Rambukkana (2004) propõe um modelo de dano ao nervo, onde um evento precoce seria a desmielinização da fibra nervosa, causada pelo *M. leprae*, o que resultaria na desdiferenciação e proliferação das células de Schwann. Torna-se necessário identificar nestas células quais moléculas funcionais seriam afetadas pelo *M. leprae* que assim, desencadeariam esses eventos.

Harris e colaboradores (1986) demonstraram que o padrão de gangliosídeos expresso em tecidos de tatu infectados com *M. leprae* é bastante diferente dos não infectados e, em especial nos nervos periféricos de tatus infectados, eles observaram um significativo aumento na expressão de vários gangliosídeos não identificados, quando comparados a nervos periféricos de tatus não infectados com o bacilo. Nesse contexto resolvemos investigar a expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann.

A expressão de muitos gangliosídeos é modulada durante o desenvolvimento do sistema nervoso, sendo o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 expresso apenas durante o desenvolvimento e voltando novamente a ser expresso no caso de injúria nervosa. Alguns trabalhos têm correlacionando sua expressão com diferenciação, sobrevivência e controle da proliferação celular (Paller *et al.*, 1992).

Nossos resultados mostram que algumas células de Schwann da linhagem ST88-14 expressam constitutivamente o gangliosídeo 9-O-Acetil GD3, sugerindo que estas células apresentam, em cultura normal, um fenótipo desdiferenciado. Quando tratadas com o *M. leprae* estas células apresentam uma modulação positiva para a expressão de 9-O-acetil GD3, embora o aumento da multiplicidade de infecção não cause efeito sobre esta modulação. O aumento da expressão do gangliosídeo pode ser um indicador do estado de reatividade, ou seja, de desdiferenciação das células de Schwann quando elas interagem com o *M. leprae*, corroborando o modelo proposto por Rambukkana (2004).

Nossos resultados ainda mostram que o padrão de expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3, inicialmente difuso torna-se pontual com o curso temporal do tratamento

com as bactérias. Esses dados poderiam sugerir o envolvimento desta molécula no processo de desdiferenciação celular promovido pelo *M. leprae* e ou, ainda, a modulação positiva desse gangliosídeo poderia promover a permanência do *M. leprae* nestas células prevenindo-as da apoptose. Foi visto por Malisan e colaboradores (2002) que células HEK-293 convertem o gangliosídeo GD3 em gangliosídeo 9-O-acetil GD3 para prevenir a apoptose, pois a acetilação desse lipídio de membrana reprimiria a atividade pro-apoptótica do GD3. Ainda, Kniep e colaboradores (2006) demonstraram que o gangliosídeo 9-O-acetil GD3 protege células tumorais da apoptose, sugerindo assim a acetilação do GD3 como um novo mecanismo pelo qual as células tumorais escapariam deste tipo específico de morte celular. O *M. leprae* através da conversão ou indução de gangliosídeo 9-O-acetil GD3 nas células de Schwann estaria protegendo essas células de sofrerem apoptose e garantindo, assim, um nicho apropriado, para sua sobrevivência. Porém Mukherjee e colaboradores (2007) demonstram pela primeira vez uma via de morte celular programada em eritrócitos maduros desencadeada pelo gangliosídeo 9-O-acetil GD3. Os diferentes trabalhos mostram efeitos opostos do 9-O-acetil GD3, a depender do tipo celular empregado no experimento.

Rambukkana e colaboradores (1997) mostraram que o tropismo neural do *M. leprae* envolve a ligação da bactéria ao domínio globular da cadeia α -2 da laminina-2. Esta isoforma de laminina está presente em abundância na lâmina basal que reveste a célula de Schwann e serviria, assim, como uma ponte inicial entre o *M. leprae* e os receptores de laminina na célula de Schwann.

A laminina-2 é formada pela associação de três distintos produtos gênicos formando as cadeias α 2, β 1 e γ 1. A mutação na cadeia α 2 resulta em regulação positiva da cadeia α 4 em humanos e camundongos, entretanto, a cadeia α 4 não possui domínio globular e sua regulação positiva é insuficiente para sustentar a estrutura da lâmina basal ou prevenir doença em camundongo mutante para esse gene (revisto por Patton *et al.*, 2008).

A laminina-2 é uma molécula importantíssima visto que mutação na sua cadeia α -2 causa distrofia muscular congênita e neuropatia desmielinizante (Xu *et al.*, 1994). De fato, estudos de camundongos distróficos e humanos com distrofia muscular congênita resultante de mutações no gene da cadeia α -2 da laminina-2 mostram

DISCUSSÃO

defeitos na mielinização de células de Schwann (Matsumura *et al.*, 1997). Como a desmielinização é uma característica patológica comum na hanseníase, poderíamos sugerir que células de Schwann com grande número de bacilos, infectadas por longo período, poderiam ter a quantidade da proteína laminina-2 diminuída, o que resultaria na desmielinização, seguida de degeneração nervosa.

Nossos resultados mostram que células de Schwann humana da linhagem ST88-14 expressam laminina-2, resultado já esperado, de acordo com dados de estudos realizados em nosso laboratório que visavam investigar o mecanismo de adesão do *M. leprae* à célula de Schwann (Marques *et al.*, 2000 e Marques *et al.*, 2001). Experimentos independentes foram realizados para a análise da modulação da expressão de RNAm da cadeia α -2 da laminina-2, comparando *M. leprae* vivo e letalmente irradiado nas células Schwann humanas primárias. Quando as células foram infectadas com a bactéria viva ou letalmente irradiado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis de RNAm para a cadeia α -2 presentes nas células tratadas e nas células controles. Este dado foi concordante com os resultados de quantificação da proteína laminina- α 2, onde não se observou alteração nos níveis desta proteína em células de Schwann tratadas com *M. leprae* por até 72 horas. Nossos resultados, assim, sugerem que o *M. leprae* tem pouca ou nenhuma interferência sobre a expressão de laminina-2 pelas CS nos tempos iniciais de infecção.

Em 1998, Rambukkana e colaboradores descreveram o complexo distroglicana como um dos receptores de laminina-2 presentes na célula de Schwann envolvidos na adesão bacteriana. Ele é composto de duas sub-unidades: α -distroglicana, uma proteína que fica ancorada na membrana e que se liga ao domínio G da cadeia- α 2 da laminina-2 e β -distroglicana uma proteína transmembrana se que liga a proteína distrofina que interage com o citoesqueleto da célula de Schwann (Henry & Campbell, 1999). Assim, o *M. leprae* se ligaria ao domínio globular da cadeia- α 2 da laminina-2 na matriz extracelular que por sua vez se ligaria ao componente α -distroglicana do complexo DG (Rambukkana, 2001).

Além da hanseníase, o complexo distroglicana está implicado na patogênese de várias distrofias musculares. Este estabiliza a membrana plasmática agindo como eixo

DISCUSSÃO

através do qual a matriz extracelular é firmemente ligada ao citoesqueleto. Deficiência em qualquer um dos vários componentes do complexo DG leva a distrofia muscular (Cohn & Campbell, 2000). A perda seletiva do gene da distroglicana em células de Schwann de camundongos causa severas disfunções neurológicas, devido a uma intensa desorganização das microvilosidades nestas células, a uma localização anormal e diminuição dos canais de sódio nos nódulos de Ranvier e um amplo aspecto de anormalidades morfológicas na mielinização destas células (Saito *et al.*, 2003). A distroglicana é superexpressa juntamente com a laminina-2 durante a mielinização do nervo periférico em ratos (Masaki *et al.*, 2002) e sua expressão é regulada em paralelo com a laminina-2 durante o processo de degeneração e regeneração após lesão do nervo (Masaki *et al.*, 2000).

Conforme esperado, os nossos resultados mostram que as células de Schwann da linhagem ST88-14, as células de Schwann primárias de rato e primárias humanas expressam a distroglicana em cultura. Quando analisado os níveis de RNAm de β -distroglicana em células de Schwann primárias humanas infectadas com *M. leprae* vivo, observamos um decréscimo significativo quando comparado ao controle. Contudo, analisando a expressão da proteína β -distroglicana em células de Schwann da linhagem ST88-14 associadas com *M. leprae* letalmente irradiado, não foi observado modulação desta nas condições experimentais utilizadas. Experimentos adicionais de quantificação da proteína distroglicana devem ser realizados com a célula primária para confirmar a capacidade do bacilo vivo e não morto de modular a expressão desta proteína nos momentos iniciais da infecção.

Torna-se importante lembrar que a β -distroglicana compõe o complexo distroglicana que age como um eixo entre a matriz extracelular e o citoesqueleto e que a deleção seletiva de distroglicana em células de Schwann resulta em severa disfunção neurológica e amplo espectro de anormalidades morfológicas na mielinização e arquitetura nodal, resultando em defeito de condução do nervo (Saito *et al.*, 2003). Baseados nos nossos resultados poderíamos, então, especular que a modulação negativa da expressão de distroglicana pelo *M. leprae* constitua em um dos mecanismos envolvidos na rápida desmielinização seguida de desdiferenciação e proliferação das CS observada em fibras nervosas tratadas com o bacilo (Rambukkana

et al., 2002).

Recentemente foi mostrado que o eixo formado pela laminina-2, o complexo distroglicana e a utrofina é requerido para a compartimentalização e alongamento de segmentos de mielina e que anormalidades nesse eixo consistem de um mecanismo patogênico que resulta na desorganização do compartimento citoplasmático marcado por um reduzido comprimento dos internodos observado em algumas neuropatias (Court *et al.*, 2009). Poderíamos sugerir, então, que a interação a longo prazo do *M. leprae* com a célula de Schwann, como se dá nos indivíduos infectados, resultaria numa diminuição da expressão de distroglicana, e talvez de outros componentes desse eixo, o que levaria à desmielinização e degeneração da fibra nervosa.

Bajestan e colaboradores (2006) mostraram que a injúria ao nervo periférico de camundongos modularam negativamente a expressão de RNAm de Desert Hedgehog (Dhh) e esta modulação negativa foi revertida com o processo de regeneração do nervo. Estudos mostraram que nervos de camundongo *Dhh*-nulos mostraram múltiplas anormalidades que afetaram as células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes, axônios, barreira hemato-neural e células imunes (Sharghi-Namini *et al.*, 2006). Esses dados mostraram que a proteína Dhh estava envolvida na manutenção do nervo periférico, além do envolvimento no desenvolvimento deste (Parmantier *et al.*, 1999).

Sharghi-Namini e colaboradores (2006) afirmaram que a proteína Dhh é sintetizada somente em células de Schwann mielinizantes, entretanto, através de imunocitoquímica, podemos mostrar que células de Schwann primárias humanas cultivadas *in vitro* são capazes de expressar esta proteína; este resultado permitirá a utilização de células de Schwann humanas cultivadas *in vitro* para estudos relacionados à expressão de Dhh.

Com base nos dados citados, analisamos a expressão de Dhh em células de Schwann primárias humanas infectadas com *M. leprae* vivo e observamos uma modulação negativa da expressão de RNAm de Dhh nestas células. O processo de desestruturação do nervo periférico que ocorre na lesão neural da hanseníase além de ser ocasionado pelo infiltrado inflamatório, também poderia ser decorrente de uma diminuição da expressão do fator Dhh. A falta desse fator no camundongo knockout para Dhh provoca no nervo a insuficiência da barreira hemato-neural, alterações do

DISCUSSÃO

perineuro, microfasciculação, alterações na proporção célula de Schwann não mielinzante-axônio, alterando de forma contundente a organização do nervo periférico. Todos esses achados descritos no camundongo nulo para Dhh são observados na neuropatia da hanseníase. O achado do presente estudo, a respeito da diminuição da expressão de mRNA de Dhh em células de Schwann primárias quando tratadas com o *M. leprae* vivo é uma evidência de que a diminuição do Dhh induzida pelo *M. leprae* possa estar também implicada na lesão neural da hanseníase.

Foi observado que camundongos com deleção seletiva para Dhh apresentaram formação de microfascículos a partir de células fibroblastóides-perineurais que circundam grupos de pequenas fibras nervosas mielinizadas, amielínicas ou mesmo células de Schwann desnervadas no endoneuro (Jessen & Mirsky, 2005) e que 21% das biópsias de nervo com hanseníase apresentaram padrão de microfasciculação (Vallat *et al.*,1991). A análise da expressão de Dhh em pacientes com hanseníase neural com e sem microfasciculação, mostrou que pacientes com nervo com microfasciculação apresentaram uma considerável diminuição na expressão de RNAm de Dhh quando comparados com pacientes que apresentam nervo sem microfasciculação. Esses dados constituem uma evidência adicional do envolvimento do Dhh na lesão neural hanseniana e com isso podemos sugerir que a regulação negativa do Dhh poderia resultar na formação do aspecto de microfasciculação desses fascículos.

VII – CONCLUSÕES

1 - As células de Schwann da linhagem ST88-14, células de Schwann primárias de rato e primárias humanas cultivadas *in vitro* constituem-se ferramentas para estudos que visam a busca de conhecimento na interação patógeno - célula hospedeira.

2 - O *M. leprae* associa-se, em alta percentagem, às células de Schwann da linhagem ST88-14, às células de Schwann primárias de rato e primárias humanas cultivadas *in vitro*; esse resultado foi obtido tanto com o uso do *M. leprae* vivo, cuja obtenção é difícil, como com o letalmente irradiado.

3 - O *M. leprae* letalmente irradiado modula positivamente a expressão do gangliosídeo 9-O-acetil GD3 em células de Schwann da linhagem ST88-14. Esta modulação poderia estar envolvida no processo de desdiferenciação celular promovido pelo *M. leprae* e ou, ainda, poderia promover a permanência do *M. leprae* nestas células protegendo-as contra apoptose.

4 - O *M. leprae* parece não modular a expressão de laminina α -2 nas células de Schwann humanas nas condições experimentais utilizadas.

5 - O *M. leprae* vivo regula negativamente a expressão de RNAm de distroglicana em células de Schwann primárias humanas. Este efeito pode estar associado à intensa desmielização seguido de desdiferenciação e proliferação da célula de Schwann causados pelo *M. leprae* na fibra nervosa em modelos *in vitro* e *in vivo*.

6 - Células de Schwann humanas primárias cultivadas *in vitro*, fenótipo amielínico, expressam Dhh podendo, então, serem utilizadas em estudos que busquem elucidar questões sobre esta proteína.

CONCLUSÕES

7 - A modulação negativa da expressão de RNAm de Dhh nas células de Schwann humanas primárias infectadas com *M. leprae* vivo poderia resultar na perda da integridade da estrutura do nervo periférico e na formação de microfascículos observados em nervos com hanseníase neural com microfasciculação.

VIII – BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, and J. D. WATSON. 1997. *Molecular biology of the cell*. 3^a ed. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- ALVES, L., L. M. LIMA, E. S. MAEDA, L. CARVALHO, J. HOLY, E. N. SARNO, M. C. V. PESSOLANI, and L. BARKER. 2004. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cell depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiology Letters** 238: 429-37.
- ANTIA, N. H., and V. P. SHETTY. 1997. **The Peripheral Nerve in Leprosy and Other Neuropathies**. Oxford University Press.
- BAJESTAN, S. N., F. UMEHARA, Y. SHIRAHAMA, K. ITON, S. SHARGHI-NAMINI, K. R. JESSEN, R. MIRSKY, and M. OSAME. 2006. Desert hedgehog-Patched 2 expression in peripheral nerves during wallerian degeneration and regeneration. **J. Neurobiol.** 66(3): 243-55.
- BAND, A. H., A. BHATTACHARYA, and G. P. TALWAR. 1986. *Lack of Mycobacterium leprae*-specific uptake in Schwann cells. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 54 (1): 71 - 78.
- BEERS, S. M. van, M. Y. L. WIT, and P. R. KLATSER. 1996. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Recent insight. **FEMS Microbiology Letters.** 136: 221-230.
- BHATHEJA, K., and J. FIELD. 2006. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 38 (12): 1995 - 1999.

BIBLIOGRAFIA

- BRADLEY, W. G., and M. JENKISON. 1973. Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. **J. Neurol. Sci.** 18(2): 227 - 47.
- BRADLEY, W. G, E. JAROS, and M. JENKISON. 1977. The nodes of Ranvier in the nerves of mice with muscular dystrophy. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 36: 797 - 806.
- BRENNAN, P. J., and NIKAIDO H. 1995. The envelope of mycobacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 64: 29 – 63.
- BRYCESON, A., and R.E. PFALTZGRAFF. (ed.). 1990. Leprosy, Churchill Livingstone, New York.
- BUNGE, P. B. 1993. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. **Cur. Opin. Neurobiol.** 3: 805 – 809.
- CARVALHO, H. F., and C. B. COLLARES-BUZATO. 2005. Células: uma abordagem multidisciplinar. 2005. 1^a ed. Editora Manole Ltda.
- CHEN, S., C. RIO, J.I. RR, P. DIKES , R. E. COGGESHALL , C. J. WOOLF, and G. CORFAS. 2003. Disruption of ErbB receptor signaling in adult non - myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss. **Nat. Neurosci.** 6 (11): 1186 - 1193.
- CHERNOUSOV, M. A., W. M. YU, Z. L. CHEN, D. J. CAREY, and S. STRICKLAND. 2008. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. **Glia.** 56 (14):1498 - 1507.

BIBLIOGRAFIA

- CLARK, M. B., and M. B. BUNGE. 1989. Cultured Schwann cells assemble normal - appearing basal lamina only when they ensheathe axons. **Dev. Biol.** 133: 393 - 404.
- COHN, R. D., and CAMPBELL, K. P. 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle Nerve.** 23: 1456 – 1471.
- COLE, S. T., K. EIGLEMEIR, J. PARKHILL, K. D. JAMES, N. R. THOMSON, P. R. WHEELER, *et al.*. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature.** 409: 1007-1011.
- COLSTON, M. J. 1993. Leprosy 1962- 1992: the microbiology of *Mycobacterium leprae*; progress in the last 30 years. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** 87: 504-507.
- COLSTON, M. J., and G. R. F. HILSON. 1976. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. **Nature.** 262: 399 – 401.
- COURT, F. A, J. E. HEWITT, K. DAVIES, B. L. PATTON, A. UNCINI, L. WRABETZ, and M. L. FELTRI. 2009. A laminin-2, dystroglycan, utrophin axis is required for compartmentalization and elongation of myelin segments. **J. Neurosci.** 29 (12): 3908 - 3919.
- DOYU, M., G. SOBUE, E. KEN, K. KIMATA, T. SHINOMURA, Y. YAMADA, T. MITSUMA, and A. TAKAHASHI. 1993. Laminin- α , β 1 and β 2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: regulation by axonal signals. **Ann. Neurochem.** 60: 543 – 551.
- EHRING, K., I. LEIVO, W. S. ARGRAVES, E. RUOSLAHTY, and E. ENGEVALL. 1990. Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminina-like protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 3264 – 3268.

BIBLIOGRAFIA

- FINE, P. E. M. 1982. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. **Epidemiol. Rev.** 4: 161 -188.
- FLETCHER, J. A., KOZAKEWICH, H.P., HOFFER, F.A., LAGE, J.M., WEIDNER, N., TEPPER, R., PINKUS, G. S., MORTON, C. C., and CORSON, J.M. 1991. Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft-tissue tumors. **N. Engl. J. Med.** 324: 436-42.
- GODAL, T., M. LOFGREN, and K. NEGASSI. 1972. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 40: 243 – 50.
- GÓMEZ-VALERO, L., A. LATORRE, and F. J. SILVA. 2004. The evolutionary fate of nonfunctional DNA in the bacterial endosymbiont *Buchnera aphidicola*. **Mol. Biol. Evol.** 21 (11): 2172 - 2181.
- GÓMEZ-VALERO, L., E. P. ROCHA, A. LATORRE, and F. J. SILVA. 2007. Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: the dynamics of gene loss and genome reduction. **Genome Res.**17(8):1178 - 1185.
- HANGMANN, M. 2000. Intimate portraits of bacterial nameses. **Science.** 288: 800 - 801.
- HARRIS, E. B., Y. LI and S. LI. 1986. Ganglioside patterns in normal and lepromatous armadillo tissues. **Inter. J. Leprosy.** 54: 289 – 293.
- HARRISINGH, M. C., E. PEREZ-NADALES, D. B. PARKINSON, D. S. MALCOLM, A. W. MUDGE, and A. C. LLOYD. 2004. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. **EMBO J.** 23 (15): 3061 - 3071.
- HASTINGS, R. C. (ed.). 1989. Leprosy. Edinburg: Churchill. Livingstone, 331p.

BIBLIOGRAFIA

- HEGGE, D., S. O. ROBINSON, D. SCOLLARD, G. McCORMICK, and D. L. WILLIAMS. 2002. A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions. **J. Infect. Dis.** 186: 1283 – 1296.
- HENRY, M. D. and K. P. CAMPEBELL. 1999. Dystoglican inside and out. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 11: 602 – 607.
- HUNTER, S. W., T. FUJIWARA, and P. J. BRENNAN. 1982. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **J. Biol. Chem.** 257: 15072.
- JESSEN, K. R., and R. MIRSKY. 1999. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. **Trends Neurosci.** 22: 402 – 410.
- JESSEN, K. R., and R. MIRSKY. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Nat Rev Neurosci.** 6 (9): 671 - 682.
- KIRCHHEIMER, W. F., and E. E. STORRS. 1971. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novincinctus*, Linn) as a model for the leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in na experimentally infected armadillo. **Int. J. Lepr.** 39:692-701.
- KNIEP, B., E. KNIEP, N. ÖZKUCUR, S. BARZ, M. BACHMANN, F. MALISAN, R. TESTI, and E. P. RIEBER. 2006. 9-O-acetyl GD3 protects tumor cells from apoptosis. **Int. J. Cancer.** 119: 67-73.
- LANCASTER, R., D. G. R. F. HILSON, A. C. McDOUGALL, and M. J. COLTON. 1983. *Mycobacterium leprae* infection in nude mice: bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. **Infection and Immunity.** 39: 865 – 872.
- LANDES, R. G. 1994. Macrophages in peripheral nerve repair, in: Perry H. V. (ed.).

BIBLIOGRAFIA

Macrophages and the Nervous System. Co. Austin, pp. 102-118.

LEVINE, J. M., L. BEASLEY, and W. STALLCUP. 1984. The D1.1 antigen: a cell surface marker for germinal cells of the central nervous system. **J. Neurosci.** 4: 820 – 831.

LEVY, L., and B. JI. 2006. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. **Lepr. Rev.** 77 (1): 5 - 24.

LOCKWOOD, D. N., S. VINAYAKUMAR, J. N. STANLEY, K. P. McADAN, and M. J. COLSTON. 1993. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad. India. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 61: 8-15.

MALISAN, F., L. FRANCHI, B. TOMASSINI, N. VENTURA, I. CONDÒ, M. R. RIPPO, A. RUFINI, L. LIBERATI, C. NACHTIGALL, B. KNIEP, and R. TESTI. 2002. Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. **J. Exp. Med.** 196: 1535 – 1541.

MARQUES, M. A., A. G. NEVES-FERREIRA, E. K. DA SILVEIRA, R. H. VALENTE, A. CHAPEAUROUGE, J. PERALES, R. DA SILVA BERNARDES, K. M. DOBOS, J. S. SPENCER, P. J. BRENNAN, and M. C. PESSOLANI. 2008. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. **Proteomics.** 8 (12): 2477 - 2491.

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

BIBLIOGRAFIA

- MARQUES, M. A., S. MAHAPATRA, E. N. SARNO, S. SANTOS, J. S. SPENCER, P. J. BRENNAN, and M. C. PESSOLANI. 2001. Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 34: 463-470.
- MARTINI, F. H. 1995. Fundamentals of Anatomy e Physiology. Prentice-Hall. 3^a ed. New jersey.
- MARTINI, R., and M. SCHACHNER. 1986. Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. **J. Cell. Biol.** 103 (6 Pt 1): 2439 - 2448.
- MASAKI, T., K. MATSUMURA, A. HIRATA, H. YAMADA, A. HASE, K. ARAI, T. SHIMIZU, H. YORIFUJI, K. MOTOYOSHI, and K. KAMAKURA. 2002. Expression of dystroglycan and the laminin-alpha 2 chain in the rat peripheral nerve during development. **Exp Neurol.** 174 (1): 109 - 117.
- MASAKI, T., K. MATSUMURA, F. SAITO, Y. SUNADA, T. SHIMIZU, H. YORIFUJI, K. MOTOYOSHI, and K. KAMAKURA. 2000. Expression of dystroglycan and laminin-2 in peripheral nerve under axonal degeneration and regeneration. **Acta Neuropathol.** 99 (3): 289 - 295.
- MATSUMURA, K., H. YAMADA, F. SAITO, Y. SUNADA, and T. SHIMIZU. 1997. Peripheral nerve involvement in merosin-deficient congenital muscular dystrophy and dy mouse. **Neuromuscul. Disord.** 7: 7-12.
- MEIER, C., E. PARMANTIER, A. BRENNAN, R. MIRSKY and K. R. JESSEN. 1999. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. **J. Neurosci.** 19: 3847 – 3859.

BIBLIOGRAFIA

- MENDEZ-OTERO, R., and M. F. SANTIAGO. 2003. Functional role of a specific ganglioside in neuronal migration and neurite outgrowth. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 36 (8): 1003 - 1013.
- MIRSKY, R. and K. R. JESSEN. 1999. The neurobiology of Schwann cells. **Brain Pathol.** 9: 293 - 311.
- MIRSKY, R., K. R. JESSEN, A. BRENNAN, D. PARKINSON, Z. DONG, C. MEIER, E. PARMANTIER, and d. LAWSON. 2002. Schwann cells as regulators of nerve development. **J. Physiol.** 96: 17 - 24.
- MIRSKY, R., A. WOODHOO, D. B. PARKINSON, P. ARTHUR-FARRAJ, A. BHASKARAN, K. R. JESSEN. 2008. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. **J. Peripher. Nerv. Syst.** 3 (2): 122 - 135.
- MISAKI, A., I. AZUMA and Y. YAMAMURA. 1977. Structural and immunochemical studies on D-arabino-D-mannans and D-mannans of *Mycobacterium tuberculosis* and other *Mycobacterium* species. **J. Biochem.** 82: 1759 – 1770.
- MODLIN, R. L., J.F. GEBHARD, C. R. TAYLOR, AND T. H. REA. 1983. In situ characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.** 53: 17-24.
- MODLIN, R. L. 1994. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J. Invest. Dermatol.** 102: 828-832.
- MUKHERJEE, K., S. CHOWDHURY, S. MONDAL, C. MANDAL, S. CHANDRA, R. K. BHADRA, and C. MANDAL. 2007. 9-O-Acetylated GD3 triggers programmed cell death in mature erythrocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 362: 651- 657.

BIBLIOGRAFIA

- NAAFS. B., and H. W. WHEATE. 1978. The time interval between the start of anti-leprosy treatment and the development of reactions in borderline patients. **Lepr. Rev.** 49: 153 -157.
- NATIONS, S. P., J. S. KATZ, C. B. LYDE, R. J. BAROHN. 1998. Leprous neuropathy: Na American perspective. **Semin. Neurol.** 18:113 - 124.
- NG, V., G. ZANAZZI, R. TIMPL, J. TALTS, J. L. SALZER, P. J. BRENNAN, and A. Rambukkana. 2000. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell.** 103: 511 - 529.
- NOON, L. A., and A. C. LLOYD. 2007 Treating leprosy: an Erb-al remedy? **Trends Pharmacol Sci.** 28 (3):103 - 105.
- PALLER, A. S. , S. L. ARNSMEIER , J. K. ROBINSON , and E. G. BREMER . 1992. Alteration in keratinocyte ganglioside content in basal cell carcinomas. **J. Invest. Dermatol.** 98(2): 226-32.
- PALMER, E., R. J. REES, and G. WEDDELL. 1965. Experimental studies on nerve fibers in leprosy. I. The reaction of rat Schwann cells toward carbon particles, *Mycobacterium lepraemurium* and *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr.** 33:137 - 159.
- PARMANTIER, E., B. LYNN, D. LAWSON, M. TURMAINE, S. S. NAMINI, L. CHAKRABARTI, A. P. McMAHON, R. K. JESSEN, and R. MIRSKY. 1999. Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. **Neuron.** 23: 713 – 724.
- PATTON B. L. 2000. Laminins of the neuromuscular system. **Microsc. Res. Tech.** 51: 247 – 261.
- PATTON, B. L., B. WANG, Y. S. TARUMI, K. L. SEBURN, and R. W. BURGESS.

BIBLIOGRAFIA

2008. A single point mutation in the LN domain of LAMA2 causes muscular dystrophy and peripheral amyelination. **J. Cell Sci.** 121 (Pt 10): 1593 - 1604.
- PEARSON, J. M., and W. F. ROSS. 1975. Nerve involvement in leprosy – Pathology, differential diagnosis and principles of management. **Lepr. Rev.** 46: 199-212.
- PREVITALI, S. C., A. NODARI, C. TAVEGGIA, C. PARDINI, G. DINA, A. VILLA, L. WRABETZ, A. QUATTRINI, and M. L. FELTRI. 2003. Expression of laminin receptors in schwann cell differentiation: evidence for distinct roles. **J. Neurosci.** 23 (13): 5520 - 5530.
- PREVITALI, S. C., M. L. FELTRI, J. J. ARCHELOS, A. QUATTRINI, L. WRABETZ, and H. HARTUNG. 2001. Role of integrins in the peripheral nervous system. **Prog. Neurobiol.** 64(1): 35 - 49.
- RAMBUKKANA, A. 2001. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Curr. Opin. Microbiol.** 4: 21 – 27.
- RAMBUKKANA, A. 2004. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. **Curr. Opi. Immunol.** 16: 511-18.
- 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: 297 - 931.
- RAMBUKKANA, A., H. YAMADA, G. ZANAZZI, T. MATHUS, J. L. SALZER, P. D. YURCHENCO, K. P. CAMPEBELL, and V. A. FISCHETTI. 1998. Role of α -dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. **Science.** 282: 2076 - 2081.
- RAMBUKKANA, A., J. L. SALZER, P. D. YURCHENCO, and E. I. TUOMANEN. 1997.

BIBLIOGRAFIA

- Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin- α 2 chain. **Cell.** 88: 811 - 821.
- REES, R. F. W. 1985. The microbiology of leprosy. In Hastings, R. C. (ed.). Leprosy. Churchill Livingstone Inc, UK. p 31-52.
- RICHARDUS, J. H., K. M. FINLAY, R. P. CROFT, and W. C. SMITH. 1996. Nerve function impairment in leprosy at diagnosis and at completion of MDT: A retrospective cohort study of 786 patients in Bangladesh. **Lepr. Rev.** 67: 297-305.
- 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: 255-73.
- RYAN, J. J., K. A. KLEIN, T. J. NEUBERGER, J. A. LEFTWICH, E. H. WESTIN, S. KAUMA, J. A. FLETCHER, G. H. DE VRIES, 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.
- SAITO, F., A. S. MOORE, R. BARRESI, M. D. HENRY, A. MESSING, S. E. ROSS-BARTA, R. D. COHN, R. A. WILLIAMSON, K. A. SLUKA, D. L. SHERMAN, P. J. BROPHY, J. D. SCHMELZER, P. A. LOW, L. WRABETZ, M. L. FELTRI, and K. P. CAMPBELL. 2003. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. **Neuron** 38: 747 – 758.
- SCHERER, S. S., and E. J. ARROYO. 2002. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. **J. Peripher. Nerv. Syst.** 7(1): 1 - 12.
- SCOLLARD, D. M. 2000. Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. **Microbes and Infection.** 2:1835-1843.
- SCOLLARD, D. M., L. B. ADAMS, T. P. GILLIS, J. L. KRAHENBUHL, R. W. TRUMAN,

BIBLIOGRAFIA

- and D. L. WILLIAMS. 2006. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.** 19(2): 338 – 381.
- SHARGHI-NAMINI, S., M. TURMAINE, C. MEIER, V. SAHNI, F. UMEHARA, K. R. JESSEN, and R. MIRSKY. 2006. The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. **J. Neurosci.** 26 (23): 6364 - 6376.
- SHEPARD, C. C. 1960. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into footpads of mice. **J. Exp. Med.** 112: 445-454.
- SHEPARD, C. C., and D. H. MCRAE. 1968. A method for counting acid-fast bacteria. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 36 (1): 78 - 82.
- SHERMAN, D. L., C. FABRIZI, C. S. GILLESPIE, and P. J. BROPHY. 2001. Specific disruption of a schwann cell dystrophin - related protein complex in a demyelinating neuropathy. **Neuron.** 30 (3): 677 - 687.
- SHIMOJI, Y., V. NG, K. MATSUMURA, V. A. FISCHETTI, and A. RAMBUKKANA. 1999. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 9857 - 9862.
- SIBLEY, L. D., and J. L. KRAHENBUHL. 1988. Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. **Infect. Immun.** 56: 1912 - 1919.
- STIRLING, C. A. 1975. Abnormalities in Schwann cell sheaths in spinal nerve roots of dystrophic mice. **J. Anat.** 119: 169-80.
- TAN, S. Y., and , C. GRAHAM. 2008. Armauer Hansen (1841-1912): discoverer of the

BIBLIOGRAFIA

- cause of leprosy. **Singapore Med. J.** 49 (7): 520 -521.
- TAPINOS, N., M. OHNISHI, and A. RAMBUKKANA. 2006. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. **Nat Med.** 12 (8): 961 - 966.
- TEMPONE, A. J. 2002. Estudo molecular da interação do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann (SC): Utilização da linhagem de celular humana ST 88-14 como modelo investigativo. 2002. **III Bienal de Pesquisa.** FIOCRUZ/ Rio de Janeiro.
- TRUMAN, R. W., and J. L. KRAHENBUHL. 2001. Viable *M. leprae* as a research reagent. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.** 2001. 69: 1 – 12.
- VALLAT JM, LEBOUTET MJ, HENRY P, MILLAN J, and DUMAS M. 1991. Endoneurial proliferation of perineurial cells in leprosy. **Acta Neuropathol.** (Berl) 81 (3): 336 – 338.
- VAUDANO, E., C. DE FILEPE, S. W. DAVIES, A. R. LIEBERMAN, and S. P. HUNT. 1992. Expression of c-jun protein in Schwann cells depends on their environment. **Soc. Neurosci. Abst.** 18: 1302.
- VISSA, V. D., and P. J. BRENNAN. 2001. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol.** 2: 1023.1 – 1023.8.
- WHO. 1998. Expert Committee on Leprosy. Seventh report. World Health Organization, Geneva.
- WHO. 2002. Global leprosy situation, january. **Wkly Epidemiol Rec.** 77: 1-8.
- WHO. 2008. Weekly Epidemiological Record. **World Health Organization.** 33(15): 293-300.

BIBLIOGRAFIA

WIWANITKIT, V. 2008. Ligand-binding prediction for ErbB2, a key molecule in the pathogenesis of leprosy. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.** 74 (1): 32 - 34.

YAMADA, H., A. J. DENZER, H. HORI, T. TANAKA, L. V. ANDERSON, S. FUJITA, H. FUKUTA-OHI, T. SHIMIZU, M. A. RUEGG, and K. MATSUMURA. 1996. Dystroglycan is a dual receptor for agrin and laminin-2 in Schwann cell membrane. **J. Biol. Chem.** 271: 23418 -23423.

YIN, X., T. O. CRAWFORD, J. W. GRIFFIN, P. TU, V. M. LEE, C. LI, J. RODER, and B. D. TRAPP. 1998. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. **J. Neurosci.** 18: 1953 – 1962.

YU, W. M., H. YU, Z. L. CHEN, and S. STRICKLAND. 2008. Disruption of laminin in the peripheral nervous system impedes nonmyelinating Schwann cell development and impairs nociceptive sensory function. **Glia.** Dec 2. [Epub ahead of print].

XU, H., X. R. WU, U. M. WERNER, and E. ENGEVAL, 1994. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. **Nat. Genet.** 8: 297 - 302.

<http://www.gefor.4t.com/arte/hansen.htm>

http://www.sms.si.edu/irlSpec/Dasyopus_novemcinctus.htm

<http://www.who.int/lep/situation/PrevStart2007a.pdf>

<http://caf.iisc.ernet.in/mouse.htm>

<http://www.esec-lousa.rcts.pt/imagens/nervo.jpg> (modificado).

IX – ANEXOS

9.1 - Artigo em preparação

9.1.1 - Artigo 1

Título: Interação do *Mycobacterium leprae* com células de Schwann: caracterização de modelos in vitro para estudo de eventos precoces na patogênese da hanseníase.

Autores: Alves, L., H. Barbosa, S. L. G. Antunes & M. C. V. Pessolani

9.1.2 - Artigo 2

Título: Microfasciculation: a morphological pattern in the leprosy nerve damage associated with desert hedgehog factor downregulation

Autores: Antunes, S. L. G., L. Alves, A. L. Oliveira, M. Ferreira-Medeiros, S. Corte-Real, M. C. V. pessolani, M. R. Jardim, J. A. C. Nery, A. M. Sales & E. N. Sarno.

9.2 - Artigos realizados em colaboração durante o doutorado

9.2.1 - Artigo 1

- Aceito para publicação

Título: Schwann cells Express the Macrophage Mannose Receptor and MHC class II. Do They Have a Role in Antigen Presentation?

Autores: Baetas-da-Cruz, W., **L. Alves**, M. C. Pessolani, H. Barbosa, A. Régnier-Vigouroux, S. Corte-Real & L. Cavalcante.

Revista: Journal of the Peripheral Nervous System

9.2.2 - Artigo 2

- Aceito para publicação

Título: Efficient uptake of mannosylated proteins by a human schwann cell line.

Autores: Baetas-da-Cruz W., **L. Alves**, E. V. Guimarães, A. Santos-Silva, M. C. V. Pessolani, H. S. Barbosa, S. Corte-Real & L. A. Cavalcante.

Revista: Histology and Histopathology - Cellular and Molecular Biology

9.2.3 - Artigo 3
- Submetido

Título: *Mycobacterium leprae* induces Insulin-Like Growth Factor and Promotes Survival of Schwann Cells upon serum withdrawal.

Autores: Rodrigues, L. S., E. S. Maeda, M. E. C. Moreira, A. J. Tempone, L. S. Lobato, V. T. Ribeiro-Resende, **L. Alves**, S. Roessle, C. H. Yoshida, U. G. Lopes & M. C. V. Pessolani.

Revista: Cellular Microbiology

Interaction of *Mycobacterium leprae* with Schwann cells: characterization of *in vitro* models to study early events in leprosy pathogenesis

Lucineia Alves¹, Helene Barbosa², Sergio Luiz Gomes Antunes³ & Maria Cristina Vidal Pessolani¹

¹Laboratory of Cellular Microbiology, ²Laboratory of Structural Biology and ³Laboratory of Hanseniasis, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ - Av. Brasil 4365, Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil - CEP: 21045-900.

Address correspondence to: E-mail: cpessola@ioc.fiocruz.br, Tel. (+55) 21 2598 4467

Abstract

Leprosy is an infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular parasite. *M. leprae* primarily invades Schwann cells (SCs) in peripheral nerves, resulting in the deformities and disabilities that constitute clinical hallmarks of the disease. Despite recent efforts in understanding the molecular mechanisms of *M. leprae* adhesion and invasion of SCs, *in vitro* models of infection are desperately needed to elucidate the early events in leprosy pathogenesis. In the present study, we used different sources of SCs and compared the capacity of *M. leprae* to associate to these cells. The results showed that the human schwannoma ST88-14 cell line, primary rats (PRSC), and primary human SCs (PHSC) are able to avidly associate with *M. leprae*, with approximately 50% of these cells displaying bacterium on their surface as early as two hours after interaction. Moreover, a detail morphological analysis of *M. leprae* interaction with the ST88-14 human SC cell line was performed by scanning electron microscopy indicating an intimate contact of the bacterium with the cell surface and effective invasion of these cells. Finally, we investigated by quantitative RT-PCR the effect of a 24 and 48h *M. leprae* infection on the expression of α 2-laminin and dystroglycan, two relevant molecules involved in *M. leprae* adhesion to SCs, While no effects on laminin α 2 chain mRNA levels was observed, live *M. leprae* was able to downregulate the levels of dystroglycan mRNA in PHSC cultures. Altogether, the results of this study showed the potential utilization of cultures of SCs as *in vitro* models to study early events in *M. leprae*-Schwann cell interaction. Moreover, using this *in vitro* model, *M. leprae* was able to affect the expression of dystroglycan, a relevant molecule in the interaction of SC with

the bacillus, suggesting a potential link of this modulation with the pathogenesis of the leprosy nerve damage.

Key words: *Mycobacterium leprae*, Schwann cells, Scanning electron microscopy, laminin-2, dystroglycan, q-PCR.

Introduction

Leprosy, one of the oldest recorded diseases, continues to be a significant public health problem in several developing countries, including Brazil, and is responsible for the legacy of millions of individuals with permanent physical deformities (www.who.int/lep). *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, is an obligate intracellular pathogen that is unique among bacterial pathogens in its ability to invade the peripheral nervous system. This unique tissue tropism is the basis of the characteristic nerve damage associated with leprosy, often leading to peripheral neuropathy, a serious sequel of leprosy and common in leprosy endemic countries. Treatment of patients with multidrug therapy, a combination of the antibiotics rifampicine, dapsone and chlofacemine, successfully achieves bacteriological sterility, but only partially reverses or prevents loss of nerve-function in patients. Thus, a better understanding of the disease mechanisms is needed to develop new tools for prevention and treatment of nerve damage in leprosy (for review see Scollard et al., 2006).

Although, in 1873, *M. leprae* was the first bacterium to be described as a causal agent of a human infectious disease, deciphering the biology of this bacterium has constituted one of the greatest challenges facing microbiologists over time due to its unique features. Multiple attempts to grow *M. leprae* in axenic or tissue cultures have all been in vain; and today infected nine-banded armadillo and athymic nude mouse constitute the major source of bacteria for biochemical and physiological studies.

M. leprae is the only known bacillus capable of invading the peripheral nerves and causing destructive lesions. In the nerve, the leprosy bacillus is found predominantly inside Schwann cells (SC) that seem to be appropriate niches for the pathogen to survive and

replicate. As a long-term consequence of infection and immune response, Schwann cell-axon interaction is affected, causing multiple biological changes in the peripheral nerve environment (Antia and Shetty, 1997). However, the molecular mechanisms involved in these processes are far from being clarified. In an attempt to better understand the molecular basis of SC-*M. leprae* interaction, studies have been recently intensified, employing *in vitro* systems of SC/neuron co-cultures or pure SC cultures. Substantial progress has been achieved regarding the mechanisms of *M. leprae* attachment to SC. In this context, it was shown that *M. leprae* binds specifically to the $\alpha 2$ chain of laminin-2 (Rambukkana et al., 1997), and the laminin receptor α -dystroglycan was shown at the role of a SC receptor for *M. leprae* (Rambukkana et al., 1998). Moreover, the histone-like protein (Hlp/LBP) and the phenolic glycolipid I (PGL-I) were characterized as the bacterial laminin-binding adhesins (Marques et al., 2000; Ng et al., 2000). More recently, we defined Hlp/LBP highly positive C-terminal region as the major adhesive domain of this protein (Soares de Lima et al., 2005). Exploring events that occur beyond *M. leprae* attachment to SC, we also demonstrated that live, but not dead *M. leprae* interfere with the normal endocytic pathway maturation of bacteria-containing phagosomes within SC (Alves et al., 2004).

In the present study, we used different sources of Schwann cells and compare the capacity of *M. leprae* to associate to these cells. Moreover, a detail morphological analysis of *M. leprae* interaction with the ST88-14 human SC cell line was performed by scanning electron microscopy. Finally, using primary human Schwann cells, we investigated by quantitative RT-PCR (qPCR) the effect of *M. leprae* infection on the expression of $\alpha 2$ -laminin and dystroglycan by these cells.

Material and Methods

Mycobacterium leprae

ML prepared from footpads of athymic *nu/nu* mice was kindly provided by J. Krahenbuhl, of the National Hansen's Disease Program, Laboratory Research Branch, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA, through NIAID/NIH contract NO155262. Part of the ML suspension was killed by gamma-irradiation (Adams *et al.*, 2000). Prior to interactive assays with SCs, dead bacteria were stained with FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) or alternatively live ML was pre-labeled with a PKH26 Red Fluorescence cell linker Kit (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Aliquots were stored at -20°C and thawed immediately before use. The quality of labeling was checked by fluorescence microscope.

Schwann cells

The ST88-14 Schwannoma cell line was obtained from Dr. Jonathan A. Fletcher, Harvard University, Boston, MA. ST88-14 cells were maintained in RPMI medium 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, <http://www.cultilab.com.br>), 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin, and 10 mM HEPES. Cultures were kept at 37°C within a humidified 5% CO_2 atmosphere.

Primary SCs were isolated from human and rat nerves as described below. Human primary SCs were isolated from peripheral nerve tissues (a generous gift from Dr. Patrick Wood, University of Miami, Miami, FL). These cells were maintained in a DMEM

medium (Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Hyclone, <http://www.hyclone.com>), 10 nM heregulin, and 2 μ M forskolin in plates previously treated with laminin-1 (Invitrogen). Rat Schwann cells were isolated according to Morissey *et al.*, (1991). Tissue was obtained from adult Wistar rats under aseptic conditions. The animals were killed by ether inhalation, and their sciatic nerves were dissected out and placed into Liebovitz's L-15 medium (Gibco) supplemented with 50 U/ml penicillin and 0.05 mg/ml streptomycin (L-15a). After the epineurium, connective tissue, and blood vessels were stripped off with fine forceps, the nerves were placed in fresh L-15a. The explants were kept for 4 weeks at 37°C in 5% CO₂, changing the medium twice per week. For dissociation, the minced nerves were placed in a 35-mm dish containing 1.25 U/ml dispase (Boehringer Mannheim Biochemicals), 0.05% collagenase (Worthington Biochemicals Corp.), 15% fetal calf serum (FCS), and 25 mM HEPES in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM); (Gibco). The tissue in this solution was triturated in a Pasteur pipette approximately 10 times and was then incubated overnight at 37°C in 7% CO₂. The following day, the explants were dissociated by gentle trituration through a flame-narrowed borosilicate pipette (0.5-1 mm bore), washed 2-3 times in DMEM/10% FCS, and seeded onto polylysine-coated glass coverslips. When the outgrowth around the explants reached a near-confluent monolayer (7-10 d), the explants were lifted off the surface of the culture dish with fine forceps and placed in new dishes with fresh medium. This was continued for approximately 4-5 weeks, at which time the cells forming the outgrowth were primarily SCs. In order to amplify the SC populations, the cells were grown on polylysine-coated tissue culture plastic in the presence of pituitary extract and forskolin (Porter *et al.*, 1986).

The cultures were analyzed on an inverted microscope (Olympus CK2, Hertfordsire, UK) and the images were captured with a Cool Snap digital camera and saved in TIFF format. For purity analysis of SC cultures, cells were immunolabeled with anti-S100 (1:100, DAKO); and nuclei were counterstained with DAPI (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The purity percentage of SCs cultures was estimated by counting the number of S100 positive SCs over the number of nuclei (total number of cells). Detailed immunofluorescence procedures are described below.

SDS-PAGE and Western blot

SCs monolayers were washed twice with PBS and lysed with RIPA buffer (Current Protocols in Molecular Biology). Cell extracts were clarified by centrifugation at 14,000 $\times g$ and protein concentration estimated by the BCA assay kit (Pierce, IL, USA) using BSA as standard. Proteins were fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose (Towbin et al., 1979). The membranes were blocked with 3% low fat milk in Tris-buffered saline containing Tween 20 (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20) (TBS/T/M). Membranes were incubated with the anti-b-dystroglycan monoclonal antibody (1:100) (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, United Kingdom). The membranes were washed with TBS/T and incubated with a goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (Sigma). The signal was detected by enhanced chemiluminescence (ECL Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham Biosciences Inc., NJ, USA) and exposure to HyperfilmTM ECL (GE Healthcare).

Quantitative RT-PCR (TaqMan)

DNA-free total RNA was extracted from SCs treated or not with *M. leprae* at variable time points using Trizol™ (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Total RNA was converted to cDNA using random hexamers and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), as recommended by the manufacturer. Five micrograms of total RNA were reverse transcribed into cDNA and samples were stored at -20°C until further use. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed using an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, <http://www.appliedbiosystems.com>). TaqMan® Universal PCR Master Mix, laminin-α2 (Hs01124077), dystroglycan (Hs01100021), GAPDH (4333764-F) and TaqMan probes were purchased from Applied Biosystems and used according to the manufacturer's instructions. Thermal cycling conditions comprised an initial incubation at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, and annealing and extension at 60°C for 1 min. To normalize the relative expression of the genes of interest, a human GAPDH gene was used as an endogenous control and the expression values obtained were corrected and quantified by converting the cycle threshold (Ct) value into a numerical value by using the following formula: expression value = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

M. leprae- SC interaction assays

SCs (7×10^4 cells ml⁻¹) were seeded on cover slips in RPMI medium. After 48 h of incubation, the culture was washed three times with PBS. FITC-labeled or PKH26 pre-stained *M. leprae* were added at a multiplicity of infection (MOI) of 50. After incubation for variable

periods of time at 37 °C, cells were washed at least 6 times with PBS, stained with 50 µg ml⁻¹ ethidium bromide for 10 min, and fixed briefly with cold methanol. The number of bacteria attached to 100 cells was counted by way of fluorescent microscopy (Optiphot-2 Nikon, Yokohama, Japan).

Alternatively, *M. leprae*-SC interaction was examined by scanning electron microscopy. Cells were treated with irradiated *M. leprae* for periods from 2 to 24h at 37°C and then fixed for 30 min at room temperature in 2.5% glutaraldehyde diluted in 0.1 M sodium cacodylate buffer. After fixation, the cells were washed in the same buffer and post-fixed for 30 min at room temperature in 1% OsO₄ diluted in 0.1 M cacodylate buffer. The material was washed in the same buffer, dehydrated in an ascending acetone series, dried by the critical point method with CO₂, mounted with silver cellotape on aluminum stubs, and coated with a 20-nm thick-layer of gold. The samples were examined under a Jeol JSM 6390-LV microscope. The adhesion/association percentage was quantified using the following method:

$$\% \text{ of adhesion/association} = \frac{\text{number of cells with adhered bacterias} \times 100}{\text{Total number of cells}}$$

Immunocytochemistry

The Schwann cell cultures were seeded on coverslips in an appropriate medium for each cell type and kept in an incubator in a 5% CO₂ atmosphere, at 37° C, up to reaching a 80% - 90% confluence. The medium were then withdrawn, the cells were rinsed with added Calcium PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and three incubations with 0.01% calcium-chloride-added PBS for 15 minutes each were performed. Blocking with

the 5% PBS-diluted non-immune goat serum for thirty minutes; the drops were then tipped off the slides and the primary antibodies were applied to the sections for one and a half hour; followed by rinsing thrice with calcium-PBS, five minutes each bath, and by the second block with PBS-diluted non-immune serum for forty minutes, application of the FITC- and TRITC-conjugated second antibodies, for one hour. The second antibodies were rinsed with three washings with calcium added calcium-PBS and the nuclei were then stained in blue with Hoechst 33342 (DAPI) (Sigma Chemical Company) for three minutes. The sections were then examined on fluorescence microscope (Nikon Eclipse 400). After the staining the coverslips were rinsed with calcium-added PBS and the coverslips were mounted with p-phenylenediamine anti-fading added to 10% glycerine diluted in 0.01M PBS.

The antibodies used in the experiments were the rabbit anti-S100 protein polyclonal antibody (Dako, USA) (1:100 diluted), rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Abcam Inc., MA, EUA) (1:40 diluted), anti-nerve growth factor receptor (NGFr) (DAKO, USA) (1:50 diluted), rabbit anti-myelinic basic protein (MBP) (DAKO, CA, EUA) (1:200 diluted), rabbit anti-glial fibrillary acidic protein 43 (GAP43) polyclonal antibody (Abcam Inc., MA, EUA) (1:40); mouse anti- β dystroglycan (Novocastra Laboratories, UK) (1:80 diluted), FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO) (1:400 diluted); FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin (DAKO) (1:40 diluted) e TRITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (DAKO, CA, USA) (1:40 diluted). The immunolabeled and mounted coverslips were examined on the optical and fluorescence Nikon Eclipse 400 microscope, and on a confocal LSM.

Statistical analysis

To verify whether the differences between the control and *M leprae*-treated cultures were statistically significant in regard of the dystroglycan and α 2-laminin mRNA expression, the non-parametrical Kruskal-Wallis test, followed by the post-hoc tests in order to compare between the three timepoints analysed were performed. Statistica software (Statsoft Inc. Tulsa, USA) was utilized for this purpose.

Results

Phenotypic characterization of Schwann cells

Primary SCs were isolated from rat and human nerves. Cells with long bi- or tripolar processes (that were approximately 5-7 times the width of the cell body) and oval nuclei were counted as SCs while fibroblast (the only other abundant cell type) were identifiable by a much more flattened polymorphic shape with larger round nuclei. SC cultures were immunolabeled with anti-S100 showing a degree of purity over 95%. The primary human Schwann cells exhibited immunoreactivity of diverse neural markers. Positive signals were obtained with S100 and NGFr (Figure 1) but no with MBP (data not shown) indicating a nonmyelinating SC phenotype. S100 protein-immunoreactivity was found in the cytoplasm and in the nuclei of human Schwann cells, while GFAP, a cytoskeletal protein, was present in the cytoplasm. The primary rat and ST88-14 Schwann cells exhibited identical immunoreactivity patterns when compared to human primary SCs (data not shown). The expression of DG by primary rat and human SCs and by ST88-14 SCs was confirmed by western blot analysis with an specific antibody that recognizes the β chain of this protein (Figure 2).

Analysis of M. leprae association to SCs

FICT-labeled irradiated bacteria were incubated at a MOI of 50 with SC monolayers and the capacity of *M. leprae* to interact with cultured SCs was initially monitored by fluorescence microscopy. Figure 3A shows an image of primary human SCs after 2 h of interaction with *M. leprae*, where cells with variable numbers of associated bacteria can be

observed. Figure 3B express the percentage of bacterium-associated cells over an interaction period of 24 h., increasing from approximately 50% at 2 h to 80% at 24 h of incubation. Identical interaction assays were performed with rat primary and ST88-14 SCs, showing a similar degree of *M. leprae* association with these cells (data not shown).

Analysis of M. leprae interaction with SC by scanning electron microscopy

M. leprae interaction with the human ST88-14 cell line was analysed in more detail by SEM. Uninfected cells form a monolayer and show a typical fusiform shape with innumerable filopodia on their surface (Figure 4). These cultures are characterized by the cell-cell contact via great areas of the plasmatic membrane or through extensive prolongations of the cellular membrane (filopodia) that establish points of focal adhesion with neighboring cells and with the substratum (Figure 4).

Schwann cells infected for 2 hours with *M. leprae* showed variation in the number of bacteria adhered on each cell and this event was time dependent. Some cells presented 1, 2 or more adherent bacteria, isolated or in groups (Figure 5A). The images obtained indicated that bacterial adhesion on SC surface occurred by at least two distinct mechanisms: (i) involvement of filopodium around the bacterium (Figure 5B); (ii) without filopodium participation the bacterium being in direct contact with the surface of the host cell (Figure 5C). Ultrastructural analysis of Schwann cell-*M. leprae* interaction, after a 24 h incubation period, showed bacteria adhered in narrow contact with the membrane of the host cell involved or not by filopodium (Figure 6A). In this period of interaction it was frequent the observation of bacteria in process of cellular internalization as demonstrated by depression of the Schwann cell membrane (Figure 6B) or, strongly involved by the filopodia (Figure 6C). In Figure 7 it is possible to observe a bacterium partially in the interior of the host cell

(Figure 7A and B). In addition to morphological observations, the capacity of adhesion of *M. leprae*- to ST88-14 SCs was quantified by SEM. Figure 8 shows 50% of bacterium-associated cells in 2 hours of incubation. This percentage was reduced to 28,3% after 24 h, due to the internalization of the bacteria.

Effect of M. leprae on laminin and dystroglycan expression by SC.

In this section of the study, primary human SCs *M. leprae* were infected with live bacteria and the effect on laminin- α 2 chain and dystroglycan mRNA levels was investigated by qPCR. No significant effect on the levels of α 2-laminin mRNA was observed during the first 48 h of infection (Figure 9A). In contrast, *M. leprae* induced a significant downregulation of dystroglycan mRNA levels in primary human Schwann cells at 24h post-infection, returning, however, to the original levels at 48 of infection. (Figure 9B)

Discussion

Leprosy is a chronic disease with a long incubation period that can last for several years before the manifestation of the first clinical symptoms. During infection, the nerves are thought to be the first tissue to be invaded by *M.leprae*, where the organisms avidly multiply inside Schwann cells. In the absence of an animal experimental model for leprosy, studies focusing on the cellular and molecular mechanisms of nerve damage are limited to the analysis of nerve biopsies of individuals affected by the disease. This restricts the analysis to events that occur very late during disease, the use of in vitro models based on nerve tissue cultures being the only way available to investigate the early events during *M. leprae* invasion of the nerves. In vitro models are also appropriate to corroborate or reject hypothesis emerged from experimental studies or clinical-pathological observations.

Although limited when compared with SC-neuron co-cultures, where SC-axon unit is surrounded by a layer of basal lamina, SC cultures constitute the easiest way available to study the intimate interaction between *M. leprae* and SCs. allowing the answer of basic scientific questions that can give insights into the pathogenesis of nerve damage in leprosy neuropathy. The data herein presented reinforce the idea that SC cultures constitute a good in vitro model to study *M. leprae* host cell interaction based on the following findings: 1) primary SCs can be easily obtained and maintained with a minimal degree of fibroblast contamination, 2) SCs cultures express molecules previously described as playing relevant roles in *M. leprae* adhesion to the nerve; 3) SC cultures express the nonmyelinating phenotype, thought to be more susceptible to *M. leprae* infection; and 4) Both live and irradiated *M. leprae* were shown to readily interact with SC cultures reaching significant levels of association between the first 24 h of incubation.

SCs can be immortalized and in early studies human Schwannoma cells, in particular the ST88-14 Schwannoma cell line has been used to model the primary cell system (Alves et al, 2004; Silva et al., 2008). However, although they are very easy to maintain, these cells display genetic lesions and rearrangements, and primary cells are required to confirm data generated with these cells. In the present study, two different sources of primary SCs were compared with the ST88-14 SCs regarding their expression of neuronal markers and capacity to interact with *M. leprae* showing very similar phenotypes. More over, human and rat primary SCs as well as the human ST88-14 Schwannoma cell line were shown to express dystroglycan and laminin-2 by western blot and RT-PCR, both involved in the process of bacterial adhesion to the nerve fiber. Indeed, confirming a previous study with the ST88-14 SCs (Alves et al, 2004), over 50% of cells were found bearing at least one bacterium at an interaction time as early as 2 h.

A more detailed morphological picture of the adhesion and internalization process of *M.leprae* on SCs was obtained by SEM analysis. The images obtained showed bacterial cell in intimate association with the cell membrane, wrapped or not by cell filapodia. Moreover, after 24 of incubation it was possible to observe some bacteria in the process of cellular internalization. The level of bacterial adherence at 2 h of interaction was confirmed by SEM.to be approximately 50%. However a decrease to half this level was observed at 24 h of interaction, suggestion that at this time point of interaction most adhering bacteria have been already phagocytized and are now intracellularly located. This observation is in agreement with our previous results where active uptake of *M. leprae* by ST88-14 SC was observed by time lapse microscopy and by visualization of internalized bacteria in SC labeled for F-actin with rhodamine-palloidin (Alves et al., 2004). At the earliest time point (4 h), actin accumulation around individual bacteria was observed and

more than 50 % of the SC contained or were associated with at least one bacterium. At 24 h, most bacteria were intracellular with a tendency towards perinuclear localization.

The in vitro Schwann cell-*M leprae* interaction models depicted in this study can be utilized for answering specific questions such as regarding the effect of bacterial infection on message levels and protein expression of adhesion proteins (laminin) and interaction receptors (dystroglycan), involved in *M leprae* interiorization. While no effects on laminin alpha 2 chain mRNA levels was observed during the time frame analysed, live *M. leprae* was able to downregulate the levels of β -dystroglycan mRNA in PHSC cultures, suggesting a potential link of this modulation with the pathogenesis of the leprosy nerve damage. Indeed, dystroglycan has been shown to play an important role in myelin maintenance by connecting elements of the SC cytoskeleton with the basal lamina that surrounds the nerve fiber (Saito *et al.*, 2003); and demyelination is a frequent observation in leprosy patients (Job, 1989). Moreover, Rambukkana *et al.* 2002 has shown that *M. leprae* is able to induce rapid demyelination (as early as 12 hours after *M. leprae* infection) by a contact-dependent mechanism in in vitro and in vivo models. Thus, although the same authors have provided evidence that *M. leprae*-induced demyelination is the result of direct bacterial ligation to and activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase located on the surface of SCs (Tapinos *et al.*, 2006), the direct dystroglycan downregulation by bacterial infection could contribute to this effect.

In conclusion, the results of this study reinforce the use of SCs cultures as in vitro models to study early events in *M leprae*-Schwann cell interaction and, consequently, in leprosy pathogenesis. The generation of novel information regarding the basic biology of

M. leprae can contribute to the development of new tools for leprosy control and ultimately to the true eradication of leprosy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by CNPq/Brazil (individual grant to M.C.V.P. L.A.. was a recipient of a fellowship from IOC-FIOCRUZ. The authors are grateful to Dr. J.Krahenbuhl for providing the ML, Dr. Patrick Wood for providing the human primary SCs., and Judy Grevan for editing the text.

Figure legends

Figure 1. Immunocytochemical labeling of the main neural markers in primary human Schwann cells. (A) S-100-immunoreactivity in cytoplasm (red); (B) DAPI-stained nuclei of human Schwann cells (blue); (C) Cytoplasmic GFAP-immunoreactivity and DAPI-stained nuclei in primary human Schwann cells; (D) DAPI-stained nuclei in control experiment with omission of the anti-S100 primary antibody; DAPI stained nuclei can be seen 200x. (E) NGFr-immunoreactivity on Schwann cells (green); (F) DAPI-stained nuclei; (G) Cytoplasmic NGFr-immunoreactivity and DAPI-stained nuclei in primary human Schwann cells; (H) Control experiment with omission of the anti-NGFr primary antibody. DAPI-stained nuclei can be seen 300x.

Figure 2. Cultures of Schwann cells express dystroglycan. Whole lysates of primary rat and human SCs and of the human ST88-14 cell line were fractionated by SDS-PAGE and proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Blot was developed with an anti- β -dystroglycan followed by incubation with chemo luminescent substrates. The molecular weight marker is indicated on the left.

Figure 3. Kinetic of *M. leprae* association to human primary SCs. In (A), an immunofluorescence image showing SCs bearing several FITC labelled bacterial cells following an incubation period of 24 h. In (B), bars represent the percentage of bacterium-associated cells at 2, 4 and 24 of interaction. Data are presented as the mean \pm SD from 2 independent experiments.

Figure 4. SEM analysis of ST88-14 SCs. Uninfected cells show a typical fusiform shape with innumerable filopodia on their surface. The cell monolayer is characterized by cell-cell contact via great areas of the plasmatic membrane or through filopodia that establish points of focal adhesion with neighboring cells and with the substratum.

Figure 5. SEM analysis of *M. leprae*- ST88-14 SC interaction. Cells were incubated with *M. leprae* for 2 h and then fixed for SEM analysis. Arrows indicate adherent bacteria, isolated or in groups. Some bacteria are completely wrapped by cell filopodia.

Figure 6. SEM analysis of *M. leprae*- ST88-14 SC interaction. Cells were incubated with *M. leprae* for 24 h and then fixed for SEM analysis. Arrows indicate adherent bacteria, completely wrapped by cell filopodia.

Figure 7. SEM analysis of *M. leprae*-internalization into ST88-14 SC. Cells were incubated with *M. leprae* for 24 h and then fixed for SEM analysis. Arrow indicates a bacterium in the process of cell internalization.

Figure 8. Quantitative analysis of bacterium adhesion to SC by SEM. Bars represent the percentage of cells bearing bacterium at 2 and 24 of interaction.

Figure 9. Effect of *M. leprae* infection on laminin- α 2 and β -dystroglycan mRNA levels in SCs. Human primary SCs were infected by *M. leprae* for 2 and 24 h and the levels of

laminin- α 2 chain and β -dystroglycan was assessed by quantitative RT-PCR. Data are presented as the mean \pm SE of 3 independent experiments. * $p < 0,05$.

References

ADAMS, L. B., N. A. SOILEAU, J. R. BATTISTA, and J. L. KRAHENBUHL. 2000. Inhibition of metabolism and growth of *Mycobacterium leprae* by gamma irradiation. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** 68 (1): 1 - 10.

ALVES, L., L. M. LIMA, E. S. MAEDA, L. CARVALHO, J. HOLY, E. N. SARNO, M. C. V. PESSOLANI and L. BARKER. 2004. *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cell depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. **FEMS Microbiology Letters** 238: 429-37.

ANTIA, N. H., and V. P. SHETTY. 1997. **The Peripheral Nerve in Leprosy and Other Neuropathies.** Oxford University Press.

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

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

MORRISSEY, T. K., N. KLEITMAN, and R. P. BUNGE. 1991. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. **J. Neurosci.** 11(8): 2433 - 2442.

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

PORTER, S., M. B. CLARK, L. GLASER, and R. P. BUNGE. 1986. Schwann cells stimulated to proliferate in the absence of neurons retain full functional capability. **J. Neurosci.** 6(10): 3070 - 3078.

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: 297 - 931.

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

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- α 2 chain. **Cell.** 88: 811 - 821.

SAITO, F., A. S. MOORE, R. BARRESI, M. D. HENRY, A. MESSING, S. E. ROSS-BARTA, R. D. COHN, R. A. WILLIAMSON, K. A. SLUKA, D. L. SHERMAN, P. J. BROPHY, J. D. SCHMELZER, P. A. LOW, L. WRABETZ, M. L. FELTRI, and K. P. CAMPBELL. 2003. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. **Neuron** 38: 747 – 758.

SCOLLARD, D. M., L. B. ADAMS, T. P. GILLIS, J. L. KRAHENBUHL, R. W. TRUMAN, and D. L. WILLIAMS. 2006. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.** 19 (2): 338 – 381.

SILVA, T. P., A. C. SILVA, G. M. D. A. BARUQUE, R. B. OLIVEIRA, M. P. MACHADO, and E. N. SARNO. 2008. Morphological and functional characterizations of Schwann cells stimulated with *Mycobacterium leprae*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 103 (4): 363 - 369.

SOARES DE LIMA C., L. ZULIANELLO, M. A. MARQUES, H. KIM, M. I. PORTUGAL, S. L. ANTUNES, F. D. MENOZZI, T. H. OTTENHOFF, P. J. BRENNAN, and M. C. PESSOLANI. 2005. Mapping the laminin-binding and adhesive domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. **Microbes Infect.** 7 (9-10): 1097 - 1109.

TAPINOS, N., M. OHNISHI and A. RAMBUKKANA. 2006. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. **Nat Med.** 12 (8): 961 - 966.

TOWBIN, H., T. STAEHELIN, and J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 (9): 4350 - 4354.

www.cutilab.com.br

www.who.int/lep

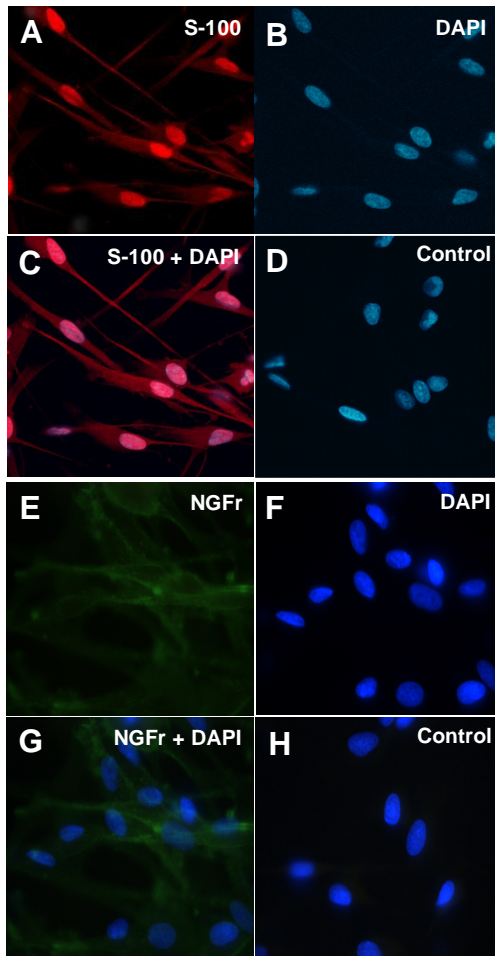


Figura 1

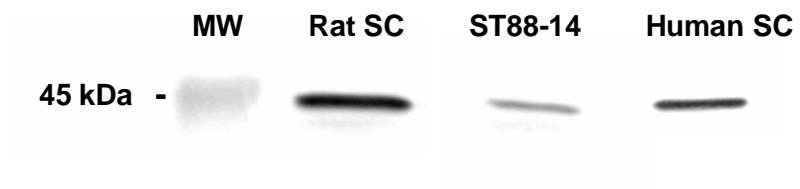


Figura 2

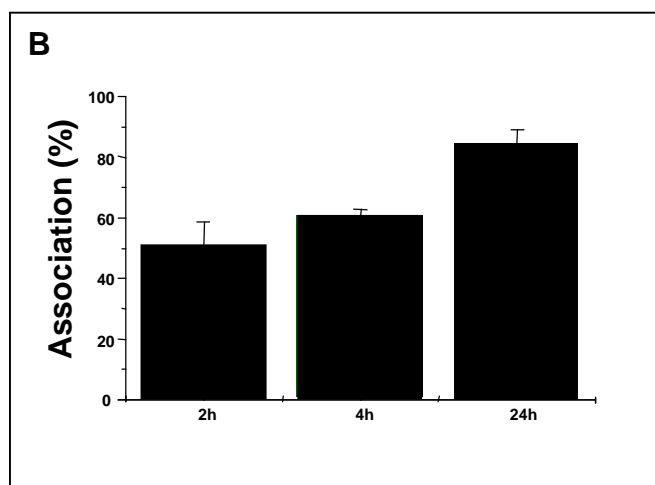
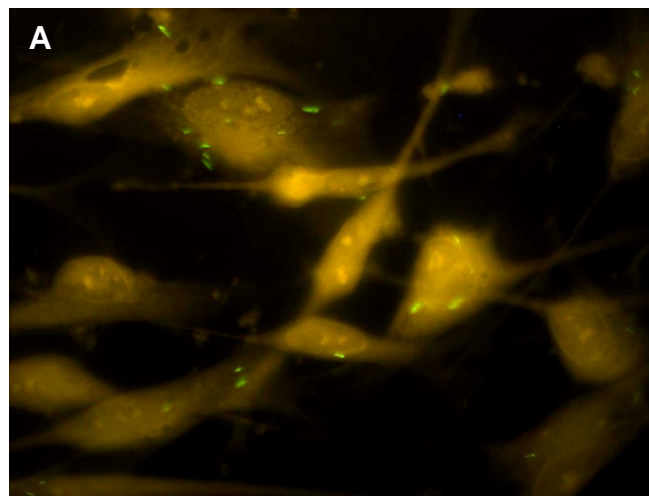


Figura 3

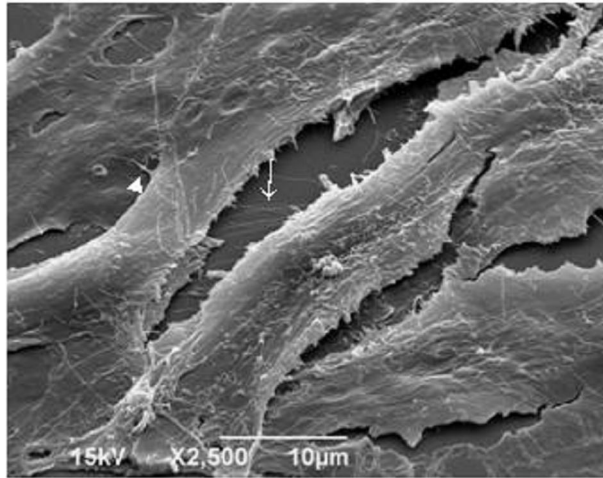


Figura 4

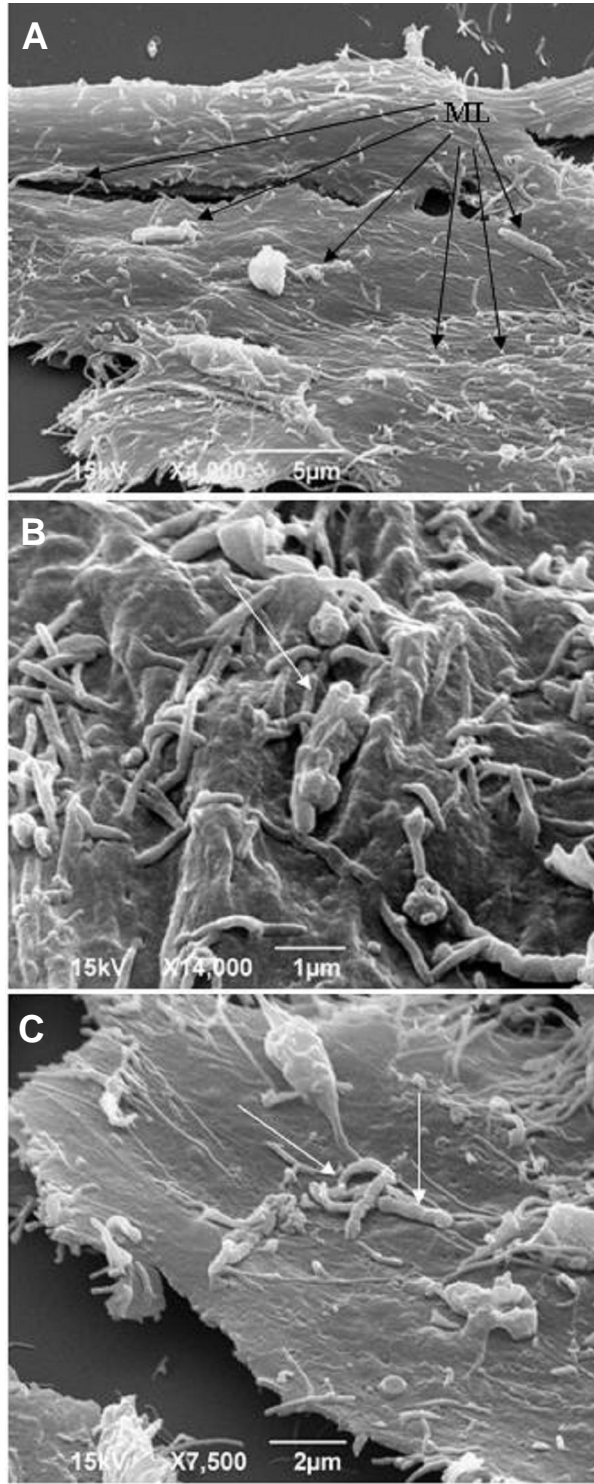


Figura 5

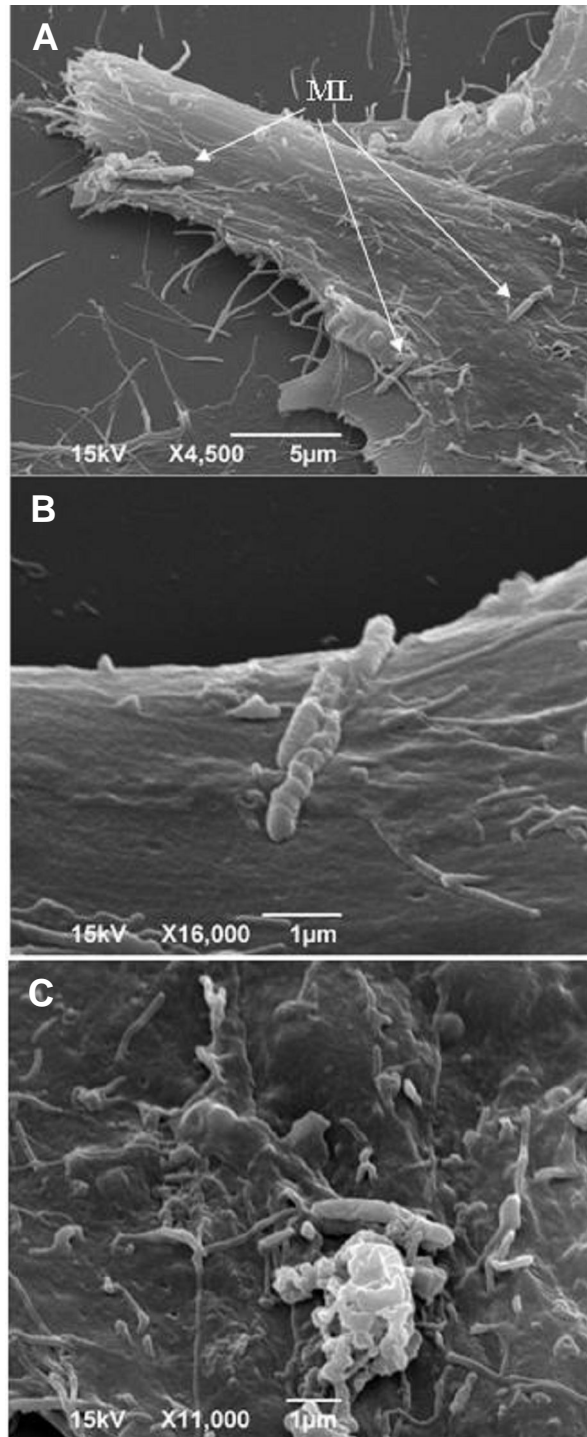


Figura 6

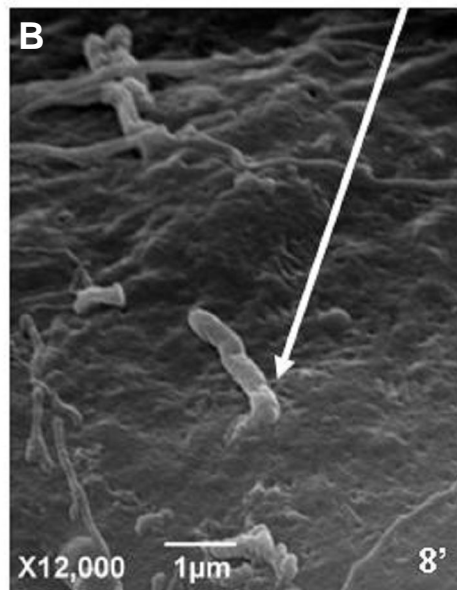
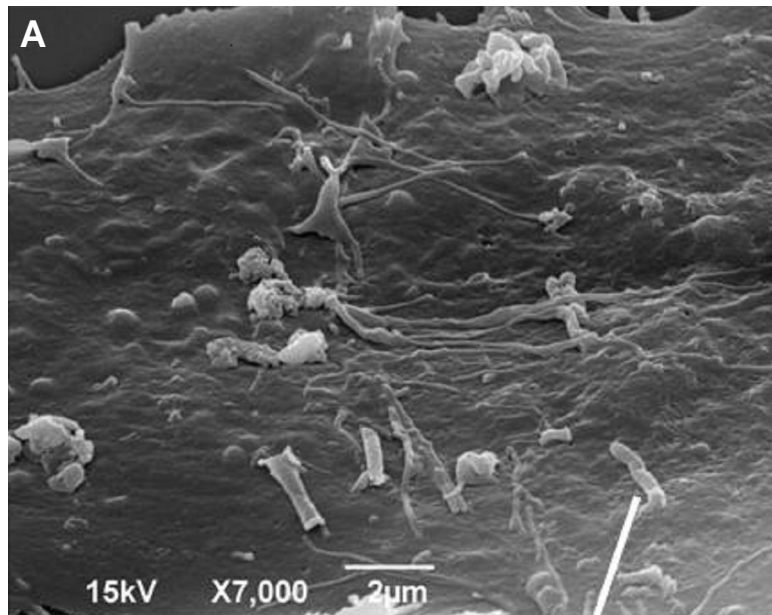


Figura 7

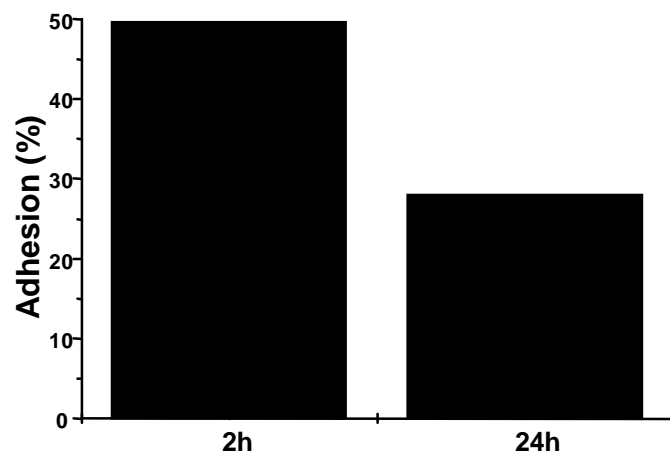


Figura 8

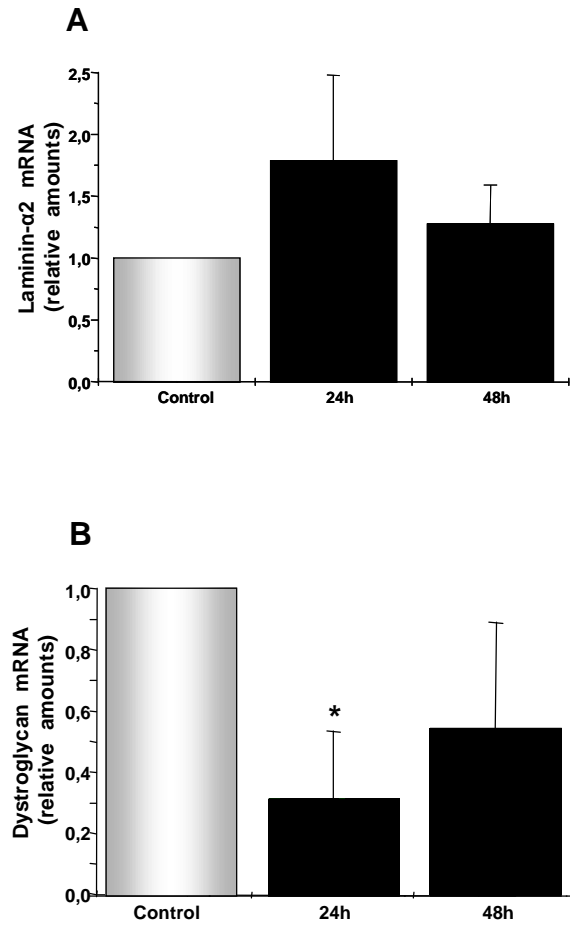


Figura 9

Microfasciculation: a morphological pattern in the leprosy nerve damage associated with desert hedgehog factor downregulation

Autores: Antunes, S. L. G., L. Alves, A. L. Oliveira, M. Ferreira-Medeiros, S. Corte-Real, M. C. V. pessolani, M. R. Jardim, J. A. C. Nery, A. M. Sales & E. N. Sarno.

Artigo em fase de preparação.

----- Forwarded message from jpns@jhmi.edu -----
Date: Sat, 21 Feb 2009 09:10:20 -0500 (EST)
From: jpns@jhmi.edu
Subject: Journal of the Peripheral Nervous System -
Manuscript
PNS-08-11-00117.R1
To: Leny@biof.ufrj.br, leny.cavalcante@gmail.com

PNS-08-11-00117.R1

Leny Cavalcante

Baetas-da-Cruz, Wagner; Alves, Lucineia; Pessolani,
MariaCristina;

Barbosa, Helene; Régnier-Vigouroux, Anne; Corte-Real, Suzana;
Cavalcante, Leny

Schwann cells Express the Macrophage Mannose Receptor and MHC
class

II. Do They Have a Role in Antigen Presentation?

Dear Dr. Cavalcante,

I am pleased to inform you that the manuscript referenced
above has
been accepted for publication by the Journal of the
Peripheral Nervous
System. Manuscript are accepted with the understanding that
they may
be subject to technical editing for style and clarity. Your
manuscript will soon be forwarded to the publisher, and you
will be
sent proofs and reprint forms in due course. You will be
able to
track its progress by accessing the JPNS author website at

<http://mc.manuscriptcentral.com/jpns>
your login: (Person not available)
your password: (Person not available)

You must fill out the copyright agreement form available on
the web
site before final processing of your manuscript.

Sincerely,
David R. Cornblath, MD
Editor-in-Chief

----- End forwarded message -----



Schwann cells Express the Macrophage Mannose Receptor and MHC class II. Do They Have a Role in Antigen Presentation?



Journal:	<i>Journal of the Peripheral Nervous System</i>
Manuscript ID:	PNS-08-11-00117.R1
Manuscript Type:	Research Report
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Baetas-da-Cruz, Wagner; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho Alves, Lucineia; Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Micobacterioses Pessolani, MariaCristina; Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Micobacterioses Barbosa, Helene; Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Laboratório de Biologia Estrutural Régnier-Vigouroux, Anne; INSERM U701, DKFZ, INF 242 Corte-Real, Suzana; Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Laboratório de Biologia Estrutural Cavalcante, Leny; Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica C. Chagas Filho
Key Words:	Glia, Pattern recognition receptor, Innate immunity, Mannosylated protein, Nerve injury



Title: Schwann cells Express the Macrophage Mannose Receptor and MHC Class II. Do They Have a Role in Antigen Presentation?

Authors: Wagner Baetas-da-Cruz^{1,2}, Lucineia Alves³, MariaCristina V. Pessolani³, Helene S. Barbosa², Anne Régnier-Vigouroux⁴, Suzana Corte-Real², *Leny A. Cavalcante¹

Addresses:

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Terapia Celular e Bioengenharia, Laboratório de Neurobiologia do Desenvolvimento, Rio de Janeiro, Brazil
2. Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Laboratório de Biologia Estrutural, Rio de Janeiro, Brazil
3. Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Micobacterioses, Laboratório de Microbiologia Celular, Rio de Janeiro, Brazil
4. INSERM U701 - DKZ D F 242, Heidelberg, Germany

Running Title: Mannose receptor in Schwann cells

* Corresponding author:

Dr. Leny A. Cavalcante
Lab. Neurobiologia do Desenvolvimento,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, CCS, Bloco G
Av. Carlos Chagas Filho, 373
21941-902 Rio de Janeiro, Brazil.
Phone: +55-21-2562-6539
Fax: +55-21-2280-8193
E-mail: Lacav@abc.org.br; e-mail: Leny@biof.ufrj.br

Abstract

The mannose receptor (MR) is a transmembrane glycoprotein, postulated to be a link between innate and adaptive immunity. MR is expressed in several cell types but no information on that is available for Schwann cells (SC). We show that rodent SC in primary cultures take up the MR ligand mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate (man/BSA-FITC) in a highly specific manner and bind an antibody against the C-terminus of the murine macrophage MR (anti-c-MR). After incubation with man/BSA-FITC, flow cytometry demonstrates 90% positive SC cells, a dose-dependent increase in tagged cellular components and near total inhibition of the neoglycoprotein uptake by D-mannose or by the mannosylated protein horseradish peroxidase (HRP). Western blot for MR shows that SC share a unique protein of about 180 kDa with peritoneal resident macrophages. Treatment of cultured SC with interferon γ (IFN- γ) or dexamethasone (DM) followed by addition of man/BSA-FITC and analysis by flow cytometry shows down- or upregulation, respectively, of man/BSA-FITC uptake. Our results show that Schwann cells express the MR in a prospectively functional state and suggest an antigen-presenting function of SC, compatible with a role in infectious/inflammatory states of the peripheral nervous system.

Key words: Glia, Pattern recognition receptor; Innate immunity; Mannosylated protein; Nerve injury

For Peer Review

Introduction

Schwann cells (SC) secrete chemokines and are both source and target of anti- and proinflammatory cytokines such as those that initiate the process of Wallerian degeneration (Rutkowski et al., 1999; Deprez et al., 2001; Awatrami et al., 2002). SC have also been considered as able to drive the immune response including participating in antigen presentation (Rutkowski et al., 1999; Lilje, 2002; Oliveira et al., 2003; Meyer zu Hörste et al., 2008).

Since antigen presentation and cytokine/chemokine secretion are often carried out by macrophages, it remains to be determined whether Schwann cells also express molecules that may provide a link between innate and adaptive immunity. The mannose receptor (MR) has been postulated as such a link, being a pattern recognition receptor (Stahl and Ezekowitz, 1998) expressed in antigen-presenting cells, thus, involved in the phagocytosis of foreign ligands during early phases of the immune response (Review: Taylor et al., 2005).

MR is a transmembrane glycoprotein of approximately 175 kDa with several domains such as the Ca²⁺-dependent lectin-like carbohydrate recognition domains (CRDs), responsible for the binding to mannose, fucose, and *N*-acetylglucosamine (Fiete et al., 1998; Martinez-Pomares et al., 2001), components of plasma membrane glycoproteins from different sources including pathogenic organisms (Wilson and Pearson, 1986; Ezekowitz et al., 1991; Chaverin and Khoo, 1998; Linehan et al., 2001; Mansour et al., 2002). MR is a constitutive receptor, which acts as a pivotal molecule of innate immune response and homeostasis, being important for the recognition and internalization of infectious agents, and also of self-antigens (Linehan et al., 2001; Lee et al., 2002; Al-Nayya et al., 2004). Nevertheless, the mechanisms by which the MR mediates the immune response in tissues are still under investigation (Cambi and Figdor, 2003).

It was previously thought that MR expression was restricted to tissue macrophages including perivascular microglia but it is currently known that it is expressed in other cells such as subsets of endothelial cells, cardiomyocytes, fibroblasts, smooth muscle cells, and myeloid cells (Lew et al., 1994; Soeiro et al., 1999; Linehan et al., 1999; Sheikh et al., 2000; Melzer et al., 2001; Galea et al., 2005; Hespanhol et al., 2005). In addition, MR has been detected in ameboid microglia, retinal pigment epithelium, astrocytes and young neurons both *in vitro* and *in vivo* (Shepherd et al., 1991; Burudi et al., 1999; Marzolo et al., 1999; Burudi and Régnier-Vigouroux, 2001; for review, see Régnier-Vigouroux, 2003). Oligodendrocytes are devoid of MR in the intact adult brain (Burudi and Régnier-Vigouroux,

2001) whereas no information is available on the expression of MR in their structural and functional homologues of PNS – Schwann cells.

In view of the potential immunocompetence of SC and, particularly, of an interest in their character of antigen-presenting cells, we have checked primary SC for the expression of a ~ 180 kDa endogenous protein identical to the MR of peritoneal resident macrophages and the occurrence of a functional mannose-specific C-type lectin receptor system. In addition, we have verified whether the uptake of a ligand for this receptor was regulated by interferon γ (IFN γ) or dexamethasone (DM) which are known regulators of MR expression (Harris et al., 1992; Burudi et al., 1999). We have also shown that a highly mannose-bound ligand and MHC class II colocalize in intracellular domains of SC, thus, implying that antigen capture may be one of the primary roles of the MR in these cells.

Materials and Methods

Animals. Animal care and sacrifice followed the norms established by NHI as well as by the Ethics Committees of Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) and Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Primary Schwann cells cultures. SC were obtained from one month old adult Wistar rats according to a modification by P.M. Wood of the procedure described by Morrissey et al. (1991). Briefly, sciatic nerves were harvested in Leibovitz's L 15 Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), fragmented and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) containing heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Campinas, Brazil). After 30 days, the nerve fragments were treated with 0.5 mg/ml collagenase type I (Worthington Biochemicals, New Jersey, NJ) and 1 mg/ml dispase II (Roche Molecular Biochemicals; Indianapolis, IN) in the CO₂ incubator at 37°C overnight to dissociation. After washes, the cells were cultivated in dishes covered with poly-L-lysine (200 μ g/mL, Sigma Chemical, St. Louis, MO), in DMEM containing 10% FBS, 100 units/mL penicillin (Invitrogen), 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen), 2 μ M forskolin (Calbiochem, La Jolla, CA), and 20 μ g/ml bovine pituitary extract (Biomedical Technologies; Stoughton, MA). After the first passage, Schwann cells were further selected from fibroblasts by an anti-mouse Thy 1.1 antibody (undiluted hybridoma culture supernatant, American Tissue Culture Collection, Manassas, VA) and rabbit complement (Sigma). This resulted in approximately 98% purity Schwann cell cultures as

1
2
3 assessed by S100 (DAKO, Carpinteria, CA) immunoreactivity. SC enriched cultures were maintained
4 in a humidified air/CO₂ (95%/5%) atmosphere at 37°C.
5
6

7
8
9 *Peritoneal resident macrophages.* Murine macrophages were obtained from adult Swiss mice or
10 Wistar rats, either untreated or treated with thioglycollate, by harvesting of the peritoneal cavity,
11 followed by plating of the cell suspension in 24-well culture dishes and incubation in DMEM in a
12 humidified 95% air/5% CO₂ atmosphere at 37°C for 1 hr. Afterward, non-adherent cells were removed
13 by washing and the adherent cells were cultured in the same medium, supplemented with 5% FBS.
14
15
16

17
18
19 *MR immunocytochemistry.* To confirm the identity as MR of a mannose binding protein
20 detected in human Schwann cells (Baetas-da-Cruz, 2006), Schwann cells were reacted with a
21 polyclonal rabbit antibody against the C-terminal of mouse macrophage MR (cMR), produced by
22 Regnier-Vigouroux and co-workers (see Auridi and Régnier-Vigouroux, 2001). Briefly, the cells on
23 coverslips were washed in DMEM before fixing with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C.
24 Subsequently, they were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 20 min and then incubated with the
25 antibody at a dilution of 1:100 in 10% BSA/PBS overnight at 4°C. After incubation with the primary
26 antibody, coverslips were washed in PBS and incubated for 1 h with a goat anti-rabbit secondary
27 antibody conjugated to Cy3, diluted 1:300 in 10% BSA/PBS. Parallel sets of SC were incubated with
28 the secondary antibody only, to serve as controls.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 *SDS-PAGE and immunoblot.* Cell extracts were prepared from SC and mouse or rat peritoneal
40 macrophages and their protein content was measured by the bicinchoninic acid method. Twenty five µg
41 of protein were loaded on 7.5-8.5% SDS-PAGE gels and electrophoresis was performed under non-
42 reducing conditions. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and these were blocked
43 overnight with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TBS/T) and 2% BSA for subsequent
44 incubations. For the immunoblot, the membranes were incubated with the cMR antibody at room
45 temperature for 1hr followed by 4°C overnight. The reacted membranes were extensively washed with
46 TBS/T and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG, washed and incubated with HRP-
47 extravidin (Sigma Extravidin 3 staining kit) for 40 min. The reaction was revealed by the SuperSignal
48 West Picco Kit (Pierce, Rockford, IL) procedure using a Hyperfilm-ECL diagnostic film (Amersham
49 Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
Detection of mannosylated protein binding and S100 immunocytochemistry. Cytochemistry assay with mannosyl/bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate (man/BSA-FITC) binding was performed in order to verify the internalization pattern in rat SC. Living cells adhered on coverslips were washed in Ringer solution and incubated with 50 µg/ml man/BSA-FITC diluted in Ringer labeling solution containing 5 mM CaCl₂ plus 1% BSA at 37°C for 1 h. To prevent quenching of fluorescence, 20 mM of NH₄Cl was added to the labeling solution. Controls were obtained by incubation of the cells with 250 mM D-mannose (Hespanhol et al., 2005) or ~ 1.1 µM HRP (Straus, 1981) diluted in the same labeling solution followed by washing and incubation with 50 µg/ml mannosyl/BSA-FITC as described above.

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
For unequivocal identification of SC from sciatic nerve cultures, cells were treated with a polyclonal brain S100 (Sigma) antibody and man/BSA-FITC. For this purpose, cells were fixed in 1% paraformaldehyde (Sigma) and washed three times with Tris-buffered saline (TBS) – 0.1% saponin (Sigma) and blocked with 10% normal goat serum for 30min. After this, the cells were incubated overnight with the primary antibody (1:100) in TBS 0.1% saponin – 1% BSA, washed once with PBS-0.3 % Triton X-100 and incubated with a CaCl₂-containing mixture in Ringer solution, with 1:400 anti-rabbit IgG-Cy3 and man/BSA-FITC (as previously described). In controls experiments, the anti-S100 antibody was omitted and the cell nuclei were stained with 0.1 µg/mL 4', 6-diamino-phenylindole (DAPI – Sigma) at room temperature for 1 h. After this period, the cells were washed in Ringer solution followed by 0.85% NaCl and the coverslips were mounted on slides with 0.1% p-phenylenodiamine (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) in TBS : glycerol : 0.1 M 9.0 carbonate– bicarbonate buffer (1:7:2). SC, double-labeled with man/BSA-FITC and anti-S100, were examined in a Zeiss epifluorescence photomicroscope.

Flow cytometry-based analysis of the uptake of mannosylated molecules. Flow cytometry was performed according to conventional protocols. Confluent monolayers of SC were harvested by exposure to 10mM EDTA (Sigma) in pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) at 37°C for 10 min. After repeated pipetting to ensure a single cell suspension, cells were washed three times in Ringer solution and incubated with 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, and 100.0 µg/ml of the neoglycoprotein man/BSA-FITC (Sigma) diluted in Ringer solution containing 5mM CaCl₂ and 1% BSA at 37°C for 1 h. To prevent quenching of fluorescence, 20 mM of NH₄Cl was added to the labeling solution. After washed twice in

1
2
3 Ringer solution, the cells were maintained on ice until analysis. Controls were obtained by the addition
4 of a large excess of D-mannose (250mM) or with ~ 1.1 μM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HRP diluted in the same
5 labeling solution at 37°C for 40 min, followed by two washes in Ringer and incubation with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
6 man/BSA-FITC as described above. After washing, the cell suspensions were also kept on ice. Samples
7 were analyzed on a Becton Dickinson FACsCalibur (Mountain View, CA). Gating was set on large
8 granular cells, and 10,000 gated events were collected from each sample. Data were analyzed by using
9 WinMDI 2.8 (Seattle, WA).
10
11
12
13
14
15

16
17 *Treatment of SC with MR modulators.* In order to investigate the regulation of the presumptive
18 MR in SC, cultures were incubated or not with IFN- γ (100 U/ml) or DM (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 18h and then
19 tagged with man/BSA-FITC, and analyzed by flow cytometry.
20
21
22
23
24

25 *Colocalization of mannosylated protein binding and MHC class II in S100-reactive cells.*
26 Sciatic nerve segments were placed in ice-cold DMEM, and then on 12-mm coverslips precoated with a
27 mixture of poly-L-ornithine and laminin and cultured as described for primary Schwann cell cultures.
28 After cultured for 30 days, cells derived by emerging of migrating cells from tissue fragments were
29 incubated or not with IFN- γ (100 U/ml) for 18h and then tagged with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ man/BSA-FITC diluted
30 in Ringer labeling solution containing 5 mM CaCl_2 plus 0.1% BSA at 37°C for 1 h. To prevent
31 quenching of fluorescence, 20 mM of NH_4Cl was added to the labeling solution. Briefly, the cells on
32 coverslips were washed in DMEM before fixing with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C.
33 Subsequently, they were permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 20 min and then incubated with
34 polyclonal anti-S100 antibody (Sigma, 1:100) and monoclonal mouse anti-rat MHC class II (RT1B,
35 clone OX-6; BD Pharmingen, BD Biosciences, Europe). After washing with Ringer solution, purified
36 rat adsorbed anti-mouse IgG (1:200; Vector Laboratories) for MHC class II and goat anti-rabbit
37 secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 405 (1:300; Molecular Probes, Eugene, OR) for S100
38 were added and the sample incubated for 1 hour at room temperature. After this period, the cells were
39 washed in Ringer solution followed by 0.85% NaCl and the coverslips were mounted on slides with
40 0.1% p-phenylenediamine (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) in TBS : glycerol : pH 9.0 carbonate-
41 bicarbonate buffer (1:7:2). SC, triple-labeled with man/BSA-FITC, anti-S100 and MHC class II, were
42 examined in a Zeiss LSM 510 META confocal microscope.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Schwann cells express the macrophage MR

Correlative microscopy of images obtained in phase-contrast optics and S100 immunofluorescence demonstrated S100 reactive cells and revealed ~98% purity in our primary SC cultures.

Incubation of fixed SC with the cMR antibody resulted in evident labeling, widely distributed both on the surface and in the cytoplasmic domain of SC from primary nerve cultures (Fig. 1). Omission of the primary antibody eliminated the respective labeling (not shown).

Primary SC were analyzed for the presence of the MR (~ 180 kDa) by Western blot using cMR polyclonal antibody. Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages were used as a positive control. A single band of ~ 180 kDa was detected in the two cell types (Fig. 2).

Schwann cells bind a mannosyl neoglycoprotein

After incubation of fixed cells with man/BSA-FITC in Ca^{2+} -containing medium there was clear labeling, both on the surface and in the cytoplasmic domain of Schwann cells from primary nerve cultures (Fig. 3B). The occasional S100-negative cells, presumably nerve fibroblasts, were labeled by the neoglycoprotein (compare Fig. 3A and 3B). Omission of the anti-S100 antibody or incubation of cells with man/BSA and high concentrations of D-mannose eliminated the respective labeling (data not shown).

Flow cytometry shows high percentages of neoglycoprotein-labeled SC

The assays of detection and saturation of the presumptive MR in SC by flow cytometry showed a man/BSA-FITC dose-dependent response in the number of tagged receptors (data not shown). The putative MR was efficaciously saturated in SC at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ man/BSA-FITC concentration (Fig. 4A). Man/BSA-FITC tagging revealed 90% of positive SC (Fig. 4A) and the preincubation of cultures with ~1.1 μM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) HRP (data not shown) or 250mM D-mannose inhibited the binding of the man/BSA-FITC (Fig. 4A, B).

The uptake of a MR ligand in SC is regulated by IFN- γ and DM

Regulation of the uptake of MR ligands was tested by treatment with mediators of the immune function. SC cultures were stimulated for 18 h with IFN- γ or DM after which changes in the uptake of man/BSA-FITC were determined by flow cytometry (Fig. 4B). DM induced a substantial (71%) increase in the fluorescent signal in comparison to unstimulated SC (Gmean: 36.10 ± 0.71 versus 21.31 ± 0.45). By its turn, IFN- γ treatment induced 42% reduction in the fluorescent signal with respect to control cultures (Gmean: 11.98 ± 0.11 versus 21.31 ± 0.45).

Colocalization of mannosylated protein binding and MHC class II

Confocal microscopy analysis showed that in SC from sciatic nerve explant cultures, treated with IFN- γ , MHC class II staining colocalized with internalized man/BSA-FITC at perinuclear areas of cells phenotypically identified as SC by the S100 protein marker (Fig. 5A, B). MHC class II reaction was not detected in control cultures untreated by IFN- γ or treated by DM (not shown). Incubation of cultures with the MHC class II control isotype in presence of 250 mM D-mannose resulted in loss of the respective labeling in SC tagged by anti-S100 antibody (not shown).

Discussion

Our results may be summarized as follows: (1) Immunofluorescence and, particularly, the Western blot assays indicate the expression of the macrophages MR (~180 kDa) in SC; (2) SC are able to bind specifically and take up mannosylated proteins, thus, suggesting the presence of a functional MR or MR-like protein in these cells (Figs. 4 and 5); (3) The uptake of a mannosylated neoglycoprotein is decreased by pro-inflammatory IFN- γ and increased by the anti-inflammatory agent DM, suggesting that expression of MR is similarly regulated in SC, astrocytes and microglia; (4) In SC from sciatic nerve explant cultures treated with IFN- γ , MHC class II staining colocalizes with internalized man/BSA-FITC at perinuclear areas, suggesting that both markers are present within endocytic compartments of these cells.

The MR receptor of SC has a molecular weight similar to that of MR of peritoneal resident macrophages. An analogous situation has been known to exist concerning the MR in microglia and in

1
2
3 neural tube derivatives such as the retinal pigment epithelium and astrocytes (Greaton et al., 1996;
4 Burudi et al., 1999; Zimmer et al., 2003).

5
6
7 It may well be asked whether our results could not be due to the occurrence of another member
8 of the MR family such as, for instance, the collagen-binding protein Endo 180. It cannot be ruled out
9 that Endo 180 could coexist with MR in SC as reported in macrophages (Sheikh et al., 2000). However,
10 there is no homology between MR cytoplasmic tail (Harris et al., 1992), used for preparation of the c-
11 MR antibody, and portions of the recently reported Endo 180 aminoacid sequence (Wienke et al.,
12 2006). This suggests that the molecule we identified in SC is indeed the MR CD 206 molecule.

13
14
15 In non-neural systems it has been proposed that MR acts in the clearance system of proteins
16 from the bloodstream and extracellular space (Lansink et al., 1999), enhancing the uptake of lysosomal
17 hydrolases, tissue plasminogen activator, neutrophil-derived myeloperoxidases, and collagen
18 propeptides (Pontow et al., 1992; Lee et al., 2002). A role for Schwann cells in such functions may be
19 important, at least, under pathological conditions. In fact, preliminary results indicate that Schwann
20 cells *in situ* express MR constitutively (Bass da-Cruz, 2006), thus, providing a necessary, although
21 not sufficient, condition for this role.

22
23
24 Schwann cells synthesize (and secrete) many neurotrophic and growth factors, cell adhesive
25 molecules, basement membrane components as well as several receptors during various stages of life
26 (Jessen and Mirsky, 1999). There is evidence that Schwann cells may promote the successful
27 regeneration and restoration of function of damaged nerve in a process that may involve their
28 functioning as non-professional phagocytes, by engulfing cell debris, prior to the guidance of
29 regrowing processes (Band et al., 1986; Vedeler and Fitzpatrick-Klein, 1990; Kury et al., 2001; Lilje,
30 2002). An interesting hypothesis we plan to test is whether the opposing actions of SC and
31 oligodendrocytes on neuritic growth (Aguayo et al., 1981; Caroni and Schwab, 1989) are related to the
32 presence of MR in Schwann cells (this paper) and its absence from oligodendrocytes (Burudi et al.,
33 1999).

34
35
36 An important implication of the MR expression by Schwann cells concerns their proposed use
37 in transplantation for regeneration of lesions of the Central Nervous System (CNS), particularly, those
38 accompanied by cavitation. There is evidence that secondary cavitation in CNS lesion involves
39 activation of macrophages through both the complement receptor type 3 β 2-integrin and the
40 macrophage MR receptor (Fitch et al. 1999). It is known that interleukin-10 and/or glucocorticoids
41 increase the expression of MR in monocyte-derived dendritic cells (Allavena et al., 1998; Longoni et
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 al., 1998; Piemonti et al., 1999). More recently, attempts have been made to clarify the behavioral
4 outcome of using these MR modulators in the acute phase of contusive cord lesions followed, after a
5 delay of days, by SC grafts. Although the beneficial effects of these therapies do not necessarily sum,
6 there were indications that a combination of methylprednisolone and interleukin-10 together with grafts
7 of SC and olfactory ensheathing glia may improve behavioral outcome in spinal cord lesions (Pearse et
8 al., 2004). The authors also emphasized the need to understand the action of those protective agents
9 (actually, MR enhancers) – interleukin-10 and a glucocorticoid – in the transformation of the milieu of
10 the injured spinal cord as such transformation influences the response to transplanted Schwann and
11 other cells.
12
13

14
15
16
17
18
19 Our present results reinforce the notion that Schwann cells may have a role in the immune
20 response, for instance, acting as facultative antigen-presenting cells during inflammation (Lilje, 2002;
21 Cf. Linehan, 2005). Similarly to astrocytes that, under IFN- γ , down-regulate MR expression while
22 upregulating MHC Class II molecule expression and antigen-presentation capacity (Burudi et al., 1999;
23 Gresser et al., 2001), SC may be able to take up antigens via the MR, process and present them to T
24 cells.
25
26
27
28
29

30
31 In summary, our current study documents for the first time the presence of MR in murine
32 Schwann cells, thus reinforcing the importance of these cells as models for the possible role of the
33 peripheral glia in host defense in infectious diseases, neoplasia, and in other degenerative disorders.
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Acknowledgments

Financial support for this work was provided by the Instituto Oswaldo Cruz, the Graduate Vice-Presidency of Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEPG/UFRJ), the Brazilian Council for Science and Technology (CNPq), and the Rio de Janeiro State Foundation for Research Support (FAPERJ). We are grateful to Bruno Avila, Generval L. Batista, and Sergio Luiz de Carvalho for their excellent technical assistance.

For Peer Review

References

- 1
2
3
4
5
6
7 Aguayo AJ, David S, Bray GM (1981). Influences of the glial environment on the elongation of axons
8 after injury: transplantation studies in adult rodents. *J Exp Biol* 95: 231-240
9
10
11 Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L (2004). From pattern recognition receptor to regulator of
12 homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit. Rev. Immunol.* 24:179-192
13
14
15 Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A (1998). IL-10
16 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to
17 macrophages. *Eur J Immunol* 28:359-369
18
19
20
21 Awatramani R, Shumas S, Kamholz J, Scherer SS (2002). TGF β 1 modulates the phenotype of Schwann
22 cells at the transcriptional level. *Mol Cell Neurosci* 19:307-319
23
24
25 Baetas-da-Cruz W (2006). Expression of the Mannose Receptor in Schwann and ST88-14 Schwannoma.
26 Cells (in Portuguese) Ph.D. Dissertation, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo
27 Cruz
28
29
30
31 Band H, Bhattacharya A, Talwar GP (1986). Mechanism of phagocytosis by Schwann cells. *J Neurol Sci*
32 75:113-119
33
34
35 Burudi EME, Régnier-Vigouroux A (2001). Regional and cellular expression of the mannose receptor in
36 the post-natal developing mouse brain. *Cell Tissue Res* 303:301-317
37
38
39 Burudi EME, Riese S, Stahl PD, Régnier-Vigouroux A (1999). Identification and functional
40 characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia* 25:44-55
41
42
43 Cambi A, Figdor CG (2003). Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr*
44 *Opin Cell Biol* 15:539-546
45
46
47 Caroni P, Schwab ME (1989). Codistribution of neurite growth inhibitors and oligodendrocytes in rat
48 CNS: appearance follows nerve fiber growth and precedes myelination. *Dev Biol* 136: 287-295
49
50
51 Chatterjee D, Khoo KH (1998). Mycobacterial lipoarabinomannan: An extraordinary lipoheteroglycan
52 with profound physiological effects. *Glycobiology* 8:113-120
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Deprez M, Lubke U, Verlaet M, Debrus S, Delvenne P, Martin JJ (2001). Detection of cytokines in human
4 sural nerve biopsies: an immunohistochemical and molecular study. *Acta Neuropathol (Berl)* 101:393-
5 404
6
7
8
9 Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, Rose RM (1991). Uptake
10 of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158
11
12
13 Fiete DJ, Beranek MC, Baenziger JU (1998). A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates
14 GalNAc-4-SO₄ binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2089-2093
15
16
17 Fitch MT, Doller C, Combs CK, Andresth GE, Silver J (1999). Cellular and molecular mechanisms of
18 glial scarring and progressive cavitation: In vivo and in vitro analysis of inflammation-induced
19 secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 19:8182-8198
20
21
22
23 Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D (2005). Mannose receptor expression
24 specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia*
25 49:375-384
26
27
28
29 Greaton CJ, Lane KB, Shepherd VL, McLaughlin B (1996). Sequence homology identified between
30 retinal pigment epithelium and the macrophage mannose receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:S910
31
32
33 Gresser O, Hein A, Riese S, Régnier-Vigouroux A. (2000) Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1
34 alpha inhibit through different pathways interferon-gamma-induced antigen presentation, processing
35 and MHC Class II surface expression on astrocytes, but not on microglia. *Cell Tissue Res.* 300:373-
36 382.
37
38
39
40 Harris N, Super M, Rits M, Chang G, Ezekowitz RA (1992). Characterization of the murine macrophage
41 mannose receptor: demonstration that the down regulation of receptor expression mediated by
42 interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood* 80:2363-2373
43
44
45
46 Hespanhol RC, Soeiro MNC, Meuser MB, Meirelles MNSL, Corte-Real S (2005). The expression of
47 mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J*
48 *Histochem Cytochem* 53:35-44
49
50
51
52 Jessen KR, Mirsky R (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve
53 development. *Trends Neurosci* 22:402-410
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Kury P, Stoll G, Muller HW (2001). Molecular mechanisms of cellular interactions in peripheral nerve
4 regeneration. *Curr Opin Neurol* 14:635-639
5
6
7 Lansink M, Jong M, Bijsterbosch M, Bekkers M, Toet K, Havekes L, Emeis J, Kooistra T (1999).
8 Increased clearance explains lower plasma levels of tissue-type plasminogen activator by estradiol:
9 evidence for potentially enhanced mannose receptor expression in mice. *Blood* 94:1330-1336
10
11
12
13 Lee SJ, Evers S, Roeder D, Parlow AF, Risteli J, Risteli L, Lee YC, Feizi T, Langen H, Nussenzweig MC
14 (2002). Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis. *Science* 295:1898-
15 1901
16
17
18
19 Lew DB, Songu-Mize E, Pontow SE, Stahl PD, Rattazzi MC (1994). A mannose receptor mediates
20 mannosyl-rich glycoprotein-induced mitogenesis in bovine airway smooth muscle cells. *J Clin Invest*
21 94:1855-1863
22
23
24
25 Lilje O (2002). The processing and presentation of endogenous and exogenous antigen by Schwann cells
26 in vitro. *Cell Mol Life Sci* 59:2191-2198
27
28
29 Linehan SA, Martinez-Pomares L, da Silva RP, Gordon S (2001). Endogenous ligands of carbohydrate
30 recognition domains of the mannose receptor in murine macrophages, endothelial cells and secretory
31 cells; potential relevance to inflammation and immunity. *Eur J Immunol* 31:1857-1866
32
33
34
35 Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S (1999). Mannose receptor and its putative ligands
36 in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by
37 selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic
38 cells. *J. Exp. Med.* 189:1961-1972
39
40
41
42
43 Linehan S.A (2005). The mannose receptor is expressed by subsets of APC in non-lymphoid organs. *BMC*
44 *Immunology* 6:4 doi:10.1186/1471-2172
45
46
47 Longoni D., Piemonti L., Bernasconi S., Mantovani A., Allavena P (1998). Interleukin-10 increases
48 mannose receptor expression and endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells. *Int. J. Clin.*
49 *Lab. Res.* 28:162-169
50
51
52
53 Mansour MK, Schlesinger LS, Levitz SM (2002). Optimal T cell responses to *Cryptococcus neoformans*
54 mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors. *J*
55 *Immunol* 168:2872-2879
56
57
58
59
60

For Peer Review

- 1
2
3
4 Martinez-Pomares L, Linehan SA, Taylor PR, Gordon S (2001). Binding properties of the mannose
5 receptor. *Immunobiology* 204:527-535
6
- 7 Marzolo MP, von Bernhardt R, Inestrosa NC (1999). Mannose receptor is present in a functional state in
8 rat microglial cells. *J Neurosci Res* 58:387-395
9
- 10
11 Melzer P, Savchenko V, McKanna J (2001). Microglia, astrocytes, and macrophages react differentially to
12 central and peripheral lesions in the developing and mature rat whisker-to-barrel pathway: A study
13 using immunohistochemistry for lipocortin1, phosphotyrosine, S100b, and mannose receptors. *Exp*
14 *Neurol* 168:63-77
15
16
17
- 18
19 Meyer zu Hörste G, Hu W, Hartung HP, Lehmann HC, Kieseier BC (2008). The immunocompetence of
20 Schwann cells. *Muscle Nerve* 41:1-13
21
22
- 23 Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP (1991). Isolation and functional characterization of Schwann cells
24 derived from adult peripheral nerve. *J Neurosci* 11:2433-2442
25
26
- 27 Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Raghubhukana A, Sarno EN, Modlin RL (2003). Expression
28 of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect*
29 *Immun* 71:1427-1433
30
31
32
- 33 Pearse DD, Marcillom AE, Oudega M, Lynch MP, Wood P, Bunge MB (2004). Transplantation of
34 Schwann cells and olfactory ensheathing glia after spinal cord injury: does pretreatment with
35 methylprednisolone and interleukin-10 enhance recovery? *J Neurotrauma* 21:1223-1239
36
37
38
- 39 Piemonti L, Monti P, Allavena P, Leone BE, Caputo A, Di Carlo V (1999). Glucocorticoids increase the
40 endocytotic activity of human dendritic cells. *Int Immunol* 11:1519-1527
41
42
- 43 Pontow SE, Kery V, Stahl PD (1992). Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137:221-244
44
- 45 Régnier-Vigouroux A (2003). The mannose receptor in the brain. *Int Rev Cytol* 226:321-342
46
- 47 Rutkowski JL, Tuite GF, Lincoln PM, Boyer PJ, Tennekoon GI, Kunkel SL (1999). Signals for
48 proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J Neuroimmunol* 101:47-60
49
50
- 51 Sheikh H, Yarwood H, Ashworth A, Isacke CM (2000). Endo180, an endocytic recycling glycoprotein
52 related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and
53 macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci* 113:1021-1032
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 Shepherd VL, Tarnowski BI, McLaughlin BJ (1991). Isolation and characterization of a mannose receptor
4 from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:1779-1784
5
6
7 Soeiro MNC, Paiva MM, Barbosa HS, Meirelles MNSL, Araujo-Jorge TC (1999). A cardiomyocyte
8 mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down-modulated after
9 infection. *Cell Struct Funct* 24:139-149
10
11
12
13 Stahl PD, Ezekowitz RA (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host
14 defense. *Curr Opin Immunol* 10:50-55
15
16
17 Straus W (1981). Cytochemical detection of mannose-specific receptors for glycoproteins with
18 horseradish peroxidase as a ligand. *Histochemistry* 73:39-47
19
20
21 Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and
22 immunity through sugar recognition. *Trends Immunol* 26:104-110
23
24
25 Vedeler CA, Fitzpatrick-Klove L (1990). Receptors for immunoglobulin G demonstrated on human
26 peripheral nerve fibres by electron microscopy. *Neurosci Lett* 115:167-170
27
28
29 Wienke D, Sturge J, Pirinen NJ, Henry LA, Davies GC, Isacke CM (2006). *Endo* 180
30 <<http://info.nature.com/cgi-bin/24/DM/y/hajy0Stkbi0HhK3BD0R0E1>>
31
32
33 Wilson ME, Pearson RD (1986). Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on
34 human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol* 136:4681-4688
35
36
37 Zimmer H, Riese S, Régnier-Vigouroux A (2003). Functional characterization of mannose receptor
38 expressed by immunocompetent mouse microglia. *Glia* 42:89-100
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Legends to the figures

Figure 1. MR immunoreactivity (cMR antibody) in SC. (A) SC showing extensive distribution of the immunoreaction. (B) same field as in A, stained with DAPI. Bar = 25 μ m

Figure 2. Expression of the mannose receptor by SC. The 180-kDa receptor protein was detected in SC using cMR. Expression of MR in SC was compared with receptor content in peritoneal macrophages (M ϕ). MWM = molecular weight markers.

Figure 3. Fluorescent microscope images showing uptake of a mannosylated protein by Schwann cells (SC) cultured from adult sciatic nerve. (A) SC incubated with anti-brain S100 antibody and Cy3-labeled secondary antibody. (B) same field as in A after incubation with man/BSA-FITC. Bar = 30 μ m.

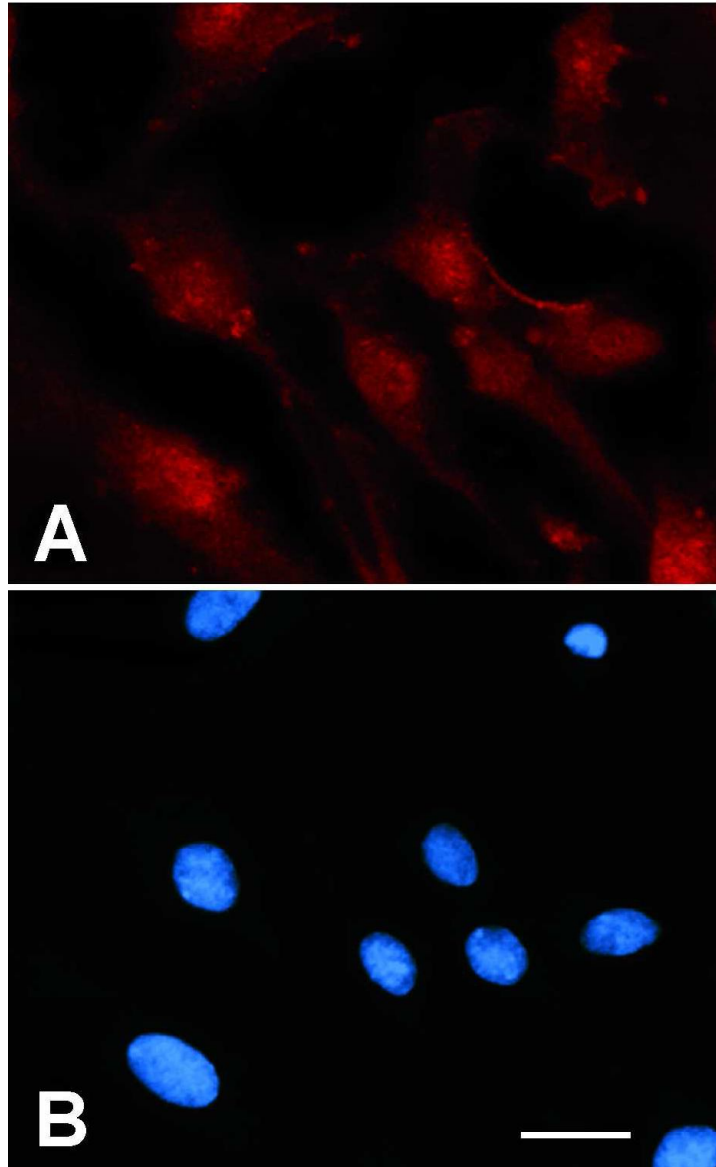
Figure 4. Neoglycoprotein uptake in primary Schwann cells. (A) Flow cytometric analysis of the uptake of man/BSA-FITC in SC. Cells were incubated with the neoglycoprotein at 50 μ g/mL (shaded histogram) or at the same concentration after preincubation of the cells with 250mM D-mannose for 40 minutes (unshaded histogram). (B) Regulation of the uptake of man/BSA-FITC in SC by interferon- γ (IFN- γ) and dexamethasone (DM). Cells were preincubated with IFN- γ or DM for 18 h or left untreated. All cells were incubated with man/BSA-FITC at 50 μ g/mL, with controls for neoglycoprotein labeling being preincubated with 250 mM D-mannose (D-man) for 40 minutes. The experiments were performed three times and quantitative analysis carried out on the geometric means of the data.

Figure 5. Confocal microscopy analysis of the man/BSA-FITC colocalization with MHC Class II molecules in migrating S100-reactive SC from sciatic nerve explant cultures treated with INF- γ for 18h. (A) shows cultured cells incubated with anti-brain S100 antibody and Alexa Fluor 405-labeled secondary antibody (blue); (B) shows the same field after incubation with man/BSA-FITC and anti-rat MHC-II revealed by Cy3. Orthogonal sections on 16 consecutive z-sections showed that this staining pattern was observed even in a plane of z-axis (the images cut at green line and red line were projected in upper and right columns, respectively). MHC Class II staining is found on the cell surface (red dots in B) and is colocalized with man/BSA-FITC punctate staining at perinuclear areas (arrows in B),

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

suggesting that both markers are present within endocytic compartments of SC. Data are representative of three separate experiments. Asterisks indicate cell nuclei. Bar = 20 μ m.

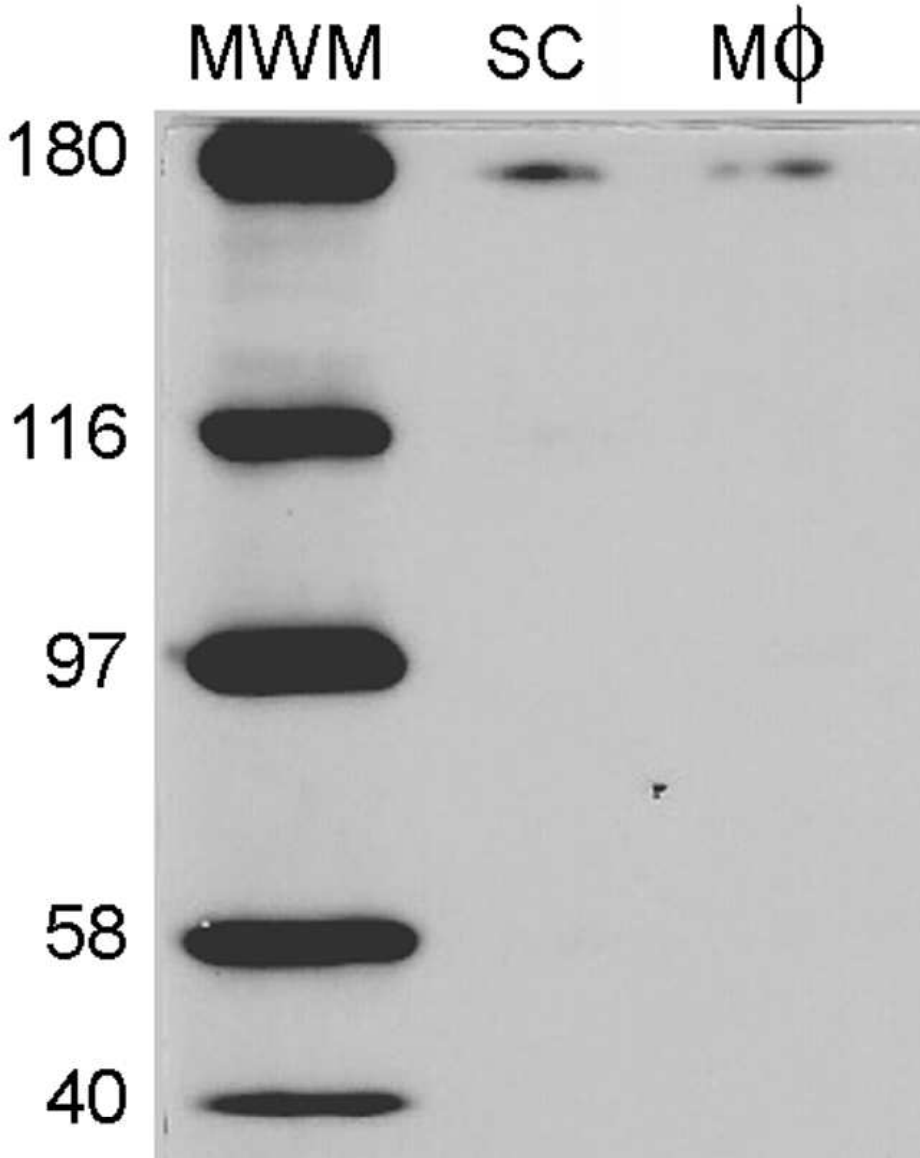
For Peer Review



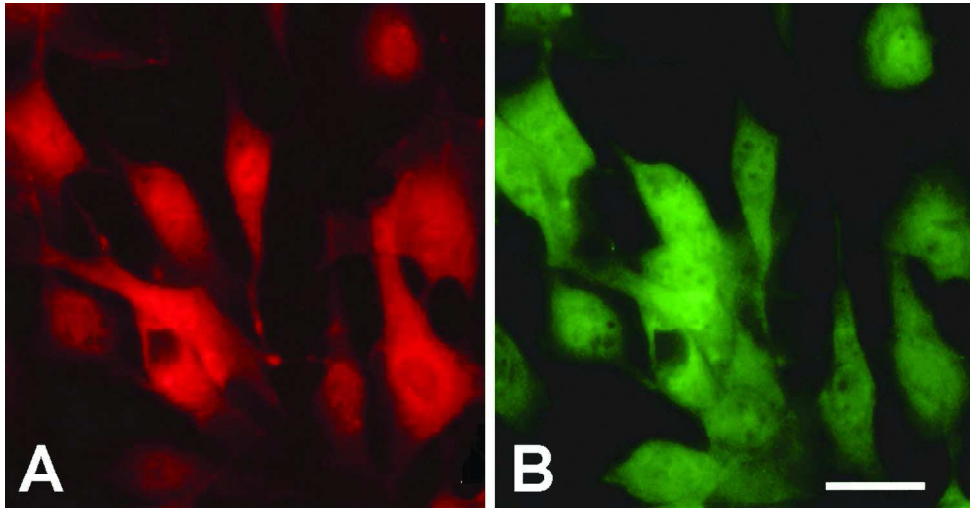
MR immunoreactivity (cMR antibody) in SC. (A) SC showing extensive distribution of the immunoreaction. (B) same field as in A, stained with DAPI. Bar = 25 μ m

79x128mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



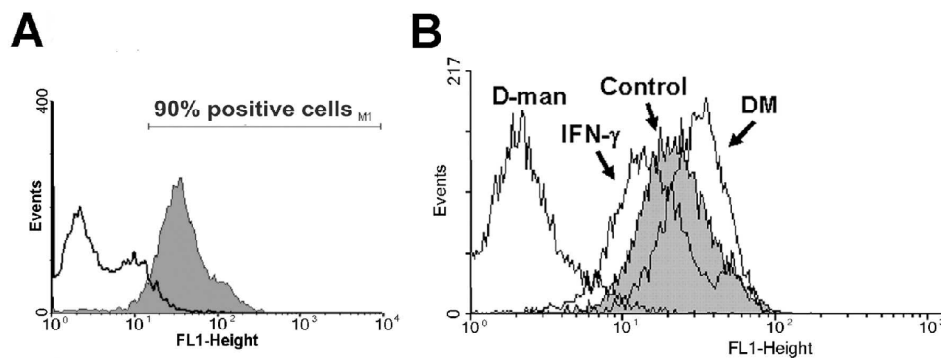
Expression of the mannose receptor by SC. The 180-kDa receptor protein was detected in SC using cMR. Expression of MR in SC was compared with receptor content in peritoneal macrophages (MΦ). MWM = molecular weight markers. 56x68mm (300 x 300 DPI)



Fluorescent microscope images showing uptake of a mannosylated protein by Schwann cells (SC) cultured from adult sciatic nerve. (A) SC incubated with anti-brain S100 antibody and Cy3-labeled secondary antibody. (B) same field as in A after incubation with man/BSA-FITC. Bar = 30 μ m. 127x66mm (300 x 300 DPI)

Peer Review

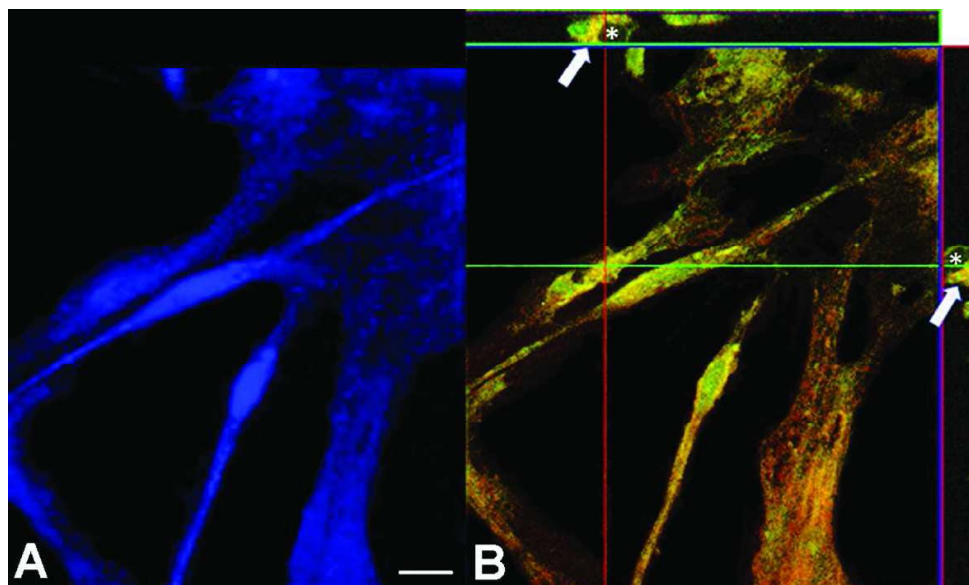
Schwann cells



Neoglycoprotein uptake in primary Schwann cells. (A) Flow cytometric analysis of the uptake of man/BSA-FITC in SC. Cells were incubated with the neoglycoprotein at 50 μ g/mL (shaded histogram) or at the same concentration after preincubation of the cells with 250mM D-mannose for 40 minutes (unshaded histogram). (B) Regulation of the uptake of man/BSA-FITC in SC by interferon- γ (IFN- γ) and dexamethasone (DM). Cells were preincubated with IFN- γ or DM for 18 h or left untreated. All cells were incubated with man/BSA-FITC at 50 μ g/mL, with controls for neoglycoprotein labeling being preincubated with 250 mM D-mannose (D-man) for 40 minutes. The experiments were performed three times and quantitative analysis carried out on the geometric means of the data.

155x78mm (300 x 300 DPI)

Review



Confocal microscopy analysis of the man/BSA-FITC colocalization with MHC class II molecules in migrating S100-reactive SC from sciatic nerve explant cultures treated with INF- γ for 18h. (A) shows cultured cells incubated with anti-brain S100 antibody and Alexa Fluor 405-labeled secondary antibody (blue); (B) shows the same field after incubation with man/BSA-FITC and anti-rat MHC-II revealed by Cy3. Orthogonal sections on 16 consecutive z-sections showed that this staining pattern was observed even in a plane of z-axis (the images cut at green line and red line were projected in upper and right columns, respectively). MHC class II staining is found on the cell surface (red dots in B) and is colocalized with man/BSA-FITC punctate staining at perinuclear areas (arrows in B), suggesting that both markers are present within endocytic compartments of SC. Data are representative of three separate experiments. Asterisks indicate cell nuclei. Bar = 20 μ m.

view

From: **Juan F Madrid** <jfmadrid@um.es>
Date: Mon, Nov 10, 2008 at 3:24 PM
Subject: Re: (paper B-3564)
To: Leny Cavalcante <leny.cavalcante@gmail.com>

August is a bad time in Spain. Many people is on holidays in Spain, but also in other countries; so it is more difficult to find reviewers, specially in the area of your article. Moreover, we were unlucky and the reviewer did not answer on time. Indeed, we have just taken our decission a few minutes ago with only one report. The decission is "accept after minor revision". In these cases, because the modifications are expected to be only a few, we send the article to our reviewer of the English style. I expect that we can send all the documents during next week.

Yours sincerely.

PS: attached you will find the comments of the reviewer. We will send it again with the decission the next week.

Prof. Juan F. Madrid, Editor

HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY
<http://www.hh.um.es>
Department of Cell Biology and Histology
School of Medicine
University of Murcia
E-30100 Espinardo - Murcia
Spain
FAX: +34-968364150

Efficient uptake of mannosylated proteins by a human schwann cell line

Wagner Baetas-da-Cruz^{1,2}, Lucinéia Alves³, Erick V. Guimarães², Alessandra Santos-Silva¹, Maria Cristina V. Pessolani³, Helene S. Barbosa², Suzana Corte-Real² and Leny A. Cavalcante¹

¹Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Laboratory of Developmental Neurobiology, Rio de Janeiro, Brazil, ²Institute Oswaldo Cruz, Laboratory of Structural Biology, Rio de Janeiro, Brazil and ³Institute Oswaldo Cruz, Laboratory of Cellular Microbiology, Rio de Janeiro, Brazil

WBC, SC-R, and LAC contributed equally to this paper

Summary. Complex carbohydrate structures are essential molecules of infectious microbes and host cells, and are involved in cell signaling associated with inflammatory and immune responses. The uptake of mannose-tailed glycans is usually carried out by macrophages, dendritic cells (DCs), and other professional phagocytes to trigger MHC class I- and MHC class II-restricted antigen presentation, and to promote T cell effector responses. Since Schwann cells (SCs) have been proposed as immunocompetent cells, we investigated whether a human cell line (ST88-14 cells) could bind mannosylated ligands in a specific manner. The saturation of uptake of mannosylated molecules by ST88-14 cells and the internalization and distribution pathway of these ligands were tested by cytometry and confocal plus electron microscopy, respectively. This uptake showed a dose-dependent increase, the saturation point being reached at high concentrations of mannosyl residues/240mM mannose. Merging of man/BSA-FITC and S100 labeling showed their partial, but, significant colocalization. Ultrastructural analysis of ST88-14 cells after incubation with HRP-colloidal gold, without or with subsequent chasing at 37°C, showed an initial location on the cell surface and temperature- and time-dependent internalization of the probe. Our findings suggest an efficient mannosylated ligand uptake system through putative lectin(s) that may be operational in inflammatory and immune responses.

Key words: Pattern recognition receptors, Mannose receptor, Endocytic compartments

Introduction

The uptake of mannose-tailed glycans has been identified as an essential mechanism carried out by phagocytes such as macrophages, dendritic cells (DCs) and other professional antigen presenting cells to enhance MHC class I- and MHC class II-restricted antigen presentation, increase T cell proliferation, and promote T cell effector responses. (for reviews, see Taylor et al., 2005). However, it is currently known that not only macrophages and DCs, but also other cells, such as non-professional phagocytes, are able to perform efficient uptake of mannosylated compounds and/or recognition and internalization of infectious agents (for review, see Stahl and Ezekowitz, 1998; Burudi et al., 1999; Hespanhol et al., 2005).

SC has occasionally been considered as a non-professional phagocyte and immunocompetent cell, able to drive the immune response in the Peripheral Nervous System (PNS) and to display a large repertoire of immune-related properties (Rutkowski et al., 1999; Oliveira et al., 2003; Baetas-da-Cruz et al., 2008; Meyer zu Hörste et al., 2008). Such properties include participation in antigen presentation, at least in some conditions such as in leprosy, in which infected SC process and present antigens of *Mycobacterium leprae* to antigen-specific, inflammatory type 1 T cells (Oliveira et al., 2003). In view of this potential immune competence of SC and, particularly, of interest in their character of antigen-presenting cells, we have studied the uptake characteristics of mannosylated proteins in a human Schwann cell line (ST88-14).

Materials and methods

Cell line cultures

The ST88-14 tumor cell line was isolated from a patient with neurofibromatosis type 1 (Ryan et al.,

Offprint requests to: Dr. Leny A. Cavalcante, Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho, 373 – CCS, Bloco G, 21941-902 Rio de Janeiro, Brazil. e-mail: Leny@biof.urfrj.br; Lacav@abc.org.br

Mannosylated proteins uptake by schwannoma cells

1994), and was generously donated by J.A. Flechter (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA). The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf bovine FCS, 1 mM glutamine, 1000U/mL penicillin, and 50 µg/ml streptomycin. All chemicals were from Sigma. The cells, plated in culture dishes or cover slips in 24-well plates (Falcon, Franklin Lakes, NJ), were maintained in a humidified air/CO₂ (95%/5%) atmosphere at 37°C for 24 h.

Flow cytometry-based analysis of the uptake of mannosylated molecules

Flow cytometry was performed according to conventional protocols in order to determine the saturation point of the uptake of mannosylated molecules. Confluent monolayers of ST88-14 cells were harvested by exposure to 10 mM EDTA (Sigma) in pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) at 37°C for 10 min. After repeated pipetting to ensure a single cell suspension, cells were washed three times in Ringer solution and incubated with 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 and 200.0 µg/ml of the neoglycoprotein mannosyl/bovine serum albumin-FITC-conjugated (man/BSA-FITC, Sigma) diluted in Ringer solution containing 5mM CaCl₂ and 1% BSA at 37°C for 1 h. To prevent quenching of fluorescence, 20 mM of NH₄Cl was added to the labeling solution. Controls were obtained by the addition of an excess of 250 mM D-mannose (Hespanhol et al., 2005) or with ~ 1.1 µM (50 µg/ml) HRP (a highly mannosylated ligand – Straus, 1981) at 37°C for 40 min, followed by washes and incubation with 50 µg/ml man/BSA-FITC as described above. Samples were analyzed on a Becton Dickinson FACsCalibur (Mountain View, CA).

Detection of mannosylated protein uptake and S100 immunocytochemistry

Cytochemistry assay with man/BSA-FITC binding was performed in order to verify the internalization pattern in ST88-14 cells. Cells adhered on coverslips were washed in Ringer solution and incubated with 50 µg/ml man/BSA-FITC diluted in Ringer solution containing 5 mM CaCl₂ plus 1% BSA at 37°C for 1 h. Controls were obtained by incubation of the cells with 250 mM D-mannose or ~ 1.1 µM HRP (Straus, 1981) diluted in the same labeling solution followed by washing and incubation with 50 µg/ml mannosyl/BSA-FITC as described above. To confirm the Schwann-like nature of our ST88-14 cells (Ryan et al., 1994) and also for localization of intracellular pool of internalized man/BSA-FITC, cells were fixed and tagged with a polyclonal brain S100 (Sigma) antibody after previous incubation of living cells with 50 µg/ml man/BSA-FITC.

Ultrastructural cytochemistry of a highly mannosylated ligand

The follow-up of the fate of HRP (Straus, 1981) was

done in ST88-14 cells. Living ST88-14 cells adhered to 35 mm Petri dishes were incubated in HRP coupled to 10 nm colloidal gold (HRP/Au) (Sigma) diluted 1:5 (v/v) in Ringer solution containing 5 mM CaCl₂ plus 1% BSA at 4°C for 40 min. After incubation, all cultures were rinsed in the same labeling solution to remove non-adhered particles. Some samples were fixed immediately in 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.2 at 4°C for 1 h. Other cultures were submitted to chase in labeling solution at 37°C for 1 and 3 h. Negative controls were obtained by preincubating the cells with 250 mM D-mannose at 4°C for 40 min. Cells were scraped out of dishes on ice, centrifuged at 900 g for 10 min, and post-fixed in 1% osmium tetroxide (Sigma) in 0.1 M sodium cacodylate buffer containing 3.5% sucrose at 4°C for 30 min. Cells were then washed in the same buffer, dehydrated in acetone, and embedded in PolyBed 812 (Polyscience, Philadelphia, PA). Thin sections were obtained in an OmU3 Reichert ultramicrotome, stained with aqueous 2% uranyl acetate, and examined in a Zeiss EM 10C transmission electron microscope.

Results

Flow cytometry shows a high percentage of neoglycoprotein-labeled Schwannoma cells

A highly homogeneous region was observed by flow cytometry (Fig. 1A). The assays of saturation of the uptake of mannosylated molecules in ST88-14 cells showed a gradual dose-dependent variation in the number of man/BSA-FITC positive cells (Fig. 1B). The saturation point was reached at 100 µg/ml man/BSA concentration (Fig. 1B). Preincubation of ST88-14 cells with ~1.1 µM HRP (data not shown) or 250mM D-mannose inhibited the binding of the man/BSA-FITC (Fig. 1B).

ST88-14 cells uptake a mannosyl neoglycoprotein

To gather information that may confirm the usefulness of a human Schwann-like cell lineage in pathological models, ST88-14 cells were double-labeled with the mannosyl neoglycoprotein and anti-S100 antibody and examined with the Zeiss LSM 510 META confocal microscope. After incubation of fixed cells with the man/BSA-FITC, there was evident labeling with this marker, widely distributed on the cellular surface (Fig. 2A) and also in the intracellular domain (Fig. 2D,G). At the level of the maximal nuclear diameter, there was intense labeling for man/BSA-FITC in perinuclear regions (Fig. 2D). S100 labeling was localized predominantly in the cytoplasm (Fig. 2E,H) and virtually absent from the membrane (Fig. 2B). Merging of man/BSA-FITC and S100 labeling showed that there is significant colocalization of these markers (Fig. 2F,I) suggesting that a major percentage of the mannosyl-binding protein pool is intracellular. Considerable pixel-to-pixel overlap of man/BSA-FITC and S100, which

Mannosylated proteins uptake by schwannoma cells

encompassed several optical sections in the z-series, was observed. Pretreatment of ST88-14 cells with 250 mM D-mannose before the incubation with man/BSA-FITC or $\sim 1.1 \mu\text{M}$ HRP resulted in virtual absence of this label (not shown). Non-specific labeling due to the secondary antibody was not detected in control sections (not

shown).

In order to test whether the mannosylated ligand uptake by ST88-14 is related to the neoplastic transformation, a pilot experiment was performed with human Schwann cells isolated from non-neoplastic tissue (generously donated by P.M Wood - University of

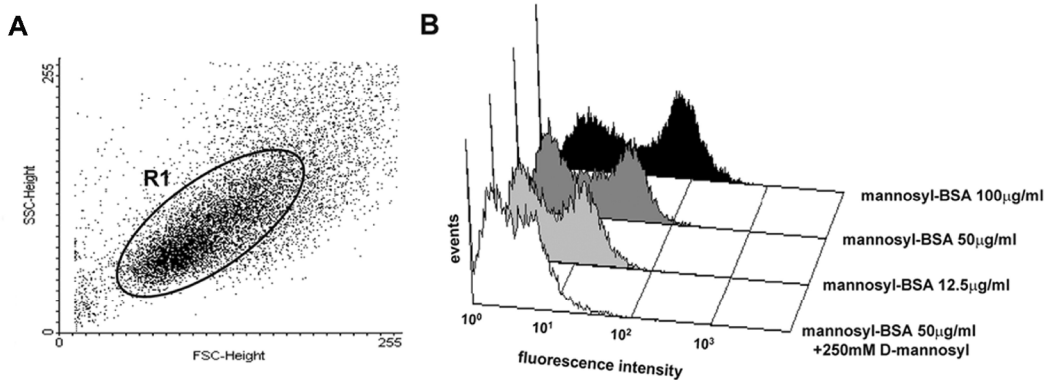


Fig. 1. Flow cytometric analysis of the uptake of man/BSA-FITC in ST88-14 cells. The analysis was performed in the specified region (R1) ST88-14 cells incubated with the man/BSA-FITC in different concentrations (shaded histograms). The saturation point was reached at 100 $\mu\text{g/ml}$ man/BSA-FITC concentration (black histogram). Preincubation of ST88-14 cells with 250mM D-

mannose inhibited the binding of the man/BSA-FITC (unshaded histogram). Data are representative of three separate experiments.

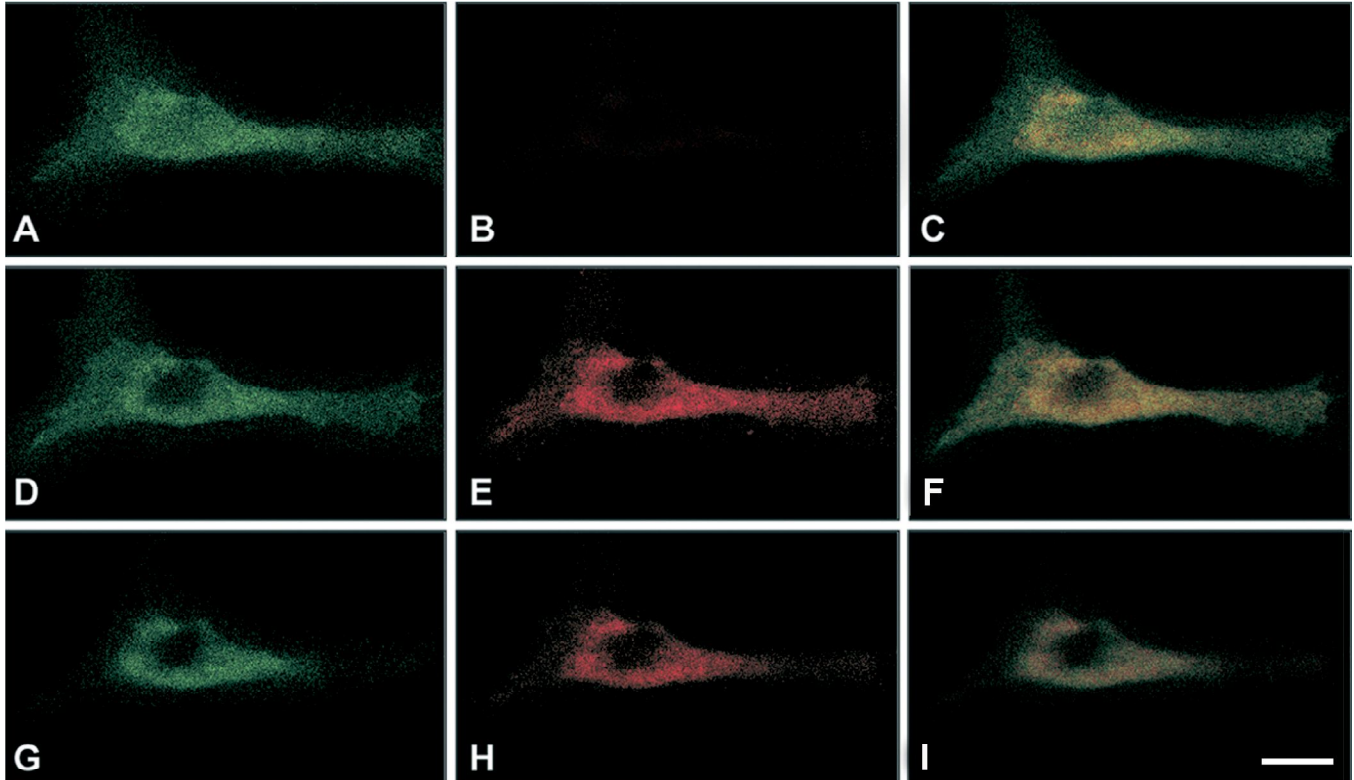


Fig. 2. Confocal microscope images showing uptake of a mannosylated protein and expression of brain S100 by a human Schwann (ST88-14) cell line. The three rows show images of a cell, taken from different optic planes, selected from z-series. Columns (and the three rows) show man/BSA-FITC binding (left-hand column – A, D, G), S100 immunoreactivity (middle column – B, E, H), and their colocalization (right-hand column – C, F, I). The top row represents an optic plane at or near the free surface of the membrane, whereas the two following rows show two planes through the nucleus (nuclear maximal diameter in D, E, F). These results are representative of five separate experiments. Bar: 20 μm .

Mannosylated proteins uptake by schwannoma cells

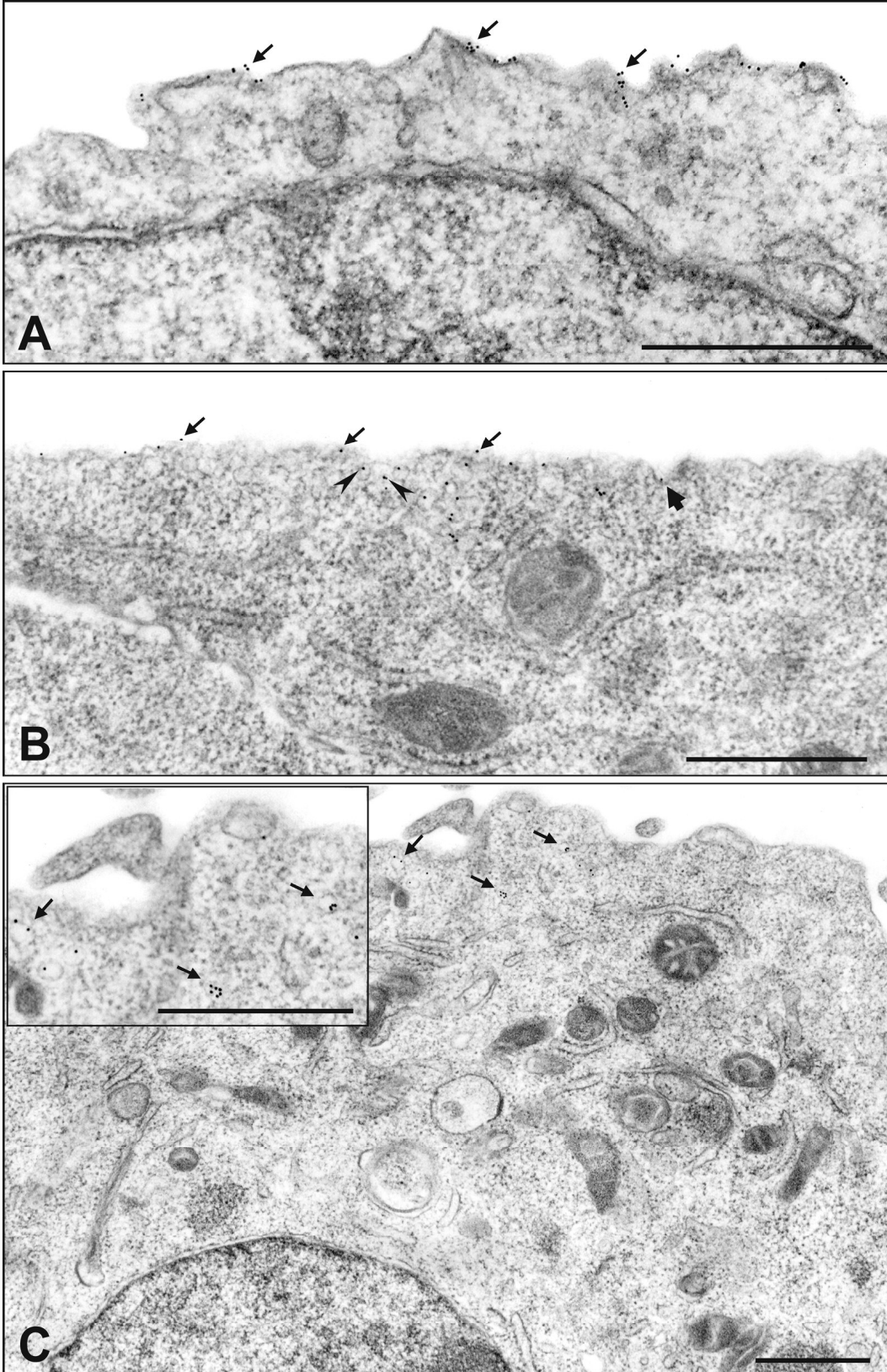


Fig. 3. Ultrastructural analysis showing the localization of MR in ST88-14 cells after incubation with a ligand at different temperatures and time intervals. **A.** Incubation of cells with HRP/Au at 4°C for 40 min reveals numerous gold particles restricted to the cell membrane (arrows). **B.** After washing of HRP/Au and a gradual increase of the temperature to 37°C, maintained for 1 hr, gold particles are still found at the cell surface (arrows) and become abundant in membrane invaginations (thick arrow) as well as within small vesicles (arrowheads) next to the internal face of the plasma membrane. **C.** After chasing for 3 hr at 37°C, virtually all gold particles are found in small vesicles (arrows), indicating MR internalization. The inset is a high magnification view with arrows pointing to some of the numerous HRP/Au-containing vesicles. Bars: 0.5μm

Mannosylated proteins uptake by schwannoma cells

Miami Miller School of Medicine, Miami, FL). In this experiment, similar to that found in ST88-14 cells, normal human Schwann cells, at least from the fixed cultures, showed an intense tagging with man/BSA-FITC (data not shown). Due to limitations on cell yield in cultures from normal human tissue, all other experiments were done on ST88-14 cells only.

ST88-14 cells take up and internalize the mannosylated ligand HRP

To initiate studies of the function of the putative mannosylated ligand uptake system on ST88-14 cells, experiments of HRP/Au internalization were performed. Incubation of the cells with HRP/Au at 4°C for 40 min, followed by washing and fixation, resulted in numerous HRP/Au particles adhered onto the cellular surface (Fig. 3A). In the chasing experiments, in which cells were kept in the labeling solution and the temperature was increased to 37°C for 1 h, some gold particles remained adhered to the cellular surface while others were localized in membrane invaginations, as well as within small vesicles next to the internal face of the plasma membrane (Fig. 3A). After 3 h of chase at 37°C, no adhered gold particles were observed on the cellular surface (Fig. 3C), but vesicles containing one or more gold particles were seen throughout the cytoplasm (Fig. 3C). To discriminate between fluid phase uptake and receptor-mediated uptake, the cultures were co-incubated with HRP/Au and 250 mM D-mannose, which resulted in an obvious reduction in the number of adhered gold particles in agreement with the flow cytometry data.

Discussion

In this work, we show that ST88-14 cells are able to bind specifically and take up mannosylated proteins, thus, suggesting the expression and function of a mannose-specific C-type lectin receptor (ManCTLR) by these cells. We also show that the occurrence of this putative receptor is not linked to neoplastic transformation, since the man/BSA-binding was also detected in SC from human primary cultures.

The prospective functionality of one or more ManCTLR involved in recognition and processing of mannosylated antigens has been inferred from the fate of the mannosylated ligands man-BSA and HRP after uptake by ST88-14 cells. HRP is a glycoprotein devoid of phosphorylated carbohydrates and rich in mannose and N-acetylglycosamine groups (Clarke and Shannon, 1976) that has been usually reported as a label for cytochemical detection of mannosyl binding sites in normal tissue (Straus, 1981) and, more recently, in *Leishmania*-infected dermal cells (Hespanhol et al., 2005). Thus, we used HRP with multiple purposes, namely, as a competitor for man/BSA binding assay and as a probe for the localization and fate of endogenous lectin(s) in an electron microscopic approach.

Both confocal and electron microscopy provided clues to the internalization and distribution pathway of ManCTLR in ST88-14 cells. Double labeling with mannosyl-BSA and S100 showed that there is significant colocalization of these markers suggesting that a major percentage of the ManCTLR cellular pool is intracellular as is the case for the macrophages mannose receptor (Taylor et al., 2005). Although not entirely understood, the colocalization of S100 and of the neoglycoprotein-binding sites seems suitable since both proteins are linked to the Ca²⁺ as well as to the cytoskeleton (Donato, 2001). In HRP/Au ultrastructural experiments, the tracer was found initially adhered to the cellular surface and, after chasing and incubation at 37°C (1–3h), in membrane invaginations and, then, inside small vesicles. Such invaginations and vesicles are probably early endosomes due to their localization near the internal face of the plasma membrane. However, multiple times of incubation are necessary in order to provide additional details on the initial steps of receptor mediated endocytosis in ST88-14 cells.

There is evidence that SC may perform an immune-inflammatory function (for review, see McGreal et al., 2004; Baetas-Da-Cruz et al., 2008) in a process that may involve a role as non-professional phagocytes by engulfing cell debris or microorganisms (Band et al., 1986; Lilje, 2002). This engulfment of cell debris may require the occurrence of a mannosylated ligand uptake system through receptors involved in “clearance” activities such as the killing and ingestion of microorganisms. Furthermore, mannosyl units of lipoarabinomannan from *Mycobacterium leprae* (Khoo et al., 1995) could serve as a putative ligand for the ManCTLR during bacterial adherence to SC.

Our present results reinforce the notion that SC may have a role in the immune response. Although poorly understood, the presumptive immune function of SC has been demonstrated in several peripheral neuropathies (Harboe et al., 2005; Le and Parada, 2007) for instance, acting as facultative antigen-presenting cells during inflammation, in whose course they process and present endogenous and exogenous antigens (Rutkowski et al., 1999; Lilje, 2002). Thus, the expression of ManCTLR can have important implications, not only for understanding how dermal SC recognize self or non-self molecules, but also for understanding the trigger mechanisms for the production of cytokines by these cells. Nevertheless, at least in the case of professional antigen-presenting cells, uptake by ManCTLR has been considered the major mechanism responsible for the enhanced antigenicity seen with mannosylated proteins (Lam et al., 2007). In this way, a better understanding of the SC mechanism associated with the induction of immune responses, as a result of targeting mannosylated antigens, could be important in exploiting mannose-specific C-type lectin for targeted drug carriers or vaccine design. That could not only mount immune defenses against neoplastic and infectious diseases, but also for specific induction of tolerance in the treatment

of autoimmune disease.

In summary, our current study documents for the first time the presence of a mannose-specific C-type lectin receptor(s) in Schwann and Schwannoma cells, thus reinforcing the importance of these cells as models for the possible role of the peripheral glia in host defense in infectious diseases, neoplasia, and in other degenerative disorders, as well as in a putative role for tolerance in cellular therapy.

Acknowledgements. Financial support for this work was provided by the Brazilian Council for Science and Technology (CNPq), and the Rio de Janeiro State Foundation for Research Support (FAPERJ). The excellent technical assistance of Sergio L. Carvalho and Bruno Avila is gratefully acknowledged.

References

- Baetas-da-Cruz W., Castro P., Guimarães E.V., Koatz V.L., Corte-Real S. and Cavalcante L.A. (2008). Increase in nuclear translocation of nuclear transcription factor-kappaB following infection of a human Schwann cell line with *Leishmania amazonensis*. *Br. J. Dermatol.* 158, 631-633.
- Band H., Bhattacharya A. and Talwar G.P. (1986). Mechanism of phagocytosis by Schwann cells. *J. Neurol. Sci.* 75, 113-118.
- Burudi E.M.E., Riese S., Stahl P.D. and Régnier-Vigouroux A. (1999). Identification and functional characterization of the mannose receptor in astrocytes. *Glia* 25, 44-55.
- Clarke J. and Shannon L.M. (1976). The isolation and characterization of the glycopeptides from horseradish peroxidase isoenzyme C. *Biochim. Biophys. Acta* 427, 428-442.
- Donato R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637-668.
- Harboe M., Aseffa A. and Leekassa R. (2005). Challenges presented by nerve damage in leprosy. *Lepr. Ver.* 76, 5-13.
- Hespanhol R.C., Soeiro M. de N.C., Meuser M.B., Meirelles M. de N.S.L. and Corte-Real S. (2005). The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 35-44.
- Khoo K.H., Dell A., Morris H.R., Brennan P.J. and Chatterjee D. (1995). Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan. *Glycobiology* 5, 117-127.
- Lam J.S., Huang H. and Levitz S.M. (2007). Effect of differential N-linked and O-linked mannosylation on recognition of fungal antigens by dendritic cells. *PLoS ONE*; 10:e1009.
- Le L.Q. and Parada L.F. (2007). Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. *Oncogene* 26, 4609-4616.
- Lilje O. (2002). The processing and presentation of endogenous and exogenous antigen by Schwann cells *in vitro*. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 2191-2198.
- McGreal E.P., Martinez-Pomares L. and Gordon S. (2004). Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.* 41, 1109-1121.
- Meyer zu Hörste G., Hu W., Hartung H.P., Lehmann H.C. and Kieseier B.C. (2008). The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle Nerve* 37, 3-13.
- Oliveira R.B., Ochoa M.T., Sieling P.A., Rea T.H., Rambukkana A., Sarno E.N. and 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.
- Rutkowski J.L., Tuite G.F., Lincoln P.M., Boyer P.J., Tennekoon G.I. and Kunkel S.L. (1999). Signals for proinflammatory cytokine secretion by human Schwann cells. *J. Neuroimmunol.* 101, 47-60.
- Ryan J.J., Klein K.A., Neuberger T.J., Leftwich J.A., Westin E.H., Kauma S., Fletcher J.A., DeVries G.H. and 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.
- Stahl P.D. and Ezekowitz R.A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 50-55.
- Straus W. (1981). Cytochemical detection of mannose-specific receptors for glycoproteins with horseradish peroxidase as a ligand. *Histochemistry* 73, 39-47.
- Taylor P.R., Gordon S. and Martinez-Pomares L. (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 26, 104-110.

Accepted February 18, 2008

----- Mensagem Original -----

Assunto: Cellular Microbiology submission - CMI-09-0215
De: cmicro@berkeley.edu
Data: Seg, 8 de Jun, 2009 14:52
Para: cpessola@ioc.fiocruz.br

Dear Dr. Pessolani,

Your manuscript, "*Mycobacterium leprae* induces Insulin-Like Growth Factor and Promotes Survival of Schwann Cells upon serum withdrawal", has been successfully uploaded for submission to Cellular Microbiology. The manuscript has been assigned the reference number CMI-09-0215. Please refer to this number in all communications.

As corresponding author you will receive future communications by e-mail. You can track your on-line submission by logging on to Cellular Microbiology Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/cell-micro> . From the Author Centre click on the manuscript title to view the progress of your submission.

If you encounter any problems with the on-line submission, please contact our online support team at ScholarOne by email (Support@ScholarOne.com) or phone (US: 1-434-817-2040 X167; International: 001-434-817-2040 X167.)

Thank you for submitting your manuscript to Cellular Microbiology.

Yours sincerely,
Bernice M.F. Hoft
Editorial Associate
Cellular Microbiology

***Mycobacterium leprae* induces Insulin-Like Growth Factor and Promotes Survival of Schwann Cells upon serum withdrawal**

Running title: *M. leprae* survival effect on Schwann cells

Luciana Silva Rodrigues¹, Elisa da Silva Maeda¹, Maria Elisabete Costa Moreira², Antonio Jorge Tempone¹, Livia Silva Lobato¹, Victor Túlio Ribeiro-Resende¹, Lucineia Alves¹, Shaila Roessle³, Caio Hajime Yoshida³, Ulisses Gazos Lopes³, Maria Cristina Vidal Pessolani¹▲.

¹Laboratory of Cellular Microbiology, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil; ²Laboratory of Experimental Medicine, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro, RJ 20230-130, Brazil; ³Laboratory of Molecular Parasitology, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil.

▲Corresponding author:

Maria Cristina Vidal Pessolani (Fax: 55-21-2270-9997; Tel.: 55-21-2598-4467; e-mail: cpessola@ioc.fiocruz.br).

Laboratory of Cellular Microbiology

Oswaldo Cruz Institute

Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ

Av. Brasil 4365 – Manguinhos

Rio de Janeiro, RJ 21045-900

Brazil

Summary

Peripheral nerve lesions are considered the most relevant symptoms of leprosy, a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. The strategies employed by *M. leprae* to infect and multiply inside Schwann cells (SCs), however, remain poorly understood. In this study, it is shown that treatment of SCs with *M. leprae* significantly decreased cell death induced by serum deprivation. Not displayed by *Mycobacterium smegmatis* or *Mycobacterium bovis BCG*, the *M. leprae* survival effect was both dose dependent and specific. The conditioned medium (CM) of *M. leprae*-treated cultures was seen to mimic the protective effect of the bacteria, suggesting that soluble factors secreted by SCs in response to *M. leprae* were involved in cell survival. Indeed, by quantitative RT-PCR and dot blot/Elisa, it was demonstrated that *M. leprae* induced the expression and secretion of the SC survival factor insulin-like growth factor-I. Finally, the involvement of this hormone in *M. leprae*-induced SC survival was confirmed in experiments with neutralizing antibodies. Taken together, the results of this study delineate an important strategy for the successful colonization of *M. leprae* in the nerve based on the survival maintenance of the host cell through induction of IGF-I production.

Key words: *Mycobacterium leprae*, Schwann cell, insulin-like growth factor, survival, apoptosis, leprosy, peripheral nerve

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

K827

Kontos, Lucineia Alves

Estudo da interação in vitro do *Mycobacterium leprae* com a célula de Schwann : análise morfológica e avaliação da expressão de moléculas funcionais / Lucineia Alves Kontos. – Rio de Janeiro, 2009.

xiv, 132 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2009.

Bibliografia: f. 116-129

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Célula de schwann. 3. Hanseníase. 4. Nervo periférico. 5. Laminina-2. 6. Distroglicana. 7. Desert hedgehog (Dhh). 8. Gangliosídeo 9-O-acetil GD3. I. Título.

CDD 616 988