



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Larissa Andrade Gonçalves

**Identificação de potenciais ligantes do glicolípido fenólico (PGL I) do  
*Mycobacterium leprae* e seu papel como modulador do metabolismo lipídico  
de células de Schwann humanas**

Rio de Janeiro

2018

Larissa Andrade Gonçalves

**Identificação de potenciais ligantes do glicolípido fenólico (PGL I) do *Mycobacterium leprae* e seu papel como modulador do metabolismo lipídico de células de Schwann humanas**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues

Coorientadora: Prof. Dra. Marcia de Bêrredo Pinho Moreira

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

G635 Gonçalves, Larissa Andrade.

Identificação de potenciais ligantes do glicolípido fenólico (PGL I) do *Mycobacterium leprae* e seu papel como modulador do metabolismo lipídico de células de Schwann humanas/ Gonçalves, Larissa Andrade. – 2018.

84 f.

Orientadora: Luciana da Silva Rodrigues.

Coorientadora: Marcia de Bêrredo Pinho Moreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. *Mycobacterium leprae* - Teses. 2. Hanseníase - Teses. 3. Células de Schwann. 4. Proteoma. 5. Lipídios – Metabolismo - Teses. I. Rodrigues, Luciana da Silva. II. Moreira, Marcia de Bêrredo Pinho. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616-002.73

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Larissa Andrade Gonçalves

**Identificação de potenciais ligantes do glicolípido fenólico (PGL I) do *Mycobacterium leprae* e seu papel como modulador do metabolismo lipídico de células de schwann**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de novembro de 2018.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana da Silva Rodrigues

Faculdade de Ciências Médicas -UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Marcia de Bêrredo Pinho Moreira

Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Thaís Porto Amadeu

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Silvia Amaral

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dra. Leticia Miranda Lery Santos

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha família, que nunca deixou de me incentivar, me apoiar nesta caminhada e em tudo na minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças para superar cada obstáculo. À minha família, por todo apoio, incentivo à minha carreira, por entender quando não podia estar presente e estar ao meu lado nos momentos difíceis e alegres da minha vida. Obrigada por tudo que fizeram por mim, amo vocês. À Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani, por ter aberto as portas do Laboratório de Microbiologia celular, para que eu pudesse iniciar o mestrado. Às minhas orientadoras, Dra. Luciana Silva Rodrigues e Dra. Marcia de Bêredo Pinho Moreira, por toda dedicação, paciência, que sempre acreditaram em mim, por terem me ajudado no momento difícil da minha vida, e também por terem auxiliado a adquirir novos conhecimentos. Obrigada por tudo. À Dra. Chyntia Carolina Díaz Acosta, por todo aprendizado, por ter também me orientado nesta caminhada, pela ajuda nos experimentos, pelos conselhos na minha carreira e por sua amizade. À Dra Letícia Lery, por ter me ajudado na análise das proteínas. Ao Fabrício da Mota Ramalho Costa, por ter me ajudado nos experimentos de bancada. A todos do Laboratório de Microbiologia Celular (IOC-FIOCRUZ) e do Laboratório de Imunopatologia (UERJ), por terem me ajudado de alguma forma, pelos conselhos, amizade, obrigada pelo carinho, por tudo mesmo. Às agências de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PGCM/UERJ) e à Faculdade de Ciências Médicas (FCM/UERJ), por todo suporte e auxílio financeiro, para realização do mestrado. Por fim, aos grupos de amigos, por todo incentivo à minha carreira, pelos conselhos para minha vida, por me darem forças para não desistir, agradeço pela amizade de vocês. Obrigada.

## RESUMO

GONÇALVES, Larissa Andrade. **Identificação de potenciais ligantes do glicolípido fenólico (PGL I) do *Mycobacterium leprae* e seu papel como modulador do metabolismo lipídico de células de Schwann humanas.** 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O glicolípido fenólico, PGL I é uma molécula exclusiva do *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), agente etiológico da hanseníase, localizada na parede celular do bacilo. Sua porção trissacarídica não encontrada em PGLs de outras micobactérias confere especificidade a esta molécula. O PGL I interage com receptores envolvidos tanto na invasão de células hospedeiras pelo *M. leprae* quanto na evasão da resposta imune induzida pela micobactéria. Uma das complicações relacionadas à hanseníase são as lesões nos nervos periféricos, que levam a neuropatias, altamente incapacitantes como resultado da infecção de células de Schwann (CS). Sabe-se que o PGL I está associado ao tropismo do *M. leprae* pela CS por interagir com laminina tipo 2 presente na lâmina basal do nervo periférico. Dados recentes do nosso grupo mostraram que o *M. leprae* e o PGL I *per se*, são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) ricos em colesterol, organelas que se mostraram importantes para a sobrevivência do patógeno. Portanto, este projeto visou compreender de que maneira o PGL I poderia estar influenciando na célula hospedeira, focando essencialmente em vias associadas ao metabolismo lipídico, a síntese de colesterol e formação de CLs. Utilizando técnicas de qRT-PCR, para análise de expressão gênica, imunofluorescência, *cross-linking* e uma reanálise de dados de proteômica *shotgun*, objetivamos: 1) mostrar o papel do PGL I como modulador do metabolismo lipídico em células de Schwann; 2) Analisar potenciais proteínas ligantes do PGL I e verificar sua possível relação com a ativação do fator de transcrição PPAR $\gamma$  e modulação do metabolismo lipídico, buscando, portanto, compreender melhor, a nível molecular, como o *M. leprae* subverte o acúmulo de colesterol a seu favor. Para alcançar estes objetivos, culturas de CS provenientes da linhagem ST88-14 foram estimuladas com a molécula de PGL I *per se* ou com uma cepa recombinante de *M. bovis* BCG que expressa o PGL I (BCG-PGL I). Nossos dados sugerem que o PGL I foi capaz de induzir um aumento na expressão de enzimas como HMGCoA redutase e da enzima ácido graxo sintase (FASN). Além disso, nossos resultados apontam que a molécula PGL I aumentou a expressão do fator de transcrição PPAR $\gamma$  e do gene que codifica a enzima prostaglandina E2 sintase (PGE2S) levando a um aumento da produção de PGE2. Através de uma reanálise de dados de proteômica gerados em nosso laboratório, selecionamos 12 proteínas potencialmente ligantes de PGL I envolvidas no metabolismo lipídico, bem como na formação de CLs. Análises *in silico* destas proteínas expandiram informações com relação sua localização celular e presença de domínios transmembrana. Análise de sequência destas proteínas também reforçaram algumas delas como potenciais ligantes da molécula de PGL I. Acreditamos que os dados gerados a partir deste estudo, poderão contribuir para uma melhor compreensão desta doença e um maior entendimento futuro sobre o desenvolvimento das lesões neurais.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. PGL I. Proteoma.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Larissa Andrade. **Identification of potential ligands of phenolic glycolipid (PGL I) from *Mycobacterium leprae* and its role as modulator of lipid metabolism of human Schwann cells.** 2018. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

The phenolic glycolipid PGL I is an exclusive molecule of *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), the etiological agent of leprosy, located in the cell wall of the bacillus. Its trisaccharide portion not found in PGLs of other mycobacteria confers specificity to this molecule. PGL I interacts with receptors involved both in the invasion of host cells by *M. leprae* and in the evasion of the immune response induced by mycobacteria. One of the complications related to leprosy is peripheral nerve lesions, which lead to highly disabling neuropathies as a result of Schwann cell (CS) infection. It is known that PGL I is associated with *M. leprae* tropism by CS because it interacts with laminin type 2 present in the basal lamina of the peripheral nerve. Recent data from our group show that *M. leprae* and PGL I *per se* are capable of inducing the formation of cholesterol-rich lipid bodies (CLs), which are important organelles for the survival of the pathogen. Therefore, this project aimed to understand how PGL I could be influencing the host cell, focusing essentially on pathways associated with lipid metabolism, cholesterol synthesis and formation of CLs. Using qRT-PCR techniques to analyze gene expression, immunofluorescence, cross-linking and a reanalysis of shotgun proteomics data, we aimed to: 1) show the role of PGL I as a modulator of lipid metabolism in Schwann cells; 2) To analyze potential binding proteins of PGL I and to verify their possible relation with the activation of the transcription factor PPAR $\gamma$  and modulation of the lipid metabolism, seeking, therefore, to understand better, at the molecular level, how *M. leprae* subverts the accumulation of cholesterol to its favor. To achieve these objectives, CS cultures from the ST88-14 lineage were stimulated with the PGL I molecule *per se* or with a recombinant strain of *M. bovis* BCG expressing PGL I (BCG-PGL I). Our data suggest that PGL I was able to induce an increase in the expression of enzymes such as HMGCoA reductase and the enzyme fatty acid synthase (FASN), and our results indicate that the PGL I molecule increased the expression of the PPAR $\gamma$  transcription factor and the gene which encodes the prostaglandin E2 synthase enzyme (PGE2S) leading to increased production of PGE2. Through a reanalysis of proteomics data generated in our laboratory, we selected 12 potentially PGL I-binding proteins involved in lipid metabolism, as well as in the formation of CLs. *In silico* analysis of these proteins expanded information regarding their cellular location and the presence of transmembrane domains. Sequence analysis of these proteins also reinforced some of them as potential ligands of the PGL I molecule. We believe that the data generated from this study may contribute to a better understanding of this disease and a greater understanding of the development of neural lesions.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. PGL I. Proteome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Representação esquemática das diferentes formas clínicas da hanseníase de acordo com Ridley & Jopling, 1966.....	18
Figura 2 –	Taxas de detecção de novos casos de hanseníase no mundo em 2017.....	20
Figura 3 –	Macrófago infectado com <i>M. leprae</i> .....	21
Figura 4 –	Composição da parede celular de bactérias gram negativas, bactérias gram positivas e micobactérias.....	23
Figura 5 –	PGLs das micobactérias.....	24
Figura 6 –	Interação do <i>M. leprae</i> com a célula de schwann.....	27
Tabela 1 –	Sequência dos iniciadores senso e antisenso.....	43
Figura 7 –	Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação de proteínas de células de Schwann da linhagem ST8814 potencialmente ligantes de PGLI.....	47
Figura 8 –	PGL I aumenta a expressão dos genes que codificam as enzimas HMGCR e FASN em células de Schwann.....	50
Figura 9 –	PGL I induz a expressão de PPAR $\gamma$ em células de Schwann.....	51
Figura 10 –	PGL I aumenta produção de PGE2 via PPAR $\gamma$ .....	52
Tabela 2 –	Análise do interactoma do PGL I com proteínas citoplasmáticas e de membrana da CS.....	53
Figura 11 –	Representação esquemática da localização celular das diferentes proteínas do citosol e da fração enriquecida em membrana de CS identificadas pelo interactoma como potenciais ligantes de PGL I.....	54
Figura 12 –	Rede de interação das proteínas de CS identificadas como potenciais ligantes de PGL I e suas interações com PPAR $\gamma$ .....	56
Figura 13 –	Representação esquemática de sítios de ligação de moléculas baseado no modelo 3D predito da proteína vimentina.....	57
Figura 14 –	Potenciais domínios de ligação à glicolípídeo identificados por análise <i>in silico</i> da proteína Vimentina.....	58
Figura 15 –	Interação indireta entre PGL I e vimentina.....	59
Figura 16 –	PGL I modula a expressão de vimentina em células de Schwann.....	60

Figura 17 –	PGL I aumenta a expressão da enzima ácido graxo sintase, FASN em células de Schwann.....	61
Figura 18 –	Representação esquemática de sítios de ligação de moléculas baseado no modelo 3D predito das proteínas Galectinas 1 e 3.....	62
Figura 19 –	Representação esquemática de sítios de ligação de moléculas baseado no modelo 3D predito da proteína VDAC1.....	64
Figura 20 –	PGL I altera o padrão de expressão da proteína PLIN3 em células de Schwann.....	65
Figura 21 –	Potenciais domínios de ligação à glicolípídeo identificados por análise <i>in silico</i> da proteína Perilipina 3.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C	Antes de Cristo
ADC	Albumina bovina, dextrose e catalase
ADRP	Adipofilina
AG	Arabinogalactanos
6-ANAM	6-ANAM-aminonicotinamida
ATGL	Lipase triglicéridica adiposa
ATP	Trifosfato de adenosina
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BALB/c	Camundongos da linhagem BALB/c
BCG	Bacilo de Calmette e Guérin
BB	“borderline-borderline”
BL	“borderline” lepromatoso
BMEC	Células endoteliais microvasculares do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
BT	“borderline” tuberculoide
cDNA	Ácido nucleico complementar
CD4+	Células T auxiliares
CD8+	Células T citotóxicas
Cg	Complexo de golgi
CLs	Corpúculos lipídicos
COX	Ciclooxigenase
CS	Célula de Schwann
Ctp	Citoplasmática
Ctq	Citoesqueleto
CyTD	Citocolasina D
D	Ácido aspártico
DAPI	Dapi-6 diamino-2 fenilindol
DCs	Células dendríticas
DGAT1/2	Diacilglicerol aciltransferase
DMSO	Dimetil sulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dntp	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
E	Ácido glutâmico
Ec	Extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
End	Endossoma
ENH	Eritema nodoso hansênico
ER	Retículo endoplasmático
F	Fenilalanina
FAF2	Fator 2 associado a FAS
FAS	Ácido graxo
FASN	Ácido graxo sintase
G	Glicina
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GW9662	Antagonista de PPAR $\gamma$
HMGCoa redutase	3-hidroxiacetil glutaril coenzima A redutase
HCV	Vírus da hepatite C
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina – 1
IL-	Interleucina
LAL	Lipase ácido lisossomal
LAM	Lipoarabinomanan
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LGALS1	Galactina 1
LGALS3	Galectina 3
LL	Lepromatoso lepromatoso
LM	Lipomanan
LPS	Lipopolissacarídeo
MM	Mieloma múltiplo
M1/2	Macrófagos
MB	Multibacilar
MBP-1	Proteína de <i>Mycobacterium avium</i>
MCP-1	Moléculas de proteína quimiotática de monócitos – 1

Me	Grupamento metila
MEM	Membrana externa da mitocôndria
MI	Mitocondriais
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanesulfônico
MP	Membrana plasmática
NDO-BSA	Albumina de soro-octil-bovino natural
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NOD2	Proteína 2 ligada ao nucleotídeo
NS	Neurite silenciosa
NU	Nucleares
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão salina fosfato
PDIMs	Dimicocerosatos de fitiocerol
PFA	Paraformaldeído
PG	Prostaglandina
PGL I	Glicolípido fenólico 1
PGLs das Micobactérias	Glicolípidos fenólicos micobacterianos
PGL TB	Glicolípido fenólico de <i>M. tuberculosis</i>
PKC $\beta$	Proteína quinase C $\beta$
PLIN1	Perilipina 1 ou adipofilina
PQT	Poliqumioterapia
P	Peptídeo glicano
PPARs	Peroxissomas proliferantes
PPP	Pentose fosfato
PPREs	Proliferadores de peroxissoma
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão intracelular
RIPA	Tampão de lise
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	“Royal Park Memorial Institute”

RR	Reação Reversa
RT	Transcrição reversa
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RXR	Ácido 9-cis retinóico
SFB	Soro fetal bovino
SNP	Sistema nervoso periférico
TAG	Triacilgliceróis
Th	Linfócitos T auxiliares (T helper)
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculoide tuberculoide
TXA2	Tromboxano
VCP	ATPase transicional de retículo endoplasmático
VDAC	Proteína formadora de canal seletivo a ânions dependente de voltagem
VIM	Vimentina
VME	Vesículas de membrana externa
3T3-L1	Linhagem de Adipócitos

## LISTA DE SÍMBOLOS

mL	Mililitro
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
mM	Milimolar
M	Molar
µL	Microlitro
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
°C	Graus Celsius
xg	Força centrífuga
Ng	Nanograma
V	Volts
%	Porcentagem

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
1.1	<b>A Hanseníase e seus principais aspectos clínicos, imunológicos e epidemiológicos</b> .....	
1.2	<b>O agente etiológico da hanseníase</b> .....	17
1.2.1	<u>Glicolípido fenólico 1 (PGL I) e seu papel na etiopatogênese da hanseníase</u> .....	23
1.3	<b>A interação do <i>M.leprae</i> com a célula hospedeira e suas repercussões sobre a lesão neural na hanseníase</b> .....	26
1.4	<b>Corpúsculos Lipídicos: biogênese e mecanismos de modulação da resposta imune</b> .....	30
1.4.1	<u>Implicações do metabolismo lipídico na patogênese da hanseníase</u> .....	31
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	34
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	35
3.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	35
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
4.1	<b>Micobactérias</b> .....	36
4.2	<b>Marcação de <i>M. leprae</i> e BCG-PGL I com o Fluoróforo PKH67 (verde) ..</b>	37
4.3	<b>Recobrimento das esferas de poliestireno (<i>Beads</i>) com PGL I .....</b>	38
4.4	<b>Cultivo e manutenção de células de Schwann da linhagem ST-8814 .....</b>	38
4.5	<b>Deteção de Corpúsculos lipídicos</b> .....	39
4.6	<b>Análise de expressão gênica de vias envolvidas no metabolismo lipídico....</b>	40
4.6.1	<u>Extração de RNA total</u> .....	40
4.6.2	<u>Quantificação dos Ácidos Nucleicos</u> .....	40
4.6.3	<u>Análise da integridade do RNA</u> .....	41
4.6.4	<u>Tratamento das Amostras com DNase RNase-Free</u> .....	41
4.6.5	<u>Síntese de cDNA</u> .....	42
4.6.6	<u>Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real</u> .....	42

4.7	<b>Avaliação da expressão de PPAR<math>\gamma</math>, vimentina, PLIN 3 e FASN na presença de PGL I.....</b>	43
4.8	<b>Medição de PGE2.....</b>	44
4.9	<b>Análise da interação indireta do PGL I com a vimentina.....</b>	44
4.9.1	<u>Análise da sequência dos domínios de ligação ao glicolípido identificados em várias proteínas.....</u>	45
4.9.2	<u>Interactoma.....</u>	46
5	<b>RESULTADOS.....</b>	49
5.1	<b>Avaliação da modulação da expressão de genes envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos por PGL I.....</b>	49
5.2	<b>Seleção de potenciais proteínas de células de Schwann ligadoras do glicolípido PGL I e análise <i>in silico</i> de sua localização celular e presença de domínios transmembrana e interação com o fator de transcrição PPA<math>\gamma</math>..</b>	52
5.3	<b>Análise <i>in silico</i> de possíveis sítios de ligação presentes em domínios proteicos capazes de reconhecer a molécula PGL I como um possível ligante.....</b>	52
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	67
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	74
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	75

## INTRODUÇÃO

A hanseníase, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), é uma doença inflamatória crônica que acomete a mucosa das vias aéreas superiores, pele e nervos periféricos levando a deformidades físicas altamente incapacitantes (1). Apesar de remontar aos tempos bíblicos (apresentando, inclusive, relatos de casos no Egito a 4.300 anos a.C.), a doença permanece como um problema de saúde pública que aflige milhares de pessoas mundialmente (2). Ao lado do elevado número de novos casos registrados a cada ano, cerca de 200 mil, destaca-se ainda o estigma que acompanha a doença até os dias atuais, o qual afeta muito a vida dos indivíduos nos seus aspectos físicos, psicológicos, sociais e econômicos devido à associação com fatores como crenças, medos, preconceitos e sentimento de exclusão que impactam a busca ao tratamento (3).

Conhecida como “lepra”, em 1970 o Brasil extinguiu oficialmente este termo e substituiu por “hanseníase” em homenagem ao médico norueguês Gerhard Armauer Hansen (1841-1912), que em 1873 descobriu o agente etiológico da infecção. As lesões no nervo e deformidades físicas características da hanseníase são explicadas pelo tropismo do *M. leprae* pela célula de Schwann (CS) dos nervos periféricos (4). Esta interação se dá pela aderência específica do *M. leprae* ao domínio globular (domínio G) da cadeia alfa 2 da laminina-2, isoforma mais abundante de laminina presente na lâmina basal e que envolve a CS (5). Esta ligação parece ocorrer por meio de duas principais adesinas na superfície da bactéria: o glicolípido fenólico I (PGL I) (6) e a proteína semelhante à histona (Hlp) (7-8). Particularmente, o PGL I está presente exclusivamente no *M. leprae* e é responsável pela especificidade imunológica ao bacilo.

Dados publicados pelo nosso grupo mostraram que o *M. leprae* e o PGL I *per se*, foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (CLs) ricos em colesterol, estas organelas são relevantes para a sobrevivência do patógeno na célula hospedeira (9-10). Assim, o presente estudo buscou compreender melhor o papel do PGL I na gênese dos CLs, além de identificar possíveis alvos moleculares que possam explicar os mecanismos utilizados por este antígeno específico do *M. leprae*, na modulação do metabolismo lipídico e que possam subverter o acúmulo de colesterol a seu favor durante a interação com a CS.

## 1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 A Hanseníase e seus principais aspectos clínicos, imunológicos e epidemiológicos

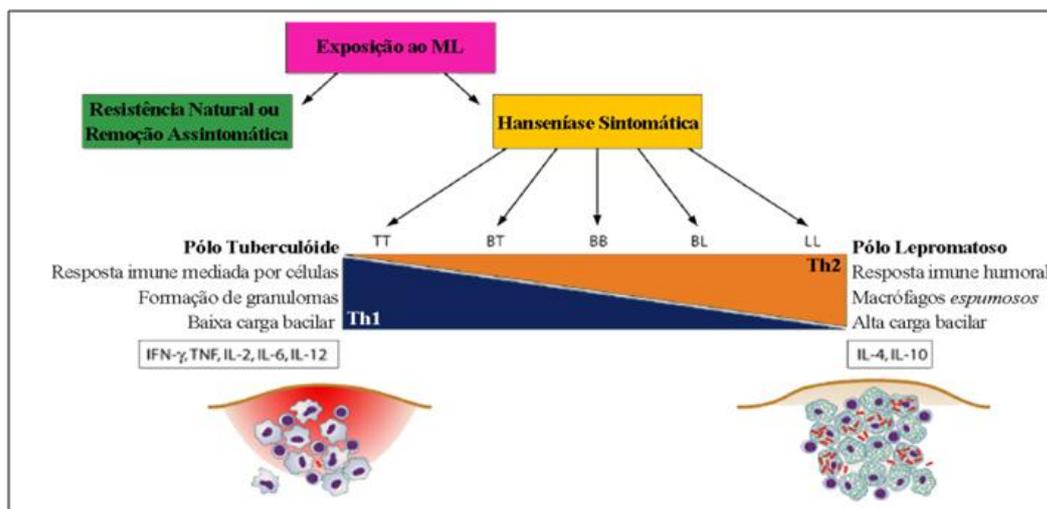
Uma das doenças mais antigas de que se tem relato, a hanseníase é uma micobacteriose de caráter crônico, que afeta a pele e os nervos periféricos devido ao tropismo do *Mycobacterium leprae* por macrófagos e células de Schwann (11). Até os dias atuais, a via de transmissão mais aceita, é a via do trato respiratório e acredita-se que a bactéria seja transmitida de pessoa para pessoa pelo contato direto, por um longo período, de um indivíduo saudável com paciente infectado (12). A doença apresenta um longo período de incubação, podendo levar de 3-10 anos para sua manifestação (13-14) e pode acometer indivíduos de todas as idades e de ambos os sexos. O bacilo inalado atinge, então, a mucosa respiratória e se espalha pelo organismo (15). Os tecidos primeiramente infectados pelo *M. leprae* são os sítios superficiais da pele e o nervo devido sua preferência por baixas temperaturas. Porém, outros órgãos podem ser afetados quando a doença não é controlada (16). Inúmeros fatores contribuem para a susceptibilidade à hanseníase, tais como fatores genéticos do hospedeiro, fatores ambientais, estado nutricional, vacinação com BCG e a taxa de exposição ao *M. leprae* (17).

O diagnóstico da hanseníase é principalmente clínico, com identificação de lesões com alteração de sensibilidade. Em unidades de referência são, ainda, realizados exames adicionais para a determinação do índice bacteriológico por meio de esfregaço de linfa, assim como análises histopatológicas (18). A poliquimioterapia (PQT) é um tratamento simples e altamente efetivo, embora considerado longo, que pode ser empregado na cura de todas as formas clínicas da hanseníase. São utilizadas em geral uma combinação de três drogas: rifampicina, clofazimina e dapsona. O esquema terapêutico depende muito das formas clínicas da doença. De uma maneira geral em pacientes multibacilares (MB) é recomendado uma combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona pelo período de 12 meses, já para os paucibacilares (PB) são utilizadas apenas rifampicina e dapsona por 6 meses (19-20).

A hanseníase pode se manifestar dentro de um amplo espectro de formas clínicas. Atualmente, a classificação mais adotada na pesquisa é a descrita por Ridley & Jopling (1966), fundamentada no aspecto clínico e histopatológico das lesões, na resposta imune do

hospedeiro e na carga bacilar. Assim, foram definidas as formas polares e interpolares da doença, conforme apresentadas na Figura 1. Nesta classificação, o polo tuberculoide (TT) é caracterizado pelo padrão de resposta do tipo Th1 com características pró-inflamatórias, onde a interleucina-2 (IL-2), age como um fator de crescimento autócrino para células T auxiliares CD4+, que secretam interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) ativando macrófagos (imunidade celular), levando a diminuição da carga bacilar. Já no polo lepromatoso (LL), o padrão de resposta é do tipo Th2 com características anti-inflamatórias, com a presença de células T auxiliares CD8+, onde a IL-4 age como um fator de crescimento para células T supressoras, estimulando a diferenciação de células B e a produção de anticorpos (imunidade humoral). As formas intermediárias, são denominadas *borderline*, que são *borderline tuberculoide* (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline lepromatoso* (BL), as quais oscilam entre as manifestações da forma TT e LL (21).

Figura 1 - Representação esquemática das diferentes formas clínicas da hanseníase de acordo com Ridley & Jopling, 1966



Legenda: As formas clínicas da hanseníase apresentam dois polos, polo tuberculóide (TT) e polo lepromatoso (LL), com as diferentes formas intermediárias “borderline tuberculoide” (BT), “borderline borderline” (BB) e “borderline lepromatoso” (BL). O padrão de resposta Th1 é observado nas formas TT, BT e BB, apresentando características pró-inflamatórias, onde IFN- $\gamma$  ativa os macrófagos (imunidade celular) levando a diminuição da carga bacilar e formação de granulomas. As formas LL e BL exibem um padrão de resposta Th2, com características anti-inflamatórias levando a produção de anticorpos (imunidade humoral) apresentando alta carga bacilar e formação de macrófagos espumosos.

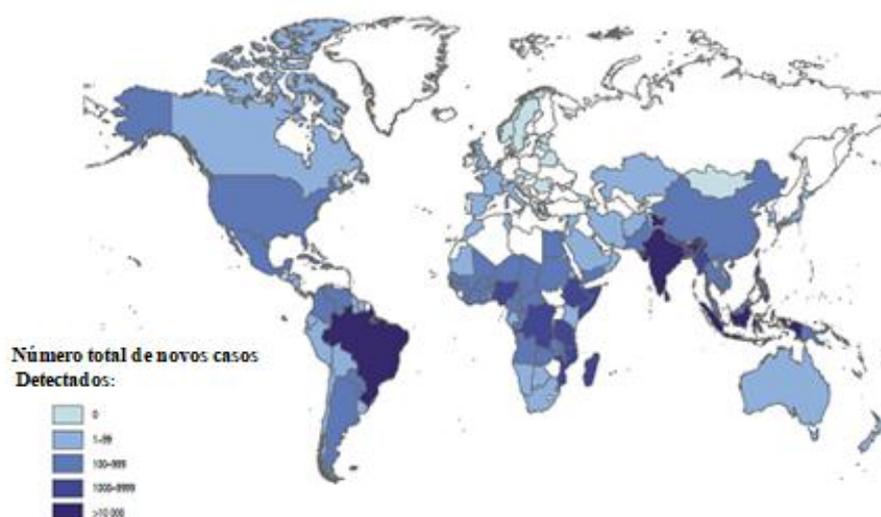
Fonte: Adaptado de Ridley & Jopling, (21).

Essa classificação, embora completa, apresenta dificuldades para aplicação em nível operacional, e para facilitar a divisão dos pacientes, a OMS propôs a classificação em *multibacilares* (MB) e *paucibacilares* (PB), que adota como critério o resultado da pesquisa de bacilos nos esfregaços cutâneos, com a intenção de operacionalizar o diagnóstico e controle da doença, sendo considerados *paucibacilares* os pacientes que manifestam até cinco lesões, chamado de hanseníase tuberculoide ou polo tuberculoide (TT), na qual poucos bacilos são encontrados e *multibacilares*, aqueles com mais de cinco lesões, na qual uma grande carga bacilar está presente nas lesões, conhecida como hanseníase lepromatosa (LL) ou Hanseníase Virchowiana (22).

Na forma BT da doença, IFN- $\gamma$ , IL-2 e linfotóxina- $\alpha$  são secretados nas lesões, resultando em atividade fagocítica intensa. Macrófagos sob a influência dessas citocinas, juntamente com os linfócitos, formam granulomas bem definidos. Os linfócitos CD4+, são encontrados principalmente dentro deste infiltrado inflamatório, e os CD8+ são encontrados na área externa que o envolvem (23). Já a forma lepromatosa da hanseníase, apresenta um acúmulo de macrófagos com alta carga bacilar e grande quantidade de corpúsculos lipídicos (CLs), sendo denominado *célula de Virchow*. Estas células funcionam como meio de cultura para o *M. leprae*, permitindo o crescimento bacteriano em seu citoplasma onde são encontradas as aglomerações bacilares (24). Sabe-se, ainda, que a forma lepromatosa é caracterizada por pobre formação do granuloma. A produção é predominantemente das citocinas IL-4, IL-5, e IL-10, tem-se descrito que a IL-4 diminui a expressão dos TLR2 nos monócitos e que a IL-10 suprime a produção de IL-12, o que está associada com a predominância de linfócitos CD8+ nas lesões lepromatosas. A IL-4, paralelamente, estimula linfócitos B a produzirem anticorpos. Assim, o aumento dessas citocinas possibilitaria a persistência e replicação do *M. leprae* no interior do fagócito (25).

Em 2017, foram detectados 210.671 novos casos de hanseníase em todo o mundo. A taxa de detecção foi de 2,77 por 100.000 habitantes, onde Índia e Indonésia apresentaram 67,4% destes casos e 92,6% regionalmente. Já na região das Américas, o Brasil apresentou 92,3% dos novos casos (Figura 2). A Índia, Brasil e Indonésia apresentaram 80,2% da carga global de hanseníase (2). O Brasil ainda ocupa uma posição de destaque no que se refere a doença, encontrando-se em segundo lugar no ranking, entre os países com maior incidência da doença (2).

Figura 2 -Taxas de detecção de novos casos de hanseníase no mundo em 2017



Legenda: Os registros de casos da doença foram detectados em 150 países, como está demonstrado na figura 2. De acordo com o mapa, 33 países relataram 0 casos e 38 relataram 1 a 9 casos, 64 relataram 100-999 casos, no ano de 2017. A Índia ocupa o primeiro lugar com 126.164 novos casos, já o Brasil aparece em segundo lugar com 26.875 novos casos.

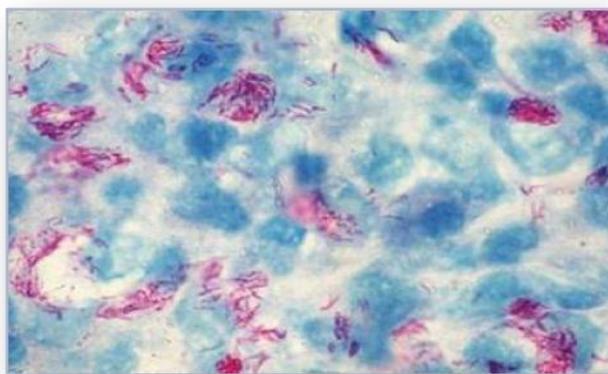
Fonte: (2).

Algumas regiões do Brasil atingiram a meta de eliminação da hanseníase que é de proposta pela OMS. No entanto, regiões como Norte (Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará, Amapá e Tocantins, Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal e Goiás e Nordeste (Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia) do Brasil ainda apresentam altos números de casos da doença (26). Dados epidemiológicos mostram uma tendência de estabilização dos coeficientes de detecção da hanseníase no Brasil. No entanto, grandes variações são observadas dependendo da região avaliada (27). No ano de 2014, o Rio de Janeiro apresentou casos de hanseníase, com o coeficiente de prevalência de 0,55 por 10.000 habitantes, e com um coeficiente de 1,86 por 100.000 habitantes em crianças com menos de 15 anos de idade. Diversos são os fatores associados à esta situação, dentre eles: densidade populacional, hábitos de vida, aspectos culturais, condições sanitárias e de moradia (27). Estes fatores compõem um cenário desfavorável que contribui para o crescimento do número de casos.

## 1.2 O agente etiológico da hanseníase

A hanseníase é causada pelo *M. leprae*, é um bacilo em forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool e ácido, como mostra na Figura 3 (15). Em 1873, o médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, identificou o bacilo *Mycobacterium leprae* como o agente causador da lepra, a qual posteriormente teve seu nome trocado para hanseníase em sua homenagem (28). A bactéria faz parte do reino Monera, filo Actinobacteria, classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, é considerada a única bactéria capaz de invadir os nervos periféricos no ser humano (15).

Figura 3 - Macrófagos infectados com *M. leprae*.



Legenda: A figura mostra os macrófagos (azul), altamente infectados pelo *M. leprae* (vermelho)  
Fonte: (29).

Até os dias atuais não é possível cultivar o *M. leprae in vitro*. Este fato dificulta seriamente o estudo de sua biologia e os mecanismos pelos quais se utiliza para causar a infecção dos nervos periféricos. Sendo assim, modelos *in vivo* são utilizados para a obtenção de grandes quantidades de bacilos utilizados na pesquisa. Os camundongos BALB/c apresentam temperatura média de 32°C, ideal para multiplicação do bacilo. Com base nisso, em 1960 Shepard retirou o bacilo de paciente lepromatoso e implantou no coxim plantar de camundongos (30).

Após o bacilo ser implantado, os camundongos não desenvolvem dano neural e a infecção se manteve localizada. Outro modelo *in vivo* que pode ser utilizado é o tatu, utilizado

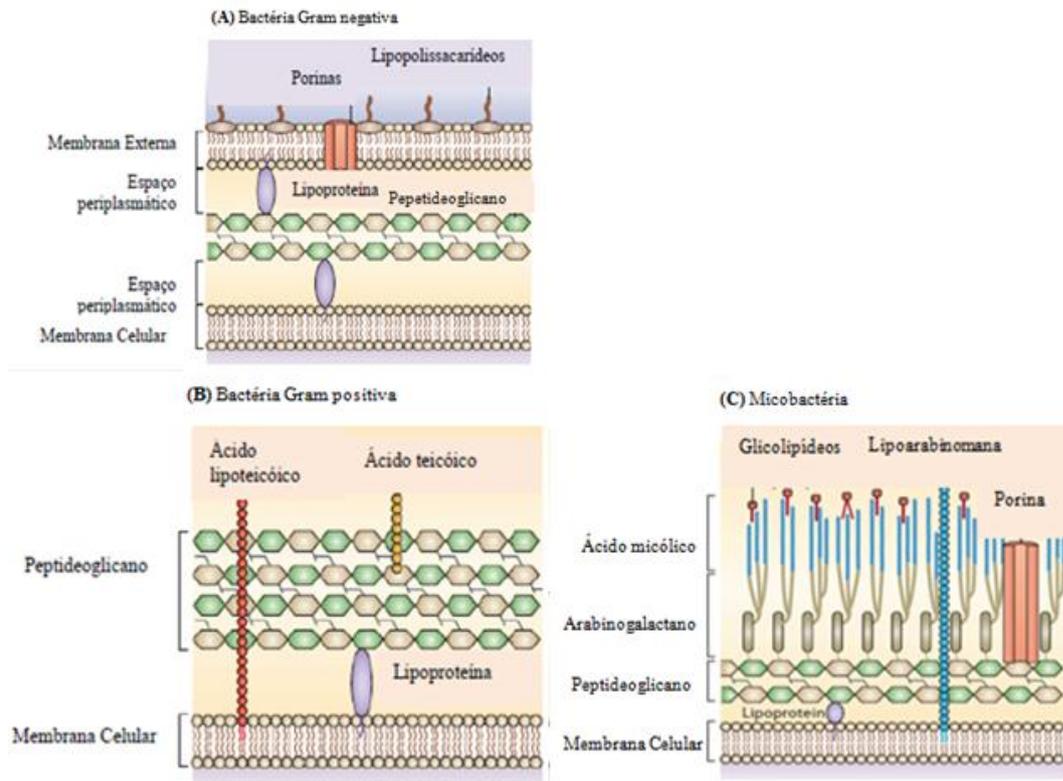
para pesquisa médica. O *M. leprae* infecta o tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) de forma natural apresentando manifestações clínicas similares da hanseníase em humanos, tais como alterações estruturais e patológicas. Por conta disso, os tatus têm sido explorados como um importante modelo para compreender melhor a doença e seus danos causados no nervo (30). Nos dias atuais, o modelo utilizado para obter o *M. leprae*, é a mesma técnica que foi aplicada por Shepard, na qual ocorre a infecção do bacilo no coxim plantar de camundongos congenitamente (*nude*) ou experimentalmente atímicos (31). Estes animais são extremamente susceptíveis à infecção pelo *M. leprae*. Após a purificação, os bacilos podem ser utilizados vivos, por até uma semana (32).

Uma característica das micobactérias é a sua intrincada parede celular que exerce importante papel na viabilidade bacteriana (33). Isto pode ser observado no fato de que inibição de sua biossíntese é alvo de muitas drogas como: etambutol, isoniazida, dentre outras, utilizadas para o tratamento da tuberculose outra importante micobacteriose (33). A compreensão da biossíntese da parede celular e a função biológica de cada componente desta estrutura bacteriana, tem sido objeto de diversas pesquisas na última década.

A composição do envelope celular das bactérias difere dentre as diferentes espécies. A figura 4 (A) mostra que as bactérias gram-negativas, apresentam na sua composição, lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e algumas moléculas de peptídeoglicanos enquanto as gram-positivas figura 4 (B), são muito ricas em peptídeoglicanos e contêm em sua estrutura ácidos graxos como ácidos teicóicos e lipotecóico contendo também lipoproteínas (34). O elevado conteúdo de peptídeoglicanos nas bactérias gram-positivas confere capacidade de se fixar ao corante violeta. Micobactérias como *M. leprae* e *M. tuberculosis* figura 4 (C) têm sua parede celular formada por três componentes estruturais principais que formam um complexo conhecido como mAGP: (m) são moléculas de ácidos micólicos, lipídeos de cadeia longa, (AG) polissacarídeos de arabinogalactana altamente ramificados e (P) uma rede de peptidoglicanos (34). Apesar desta rede de peptídeoglicanos, as micobactérias são coradas pelo método de Gram devido seu alto conteúdo lipídico que tornam estes bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), sendo corados pelo método de Ziehl-Neelsen (34). Além deste complexo molecular, lipoglicanos como lipoarabinomana (LAM) e lipomananas (LM), ancoram a membrana plasmática um segmento de membrana mais externo rico em lipídios, como os glicolipídeos, fitiocerol dimicocerosato (PDIM), monomicolato de trealose (TMM) e o glicolipídeos fenólicos como por exemplo o PGL I, um glicolipídeo específico do *M. leprae* (34), cujo papel na etiopatogênese da doença desperta grande interesse, devido a sua

utilização como diagnóstico precoce da infecção (35), bem como sua participação na interação patógeno-célula hospedeira (36).

Figura 4 - Composição da parede celular de bactérias gram negativas, bactérias gram positivas e micobactérias



Legenda: A figura (A) mostra que bactérias gram-negativas, apresentam na sua composição, canais de porina, lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e algumas moléculas de peptídeooglicanos. A presença do (LPS), vai contribuir para o seu transporte, por meio de canais de porinas ou transportadores especializados. Já na figura (B), são bactérias gram-positivas que são muito ricas em peptídeooglicanos na sua parede celular, tornando bem espessa e em sua estrutura contém ácidos graxos como ácidos teicóicos e lipoteicóico contendo também lipoproteínas. Na figura (C) representa a parede celular de micobactérias como *M.leprae* e *M. tuberculosis*, estão presentes moléculas de ácidos micólicos, lípidos de cadeia longa, (AG) polissacarídeos de arabinogalactana altamente ramificados e (P) uma rede de peptídeooglicanos.

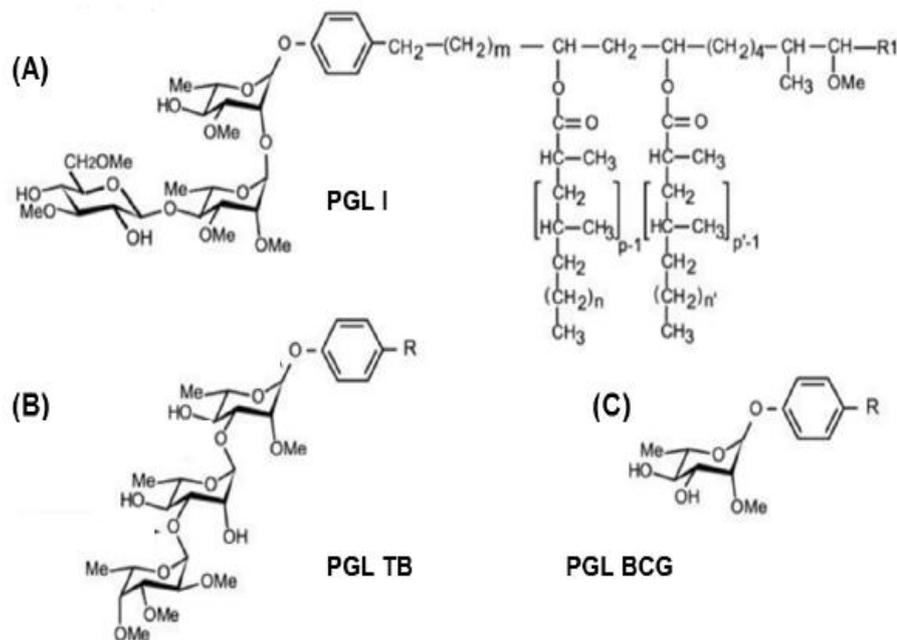
Fonte: Adaptado de Brown, *et al.* 2015.

### 1.2.1 Glicolípido fenólico 1 (PGL I) e seu papel na etiopatogênese da hanseníase

O glicolípido fenólico 1, PGL I, específico do *M. leprae*, está localizado mais externamente na parede celular. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, ligado a um

grupamento fenólico, e este a uma molécula de ftiocerol de micocerosato. A figura 5 mostra a diferença estrutural entre os PGLs de outras micobactérias (37). O PGL I caracteriza-se por ser um antígeno específico do bacilo, podendo ser encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares. É detectado também em tatus infectados com o *M. leprae* (38). Acredita-se que o PGL I esteja relacionado com a carga bacilar, porque na forma tuberculoide (TT) não é observada a produção de anticorpos anti-PGL I, sugerindo uma infecção paucibacilar, já que na forma lepromatosa (LL) observa-se a produção de anticorpo anti-PGL I, sugerindo uma infecção multibacilar (39).

Figura 5 - PGLs das micobactérias



Legenda: Esta figura mostra a diferença estrutural, entre os PGLs das micobactérias de crescimento lento, a estrutura química comum aos PGLs micobacterianos representa a porção lipídica ligada ao anel fenólico representada pela letra (R), o que difere entre elas é a porção glicídica. A figura (A) é o PGL I de *M. leprae*, a estrutura do PGL I é composta de um trissacarídeo, ligado ao grupamento fenólico e este a uma molécula ftiocerol de micocerosato. Na figura (B) é o PGL-tb de *M. tuberculosis*, também apresenta um trissacarídeo mas com composição diferente e a figura (C) é o PGL de *M. bovis* BCG, que é um monossacarídeo, ou seja, apresenta apenas um açúcar. (Me) grupamentos metila

Fonte: (37).

O PGL I é uma importante molécula envolvida na interação do *M. leprae* com a célula de Schwann. Esta interação se dá pela porção trissacarídica deste glicolípido com o domínio G da cadeia  $\alpha$  da laminina-2 presente na lâmina basal de CS (6). Rambukkana e colaboradores em 2002 mostraram que, tanto o *M. leprae* morto por irradiação gama quanto a fração da parede celular e PGL I *per se* foram capazes de induzir a desmielinização das CS

com uma eficiência comparada à bactéria viva após 24 horas de interação (40). Portanto, o PGL I é um importante fator de virulência associado a patogênese da hanseníase (35).

Além do seu papel na adesão e invasão de células hospedeiras, o PGL I encontra-se envolvido na modulação da resposta imune (36, 41). As células T de pacientes com hanseníase expostos ao PGL I, demonstraram uma baixa resposta proliferativa (37). Hashimoto e colaboradores em 2002, examinaram a sensibilidade de células dendríticas (DC) derivadas de monócitos de indivíduos saudáveis e também investigaram a influência da infecção micobacteriana, na função das células apresentadoras de antígenos. Este grupo mostrou que as DCs tratadas com anticorpo monoclonal, para PGL I e infectadas com o *M. leprae*, expressou o PGL I na superfície da célula, que apresentou características imunossupressoras e provocou o seu mascaramento na superfície de DC. Na superfície celular das DCs, o PGL I atuou como um anticorpo específico que regulou positivamente a resposta proliferativa de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T. Estes resultados indicam que os componentes individuais do *M. leprae*, como o PGL I, são mais eficazes na estimulação de células T do que a bactéria inteira (42).

Outra pesquisa relatou que células mononucleares do sangue periférico (PBMC), pré-incubadas com PGL I, perderam a capacidade de secretar citocinas como TNF, IL-1 $\beta$ , em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS), sugerindo que o PGL I modula negativamente a expressão de citocinas. Também foi observado que o PGL I, foi capaz de inibir a maturação e ativação de DCs (37). Manca e colaboradores em 2012, utilizaram o LPS como controle positivo, e demonstraram que o PGL I puro era um estimulador fraco de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, porém ao mesmo tempo induzia altos níveis de MCP-1 e IL-1Ra, mediadores associados com a supressão de IL-12 e IL-1 $\beta$  (41).

Tabouret e colaboradores (2010) construíram uma cepa de *Mycobacterium bovis* BCG reprogramado para sintetizar PGL I como constituinte da sua parede celular (rBCG PGL I). O BCG apresenta um glicolípido na sua parede celular chamado de (mycosídeo B), que foi substituído pelo PGL I, passando a expressá-lo como constituinte da sua parede celular. Neste trabalho, foi demonstrado que a cepa recombinante (rBCG PGL I) possui uma maior capacidade de ser fagocitada, quando comparado com a cepa selvagem que contém o vetor vazio, (BCG WT). Os autores deste trabalho mostraram, também, que a cepa (rBCG PGL I) diminui a secreção de TNF e a expressão de NF-kB em macrófagos. Todavia, este mesmo grupo mostrou que monócitos humanos expostos à cepa rBCG PGL I, produzem mais

citocinas IL-12 e TNF, sugerindo que dependendo do tipo celular o PGL I pode modular de forma positiva ou negativa a resposta imune da mesma (37).

Durante o doutoramento de Acosta e colaboradores em 2016, foi demonstrado que a expressão do glicolípido PGL I no BCG recombinante aumenta a capacidade da bactéria de aderir à CS humanas da linhagem ST-8814. No entanto, BCG selvagem e BCG expressando PGL TB apresentam capacidade reduzida de aderir a estas células. Além disso, a cepa BCG-PGL I induziu a formação de CLs, de maneira similar à infecção pelo ML vivo. Estes dados indicam que esta molécula, específica do ML, participa da modulação do metabolismo lipídico na célula hospedeira. Mais estudos são necessários para uma melhor compreensão do amplo papel do PGL I na fisiopatologia da hanseníase.

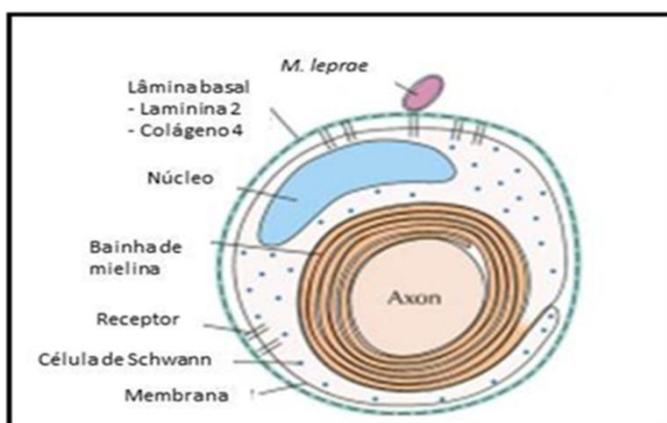
### **1.3 A interação do *M. leprae* com a célula hospedeira e suas repercussões sobre a lesão neural na hanseníase**

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem é mediada por receptores das células do hospedeiro, que reconhecem padrões moleculares das micobactérias, os chamados receptores de reconhecimento de padrões (PRR). Exemplo desse tipo de receptores, os receptores *Toll-like* (TLRs) são essenciais para o reconhecimento de patógenos, pelos macrófagos e pelas células dendríticas durante a resposta da imunidade inata (25). Dez TLRs já foram identificados, dos quais os heterodímeros TLR2-TLR1, os homodímeros TLR2 e TLR4 parecem ser importantes para o reconhecimento de micobactérias. Os receptores TLRs, especialmente o TLR-2, são ativados por lipoproteínas do *M. leprae*, e a capacidade de iniciar a resposta protetora esta diretamente relacionada com a secreção de IL-12 e a diferenciação de macrófagos e células dendríticas (25). Estas últimas apresentam o antígeno e causam a ativação de células T virgens através da secreção de IL-12. Esse processo pode levar a expansão e diferenciação de células Th1 produtoras de interferon (IFN- $\gamma$ ), que induz os elementos da resposta imune responsáveis pela eliminação do bacilo, controlando assim a evolução da doença (25). A lesão neural observada na hanseníase se deve ao tropismo do *M. leprae* pelo sistema nervoso periférico (SNP). No nervo, o bacilo é preferencialmente encontrado no interior de células de Schwann (CS) de fibras amielínicas (43). Para alcançar a CS, o ML precisa interagir com a lâmina basal dos nervos periféricos como na figura 6.

As CS do SNP apresentam dois fenótipos: mielinizantes e não mielinizantes, que manifestam resposta diferente ao *Mycobacterium leprae*. Uma característica interessante das CS mielinizantes é a sua maior resistência à invasão pelo *M. leprae*, quando comparada as células não mielinizantes (44, 6). As células, do segundo fenótipo, são o nicho natural para multiplicação da bactéria, permitindo a bactéria a proteção de respostas imunes do hospedeiro, sobretudo, fornecendo um local extremamente favorável a sua proliferação e sobrevivência, no sistema nervoso periférico (44, 6). No entanto, apesar da maior resistência destas células, após a adesão do bacilo, as mesmas começam a sofrer um processo de desmielinização (44, 6).

Em 2002, Rambukkana e colaboradores mostraram que o *M. leprae* é capaz de induzir a desmielinização rápida na ausência de células imunes, por um mecanismo contato-dependente, em um modelo *in vitro* de tecido nervoso (40). Este mesmo grupo observou também, que a viabilidade do *M. leprae* não é necessária para induzir este fenômeno *in vitro*. Neste trabalho, tanto *M. leprae* morto por irradiação gama quanto a fração da parede celular e PGL I *per se*, foram capazes de induzir a desmielinização com uma eficiência comparada à bactéria viva após 24 horas de interação (40).

Figura 6 - Interação do *M. leprae* com a CS



Legenda: A figura mostra o *M. leprae*, interagindo com a laminina 2, que é uma proteína da matriz extracelular presente na lâmina basal, para poder atingir a CS dos nervos periféricos. Na figura também demonstra o axônio envolvido pela CS e bainha de mielina

Fonte: (40).

Já foi demonstrado na literatura, que o metabolismo da glicose da CS, pode ser modulado pelo *M. leprae* após a infecção, levando ao aumento na captação de glicose e da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase G6PDH da via da pentose fosfato PPP, e também diminuiu a atividade da cadeia respiratória mitocondrial e reduziu a produção de lactato (45). Nas lesões de pele LL, foi visto o aumento da expressão de G6PDH, quando comparados com biópsias de pele BT. Os autores trataram as CS com o antagonista de G6PDH, o aminonicotinamida (6-ANAM), infectaram com o *M. leprae*, e verificaram que após o tratamento retomou a produção de lactato, o potencial de membrana mitocondrial e reduziu a viabilidade do *M. leprae*, quando comparados com a CS infectada sem o tratamento. Com base nestes resultados, esta via PPP, pode estar envolvida no controle da hanseníase (45).

Além desta característica, sabe-se também que o *M. leprae* altera a homeostase lipídica do hospedeiro por meio da regulação da biogênese de CLs em CS, onde os fagossomos bacterianos recrutam estas organelas (29). A biogênese de CLs nas CS infectadas apresenta um aspecto espumoso no interior da célula, e esse acúmulo de lipídeos irá contribuir para a sobrevivência bacteriana intracelular. Nas CS de amostras de fragmento de nervo de pacientes LL foi encontrado um acúmulo de CLs (29). Adicionalmente, já foi demonstrado o envolvimento do citoesqueleto no deslocamento intracelular dos CLs, mediado pelos microtúbulos (46-49). Com base nestes resultados, os autores avaliaram o envolvimento do citoesqueleto, no deslocamento do LD na infecção com *M. leprae*. As células foram tratadas com taxol, um medicamento estabilizador de microtúbulos, e citocalasina D (cytD), um fármaco que interrompe a actina. As células que foram tratadas com taxol ou cytD, demonstrou o aumento de *M. leprae* morto quando comparados com as CS sem tratamento. Mostraram que os fármacos reduziram a sobrevivência bacteriana, por ter interrompido a biogênese e o deslocamento intracelular de LD. Demonstraram que a biogênese de LD é importante para sobrevivência bacteriana, e estes resultados podem contribuir, para novas ferramentas para evitar ou controlar a lesão nervosa periférica na hanseníase (29).

O *M. leprae* após infectar a CS, impede a apoptose da célula hospedeira para que ocorra a infecção, pela indução do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). A CS infectada com *M. leprae* sem o soro, apresentou maior sobrevivência, e de modo dose-dependente, o IGF-1 impediu a apoptose na CS. Também verificaram em outras micobactérias, como o *Mycobacterium smegmatis* e o *Mycobacterium bovis* (BCG), se iriam ter o mesmo resultado, mas mostraram que essas micobactérias não impedem a apoptose da célula hospedeira (50). Pode ser que essa função seja algo específico do *M. leprae*, por conta

da sua parede celular ser composta por um trissacarídeo único, diferente das outras micobactérias (50). Por isso, foram verificadas se o *M. leprae* controla o potencial transmembrana mitocondrial, porque as mitocôndrias exercem um papel importante na sobrevivência celular e apoptose. Quando o soro é retirado, que é o suprimento da célula, se inicia a via intrínseca da apoptose (50). Com base nisso, a CS infectada com *M. leprae* sem o soro, evitou a diminuição do potencial transmembrana mitocondrial, atrasando a ativação da caspase-3 (50). As CSs infectadas com *M. leprae*, apresentou maior expressão e secreção de IGF-1 (50). Estes dados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos, pelo quais o *M. leprae* se utiliza para garantir um nicho de sobrevivência e replicação no nervo.

A Neuropatia pode desenvolver em todas as formas clínicas da hanseníase e caracteriza-se por ser um processo lento, progressivo, silencioso e irreversível, sendo esta última uma das principais preocupações na hanseníase. A lesão pode ocorrer não só após a infecção do *M. leprae* no nervo periférico, como também a partir das respostas inflamatórias e imunológicas (51). Os principais sinais da lesão no nervo são as lesões cutâneas, espessamento dos nervos e perda de sensibilidade (52). A neuropatia da hanseníase tem uma evolução extremamente crônica, porém, coexistem períodos agudos e subagudos durante reações inflamatórias imunomediadas, no decorrer da doença (52).

A neurite aguda acomete mais os pacientes com reações hansênicas, que são episódios de exacerbação inflamatória por conta da intensa resposta imune do indivíduo ao *M. leprae* (53). Na reação reversa desenvolve-se extensa desmielinização, havendo grande chance de recuperação, enquanto, nas formas mais graves, desenvolvem-se granulomas e abscessos que resultam, quase sempre, em uma rápida degeneração axonal (53). No ENL há inflamação difusa, celular e humoral, resultando em intenso edema intraneural, que pode levar à compressão dos troncos nervosos, causando inicialmente desmielinização do segmento posteriormente, perda axonal, caso não haja controle da neurite (53).

As compressões ocorrem onde os nervos cruzam, tal como ocorre nas regiões do cotovelo, punho, joelho e tornozelo. Esse processo inflamatório intenso, que resulta em muito edema, conseqüentemente, ao aprisionamento do nervo, ocasionando intensos distúrbios da função neural (53). A neurite em alguns pacientes evolue com perda neural insidiosa e sem a presença das manifestações tais como: dor, parestesias e disestesias, caracterizando a denominada neurite silenciosa (NS), cujo reconhecimento é de grande importância clínica, pois o atraso no diagnóstico pode resultar em danos neurais irreversíveis. A neurite silenciosa costuma ocorrer em dois momentos: na fase inicial de crescimento bacilar nas células de

Schwann, com a desmielinização segmentar, e num período mais tardio, tendo como causa a fibrose intersticial, na qual se pode encontrar evolução sem dor ou sintomatologia pouco relevante (53).

#### **1.4 Corpúsculos Lipídicos: biogênese e mecanismos de modulação da resposta imune**

Anos atrás, os corpúsculo lipídicos (CL) eram considerados apenas como organelas que estocavam lipídeos. Muitos estudos analisaram por espectrometria de massa e verificaram várias estruturas interagindo com esta organela, sendo esta interação importante para manter a homeostase celular (54). Esta organela é importante nos tecidos para o armazenamento de energia ou renovação lipídica, no tecido adiposo, fígado, intestino (55-57). Também encontra-se acumulados no músculo esquelético, córtex adrenal, macrófagos e nas glândulas mamárias (58). Os estudos que já foram realizados com o CL, trouxeram novas descobertas e demonstraram que além de seu papel no armazenamento de lipídeos, também foram reconhecidas novas funções como armazenamento (59), degradação de proteínas (60), auxilia no tráfego de membrana (61-62), é importante na replicação e montagem do vírus da hepatite C (HCV) (63) e também na neurodegeneração (64). As pesquisas que foram feitas com o CL, adquiriram novos conhecimentos ganhando sua importância e destaque no campo da biologia celular.

Os CLs são originados no retículo endoplasmático (ER) pela lipogênese localizada, quando os ácidos graxos são liberados pelos triacilgliceróis (TAG) e entram na célula, o acúmulo de lipídeos neutros no espaço intermembranar do ER, leva a formação de uma lente lipídica, que cresce e dobra a membrana em direção ao citosol, levando fosfolípidios do folheto citosólico (65). Após a formação da gotícula lipídica, duas enzimas diacilglicerol aciltransferase, DGAT1 e DGAT2, sintetizam triglicerídeos (TAG) em diacilgliceróis e acetil-CoA (derivados de ácidos graxos, FAS). Os diacilgliceróis são convertidos em lípidos neutros (triacilgliceróis) por enzimas DGAT. As gotículas nascentes, dão origem a gotículas lipídicas maduras, que podem se soltar do ER ou permanecer conectadas (65). No tecido adiposo e em muitas outras células, a maior parte da hidrólise dos triglicerídeos é catalisada por uma única lipase, a lipase triglicerídica adiposa (ATGL). A gotícula lipídica também pode ser ativada por autofagia, uma membrana dupla (fagóforo) que cresce em torno de várias organelas,

incluindo gotículas lipídicas, mitocôndrias e vesículas, e as prende dentro de um autofagossoma, que se fundem com os lisossomos para formar autolisossomos. Os triglicerídeos são hidrolisados pela lipase ácida lisossomal (LAL) (65).

A estrutura dos CLs é formada por diversas proteínas, as que são mais encontradas, como as da família PAT, que compõe a perilipina, a adipofilina (ADRP) e a TIP47 (66). Embora a função biológica de ADRP não tenha sido totalmente esclarecida, várias evidências apontam para um papel desta proteína na captação de ácidos graxos, ou seja, na ligação de ácidos graxos e colesterol, e na estocagem de lipídeos neutros (67). O ADRP atua, ainda, como ponto central do agrupamento de lipídios, para a formação de novos corpúsculos lipídicos. Além disso, também promove o estoque de colesterol, e triglicerídeos e reduz o efluxo de colesterol (68). A composição dos CLs consiste de um núcleo neutro, constituído por triacilgliceróis, ésteres de colesterol, diacilglicerol e cercado por monocamada de fosfolipídios (29).

#### 1.4.1 Implicações do metabolismo lipídico na patogênese da hanseníase

Sabe-se, que a infecção com *M. leprae* afeta a homeostase lipídica em células hospedeiras (9). As lesões de pele de pacientes com a forma lepromatosa, apresentam uma característica clássica, que consiste na presença de macrófagos espumosos altamente infectados. O aspecto espumoso se deve ao acúmulo de lipídeos derivados do hospedeiro, tais como os fosfolípidos oxidados e ésteres de colesterol. O acúmulo de lipídeos leva à formação de organelas citoplasmáticas chamadas de corpúsculos lipídicos (CL) (9).

Nosso grupo demonstrou que nas lesões de pacientes LL, os CLs são enriquecidos de colesterol e ésteres de colesterol, e que os lipídios acumulados nos macrófagos, os fosfolipídios oxidados, são derivados do hospedeiro (29). Também observou que no interior dos corpúsculos lipídicos induzido por *M. leprae*, ocorreu a produção de eicosanóides, entre eles a prostaglandina E2 (PGE2), que foi capaz de inibir a produção de citocinas Th1. Demonstraram que as lesões de pacientes LL, apresentaram uma elevada concentração de PGE2, produzida por macrófagos em resposta ao *M. leprae*, devido ao aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos. A partir destes resultados, acreditamos que possivelmente a síntese de PGE2, ocorra no interior das *células de Virchow*, presentes nas lesões de pacientes LL,

contribuindo assim com a inibição da atividade bactericida dos macrófagos, regulando negativamente a resposta imune (29). A PGE<sub>2</sub>, é um eicosanoide, e também um mediador lipídico do grupo das prostaglandinas derivado do ácido araquidônico. A via das prostaglandinas é realizada após um estímulo, com isso a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> é ativada por citocinas pró-inflamatórias, levando a degradação dos fosfolípidos e a produção de ácido araquidônico (69).

Dentre os lipídeos acumulados na célula infectada, o colesterol e éster de colesterol foram identificados, por Mattos e colaboradores em 2014, onde o *M. leprae* também foi capaz de induzir o acúmulo de colesterol intracelular, pela modulação positiva de receptores de captação de colesterol extracelular e da síntese *de novo* do mesmo (70). Além disso, os autores demonstraram que ao reduzir as concentrações de colesterol intracelular com o uso de estatina (que possui ação inibidora da atividade da hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase HMGCoA redutase), havia uma redução na viabilidade da micobactéria (70). Corroborando os dados anteriores, Lobato e colaboradores em 2014, demonstraram que as estatinas são capazes de aumentar a atividade microbicida da rifampicina, antibiótico utilizado na rotina de tratamento da hanseníase, sugerindo assim que o aumento dos níveis de colesterol intracelular possui um caráter anti-inflamatório, protegendo a bactéria, não somente do sistema imunológico, como também dos antibióticos (71).

Na formação do corpúsculo lipídico a enzima FASN, por ser uma ácido graxo sintase, aumenta síntese de lipídeos e em estudo com células cancerosas, observa-se que o aumento da expressão desta enzima leva a um acúmulo de CLs (72). Estas organelas lipídicas, requerem reorganização de componentes estruturais como citoesqueleto e ativação de enzimas lipogênicas. Recentemente, foi demonstrado, por microscopia confocal, a participação de componentes de citoesqueleto e de duas enzimas lipogênicas, ácido graxo sintase e glicerofosfato desidrogenase durante a formação de CLs. Neste mesmo trabalho, foi evidenciado por imunoprecipitação que vimentina e PLIN1 (perilipina 1 ou adipofilina) associam-se durante os estágios iniciais de diferenciação e formação de corpúsculo lipídico (73). A vimentina é uma proteína de filamento intermediário importante na formação do citoesqueleto. Em 1996, Lieber e colaboradores mostraram, que o rompimento do filamento de vimentina inibia a formação de CLs em adipócitos (3T3-L1) (74). Na literatura já foi demonstrado, que a formação de CLs em adipócitos humanos, envolve a organização de um complexo de vimentina e perilipina, principalmente a perilipina 1 (PLIN1) ou adipofilina (75).

As micobactérias patogênicas regulam diversos genes dentro do hospedeiro, modulando o metabolismo lipídico para sua sobrevivência. Os receptores ativados de peroxissomas proliferantes (PPARs), são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, regulam a expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo dos lipídeos e da glicose. Três proteínas, codificadas por genes distintos, têm sido identificadas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$  e PPAR $\gamma$  (76). Os PPARs são fatores de transcrição ligantes dependentes, que regulam a expressão do gene-alvo, pela ligação a específicos PPREs (elementos responsivos aos proliferadores de peroxissoma), situados em sítios regulatórios de cada gene. O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator proteico adicional, o receptor do ácido 9-cis retinóico (RXR) (76). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcricionais, resultando em aumento na transcrição gênica (76).

O PPAR $\gamma$  está expresso predominantemente no tecido adiposo e exerce um papel importante na diferenciação dos adipócitos e na expressão de diversos genes (76). As anormalidades do metabolismo lipídico devem estar envolvidas com os processos bioquímicos e, conseqüentemente, clínicos da aterosclerose (76). O envolvimento bioquímico vem sendo desvendado pela caracterização de um receptor nuclear: PPAR $\gamma$ . Aterosclerose é caracterizada pelo acúmulo gradual de lipídeos na parede arterial (placa aterosclerótica). A disfunção do endotélio resulta da inflamação crônica da parede vascular, proliferação de células musculares lisas e da formação de células espumosas (77). O PPAR $\gamma$  também pode promover a proliferação da placa aterosclerótica, na medida em que estimula a captação de LDL oxidada, um evento crítico na formação das células espumosas, por promover a transcrição de RNAs que codificam receptores de superfície específicos para lipoproteínas, possibilitando, desse modo, um maior aporte de lipídeos locais, onde a placa de aterosclerose está se desenvolvendo. O PPAR $\gamma$  pode afetar a formação das células espumosas, modulando a resposta inflamatória e influenciando a estabilidade da placa (77).

Dados apresentado em 2018 pelo nosso grupo, mostraram que o PGL I está envolvido na ativação de um *cross-talk* entre PPAR $\gamma$  e o receptor de manose CD206 contribuindo para o sucesso do *M. leprae* na colonização dos nervos periféricos (10). O PPAR $\gamma$  regula a expressão do gene ADRP (77). Mattos e colaboradores em 2010, detectaram a expressão da proteína ADRP em biópsias de pele e nervo de pacientes com hanseníase lepromatosa (29).

## 2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase, ainda continua sendo um importante problema de saúde pública é uma doença crônica responsável por lesões irreversíveis do sistema nervoso periférico, sendo uma das causas mais comuns de neuropatia periférica não traumática. Estas lesões resultam em perda sensorial e sensório-motora como consequência da infecção da célula de Schwann, e não podem ser revertidas com o uso da PQT. Portanto, estratégias terapêuticas alternativas, somadas ao uso de antibióticos que possam eficazmente combater ou prevenir as injúrias neurológicas, são foco de diversas pesquisas.

Logo, a compreensão das bases bioquímicas e moleculares pelas quais o *M. leprae* induz a neurodegeneração, é de fundamental importância para a prevenção da progressão da hanseníase. O PGL I parece ser crucial para a invasão, sobrevivência e proliferação do *M. leprae* num ambiente intracelular. Portanto, este trabalho visa compreender de que maneira o PGL I poderia estar influenciando na célula de Schwann, focando essencialmente em vias associadas ao metabolismo lipídico, síntese de colesterol e de formação de CLs, assim como em mecanismos ligados ao transporte reverso de colesterol.

Para isto, utilizaremos esferas de poliestireno revestidas com PGL I e a cepa rBCG PGL I, cedido pelo Dr. Christophe Guilhot, Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse, França. Os dados gerados a partir do presente estudo poderão contribuir para: i) trazer novas perspectivas com relação ao entendimento destas lesões neurológicas; ii) identificação de potenciais alvos que poderão ser objeto para o desenvolvimento de terapias complementares e iii) trazer novas perspectivas para uma maior compreensão desta doença milenar que aflige milhares de pessoas até os dias atuais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do glicolípídeo PGL I do *Mycobacterium leprae*, no metabolismo lipídico e formação de corpúsculos lipídicos em células de Schwann.

##### 3.1.2 Objetivos específicos

- a) Analisar o papel do PGL I, na regulação da expressão de genes e proteínas envolvidas na síntese de ácidos graxos e de colesterol em células de Schwann;
- b) Analisar o papel do PGL I, na regulação da expressão do fator de transcrição PPAR $\gamma$  da enzima PGE2 sintase e do mediador lipídico PGE2 em células de Schwann;
- c) Reanalisar algumas proteínas identificadas, como potenciais ligantes de PGL I identificados no interactoma, com as frações proteínas citosólicas e de membrana;
- d) Validar a interação de potenciais ligantes das células de Schwann com PGL I;
- e) Analisar a localização celular e a presença de domínios transmembrana das proteínas selecionadas como potenciais ligantes de PGL I, usando programas de bioinformática;
- f) Analisar a rede de interação entre as proteínas selecionadas e sua interação com o fator de transcrição PPAR $\gamma$ ;
- g) Predizer a presença de domínios de ligação para PGL I e potenciais ligantes das proteínas selecionadas no interactoma com PGL I.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Micobactérias

*M. bovis* BCG recombinante expressando PGL I (BCG-PGL I), BCG selvagem com o plasmídeo vazio (BCGWT) foram cedidos gentilmente pelo Dr. Christophe Guilhot, do Institute de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse, França. As micobactérias foram cultivados em meio líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO laboratories, EUA), suplementado com 0,05% de Tween 80 (DIFCO laboratories, EUA) e com 10% Middlebrook ADC (albumina bovina, dextrose e catalase) assimcomo contendo 50 µg/mL kanamicina, sob constante agitação por 15 dias. O tempo de cultivo foi de aproximadamente 15 dias, sob constante agitação, à temperatura de 37° C. Ao atingir aproximadamente DO<sub>600</sub>=0,8 correspondente à fase exponencial do crescimento micobacteriano, o cultivo foi interrompido e aliquoteado em 20% glicerol e estocado em freezer -70 ° C para posterior uso em ensaios de infecção. Para a utilização nos ensaios de infecção, as alíquotas congeladas de *M. bovis* BCG em 20% glicerol foram centrifugadas a 16000 xg por 10 min e ressuspensas em meio RPMI-1640 sem adição de antibióticos. No caso do *M. bovis* BCG recombinante expressando Green Fluorescent Protein o antibiótico empregado foi a higromicina (50µg/mL). Após o cultivo os bacilos foram centrifugados, lavados, contados e utilizados nos experimentos de infecção com células de Schwann na multiplicidade de infecção, MOI 50:1.

Amostras de *M. leprae* Thai-53 viáveis isolados de coxim plantar de camundongos atímicos BALB/c (*Nu/Nu*) são doados mensalmente pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa, do Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil. A purificação do *M. leprae* a partir do coxim plantar de camundongos nude infectados é realizada mensalmente pelo técnico de laboratório e ocorre após a infecção da pata dos camundongos atingir uma carga bacilar de cerca de 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> /g de tecido. Cerca de nove meses após a inoculação dos bacilos, os camundongos são sacrificados asfixiados com CO<sub>2</sub> no interior de uma cabine de segurança biológica de classe II e tratados com luz UV por 3 minutos. A pata infectada é removida, imersa em iodo 20% por 20 minutos e rinsada com álcool 70%, sendo posteriormente fragmentada. As patas são mantidas em meio RPMI (LGC Biotecnologia) com 10%SFB

(SFB-Cription Biotecnologia LTDA) a 4 °C e são enviadas ao laboratório de Microbiologia Celular – Pavilhão de Hanseníase (Fiocruz-RJ) para purificação.

Os tecidos são fragmentados picando em pedaços menores com tesoura pequena e pinça estéreis. Os fragmentos são transferidos para uma placa de 6 poços, aos quais se adiciona meio RPMI 1640. Adiciona-se solução de colagenase-dispase 2 vezes no poço em uma proporção 1:1 com o meio já no poço em conjunto com uma solução de ampicilina (Sigma-Aldrich, EUA) com concentração final de 50µg/mL. Homogeniza-se a placa por agitação suave e incuba-se a placa por 2 horas a 33°C. Após a incubação, homogeniza-se novamente com o auxílio de uma ponteira de 1000µL e transfere para tubos eppendorfs de 1,5 mL. Em seguida realiza uma centrifugação de 16000 xg por 5 minutos, em que se descarta o sobrenadante e lava o pellet duas vezes com água estéril livre de pirogênio. Posteriormente, dissolve-se o precipitado com uma solução de NaOH 0,1N estéril e então centrifuga novamente a 16000 xg por 5 minutos, descartando o sobrenadante. Em seguida, dissolve-se o precipitado com 1mL de meio RPMI 1640 estéril e homogeniza o material com o auxílio de uma seringa de insulina de 1mL para remover os grumos (Adaptado de Trombone, 2014). As bactérias foram quantificadas e alíquotadas contendo 10<sup>9</sup> células/mL cada. Também foi realizado um controle sobre a viabilidade dessas bactérias utilizando o kit *Live and Dead* (Molecular Probes), utilizando o protocolo descrito pelo fabricante.

#### 4.2 Marcação de *M. leprae* e BCG-PGL I com o Fluoróforo PKH67 (verde)

Para a realização dos experimentos de microscopia de fluorescência, as micobactérias foram marcadas com o fluoróforo PKH67 verde (Sigma). A concentração de micobactérias a serem marcadas com PKH67 é de acordo com a MOI 50:1, elas foram então centrifugadas por 5 minutos à 16000 xg. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o corante adicionado as bactérias sedimentadas. O corante foi diluído na solução fornecida pelo fabricante (1µL de corante para 250 µL de diluente) e adicionado à suspensão de bactérias por 2 min, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Para bloquear a reação era adicionado 250 µL soro fetal bovino (SFB) por 1 minuto. Foi então centrifugado por 5 minutos à 16000 xg e a suspensão de bactérias foram ressuspensas em Tampão fosfato salino (PBS) estéril e centrifugado novamente. As micobactérias marcadas foram ressuspensas, em 100 µL de PBS estéril. Por fim, as micobactérias foram adicionadas às culturas de CS, numa placa de 24

poços com lamínulas de vidro (CORNING) para imunofluorescência, na MOI de 50:1 por poço e deixou por 24h numa estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3 Recobrimento das esferas de poliestireno (*Beads*) com PGL I

Preparo do PGL I: O PGL I liofilizado (10 mg), proveniente do BEI Resources (NR-19342) foi ressuspendido no microtubo contendo 10 mg do PGL I em 1 ml do tampão bicarbonato de sódio 0,05 M (pH 9,6) com auxílio de uma pipeta. Em seguida, sonicar, em sonicador de banho, a amostra durante 30 segundos e depois passar o 1 ml da solução de PGL I para um tubo tipo Falcon contendo 9 ml de tampão bicarbonato de sódio 0,05 M (pH9,6). Homogeneizar por inversão do tubo. Aliquotar a solução de PGL I, a cada 1 mL, em eppendorf, deixando a concentração em 1 mg/ml. As alíquotas devidamente identificadas devem ser armazenadas à -20°C. Retirar 100 µg da solução de PGL I 1mg/ml, que foi preparada anteriormente, que corresponde 100 µl da solução. Após a preparação do PGL I, adicionar  $2 \times 10^8$  de “beads” por eppendorf, que equivale à 5µL de “beads” comum de 3µM de diâmetro, da concentração de  $2 \times 10^{10}$ /mL (Sigma LB-30), já o “beads” verde fluorescente de 1 µM de diâmetro, adicionar 15 µL da concentração  $6,5 \times 10^9$ /mL (Invitrogen). Depois avolumar para 500 µL com tampão bicarbonato de sódio (pH 9,6). Incubar a solução contendo “beads” e PGL I, por 3 horas à temperatura ambiente, sob agitação. Posteriormente, centrifugar a solução à 16000 xg (15 minutos) e após a centrifugação descartar o sobrenadante. Avolumar com 100 µL de PBS estéril. Os “beads” utilizados no protocolo, são partículas coloidais com carga negativa, e a interação com o PGL I é por carga. (Adaptado de Rambukkama, 2000).

#### 4.4 Cultivo e manutenção de SC da linhagem ST8814

Esta linhagem foi isolada de um paciente com neurofibromatose tipo I e doada pelo Dr. Jonathan A. Fletcher (Harvard Medical School, Boston, EUA). As células serão cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% Soro fetal bovino, 10 mM de HEPES, 1 mM de L-

Glutamina (Invitrogen). As culturas foram mantidas em at 121212121 início do cultivo, as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C, adicionadas em um volume de 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C para a retirada do crioprotetor DMSO (dimetil sulfoxido – Sigma Chemical Company) e então  $1 \times 10^6$  células foram ressuspensas novamente em meio RPMI suplementado, sendo cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc A/S, Roskilde, Dinamarca) em 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até obter uma confluência de 90%. Estas células são aderentes e a sua manutenção foi feita por repiques retirando o sobrenadante da cultura, lavando a monocamada com PBS, ressuspensando as células adicionando 1 mL de tripsina (0,125%) (Invitrogen) e levando-as à estufa por 1 à 2 minutos. Em seguida, 3 mL de meio RPMI suplementado foi adicionado e a suspensão centrifugada à 1500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Para o plaqueamento, as células eram quantificadas na câmara de Neubauer e tinham a viabilidade celular aferida pelo método de exclusão do corante Azul de Tripán (Sigma-Aldrich). Estas células são armazenadas e estocadas em *vials* no nitrogênio líquido, em 1 mL de solução de congelamento, 90% de soro fetal bovino (SFB, Cripion Biotecnologia LTDA) em 10% de DMSO.

#### 4.5 Detecção de Corpúsculos lipídicos

A detecção dos corpúsculos lipídicos produzidos pelas CS foi feita plaqueando cerca de 40.000 CS/poço sobre lamínula de vidro (CORNING) em placas de cultura de 24 poços. As culturas foram mantidas a 2% SFB/33°C e infectadas ou não com micobactérias, ou estimuladas com as “beads” e tratadas ou não com drogas. Após 48 h do estímulo as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% durante 20 minutos a 4°C, e lavadas com PBS por duas vezes. Os CLs foram evidenciados utilizando o Óleo Vermelho - Oil Red O (ORO).

Marcação com ORO: as células foram recobertas com propilenoglicol 100% por 5 minutos após a remoção deste, foi adicionado ORO (0,5% em propilenoglicol) durante 7 minutos, passado este tempo o ORO foi retirado e acrescentou se propilenoglicol 85% por 3 minutos, posteriormente as lamínulas foram lavadas com água destilada. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de microscopia utilizando-se resina sintética (Entellan®, Merck). O

núcleo celular foi marcado com 4', 6- diamino- 2- fenilindol (DAPI). Os corpúsculos lipídicos foram visualizados em vermelho e o núcleo marcado em azul no microscópio de fluorescência Carl Zeiss usando o programa AxioVision SE64 Rel. 4.9.1. (aumento de 40x).

#### 4.6 Análise de expressão gênica de vias envolvidas no metabolismo lipídico

##### 4.6.1 Extração de RNA total

As culturas de ST8814 não infectadas, estimuladas com beads PGLI ou infectadas com rBCG-PGLI foram lavadas com PBS. As amostras foram coladas em microtubos livres de RNase, depois foi adicionado 1mL De Trizol (Life technologies, USA). Em seguida foi adicionado 200  $\mu$ L, agitar manualmente até obter uma mistura leitosa. Deixar por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C). Foram centrifugados a 12000 xg por 15 min a 4°C, o sobrenadante (fase aquosa superior) foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 500  $\mu$ L de isopropanol e agitou bem. As amostras foram armazenadas a - 70°C *overnight*. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ficou secando a temperatura ambiente (25 °C) por cerca de 10 min. Foram adicionados 500  $\mu$ L de etanol 70%, em seguida as amostras foram centrifugadas 10000 xg por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o RNA ficou secando a temperatura ambiente (25°C) por cerca de 10 min. O RNA foi ressuspensão em 20 $\mu$ L de água RF (*RNase-Free Water*). Depois as amostras foram armazenadas no freezer -70°C até o momento do experimento (Protocolo adaptado de Sambrook e Russel, 2001).

##### 4.6.2 Quantificação dos Ácidos Nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Inicialmente foi lido 1  $\mu$ L de água DEPC/água de ampola para determinar o “branco”. Em seguida, 1 $\mu$ L de cada amostra foi lido contra o “branco” no comprimento de onda de 260 nm. A avaliação da pureza foi determinada pela razão da absorbância (A) em dois comprimentos de onda: A260/280 indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto A260/230 indica o grau de contaminação por

compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões A260/280 e A260/230 apresentaram valores > 1,8.

#### 4.6.3 Análise da integridade do RNA

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de agarose (Life technologies, EUA) a 1,2% em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se 150 ng de RNA a 35% formamida, MOPS 1X, 0,125% corante azul de bromofenol e 1 µL de SYBR Green II 100X (Life technologies, EUA). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho seco a 65°C por 15 minutos e depois aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de foto documentação (L-Pix touch, Loccus biotecnologia, SP).

#### 4.6.4 Tratamento das Amostras com DNase RNase-Free

Após a quantificação e confirmação da integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit TURBO DNA-*free*<sup>TM</sup> (Life technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30 µL. Inicialmente, em tubos de 0,5 mL, foi adicionado 3 µg de RNA, 0,1 volume de tampão de enzima 10X e 1 µL da enzima Turbo DNase, seguido por incubação a 37° C durante 30 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado 0,1 volume do reagente de inativação enzimática. Em seguida, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos, agitando os tubos manualmente 2-3 vezes durante esse período para homogeneizar o conteúdo. Após isso, os tubos foram centrifugados a 10000 xg por 2 minutos, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado.

#### 4.6.5 Síntese de cDNA

A reação de transcrição reversa para a síntese de cDNA a partir do RNA, foi realizada utilizando o kit RevertAid first strand cDNA synthesis (Thermo Fischer Scientific). Inicialmente foi utilizado 1 µg de RNA, ao qual adicionou-se água-DEPC para completar o volume de 11 µL e adicionou-se 1 µL de OligodT. Preparou-se também um controle negativo onde não foi adicionada amostra, mas sim 11 µL de água-DEPC. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos em banho seco e em seguida foram adicionados a cada amostra 4 µL de tampão de reação 5x, 1 µL de Ribolock RNase inhibitor, 2 µL de DNTP e 1 µL da enzima transcriptase reversa, as amostras foram então incubadas a 42°C por uma hora, seguida de incubação a 70°C por 5 minutos, para a inativação da enzima e as amostras foram acondicionadas a -70 °C.

#### 4.6.6 Reação da cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Para a análise da expressão dos genes ADRP, HMGCR, PTGES2 e FAS a nível transcricional, as amostras de cDNA foram diluídas para a concentração de 5 ng/µL. O mix de PCR foi preparado utilizando o kit SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) e consistia em 5 µL de master mix, os primers senso e antissenso na concentração de 400 nM e 10 ng de material genético.

Utilizou-se água livre de RNase para avolumar e completar o volume final de reação de 10 µL. Em seguida, os mix foram adicionados a cada poço de uma placa de 96 poços (Applied Biosystems) e duplicata. Além do controle negativo da RT foi preparado um controle negativo da PCR, onde não foi adicionado cDNA mas, em seu lugar, foi adicionado água. A placa foi submetida a uma rápida centrifugação e então foi disposta na máquina StepOnePlus®-Applied Biosystems, ajustada para o método comparativo por  $\Delta\Delta CT$ , sistema de detecção para SYBR *Green*, para então realizar a reação por 2h. As amostras foram submetidas ao seguinte padrão de ciclagem: 95°C para desnaturação por 10 minutos seguidos de ciclos alternados de 15 minutos a 94°C de desnaturação e 1 minuto a 60°C para anelamento/extensão. Em seguida foi realizada a curva de dissociação aquecendo-se as

amostras a 95°C por 15 minutos, resfriando-se e seguida a 60°C por 1 minuto e aquecendo-se lentamente até as amostras atingirem novamente 95°C, sendo incubadas nesta temperatura por 15 minutos. Terminada a reação, os resultados foram analisados. As sequências dos iniciadores utilizados estão representadas na tabela 1.

Tabela 1 - A expressão dos genes foi normalizada pela expressão de um gene constitutivo (RPL13)

Gene	Senso	Antissenso
ADRP	GTGAAGACCATCACCTCCGT	TGTCTAGCCCCTTACAGGCA
HMGCR	CCTGTTTGCAGATGCTAGGTGTT	GCCAATGCTGCCATAAGTGA
PTGES2	GTGGGCGGACGACTGGTTGG	CGGAGGTGGTGCCTGCGTTT
FAS	TGGCCTACACCCAGAGCTAC	GTGAACTGCTGCACGAAGAA
RPL13	GACAAGAAAAAGCGGATGGT	GTACTTCCAGCCAACCTCGT

#### 4.7 Avaliação da expressão de PPAR $\gamma$ , vimentina, PLIN 3 e FASN na presença de PGL I

Foram plaqueadas 50.000 células ST8814 por poço, em quatro placas de 24 poços com lamínulas de vidro (CORNING) para (PPAR $\gamma$ , vimentina e PLIN 3) e 40.000 células para proteína FASN, nas seguintes condições: controle, “beads” fluorescentes vazio, “beads” fluorescentes-PGL I, BCG-PGLI e *M. leprae*. As células foram estimuladas ou infectadas na concentração de 50:1 por poço, as células foram colocadas na estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 30 minutos as células foram retiradas da estufa e foi adicionado o GW9662, o antagonista de PPAR $\gamma$ . Após 24h, as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com PFA 4% por 20 minutos a 4°C, depois lavadas com PBS 1X por duas vezes. Para avaliar a expressão de vimentina, PLIN 3, foi utilizada uma solução de permeabilização com PBS+ 10% SFB+ 0,01% Triton X-100, para o fator de transcrição PPAR $\gamma$  e FASN foi utilizada outra solução de permeabilização PBS+ 10% SFB+ 0,01% Tween-20 e bloqueou por 30 minutos. Os anticorpos primários anti-PPAR $\gamma$  Santa Cruz (H-100) (SC-7196 *rabbit*), anti-vimentina (Biocare Medical-*mouse*), anti-PLIN 3 (PROGEN-*mouse*), anti-FAS Santa Cruz (SC-55580 *mouse*), na concentração de 1:100 para todas as proteínas e foram diluídos na solução de

permeabilização e foi deixado *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a placa foi lavada 3X com PBS por 5 minutos. Posteriormente, as culturas foram incubadas por 1h a 4°C com o anticorpo secundário anti-IgG *mouse* Alexa 555 (vermelho-Invitrogen) para as proteínas vimentina e PLIN3, na concentração de 1:300, para o FASN também foi utilizado o mesmo anticorpo, mas na concentração de 1:200. Já para o PPAR $\gamma$  foi utilizado o anticorpo anti-IgG *rabbit* Alexa Fluor 555 (vermelho-Molecular Probes), na concentração de 1:200. Após 1h, as placas foram lavadas 3X com PBS 1X. Depois foi feita a marcação do núcleo, com 6- diamino- 2-fenilindol (DAPI) foi diluído 100x em H<sub>2</sub>O miliq. Após a diluição do DAPI, foi adicionado 250  $\mu$ L desta solução em cada poço da placa e deixou agir por 3 minutos, depois lavou 3X com PBS 1X. Por fim, As lamínulas foram colocadas em lâminas de vidro com a face coberta pelas células voltada para baixo, entrando em contato, assim, com uma solução anti-*fading*, as lamínulas foram então seladas à lâmina com auxílio de Entellan (Harleco EM Science). A expressão de PPAR $\gamma$ , vimentina, PLIN 3 e FASN na presença de PGL I, foram avaliadas através do microscópio de fluorescência Ziess.

#### 4.8 Medição de PGE2

A expressão de PGE2 induzido por PGL I, via PPAR $\gamma$  foi analisado. Então foi utilizada o GW9662 a 5  $\mu$ M (CAS 22978-25-2, Cayman Chemical, EUA), foram adicionadas ao meio de cultivo antes do primeiro estímulo. O GW9662 é um antagonista irreversível do fator de transcrição PPAR $\gamma$ . Após a estimulação com Beads, Beads-PGL I, mais Beads-PGL I + GW9662, os sobrenadantes da cultura foram colhidos, centrifugados e armazenados a -70°C. A concentração de PGE2, foi medida em sobrenadantes sem células através de um kit EIA (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, EUA). Os ensaios foram conduzidos de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração ideal de GW9662, para inibir a biogênese do corpo lipídico, foi determinada empiricamente para ST8814-SC (Díaz-Acosta *et al.*, 2018).

#### 4.9 Análise da interação indireta do PGL I com a vimentina

A célula ST8814 foi plaqueada com  $1 \times 10^6$ , numa garrafa pequena com RPMI 1640 (10mM de HEPES, 1 mM de L-Glutamina (Invitrogen) pH 7,4,) e 10% SFB (SFB-Cripion

Biotecnologia LTDA) e foi colocada numa estufa de CO<sub>2</sub> á 37°C por 24h. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado e a garrafa foi lavada com PBS 1X, e depois as células foram lisadas para obtenção das proteínas totais, com 1mL do tampão de lise RIPA (50mM TRIS pH= 7,5; 1% Novidet p40; 0,25% Deoxicolato de sódio; 0,1% de SDS) gelado e complementado com inibidores de proteases (Roche, USA), deixamos agir por 10 minutos no gelo. As células foram lisadas e as proteínas totais obtidas da lise foram retiradas, e transferidas para um eppendorf, onde foi passado a seringa 10X. As proteínas foram centrifugadas na rotação máxima, a 4°C por 10 minutos, e após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e guardado na temperatura de -20°C. As proteínas foram dosadas utilizando a técnica Bradford (Bio Rad). Revestimos uma placa de 96 poços com PGL I (100 ng), NDO-BSA (100 ng/mL) e BSA (250 ng/mL) e deixamos *overnight* a 4°C. No dia seguinte lavamos 3X com PBS + 0,05% tween 20, depois bloqueamos com 5% de BSA em PBS por 1h à temperatura ambiente. Novamente lavou-se 3X com PBS + 0,05% tween 20, após a lavagem aplicou as proteínas na placa na concentração de 100ng, 250ng e 500ng incubou por 3 horas a 4°C. Foi realizada mais uma lavagem 3X com com PBS + 0,05% tween 20, depois incubou por 1h com anticorpo primário 1:500 anti-vimentina (*mouse*-Biocare Medical), após a incubação foi feita mais uma lavagem PBS + 0,05% tween 20 e incubou por 1h com anticorpo secundário 1:10.000 anti-mouse conjugado a peroxidase. Realizou mais uma lavagem com PBS + 0,05% tween 20 e, por fim, foi revelado com o Tetrametilbenzidina (TMB) e analisado no leiror de ELISA à 450 nm.

#### 4.9.1 Análise da sequência dos domínios de ligação ao glicolípido identificados em várias proteínas

Analizamos a sequência de aminoácidos das proteínas, que foram identificadas na análise proteômica, nas quais estão associadas a formação dos CLs e modulação do metabolismo lipídico. Analizamos a sequência de aminoácidos destas proteínas, pois queríamos detectar a possível ligação direta ou indireta com o PGL I, mas na literatura não foi encontrada este tipo de pesquisa com o glicolípido do *M. leprae*. Então pesquisamos, esta análise em outro glicolípido. De acordo com Fantini J e colaboradores (78) o primeiro passo da infecção, onde as bactérias se ligam às células do hospedeiro, ocorre pela ligação de suas adesinas aos glicolípidos da superfície celular. Com base nisso, analisaram um domínio de

ligação ao glicolípido na sequência de aminoácidos da adesina bacteriana (*Helicobacter pylori* adesina A, HpaA) (78). Então realizamos o mesmo procedimento, utilizamos o programa de bioinformática de banco de dados das proteínas o UniProt (*Universal Protein*) e colocamos o nome das proteínas que estão envolvidas na formação do CL e modulação do metabolismo lipídico. O programa fornece as funções e a sequência de aminoácidos de cada proteína, e os dados da sequência se encontra no formato FASTA. Para saber o domínio de ligação das proteínas com o PGL I, a sequência de aminoácidos de cada proteína, foi analisada no programa Predict Protein, que analisa regiões acessíveis ao solvente. De acordo com o artigo (78), para que tenha a possível ligação ao glicolípido, marcamos em vermelho os aminoácidos aromáticos W (triptofano), F (Fenilalanina) e Y (Tirosina), os aminoácidos carregados positivamente em verde K (Lisina) e R (Arginina), os aminoácidos carregados negativamente em amarelo D (Ácido aspártico) e E (Ácido glutâmico), e os aminoácidos que induzem “voltas” em azul G (Glicina) e P (Prolina). Para possível ligação ao glicolípido de acordo com o artigo, foram os aminoácidos aromáticos (W, F e/ou Y) que se ligaram ao glicolípido de *H. pylori* e na região que têm a possível ligação, deve conter de 15 a 20 aminoácidos. É necessário que tenha pelo menos um aminoácido aromático, na região que têm a possível ligação.

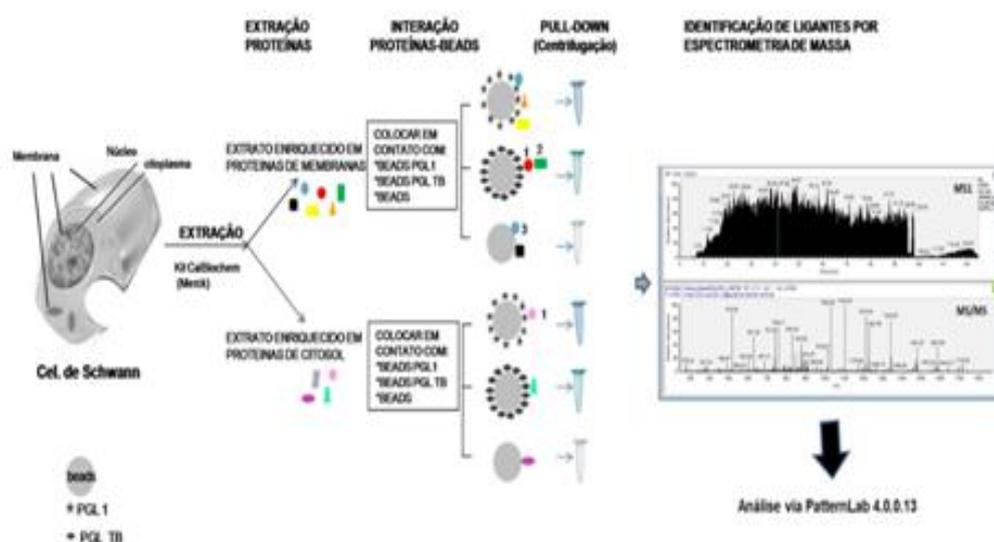
Retiramos a sequência de aminoácidos das proteínas, no programa de banco de dados das proteínas, o Uniprot (*Universal Protein*). O formato FASTA das proteínas foi utilizado no programa Predict Protein que integra previsão de características para estrutura secundária, acessibilidade a solventes, hélices transmembrana, regiões globulares, regiões de espiral enrolada, regiões de troca estrutural, regiões de desordem, contatos intra-resíduos, sítios proteína-proteína e proteína-DNA localização celular, limites de domínio, beta-barris, ligações de cisteína, locais de ligação de metal e pontes dissulfureto. Analisamos no programa, apenas a sequência que têm acessibilidade a solvente.

#### 4.9.2 Interactoma

Como este projeto visa compreender o papel do PGL I no metabolismo lipídico da célula hospedeira, iniciamos nossas análises buscando em dados proteômicos ainda não publicados, obtidos a partir da tese de doutorado da aluna Chyntia Carolina Díaz Acosta

(2016). Neste trabalho, por meio da técnica de *cross-linking* utilizando partículas de látex revestidas com PGL I e frações proteicas de membrana e de citoplasma de células de Schwann da linhagem ST8814, obteve-se um conjunto de proteínas potencialmente ligantes ao PGL I. A partir destes dados, buscamos identificar/selecionar apenas proteínas ligantes do glicolípídeo PGL I associadas ao metabolismo lipídico e à formação de CLs. O fluxograma apresentado na figura mostra como esta análise foi realizada. A partir deste conjunto de proteínas identificadas apenas na amostra de PGL I, decidimos selecionar os candidatos. Para isto, nos concentramos em analisar as proteínas que foram identificadas nas 3 replicatas biológicas e que tiveram no mínimo dois peptídeos totais e 1 peptídeo único. É fundamental que a validação destas proteínas como verdadeiros ligantes do PGL I seja realizada. Desta forma, podemos não apenas ver como este glicolípídeo modula o metabolismo lipídico da célula hospedeira, mas também podemos gerar um conhecimento ao nível de interação molecular, e desta maneira compreender mais detalhadamente os mecanismos moleculares que o PGL I pode estar disparando na célula hospedeira.

Figura 7 - Esquema representativo da metodologia utilizada para identificação de proteínas de células de Schwann da linhagem ST8814 potencialmente ligantes de PGLI



Legenda: Resumidamente, CS da linhagem ST88-14 foram lisadas e foi feita uma extração diferencial para obtenção de extratos enriquecidos em proteínas citoplasmáticas ou de membranas. Cada extrato foi incubado com “beads” recobertos com PGLI, PGLTB ou com “beads” sem revestimento (controle). Em seguida foram separados por “pull-down”, lavados com PBS e submetidos à digestão trípica para identificação das proteínas ligantes por espectrometria de massas (nLC-MS/MS). Os números 1 e 2 representam a interação direta e indireta de proteínas, respectivamente. O número 3 representa uma

possível associação inespecífica. Os ligantes dos “beads” controle não foram considerados para a criação de redes de interação.

Fonte: Acosta, 2016.

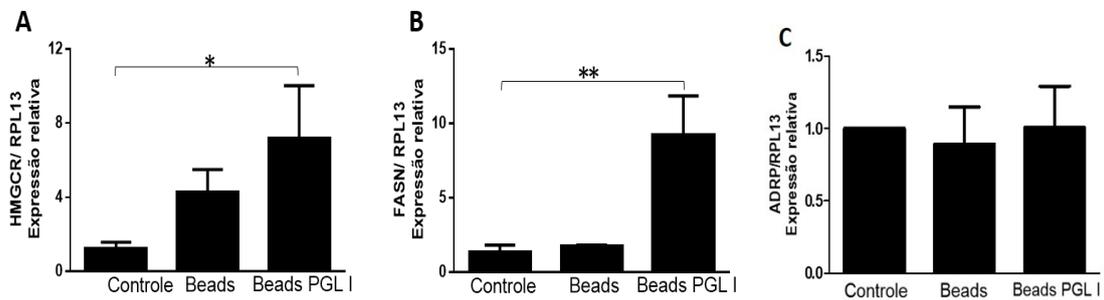
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da modulação da expressão de genes envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos por PGL I

A modulação do metabolismo lipídico pela infecção com *M. leprae* tem sido mostrada pelo nosso grupo em diversos trabalhos publicados (9,10,29,70). Entretanto, o papel do PGL I neste contexto ainda não foi avaliado de forma efetiva. Dados ainda não publicados do nosso grupo mostram a contribuição do PGL I na formação de CLs nas CS (dados não mostrados). Entretanto, não sabemos quais os mecanismos moleculares desencadeados pelo PGL I que levam a formação destas organelas lipídicas.

Para avaliar que alvos poderiam estar envolvidos neste efeito, analisamos por qRT-PCR a expressão de alguns genes sabidamente envolvidos na formação de CLs induzida pelo *M. leprae*. O primeiro a ser analisado foi o gene que codifica a enzima hidroxil metil-glutaril Coenzima A redutase, HMGCoA redutase (HMGCR), que catalisa a etapa limitante na via de biossíntese de colesterol. Os dados obtidos mostram que a estimulação de CS com *beads*-PGL I na MOI 50:1 por 24 horas sugere o aumento da expressão deste gene em relação à condição não estimulada ou mesmo estimulada com *beads* sem revestimento (Figura 8A). Outro gene analisado foi o *fasn*, que codifica a enzima ácido graxo sintase, que catalisa a formação de ácidos graxos de cadeia longa. Nossos dados sugerem que a estimulação de CS com *beads*-PGL I levou também a um aumento da expressão do gene *fasn* em relação às outras condições analisadas (Figura 8B). No entanto, para o gene que codifica a proteína estrutural de CLs, *adrp* (*adipose differentiation related protein*), o estímulo com *beads*-PGL I sugeriu não alterar seu perfil de expressão gênica no tempo de 24 horas (Figura 8C).

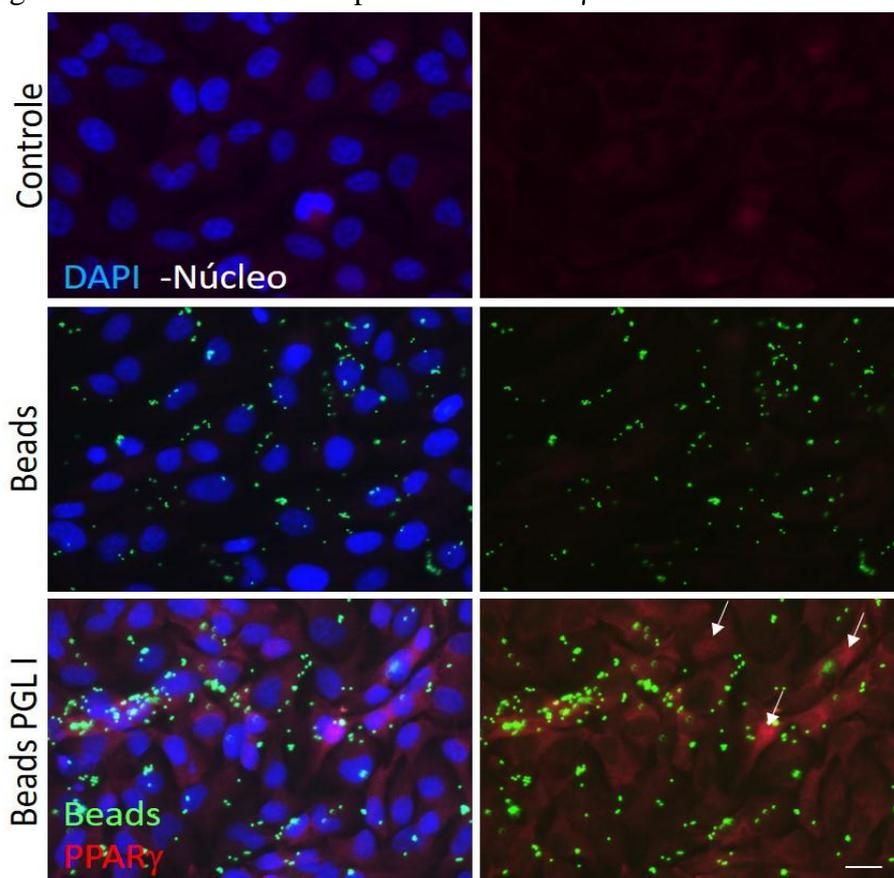
Figura 8 - PGL I aumenta a expressão dos genes que codificam das enzimas HMGCR e FASN em células de Schwann



Legenda: Células de Schwann da linhagem ST8814 foram estimuladas ou não com *beads* e *beads*-PGL I na MOI de 50:1 por 24h. (A-C) Análise comparativa da expressão gênica de *hmgcr*, *fasn* e *adrp*, respectivamente. (n:3).

Tanto *hmgcr* quanto *fasn* são genes que tem sua transcrição regulada pelo fator de transcrição PPAR $\gamma$  (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) (79), um receptor nuclear, que ao se ligar ao segmento específico do DNA, PPRE, (*Peroxisome Proliferator Responsive Element*), ativa a transcrição de vários genes relacionados a adipogênese, metabolismo lipídico, metabolismo de glicose, síntese de prostaglandina E dentre outros (80-81). Dados do nosso grupo mostraram que tanto o *M. leprae* quanto a cepa de BCG que expressa o glicolípido PGL I (BCG-PGL I), aumentam a expressão do fator de transcrição PPAR $\gamma$  (10). A partir disto, decidimos então avaliar qual o papel do PGL I na modulação da expressão de PPAR $\gamma$  nas CS. De forma semelhante, CS foram estimuladas com *beads* sem revestimento ou *beads*-PGL I por 48h em meio com 2% de SFB. O resultado obtido, apresentado na figura 9, mostra por imunofluorescência, que o estímulo com *beads*-PGL I, aumentou a expressão de PPAR $\gamma$  no citosol das CS, no entanto, também observamos um aumento da expressão do PPAR $\gamma$  no núcleo de algumas células (setas brancas), sugerindo que este fator de transcrição esteja se translocando para o núcleo da célula, podendo desta maneira ativar a transcrição de genes sob sua regulação.

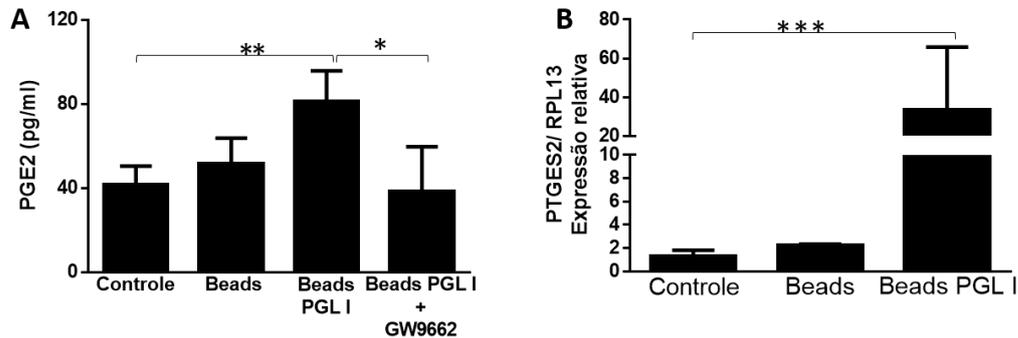
Figura 9 - PGL I induz a expressão de PPAR $\gamma$  em células de Schwann



Legenda: Células de Schwann da linhagem ST8814 foram estimuladas ou não com *beads* e *beads*-PGL I na MOI de 50:1 por 48h em meio RPMI com 2% SFB. Microscopia de fluorescência mostrando a expressão do fator de transcrição PPAR $\gamma$  em CS não estimuladas e estimuladas com *beads* e *beads*-PGL I. As setas brancas ressaltam a localização nuclear deste fator de transcrição sugerindo sua translocação para o núcleo nas células estimuladas com PGL I. Barra - 10 $\mu$ m. (n=3).

Como mencionado acima, o PPAR $\gamma$  regula a síntese de um mediador lipídico importante na hanseníase chamado de prostaglandina E2 (PGE2), nosso próximo passo então foi analisar se a produção de PGE2 seria afetada pelo estímulo com *beads*-PGL I. Neste ensaio analisamos também em paralelo, qual o efeito do antagonista de PPAR $\gamma$ , GW9662, na produção deste eicosanoide. Verificamos também por qRT-PCR, se o gene *pge2s*, seria modulado por este glicolípido. Nossos resultados sugerem que *beads*-PGL I foram capazes de aumentar a produção de PGE2, e que a produção deste eicosanoide foi inibida pelo antagonista de PPAR $\gamma$  (Figura 10A). Além disto, observamos também que o estímulo com PGL I aumentou a expressão do gene *pge2s*, que codifica a enzima prostaglandina E2 sintase (Figura 10B). Estes resultados sugerem que o PGL I é uma ou uma das moléculas do *M. leprae* importantes na modulação do metabolismo lipídico das CS.

Figura 10 - PGL I aumenta produção de PGE2 via PPAR $\gamma$



Legenda: Células de Schwann da linhagem ST8814 foram estimuladas ou não com *beads* e *beads*-PGL I na MOI de 50:1 por 24h. (A) Análise da produção de PGE2 e envolvimento do fator de transcrição PPAR $\gamma$  neste fenômeno. Neste ensaio foi usado 5 $\mu$ M de GW9662 (inibidor de PPAR $\gamma$ ) durante todo o tempo de incubação. (B) Análise comparativa da expressão do gene que codifica a enzima *pge2s* frente as condições acima citadas. (n=3).

## 5.2 Seleção de potenciais proteínas de células de Schwann ligadoras do glicolípídeo PGL I e análise *in silico* de sua localização celular e presença de domínios transmembrana e interação com o fator de transcrição PPAR $\gamma$

Como consequência destes achados, nos perguntamos, como o PGL I poderia estar aumentando a expressão de PPAR $\gamma$ ? Recentemente foi identificado pela Dra. Chyntia Acosta durante o seu doutoramento no Lab de Microbiologia Celular (dados não mostrados), proteínas potencialmente ligantes ao PGL I. Isto foi avaliado pelo interactoma deste glicolípídeo com duas frações proteicas distintas de CS, uma enriquecida em proteínas de membrana e outra em proteínas citoplasmáticas.

Brevemente, estas proteínas foram postas para interagir com *beads* sem revestimento e *beads*-PGL I, após esta interação foi feita uma centrifugação e a fração de proteínas ligadas às *beads* vazias e ou ao PGL I ligado às *beads*, foram tratadas com tripsina e identificadas por espectrometria de massas. Nesta parte do trabalho foi feita uma revisitação e reanálise dos dados da Dra. Chyntia. Nesta reanálise foi feita uma procura de possíveis alvos que pudessem nos direcionar quanto ao papel do PGL I como um ligante, favorecedor da formação de CLs, e algum alvo que pudesse direcionar como esta molécula poderia estar aumentando a expressão ou mesmo regulando positivamente a atividade do PPAR $\gamma$ . Selecionamos em nossas análises algumas proteínas apresentadas na tabela 2. Com relação às proteínas apresentadas na tabela 2, o critério de seleção foi baseado na identificação em todas as replicatas biológicas e na

presença de pelo menos um peptídeo único específico para cada proteína identificada. Além desta reanálise foi feita também, uma análise de predição de localização celular usando duas ferramentas, o site Hum-mPLoc 2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/hum-multi-2/>) (Tabela 2).

**Tabela 2:** proteínas potencialmente ligantes de PGL I presentes nas frações de proteínas enriquecidas de membrana e de citoplasma de células de Schwann envolvidas direta ou indiretamente com a formação de corpúsculos lipídicos

Cod. Uniprot	Identificação	Sigla	Fração proteica				*Localização celular	**Domínio transmembrana	***Domínio transmembrana
			Membrana		Citoplasmática				
			Peptídeos totais	Peptídeos únicos	Peptídeos totais	Peptídeos únicos			
P49327	Ácido graxo sintase	FASN	17	17	50	50	Ctp	-	-
P09382	Galectina-1	LGALS1	9	9	3	3	Ctp, Ec	-	-
P17931	Galectina-3	LGALS3	2	4	-	-	Ctp, Mp, Nu	-	-
O60664	Perilipina-3	PLIN3/TIP47	-	-	1	6	Ctp, End, Cg	-	-
P21796	Proteína formadora de canal seletivo a ânions dependente de voltagem	VDAC1	-	-	3	3	Ec, Mit	-	ok
P08670	Vimentina	VIM	2	25	4	30	Ctp, Ctp, Nu	-	-

\*Localização celular predita usando Hum-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/hum-multi-2/>).

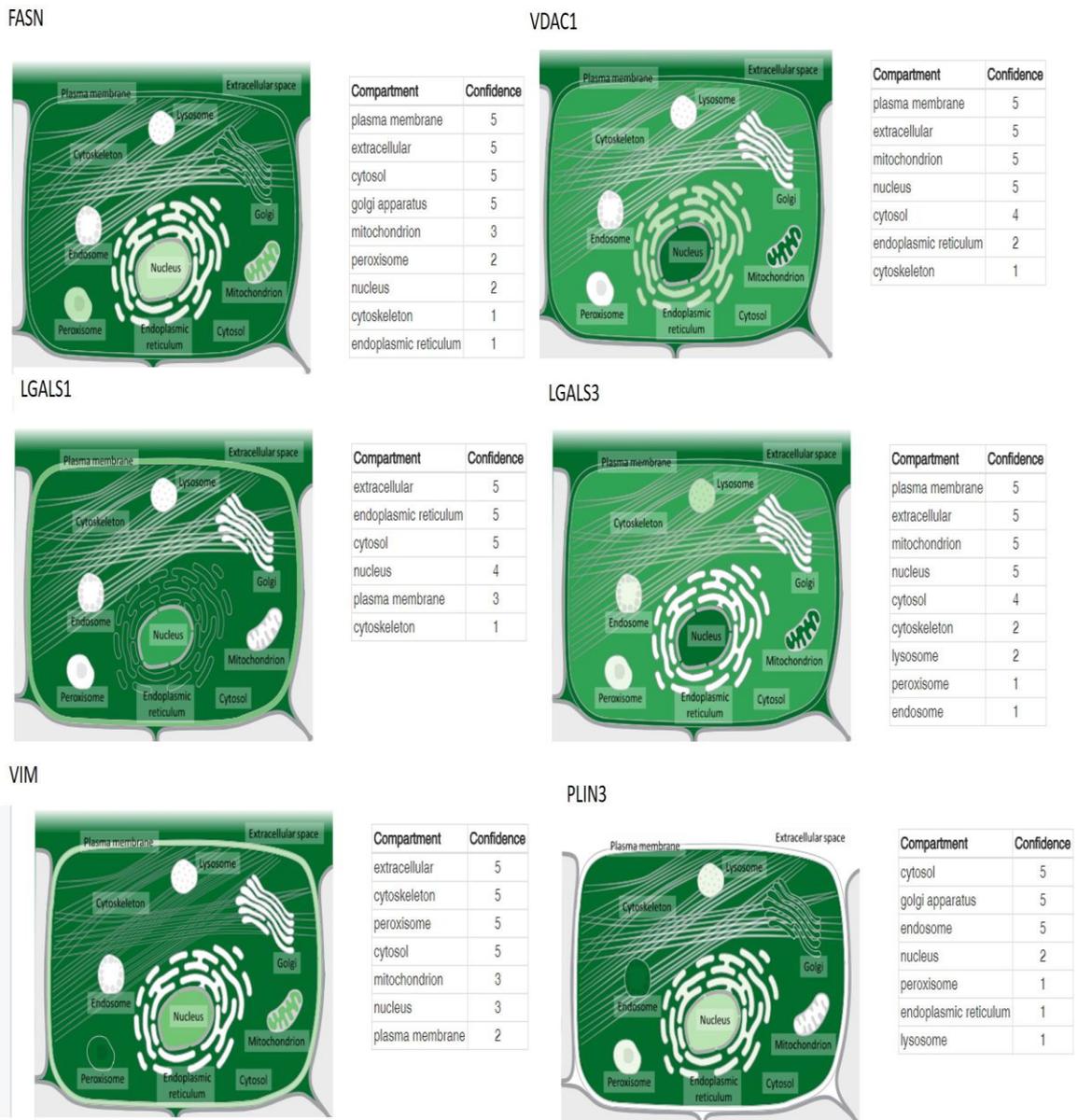
\*\*Predição de domínio transmembrana alfa-hélice usando TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

\*\*\*Predição de domínio transmembrana barril-beta usando PRED-TMBB(<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/input.jsp>).

Ctp - citoplasmática, Ctp - citoesqueleto, Cg - Complexo de golgi, Ec - extracelular, Mic - microsomo, Mit - mitocôndria, Nu - núcleo, Re - Reticulo endoplasmático

A informação extraída do banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot a partir do *Gene Cards*, um banco de dados do genoma humano (<https://www.genecards.org/>) que validou e refinou a localização celular destas proteínas (Figura 11). A figura 11 mostra para cada proteína identificada, um grau de confiança representado por uma escala verde, sendo o verde mais escuro as predições com maiores informações e o branco onde não foi até o momento detectada esta proteína. A representação esquemática desta escala pode ser visualizada também nos esquemas celulares que mostram os diferentes compartimentos celulares.

Figura 11 - Representação esquemática da localização celular das diferentes proteínas do citosol e da fração enriquecida em membrana de CS identificadas pelo interactoma como potenciais ligantes de PGL I



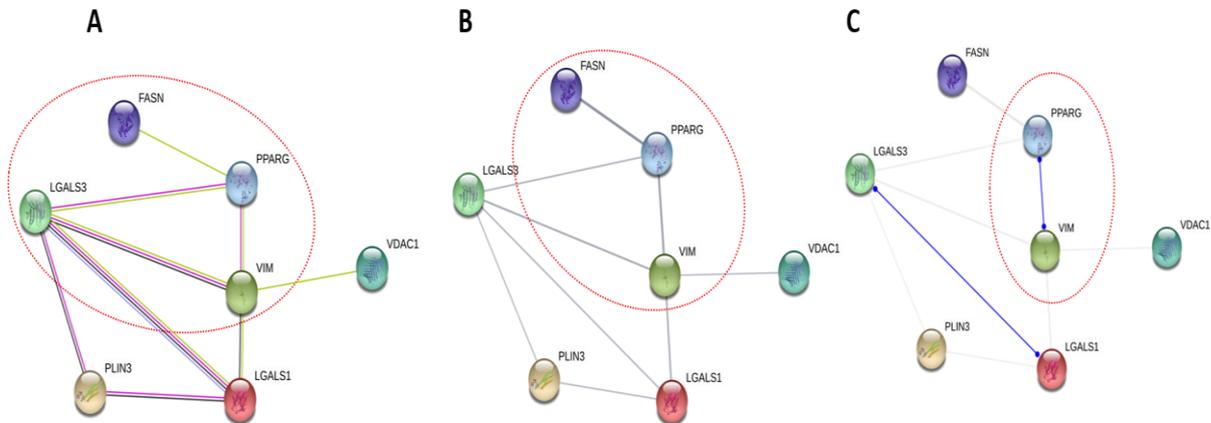
Legenda: A escala em verde crescente mostra os compartimentos celulares onde cada proteína é descrita mais abundante. Fonte: (<https://www.genecards.org/>).

Os dados *in silico* mostram, segundo Hum-mPLoc, que a proteína VDAC1 predita como Mit e extracelular (Ec) foi identificada apenas na fração Ctp. Entretanto, segundo UniprotKb/Swiss-Prot, apesar do núcleo (Nu) e mitocôndria (Mit) serem duas das principais localizações celulares da proteína VDAC1, o Ctp também está predito como uma localização celular para esta proteínas, com um grau de confiança de 4 e 3. Observamos também que a maioria das proteínas preditas como Ctp foi identificada tanto na fração Ctp quanto na fração

de membrana. Logo, decidimos ampliar nossas análises e fomos verificar se alguma delas teria domínio transmembrana, e para isto a sequência de aminoácidos foi analisada usando dois algoritmos, TMHMM ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) que verifica a presença de alfa-hélices transmembranares nas proteínas.

O resultado apresentado na tabela 2 mostra que nenhuma delas tem domínios transmembrana em alfa-hélice, no entanto quando analisamos através da estrutura em barril-beta, observamos que a proteína VDAC1 apresenta domínio transmembrana em barril beta. Este resultado mostra a relevância de utilizarmos diferentes ferramentas de bioinformática afim de refinarmos e compreendermos um pouco mais sobre as proteínas identificadas. A identificação de proteínas na fração enriquecida em proteínas de membrana mas que não apresentam um domínio transmembranar pode sugerir que estas proteínas estavam ligadas ou por âncoras à membrana da célula ou de organelas, ou estavam ligadas indiretamente às proteínas membranares. FASN, foi predita como sendo Ctp mas foi identificada em ambas as frações proteicas. Uma análise via UniprotKb/Swiss-Prot, mostrou que além de estar predita no Ctp celular, esta proteína já foi descrita na membrana plasmática (Mp) com elevada confiança (5) e em diversas organelas inclusive no Nu celular (Figura 11). A localização da FASN no Nu da célula tem sido evidenciada em estudos com células cancerosas (72). A proteína PLIN3 foi selecionada por ser uma proteína estrutural de CLs, esta proteína foi identificada apenas na fração citoplasmática e apesar das predições confirmarem esta localização, ela também parece ser expressa no complexo de Golgi (Cg) e e endossoma (End) (Tabela 2 e Figura 11). A VIM foi uma das proteínas que obteve maior número de peptídeos identificados, ela foi identificada tanto na fração enriquecida em proteínas de membrana, quanto no citoplasma. Com relação a predição de localização subcelular, confirmamos sua presença no Ctp e citoesqueleto (Ctq) mas também aponta sua presença na Mp e em outros compartimentos celulares (Figura 11). A partir destas análises outra pergunta surgiu: será que a ligação a algumas destas proteínas poderia resultar em um aumento da formação de CLs e/ou na expressão ou atividade do fator de transcrição PPAR $\gamma$ ? Com o objetivo de avaliar se as proteínas identificadas como potenciais ligantes de PGL I interagem entre si e com o PPAR $\gamma$ . Utilizamos o banco de dados do programa STRING (<https://string-db.org/cgi/>) que prediz a interação proteína-proteína. A figura 12 mostra que existe uma rede de interação entre as proteínas, com exceção da septina 9 (Figura 12A).

Figura 12 - Rede de interação das proteínas de CS identificadas como potenciais ligantes de PGL I e suas interações com PPAR $\gamma$ .



Legenda: Proteínas identificadas pelo interactoma e apresentadas na tabela 1 (A) Representação esquemática das interações usando uma escala de cores a linha amarela representa dados da literatura, em rosa dados experimentais, em preto co-expressão gênica, azul homologia e outros. Círculo pontilhado representa as proteínas que têm algum nível de interação com PPAR $\gamma$ . (B) Grau de confiança entre as interações proteína-proteína. Os círculos ressaltam as interações previstas com maior confiança, representadas por linhas cinzas mais grossas. (C) Interação molecular entre as diferentes proteínas. Resaltando a interação entre a vimentina e o fator de transcrição PPAR $\gamma$ . Para estas análises usamos o banco de dados String versão 10.5. Fonte: (<https://string-db.org/cgi/network.pl>).

Os resultados mostraram que as proteínas VIM, FASN e LGALS3 interagem de alguma maneira diretamente com o fator de transcrição PPAR $\gamma$  (círculo pontilhado - Figura 12A). O resultado extraído destas análises mostra que as interações são baseadas principalmente em dados experimentais (linha rosa) e informações extraídas da literatura (linha amarela). Entretanto, dados de co-expressão (linha preta) e homologia de proteína (linha lilás) também foram descritos como meios de associação (Figura 12A). A figura 12B representa o grau de confiança entre estas interações. As linhas mais grossas representam uma maior confiabilidade e estão ressaltadas nos círculos pontilhados. Interessante observar que a VIM e a FASN mostraram um maior grau de confiança nesta interação com PPAR $\gamma$ . A última representação gráfica (Figura 12C) mostrou a interação ao nível molecular entre as diferentes proteínas. Neste nível a VIM mostrou ser a única proteína a interagir molécula-molécula com PPAR $\gamma$ .

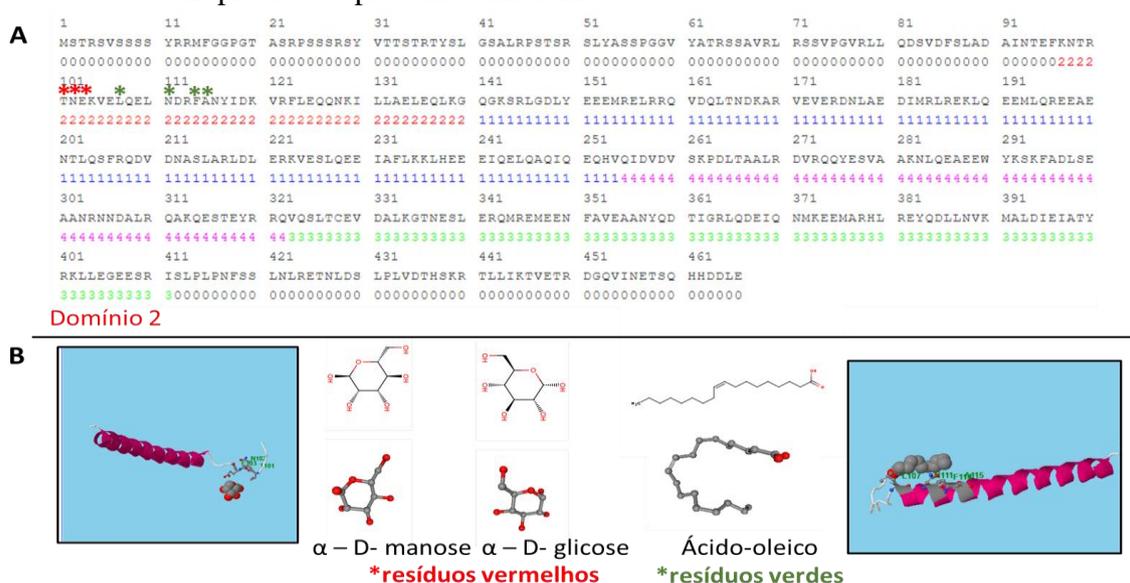
Os dados de interactoma apontam o PGL I como um potencial ligante deste filamento intermediário tanto na fração citosólica quanto na fração de proteínas enriquecidas em membrana (Tabela 2). Apesar de ser uma proteína de Ctq e, portanto, citosólica, os programas

de localização celular mostram que esta proteína está descrita em outros compartimentos celulares como Nu, Mp, Mit e etc (Tabela 2 e Figura 11). Nossas análises mostraram que esta proteína, apesar de ter sido identificada também na fração de membrana, não possui nenhum domínio transmembranar predito pelos algoritmos utilizados neste trabalho. Isto sugere que a vimentina identificada nesta fração proteica provavelmente está ligada a outras proteínas de membrana.

### 5.3 Análise *in silico* de possíveis sítios de ligação presentes em domínios proteicos capazes de reconhecer a molécula de PGL I como um possível ligante

Para tentar fortalecer um pouco mais os achados do interactoma, algumas proteínas identificadas na tabela foram analisadas usando o programa *Raptor X binding* (<https://www.rcsb.org/>) que prediz sítios de ligação e possíveis ligantes baseados na estrutura molecular da proteína alvo. O resultado mostra que a vimentina tem quatro domínios (Figura 13A), entretanto, nestas análises observamos que apenas o domínio 2 apresenta resíduos de aminoácidos capazes de reconhecer como ligantes preditos, moléculas de glicose, manose, ácido graxo, dentre outras (Figura 13B). Estes dados podem reforçar que o PGL I pode estar se ligando a esta proteína considerando tanto a porção glicídica quanto lipídica de sua estrutura molecular.

Figura 13 - Representação esquemática de sítios de ligação de moléculas baseado no modelo 3D predito da proteína vimentina



Legenda: (A) sequência primária da proteína com 4 domínios (domínios 1-4) representados por azul, vermelho, verde e rosa preditos com base no modelo 3D da proteína extraído do *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Os resíduos marcados com asteriscos, representam os aminoácidos presentes

no domínio 2 capazes de reconhecer possíveis moléculas ligadoras. (B) Estrutura 3D da vimentina com moléculas de manose e glicose sendo reconhecidas pelos aminoácidos em vermelho e a molécula de ácido graxo, ácido oleico, sendo reconhecida pelo aminoácidos em verde.

Além destas análises, também analisamos as proteínas com base no artigo de Fantini J e colaboradores em 2006, um trabalho que identificou resíduos de aminoácidos específicos em domínios de proteínas que formam um *pocket* de ligação a glicolipídeos. Sabe-se que muitas bactérias, assim como seus fatores de virulência, como toxinas, interagem com regiões da membrana plasmática ricas em colesterol, esfingomielina e glicosfingolipídeos conhecidas como *lipids rafts* (82, 78), sendo estas regiões consideradas muito atraentes para uma gama de patógenos tais como, vírus, bactérias e mesmo *prions* (78). Acredita-se que motivos estruturais presentes em domínios de proteínas presentes nestas regiões, que reconheçam glicolipídeos, sejam de grande relevância. Com base neste artigo, nós avaliamos se a vimentina poderia ter uma sequência de aminoácidos que potencialmente poderia reconhecer o PGL I, afim de corroborar com os dados do interactoma e do *Raptor X binding*. A figura 14 mostra duas sequências de 31 e 35 aminoácidos sublinhadas que, segundo o artigo de Fantini J e colaboradores (78), pode ser reconhecida por glicolipídeos. Esta análise reforça ainda mais a vimentina como um ligante em potencial da molécula de PGL I (Figura 14).

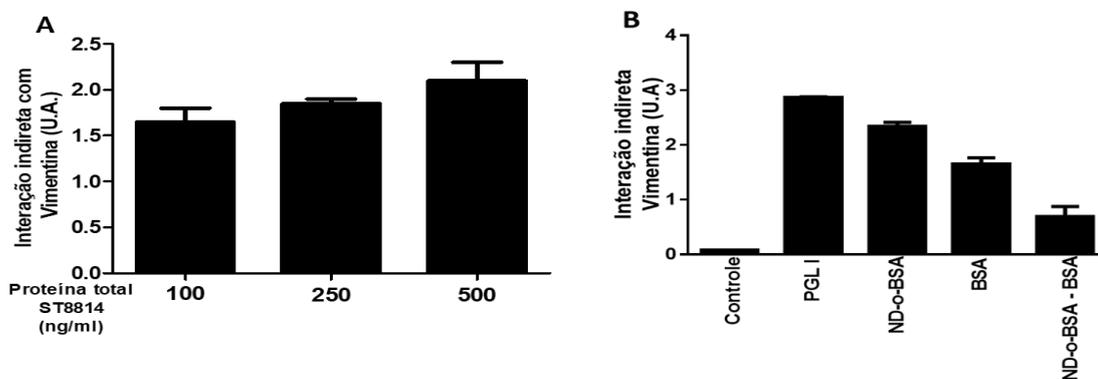
Figura 14 - Potenciais domínios de ligação à glicolípido identificados por análise *in silico* da proteína Vimentina

**Vimentina**  
 >sp|P08670|VIME\_HUMAN Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4  
 MSTSVSSSSVREMFGGGTASSSSSSVTTSTSTVSLSALRSTSSLVASSGGV  
 NATSSAVLSSVPGVLLQDSVDFSLADAINTEFANTTNEFVELQELNDRSANLIDK  
 VFLEQQNILLAELEQLQSSLDLVEEMLELQVDQLTNDKASVEVEDNLAE  
 DIMLSEELQEEMLQEEAENTLQSEEQVDNASLASLDLEKVESLQEEIASLKLHEE  
 EIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKDLTAALDVEQQLESVAAANLQEAEEWYSSKADLSE  
 AANNNDALQAKQESTELQVQSLTCEVDALKVTNESLEKQMRMEENFAVEAANLQD  
 TIFLQDEIQNMEEEMASHLEEQDLLNVKMALDIEIATVRSLLLEESISLILNFS  
 LNLSETNLDLVLVDTHSGRTLLITVETLDQVINETSQHHDDLE

Legenda: Os resíduos de aminoácidos aromáticos estão indicados em vermelhos, os indutores de rotação em azul, resíduos básicos em verde e resíduos ácidos em amarelo. Os resíduos aromáticos marcados com asteriscos são potencialmente envolvidos no reconhecimento de glicolipídeos.

Para confirmar a interação entre a vimentina e PGL I foi realizado um ensaio de interação indireta. Para isto revestimos placas de 96 poços com PGL I, após este período foi feito o bloqueio com albumina bovina (BSA) e recobrimos este glicolípido com extrato total de proteínas de CS. Após uma interação de 3 horas lavamos, incubamos com anticorpo primário anti-vimentina por 1 hora, foi usado um anticorpo secundário conjugado à HRP, e a reação foi revelada com a solução de TMB e a interação foi avaliada por espectrofotometria. A figura 15A mostra um aumento sutil na interação entre a vimentina e PGL I, a medida que aumentamos a concentração de extrato proteico, entretanto, este aumento não parece ser tão expressivo, pois com 100ng/ml de proteína já observamos uma D.O de 1,75.

Figura 15 - Interação indireta entre PGL I e vimentina



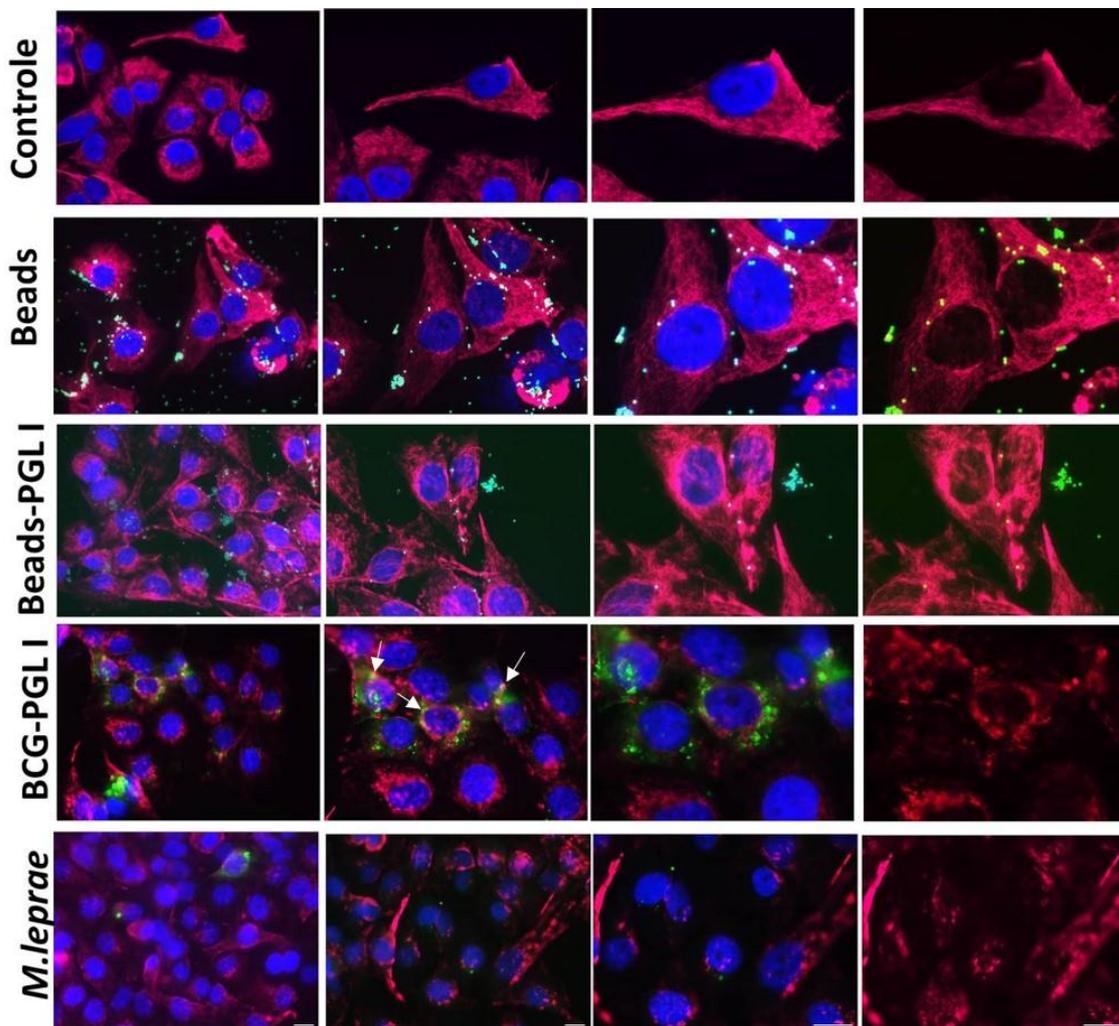
Legenda: (A) Placas de 96 poços foram revestidas com PGL I na concentração de após a sensibilização da placa foi adicionado concentrações crescentes de extrato total de proteína de Schwann. (B) Foi feita a sensibilização com PGL I, ND-o-BSA, que contém apenas a porção glicídica do PGL I, e com BSA, foi adicionado 500ng/ml de extrato total de proteínas de CS. Tanto em (A) quanto em (B) a interação entre o PGL I e vimentina foi avaliada usando anticorpo anti-vimentina 1:100 e a reação foi visualizada com anticorpo secundário conjugado a HRP e a reação foi revelada com TMB. (n=2).

Como o PGL I tem tanto uma porção lipídica quanto uma porção glicídica e, pelas análises acima a vimentina parece ser capaz de reconhecer tanto carboidratos quanto lipídeos como ligantes, resolvemos analisar qual a porção do PGL I poderia ser mais importante nesta interação (Figura 15B). A molécula ND-O-BSA corresponde a porção dissacarídica do PGL I ligada a molécula de BSA, como controle revestimos também poços com BSA na mesma concentração. O resultado mostra que a vimentina se ligou a molécula de ND-O-BSA, no entanto, para descartar que esta ligação tenha sido via a porção proteica, revestimos alguns poços com BSA. O resultado mostra uma interação importante entre a vimentina e o BSA. Para quantificarmos a interação via a porção dissacarídica, subtraímos a D.O. da ligação com ND-O-BSA com a D.O da ligação direta ao BSA. O resultado mostra que a porção

dissacarídica se liga a vimentina, no entanto a porção lipídica do PGL I parece ser mais importante nesta interação com a vimentina (Figura 15B).

Analisamos também por imunofluorescência como o estímulo com PGL I modula a expressão da vimentina nas CS. A figura mostra que o estímulo com PGL I altera o perfil de marcação da vimentina, exibindo um padrão mais fragmentado e menos filamentar quando comparado a condição controle. Este efeito é ainda mais visível nas CS infectadas com BCG PGL I e *M. leprae* (Figura 16).

Figura 16 - PGL I modula a expressão de vimentina em células de Schwann

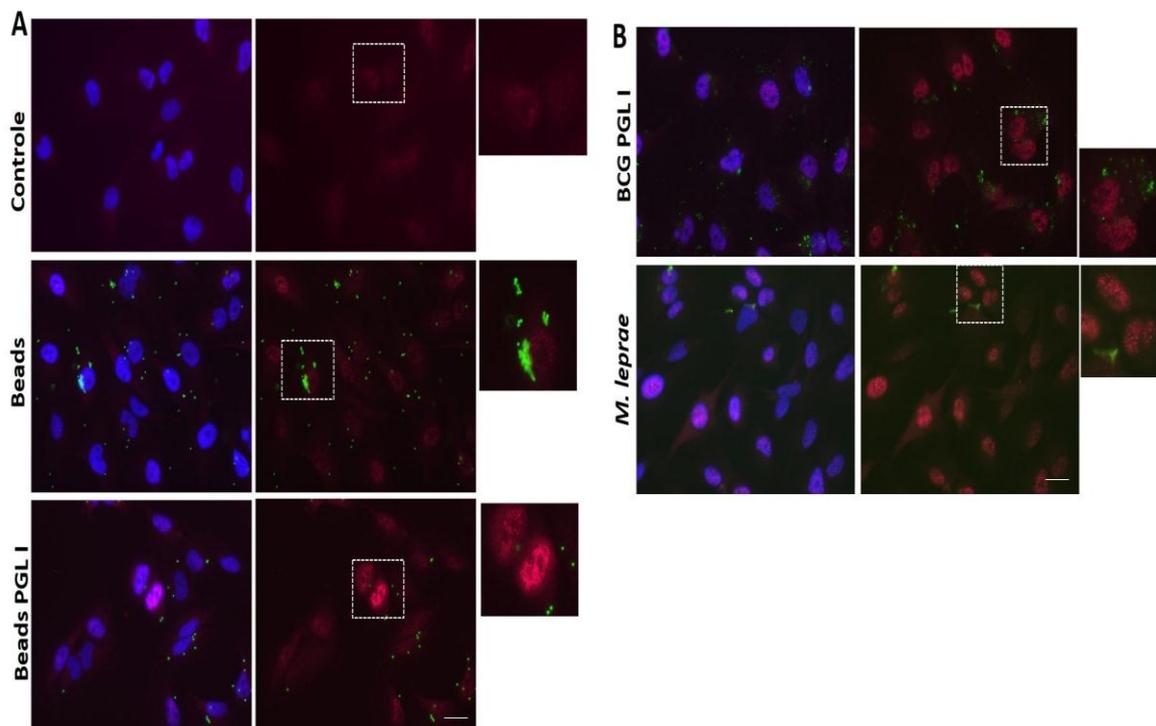


Legenda: Células de Schwann da linhagem ST8814 foram estimuladas ou não com *beads* e *beads*-PGL I (verde) e infectadas com *M. leprae* ou BCG PGL I (ambos marcados com PKH67) na MOI de 50:1 por 48h. Microscopia de fluorescência mostrando a expressão do filamento intermediário vimentina (em vermelho) e o núcleo das células com DAPI (em azul). As setas brancas ressaltam a co-localização entre o bacilo BCG PGL I e o filamento de vimentina. Barras - 10 $\mu$ m. (n=2).

## Ácido graxo sintase – FASN

Com relação a FASN, alguns trabalhos apontam os ácidos graxos de cadeia longa como agonistas de PPAR $\gamma$  (79). Como mencionado acima, a enzima FASN apesar de ter sido localizada e de ser predita como uma proteína Ctp, está presente também no núcleo de alguns tipos celulares (72). Com base nisto fomos confirmar por imunofluorescência se de fato o PGL I afeta a expressão desta proteína nas CS. O resultado da figura 17 mostra que o PGL I parece aumentar a expressão de FASN, (Figura 17A) principalmente no núcleo da célula. Observamos também, que a infecção com BCG PGL I e com *M. leprae* também foram capazes de aumentar a expressão desta enzima principalmente no núcleo da célula (Figura 17B).

Figura 17 - PGL I aumenta a expressão da enzima ácido graxo sintase, FASN em células de Schwann



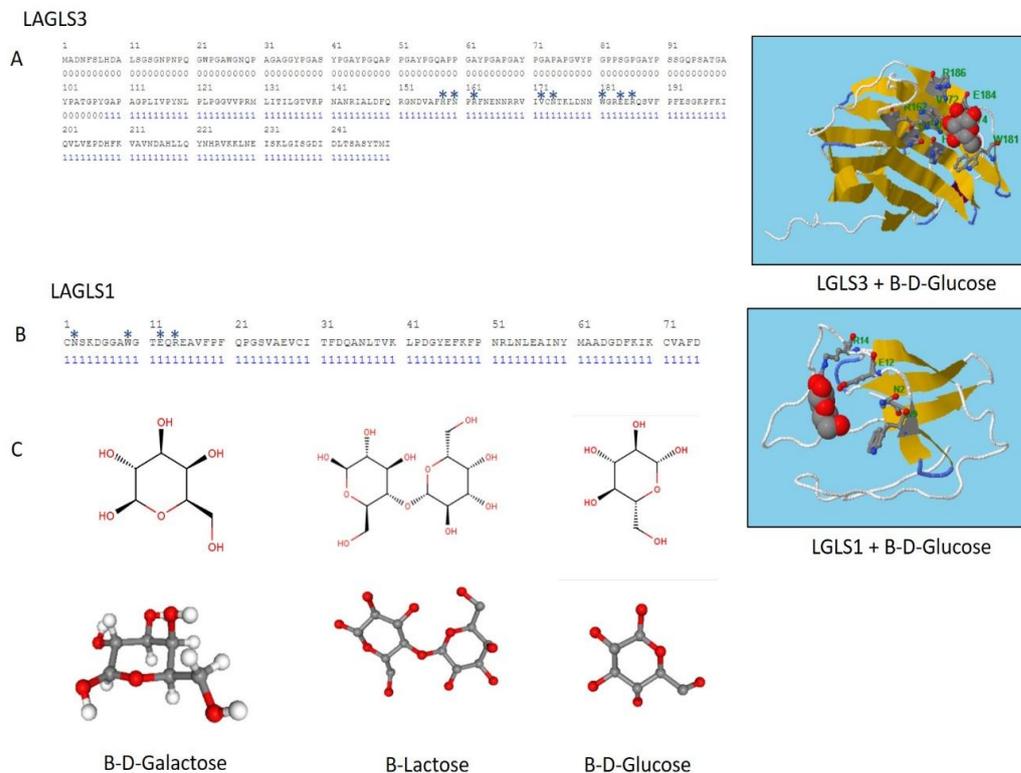
Legenda: Microscopia de fluorescência de células de Schwann da linhagem ST8814 que foram estimuladas ou não em (A), com *beads* e *beads*-PGL I (verde) e em (B) infectadas com *M. leprae* ou BCG PGL I (ambos marcados com PKH67) na MOI de 50:1 por 48h. Expressão da enzima FASN (em vermelho) e o núcleo das células com DAPI (em azul). Podemos observar a marcação da enzima no núcleo da célula *beads*-PGL I. Os retângulos pontilhados ressaltam a localização nuclear desta proteína sugerindo sua translocação para o núcleo nas células estimuladas com PGL I e ou infectadas com *M. leprae* e BCG PGL I. Barra - 10 $\mu$ m. (n=3 Figura A) (N=1 Figura B).

Devido ao tamanho da proteína FASN, não conseguimos avaliar via Raptor x binding potenciais ligantes desta proteína. Análises usando as bases fornecidas pelo trabalho de Fantini J e colaboradores (78) também não mostraram *pockets* de ligação à glicolípido.

### Galectina 1 e Galectina 3

Nas análises do interactoma foram identificadas também duas galectinas, galectina 1 (LGALS1) e galectina 3 (LGALS3). As galectinas fazem parte de uma família de proteínas ligadoras de glicanos implicadas em sinalização celular, comunicação célula-célula dentre outras (83). Na figura 18B vimos que dentre as galectinas identificadas como potenciais ligantes de PGL I, a que interage diretamente com PPAR $\gamma$  é a LGALS3, entretanto segundo a análises *in silico* com o programa STRING ambas galectinas interagem molecularmente entre si (Figura 18 C). Uma análise de domínios e de possíveis ligantes foi também realizada com estas proteínas e vimos que tanto galectina 1 quanto a galectina 3 apresentam domínios de ligação com resíduos de aminoácidos capazes de reconhecer B-D galactose, lactose e B-D-glicose (Figura 18A-C).

Figura 18 - Representação esquemática de sítios de ligação de moléculas baseado no modelo 3D predito das proteínas Galectinas 1 e 3



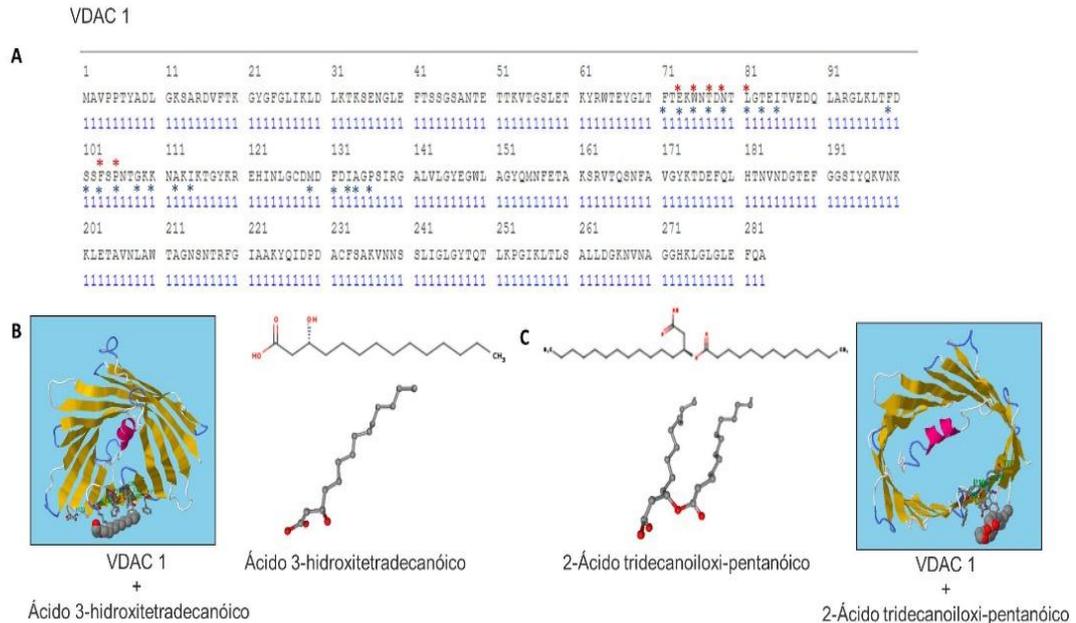
Legenda: (A-B) sequência primária das proteínas galectina 3 e galectina 1 com 1 domínio representados por azul predito com base no modelo 3D da proteína extraído do *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Os resíduos marcados com asteriscos, representam os aminoácidos presentes no domínio 1 capazes de reconhecer possíveis moléculas ligadoras. (C) Estrutura 3D das galectina 3 e galectina 1 com a molécula de glicose sendo reconhecida pelos aminoácidos marcados com asteriscos.

Como o PGL I tem em sua estrutura duas ramnosas e uma glicose, estes achados podem sugerir que a molécula de PGL I possa se ligar via sua porção glicídica à estas galectinas. Em 2015 Jung-Hwan Baek e colaboradores mostraram que a LAGLS3 interage com PPAR $\gamma$  e aumenta sua atividade transcricional (84). Será que a ligação do PGL I à LAGLS3 poderia favorecer este mecanismo?

## **VDAC1**

Outra proteína que nos chamou a atenção foi a proteína 1 formadora de canal seletivo a ânions dependente de voltagem, VDAC1, trabalhos publicados mostram que VDAC1 é altamente expressa na membrana externa da mitocôndria (MEM) (85) e na membrana do fagossoma (86). Sendo uma proteína importante para sobrevivência do *M. avium*, e envolvida na exportação de lipídeos micobacterianos (86). Este achado abre uma brecha para o possível envolvimento do PGL I com esta proteína. Será que o PGL I se liga a esta molécula no fagossoma e é então liberado para o ambiente citoplasmático? Para tentar fortalecer um pouco mais este achado usamos o programa *Raptor X binding*. A análise mostrou que a proteína VDAC1 tem apenas um domínio de ligação, que compreende toda a extensão da proteína, e apresenta diversos sítios de ligação (ressaltados com asteriscos azuis e vermelhos) para diferentes possíveis ligantes (Figura 19A). A figura 19B-C mostra a estrutura tridimensional da proteína com o ácido graxo 3-hidróxi-tetradecanóico ligado aos resíduos de aminoácidos vermelhos e com o possível outro ligante desta proteína o ácido tri-decanonoiloxipentanóico interagindo com os aminoácidos marcados em azul (Figura 19B).

Figura 19 - Representação esquemática de sítios de ligação de moléculas baseado no modelo 3D predito da proteína VDAC1



Legenda: (A-B) sequência primária da proteína VDAC1 com 1 domínio representados por azul predito com base no modelo 3D da proteína extraído do *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). Os resíduos marcados com asteriscos, representam os aminoácidos presentes no domínio 1 capazes de reconhecer possíveis moléculas ligadoras. (B-C) Estrutura 3D VDAC1 com as moléculas de ácidos graxos sendo reconhecida pelos aminoácidos marcados com asteriscos.

Estas análises nos pareceram interessantes pois podem fortalecer o achado do PGL I como potencial ligante desta proteína devido a grande porção lipídica que este glicolípido tem sua estrutura química. Este achado pode sugerir uma possível via de secreção do PGL I do fagossoma.

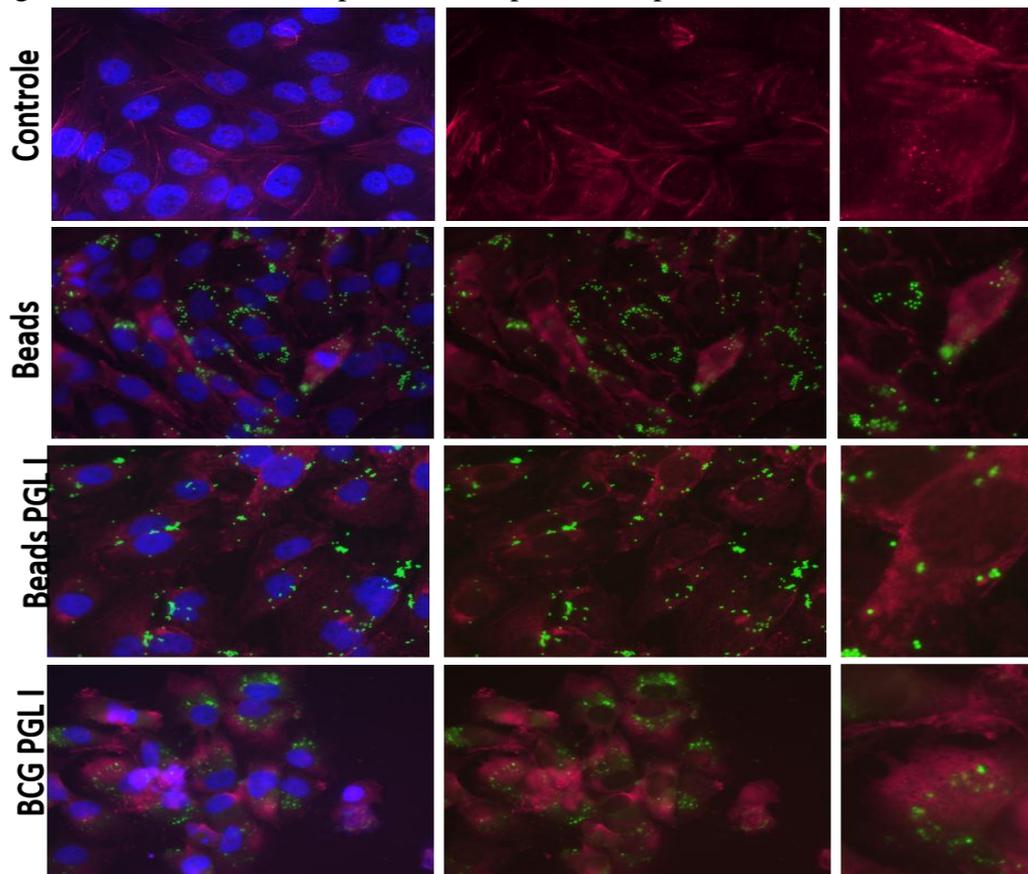
### Perilipina 3

Apesar do PPAR $\gamma$  ser muito importante, outras proteínas foram identificadas no interactoma que também tem sido associada a formação de CLs. Uma delas é a perilipina 3 (PLIN3). As proteínas da família das perilipinas convencionalmente chamada de família PAT compreendem PLINs 1-5 e são as principais proteínas associadas a CLs (87), PLIN3 tem uma localização no citosol e nos CLs (88). Nossos resultados mostram o PGL I como um ligante de PLIN3 e que esta interação foi observada apenas na fração de proteínas citoplasmáticas (Tabela 2).

Na tentativa de avaliarmos o efeito do PGL I na expressão de PLIN3 e de detectarmos esta interação, foi realizada uma imunofluorescência para PLIN3 em CS estimuladas com *beads* e *beads*-PGL I.

O resultado na figura 20 mostra um padrão de marcação na célula não infectada com filamentos e pequenos granulos. A célula estimulada com *beads* vazias revelou um padrão menos filamentososo, e mais homogêneo. O estímulo com *beads*- PGL I exibiu um padrão de marcação mais vesicular não sendo possível visualizar os filamentos observados na célula não infectada e em menor grau, na célula tratada com *beads* vazias, por fim, a infecção com BCG PGL I mostrou um padrão de expressão de PLIN3 sem nenhum filamento mais homogêneo. Observamos que em algumas regiões a proteína parece formar uma vesícula contendo o bacilo.

Figura 20 - PGL I altera o padrão de expressão da proteína PLIN3 em células de Schwann



Legenda: Microscopia de fluorescência mostrando a expressão do fator de transcrição PPAR $\gamma$  em células de Schwann da linhagem ST8814 estimuladas ou não com *beads* e *beads*-PGL I na MOI de 50:1 por 48h em meio RPMI com 2% SFB ou infectadas com BCG PGL I marcado com PKH67. Barra - 10um. (n=2).

Uma análise via *Raptor X binding* revelou dois domínios nesta proteína, mas os ligantes preditos foram compostos iônicos como sulfato, zinco, óxido de ferro dentre outros (dados não mostrados). Entretanto, uma análise *in silico* da sequência de aminoácidos baseada no trabalho de Fantini J e colaboradores (78) mostrou que a PLIN3 apresenta três *pockets* de aminoácidos com capacidade de ligação ao glicolípido (Figura 21).

Figura 21 - Potenciais domínios de ligação à glicolípido identificados por análise *in silico* da proteína Perilipina 3

### Perilipina 3

```
>sp|O60664|PLIN3_HUMAN Perilipin-3 OS=Homo sapiens GN=PLIN3 PE=1 SV=3
MSADCAEADSTQVTVEEVQQSVVDVASMELISSTCDMVSAAIASTESYPHITVC
DAAEKGVTLTAAAVSIAQFILSLEEQIASASEYAHGLDLEENLEILQQPTEKVLAD
TRELVSSVSAQEMVSSADTVATQLSEAVDATREAVQSGVDKTSVVTGGVQSVMSG
LQQMVLSCVDTVLGRSEEWADNHLFLTDAELAIAATSLDGFDDVASVQQQEQEQSYFVILG
SLSEILQHAVESHSLILATQQAQEAALLQLSQVLSLMETVQGVDDQLVEGQELHQM
WLSWNRQLQGEPEPPKEQVESALTMFDIAQQLQATCTSLSSSIQGLPTNVKDQVQ
QANRQVEDLQATSSSIHSQDLSSSILAQSREVASAREALDHMVEYVAQNTFVTWLVGP
EAPGITEAEEK
```

Legenda: Os resíduos de aminoácidos aromáticos estão indicados em vermelhos, os indutores de rotação em azul, resíduos básicos em verde e resíduos ácidos em amarelo. Os resíduos aromáticos em vermelho são potencialmente envolvidos no reconhecimento de glicolípido.

Estes resultados sugerem que a proteína PLIN3 como um possível ligante de PGL I e mostraram que tanto o estímulo com PGL I quanto a infecção com BCG PGL I modulam o padrão de expressão desta proteína. Se esta ligação favorece a formação de CLs e qual a importância fisiológica da modulação da expressão desta proteína nas CS, são questões que ainda precisam ser estudadas com mais detalhes.

## 6 DISCUSSÃO

Nosso grupo vem mostrando que a infecção pelo *M. leprae* é capaz de modular o metabolismo lipídico da célula hospedeira, levando a formação de CLs ricos em colesterol (70). Esta modulação se dá tanto ao nível de captação de colesterol exógeno, LDL-colesterol, via um aumento do receptor específico de LDL-colesterol, LDLR, como de outros receptores conhecidos como receptores *scavengers*: CD36, SRA-1, SRB-1 e LRP-1 (70). Estes resultados foram tanto em estudos em cultura de células quanto em amostras de biópsias de pele de pacientes com hanseníase, (70). Neste caso, evidenciou-se um aumento da expressão destes receptores em pacientes multibacilares (70). Além da captação de colesterol foi mostrado também neste trabalho, um aumento da expressão de diversas enzimas envolvidas na biossíntese de colesterol, dentre elas, a enzima HMGCR, como já mencionado anteriormente, enzima que catalisa a etapa limitante na síntese de colesterol (70).

Um dado muito relevante também publicado pelo nosso grupo, é que o tratamento com estatinas, inibidores da HMGCR, diminui a viabilidade intracelular do *M. leprae* tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (71). A expressão das moléculas acima referidas, são reguladas por importantes fatores de transcrição, tais como PPAR $\gamma$ , LXR e SREBP. Estes fatores de transcrição estão regulados positivamente em macrófagos e amostras biópsia de pele de pacientes multibacilares, o que explica a elevada expressão deste componentes (70). Apesar de cada vez mais estarmos compreendendo como o *M. leprae* exerce este efeito modulatório sobre a célula hospedeira, pouco se sabe a respeito de quais componentes micobacterianos estão envolvidos neste fenômeno.

Quando pensamos em componentes micobacterianos como moléculas reguladoras de processos biológicos na célula hospedeira, os componentes mais externos, isto é, de membrana e de parede celular aparecem como os principais candidatos, visto serem as primeiras moléculas a entrarem em contato com a célula hospedeira. Como mencionado anteriormente, a parede celular do *M. leprae* é rica em peptidoglicanos, arabinogalactanos, ácidos micólicos, LM, LAM e glicolipídeos como o glicolipídeo fenólico I (PGL I) (34). Apesar de todas estas moléculas serem de grande importância para o *M. leprae*, o lipídeo dominante que confere especificidade imunológica ao *M. leprae* é a molécula PGL I (39).

Sabe-se que o PGL I também tem sido implicado no tropismo do *M. leprae* pelas células de Schwann, pela sua ligação específica à laminina, e desempenhando um papel importante na regulação negativa da resposta imune inflamatória e na inibição da maturação e ativação das células dendríticas, facilitando a persistência do *M. leprae*, portanto, na patogênese da hanseníase (5, 42). Além disto, o PGL I tem sido apontado como uma molécula envolvida na desmielinização observada em co-culturas de neurônios de gânglio da raiz dorsal e células de Schwann, na ausência de células imunes (40).

Recentemente foi mostrado em modelo de *zebrafish* que o PGL-1 induz o aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase em macrófagos infectados, elevando os níveis de espécies reativas de nitrogênio que danificam os axônios, lesionando suas mitocôndrias e induzindo desmielinização (89). Dados publicados neste ano pelo nosso grupo mostraram que PGL I está envolvido na ativação de um *cross-talk* entre PPAR $\gamma$  e o receptor de manose CD206 contribuindo para o sucesso do *M. leprae* na colonização dos nervos periféricos (10). Estes dados em conjunto sustentam a importância do PGL I para o *M. leprae* e como molécula fundamental na patogênese da hanseníase e, em particular, na neuropatia hansênica. Entretanto, a participação do PGL I na modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro ainda é pouco explorada. Portanto, neste projeto analisamos se o PGL I modula moléculas reguladoras do metabolismo lipídico da célula hospedeira, já tradicionalmente descritas serem afetadas pela infecção com *M. leprae*, usando como modelo *in vitro*, as células de Schwann humanas da linhagem ST8814.

Nosso primeiro dado mostra que de fato o PGL I sugere um aumento na formação de CLs e que este aumento esteja associado ao aumento da expressão da enzima HMGCR. Este achado sugere que o PGL I possa ser uma das moléculas do *M. leprae* responsáveis pelo aumento dos níveis de colesterol na célula infectada. Um ponto interessante que devemos mencionar, é o fato de que a via de biossíntese de colesterol forma intermediários isoprenoides, como geranyl pirofosfato e farnesil pirofosfato. Estas moléculas são muito importantes e estão envolvidas na isoprenilação de uma família de Rab-GTPases que regulam diferentes funções biológicas e vias de sinalização. Dados da literatura apontam que a diminuição da isoprenilação de algumas destas proteínas está associada com a ativação do inflamassoma e com o aumento da produção de uma citocina inflamatória, IL1 $\beta$  (90). Outro aspecto também descrito na literatura é a regulação da captação de glicose em células de mieloma múltiplo. MM) (91). Células de pacientes com MM têm um aumento da captação de glicose, e neste trabalho mostraram que a lovastatina e mevalonato inibem esta captação via a

diminuição da isoprenilação de transportadores de glicose, diminuindo desta maneira sua função como transportador de glicose (92). Estes pontos são relevantes pois, mostram que o aumento da HMGCR pelo PGL I e pela infecção em si, podem estar contribuindo para a sobrevivência do *M. leprae* por outros fatores, além do aumento do colesterol.

Além do gene que codifica a enzima HMGCR, os dados sugerem aumento do gene *fasN* nas células estimuladas com PGL I. Dados de imunofluorescência sugerem um aumento da expressão de FASN nas células estimuladas com PGL I, no entanto, estas células com *M. leprae* ou BCG PGL I, sugerindo que existam outros fatores associados. Um aspecto que nos chamou muita atenção, foi o fato, desta enzima ser expressa abundantemente no núcleo da célula. Previamente, já havia sido mostrado que FASN interage com forma nuclear de uma histona 5 desacetilase (HDA5) (93). Interessante é que em 2012, Raichur e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que HDAC5 regula a captação de glicose em células musculares (93). Neste trabalho, foi mostrado que o *knockdown* desta enzima aumentava a captação de glicose. Este resultado apesar de intrigante nos chamou atenção por dois motivos:

1) Esta enzima aumenta a síntese de ácidos graxos e dados da literatura mostram que enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos são capazes de induzir a formação de CLs (93). Além disso, existem ainda trabalhos mostrando que ácidos graxos de cadeia longa saturados e insaturados podem agir como ligantes de PPAR $\gamma$ , ativando desta maneira a expressão de genes regulados por este fator de transcrição (94). 2) dados do nosso grupo mostraram que a infecção de células de Schwann com *M. leprae*, levam o aumento de captação de glicose (45). Logo, será que o *M. leprae* via PGL I, ao infectar as células de Schwann, aumenta FASN que sintetiza mais ácidos graxos, que vão para o núcleo da célula, via proteínas ligadoras de ácidos graxos, e no núcleo, eles se ligam ao PPAR $\gamma$ , ativando a transcrição de genes adipogênicos?. Além disso, será que, a FASN no núcleo pode se ligar a HDAC5, inibindo sua função contribuindo desta maneira para a maior captação de glicose? Nossos dados não respondem estas perguntas mas abrem novos caminhos de estudos.

Para validar estes resultados analisamos se o PGL I aumenta a expressão do próprio fator de transcrição PPAR $\gamma$ . Os resultados sugerem que o PGL I não só aumenta a expressão de PPAR $\gamma$ , como aumenta sua localização no núcleo da célula, sugerindo que este fator de transcrição esteja sendo translocado para o núcleo da célula. Outro gene que é regulado positivamente pelo PPAR $\gamma$  é o gene que codifica a enzima PGE2S, que catalisa a síntese de um mediador lipídico conhecido por PGE2, um modulador da resposta imune que regula negativamente a resposta Th1 e a atividade bactericida (95). Além disto, dados da literatura

mostraram que a enzima ciclooxigenase-2 (COX2) e seu produto, PGE2, estão envolvidos na patogênese da desmielinização inflamatória do sistema nervoso periférico (96). Nosso grupo já mostrou que a infecção de macrófagos e células de Schwann com *M. leprae* leva a um aumento de PGE2, no contexto da hanseníase. Estes dados correlacionam os CLs como sítios de geração de eicosanoides, como o PGE2 (29).

Na realidade, as altas concentrações de PGE2 produzidas por macrófagos COX-2 positivos em pacientes multibacilares inibiram a produção de citocinas Th1, provavelmente contribuindo para a anergia da célula Th1 neste polo da doença (97). Recentemente, mostramos que o *M. leprae* e BCG PGL I foram capazes de aumentar a produção de PGE2, sugerindo que a molécula de PGL I seja importante neste fenômeno. Nossos dados mostraram que de fato o estímulo com PGL I aumentou a produção de PGE2 e que este efeito foi revertido com adição do inibidor de PPAR $\gamma$ . Observamos também que a enzima PGE2S também está aumentada na célula estimulada com PGL I.

Nossos dados sugerem então o PGL I como uma molécula do *M. leprae* que pode, por alguma via ainda não definida, aumentar a expressão de PPAR $\gamma$  e a translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, este fator de transcrição pode então, ser o responsável pelo aumento da expressão de *hmgcr* e *fasn*, enzimas que podem contribuir para a formação de CLs nas CS. O aumento de FASN pode então levar a maior produção de CLs e de ácidos graxos, que podem ativar ainda mais PPAR $\gamma$ , amplificando a resposta. Além disto, o aumento de PPAR $\gamma$  por ação do PGL I pode também levar o aumento da expressão gênica de *pge2s* contribuindo com a produção elevada de PGE2. Este resultado é fortalecido quando a adição de GW9662 inibe a produção de PGE2 induzida pelo PGL I. Logo, estes dados fortalecem o que a literatura tem mostrado sobre o efeito do *M. leprae* no metabolismo lipídico da célula hospedeira e lançam o PGL I como uma possível molécula do *M. leprae* envolvida nestes fenômenos.

A principal questão quando pensamos no papel do PGL I como uma molécula moduladora é: como esta molécula poderia afetar vias de sinalização intracelular? Uma possibilidade, é a ligação direta deste glicolípido à proteínas de superfície que, por sua vez, poderiam ativar uma cascata de sinalização intracelular. Considerando que o PGL I é uma molécula de superfície que interage com a laminina tipo 2 e isto resulta em modulação da via ErbB2 em células de Schwann (40), é possível que outros ligantes presentes na superfície celular possam funcionar como possíveis receptores para esta molécula, desencadeando respostas celulares diferentes. Entretanto, o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório e

ao ser fagocitado, reside no fagossoma e escapa da fusão fagolisossomal (98). Duas questões surgem então, será que o PGL I pode se ligar às proteínas do fagossoma gerando um efeito no interior do fagossoma e mesmo no citosol da célula? Será que esta e outras moléculas da micobactéria podem ser secretadas a partir do fagossoma e podem interagir com proteínas de outras organelas celulares, e ou com proteínas do citosol modulando a função das mesmas? Será que a interação com determinadas proteínas poderia modular o fator de transcrição PPAR $\gamma$  e levar a formação de CLs? Sabe-se pela literatura que patógenos, como micobactérias, liberam vesículas de membrana externa (VME) que contêm proteínas e muitos componentes de parede celular das micobactérias (34).

Uma possibilidade de interação e liberação destas moléculas na célula hospedeira, pode ser via estas VME. Entretanto, em 2017 foi publicado um trabalho mostrando que a proteína 1 formadora de canal seletivo a ânions dependente de voltagem, VDAC1, altamente expressa na membrana externa da mitocôndria (MEM). Esta proteína também expressa na membrana do fagossoma, é importante para sobrevivência do *M. avium*, e está envolvida exportação de lipídeos micobacterianos (86). Portanto, a proteína VDAC1 também pode ser uma possível via de exportação de moléculas micobacterianas para o citoplasma celular. Os dados de interactoma apontam esta proteína como um possível ligante de PGL I e as análises pelo *Raptor X binding* sugere que esta proteína contém apenas um domínio, mas que reconhece moléculas de ácidos graxos. Este resultado pode sugerir que o PGL I esteja se ligando a VDAC 1 via sua porção lipídica. Entretanto, como a VDAC1 é muito expressa na MEM não se pode descartar o efeito da ligação do PGL I a esta proteína sobre a fisiologia mitocondrial, mesmo porque, recentemente foi mostrado que a infecção de CS com *M. leprae* diminui o potencial de membrana mitocondrial (45). A proteína VDAC1 já foi descrita por estar envolvida tanto no potencial de membrana da mitocôndria, quanto nos níveis de ATP celular visto que seu silenciamento, leva a diminuição destas duas funções mitocondriais. O papel de lipídeos na oligomerização desta proteína foi mostrado ser importante no direcionamento de determinados processos celulares, por exemplo, fosfatidilglicerol leva a oligomerização de VDAC 1, enquanto cardiolipina rompe esta agregação, e estes efeitos têm grande relevância na apoptose celular (99). Portanto, apesar desta proteína até o momento não ter sido associada ao metabolismo lipídico diretamente, esta possível interação pode resultar na liberação do PGL I para o citoplasma e também pode ser de grande relevância na compreensão do impacto da infecção na função mitocondrial.

A vimentina também apareceu no interactoma como uma proteína potencial ligante de PGL I, uma análise da sequência da proteína usando o trabalho de Fantini J e colaboradores sugere que a região C-terminal contém uma sequência de aminoácidos com resíduos capazes de se ligar a glicolípido (403-440). Já o programa *Raptor X binding* mostra que apesar da vimentina conter 4 domínios, o domínio 2 contém aminoácidos que potencialmente podem reconhecer manose, glicose e ácido oleico. Estas análises sugerem sítios de ligação ao PGL I. Resultados experimentais reforçam que a vimentina pode de fato estar se ligando ao PGL I. Além disso observamos que o estímulo com PGL I e a infecção com *M. leprae* e BCG PGL I modificaram o padrão de expressão desta proteína. Dados da literatura mostraram que a interação da vimentina com PPAR $\gamma$  se dá no compartimento citosólico, onde a vimentina parece regular a taxa de *turnover* do PPAR $\gamma$ , regulando indiretamente a atividade transcricional do PPAR $\gamma$  pela regulação de sua degradação (100).

O papel de proteínas do citoesqueleto no movimento intracelular de colesterol em células estereoidogênicas já foi descrito há bastante tempo quando mostraram que drogas que rompem esta estrutura afetam a produção deste esteróide (101-105). Em 2007, foi mostrado que a inibição de PPAR $\gamma$  inibe o crescimento e a capacidade invasiva de células de carcinoma hepático pela desorganização dos filamentos de vimentina (103).

Um aspecto bem interessante sobre a vimentina, é que esta proteína já foi identificada em CLs de adipócitos, macrófagos espumosos e lesões ateroscleróticas (106-110). Recentemente, foi mostrado que uma organização cortical entre perilipina e a vimentina é importante para a formação de CLs em adipócitos (75). Portanto, esta proteína parece ser importante na formação de CLs, além disto, o envolvimento da vimentina em metabolismo lipídico tem sido descrito na literatura (109). Um destes papéis foi evidenciado em 2010 quando detectaram que a vimentina participa da lipólise pela interação direta com a enzima hormônio lipase sensível ativando esta enzima (110).

Além do papel da vimentina no metabolismo lipídico foi mostrado recentemente que este filamento intermediário regula a mielinização do nervo periférico pela regulação da neuregulina 1 tipo 3 (111). Foi evidenciado também que filamentos intermediários do tipo vimentina interagem com bicamadas lipídicas (112) com RE e também com Cg (113). Além disto, foi mostrado recentemente que o potencial de membrana da mitocôndria é regulado a partir da interação desta organela com a porção N-terminal da vimentina (114). Portanto, a interação entre PGL I e vimentina pode ser um achado de grande relevância no contexto da hanseníase, pois pode levar a diminuição da degradação de PPAR $\gamma$ , via o proteassoma, e com

isto amplificar seu efeito sobre o metabolismo lipídico, pode também estar relacionada com o fenômeno de desmielinização e com o efeito do *M. leprae* sobre o potencial de membrana da mitocôndria. Estes dois fenômenos podem talvez estar relacionados com a alteração do padrão da vimentina após a infecção. Portanto, apesar de termos obtido alguns resultados com algumas proteínas, acabamos por focar um pouco mais na interação PGL I e vimentina.

Identificamos também como prováveis ligantes duas galectinas, galectina 1 e 2. Até o momento foram identificadas 14 lectinas desta família (115). LGALS1 é codificada pelo gene *lgals1* e tem em torno de 15kDa e é conhecida por ser um regulador imune e inflamatório que age tanto intra quanto extracelularmente, modulando a resposta imune inata e adaptativa (115). Recentemente, foi mostrado que a diminuição da expressão desta proteína reduz a expressão de proteínas envolvidas na formação de CLs em tecido hepático (115), inclusive da proteína perilina 2 ou adipofilina, uma proteína estrutural de CLs cuja a expressão está aumentada em células infectadas com *M. leprae* (29). A LGLAS3 é codificada pelo gene *lgals3* e tem cerca de 30kDa, cuja localização é ubíqua e está envolvida em múltiplas funções (116).

Já foi mostrado que o aumento de tecido adiposo está relacionado ao aumento de LGALS3 e que esta proteína estimula a proliferação de pré-adipócitos (117). Recentemente, foi visto que a LGLAS3 ativa PPAR $\gamma$  e leva a diferenciação de adipócitos *in vivo* e *in vitro* (118).

## CONCLUSÃO

O PGL I é uma molécula muito importante na parede do *Mycobacterium leprae* esta molécula está envolvida na desmielinização, observada em co-culturas de neurônios de gânglio da raiz dorsal e células de Schwann, na ausência de células imunes (40). Entretanto, a participação do PGL I na modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro ainda é pouco explorada. Portanto, neste projeto foi demonstrado, se o PGL I modula moléculas reguladoras do metabolismo lipídico da célula hospedeira, foi utilizado um modelo *in vitro*, as células de Schwann humanas da linhagem ST8814. Os nossos dados sugerem o aumento de genes e proteínas envolvidas no metabolismo lipídico (HMGCR, FASN, PLIN3, vimentina, fator de transcrição PPAR $\gamma$  e PGE2). Estes resultados apontam o PGL I como uma molécula do *M. leprae* capaz de aumentar a formação de corpúsculos lipídicos, pelo menos em parte via o aumento da síntese de colesterol e aumento da síntese de ácidos graxos, através do aumento das enzimas HMGCR e FASN respectivamente. O PGL I aumentou a expressão de PPAR $\gamma$  e PGE2 sintase nas células de Schwann. Assim como a produção do mediador lipídico PGE2.

Fizemos uma reanálise das proteínas envolvidas no metabolismo lipídico e formação do corpúsculo lipídico, retirados dos dados da Dra. Chyntia. Nesta reanálise, foi feita uma procura de possíveis alvos, que pudessem nos direcionar quanto ao papel do PGL I, como um ligante favorecedor da formação de CLs. Validamos a localização celular das proteínas potencialmente ligantes de PGL I, utilizando o programa Hum-mPLoc 2.0. Analisamos *in silico* se as proteínas potencialmente ligantes de PGL I interagem entre si e com PPAR $\gamma$  a partir do programa STRING. Os dados mostraram que existe uma rede de interação entre as proteínas, e que segundo o programa STRING apenas a Vimentina interage molecularmente com o PPAR $\gamma$ . Determinamos sítios de ligação das proteínas e possíveis ligantes de PGL I, usando o programa Raptor X *binding*. Analisamos o possível sítio de ligação das proteínas com o PGL I pelo programa Predict Protein. Os dados analisados anteriormente, sugerem que o PGL I modula a expressão da vimentina e da perilipina 3, e que parece se ligar a proteína vimentina.

Os experimentos realizados, foram para determinar os possíveis ligantes de PGL I e como modula as proteínas reguladoras do metabolismo lipídico, mais experimentos devem ser realizados para comprovar esta ligação. Este trabalho abre novas possibilidades de estudo, do papel do PGL I na interação com a célula de Schwann.

## REFERÊNCIAS

- 1- Eidt Letícia Maria. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. Saude soc. Agosto de 2004; 13 (2): 76-88.
- 2- World Health Organization. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. Weekly Epidemiological Record. Setembro de 2017; 92 (35): 501-520.
- 3- Rafferty J. Curing the stigma of leprosy. Leprosy Review. junho de 2005; 76: 119-126.
- 4- Kaplan G, Cohn ZA. The immunobiology of leprosy. Int Rev Exp Pathol. 1986; 28: 45-78.
- 5- Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. Cell. março de 1997; 88 (6): 811-821.
- 6- Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. Cell. outubro de 2000; 103 (3): 511–524.
- 7- Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. Proc Natl Acad Sci U S A. agosto de 1999; 96 (17): 9857-9862.
- 8- Marques MAM, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Vidal Pessolani MC. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells Microbes Infect. outubro de 2000; 2 (12): 1407-1417.
- 9- Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, MC Pessolani, Bozza PT. TLR6-Driven Lipid Droplets in *Mycobacterium leprae*-Infected Schwann Cells: Immuno inflammatory Platforms Associated with Bacterial Persistence. J Immunol. janeiro de 2011; 187 (5): 2548–2558.
- 10- Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TLSA, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, Costa FDMR, Lara FA, Rodrigues LS, Mattos KA, Sarno EN, Bozza PT, Guilhot C, de Berrêdo-Pinho M, Pessolani MCV. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR $\gamma$  cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. PLoS Pathog. julho de 2018; 14 (7): e1007151.
- 11- Kaufmann SH, Golecki JR, Kazda J, Steinhoff U. T lymphocytes, mononuclear phagocytes, Schwann cells and *Mycobacterium leprae*. Acta Leprol. 1989; 1:141-8.
- 12- Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. Am J Trop Med Hyg. março de 2008; 78 (3): 518–521.

- 13- Fine PE. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiol Rev.* 1982; 4 161-188.
- 14- Meima A, Smith WC, van Oortmarssen GJ, Richardus JH, Habbema JD. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. *Bull World Health Organ.* maio de 2004; 82 (5): 373-380.
- 15- Goulart Isabela Maria Bernardes, Penna Gerson Oliveira, Cunha Gabriel. Imunopatologia da hanseníase: uma replicação dos mecanismos de resposta da imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* agosto de 2002; 35 (4): 363-375.
- 16- Lastória JC, Abreu MAMM de, Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol.* abril de 2014; 89 (2): 205–218.
- 17- Visschedijk J, van de Broek J, Eggens H, Lever P, van Beers S, Klatser P. Review: *Mycobacterium leprae* – millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. *Trop Med Int Health.* junho de 2000; 5 (6): 388–399.
- 18- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. 3ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- 19- Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 7ª ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2009.
- 20- WHO, World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record.* Leprosy update. agosto de 2012; 87 (34): 317-328.
- 21- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* setembro de 1966; 34 (3): 255–273.
- 22- WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. 1982; 675: 1-33.
- 23- Mendonça Vanessa Amaral, Costa Rosane Dias, Melo Gustavo Eustáquio Brito Alvim de, Antunes Carlos Maurício, Teixeira Antonio Lúcio. Imunologia da hanseníase. *An. Bras. Dermatol.* agosto 2008; 83 (4): 343-350.
- 24- Die Krankhaften Geschwülste, vol. 1: Dreissig Vorlesungen, Gehalten während des Wintersemesters 1862-1863 an der Universität zu Berlin (Classic Reprint) (German Edition).
- 25- Sieling PA, Modlin RL. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Semin Immunopathol.* Julho de 1992; 13 (3-4): 413-426.
- 26- Brasil. Ministério da Saúde (MS). Coeficientes de prevalência e detecção em hanseníase Brasil, 2005 à 2014.

- 27- Gracie R, Peixoto JNB, Soares FBDR, Hacker MAV. Analysis of the geographical distribution of cases of leprosy. Rio de Janeiro, 2001-2012. *Cien Saude Colet.* maio 2016; 22 (5): 1695-1704.
- 28- Hansen GHA. "Undersøgelser Angående Spedalskhedens Årsager (Investigations concerning the etiology of leprosy)". *Norsk Mag. Laegervidenskaben.* 1874. 4:1–88.
- 29- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* março de 2010; 87 (3): 371–384.
- 30- Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech.* janeiro de 2013; 6 (1): 19–24.
- 31- Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol.* março de 2005; 54 (3): 235–242.
- 32- Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc.* março de 2001; 69 (1):1–12.
- 33- Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev.* março 2008; 72 (1): 126-156.
- 34- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol.* outubro 2015; 3 (10): 620–630.
- 35- Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* setembro de 1981; 147 (3): 728–735.
- 36- Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol.* setembro de 1991; 147 (6): 1983-1994.
- 37- Tabouret G, Astarie-Dequeker C, Demangel C, Malaga W, Constant P, Ray A, et al. *Mycobacterium leprae* Phenolglycolipid-1 Expressed by Engineered *M. bovis* BCG Modulates Early Interaction with Human Phagocytes. Ehrh S, organizador. *PLoS Pathog.* outubro de 2010; 6 (10): e1001159.
- 38- Foss NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. *Anais brasileiros de imunologia.* 1999; 74 (2): 113-119.

- 39- Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGLI) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.* dezembro de 2011; 82 (4): 344–357.
- 40- Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-Dependent Demyelination by *Mycobacterium leprae* in the Absence of Immune Cells. *Science.* março de 2002; 296 (5569): 927–931.
- 41- Manca C, Peixoto B, Malaga W, Guilhot C, Kaplan G. Modulation of the Cytokine Response in Human Monocytes by *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid-1. *J Interferon Cytokine Res.* janeiro de 2012; 32 (1): 27–33.
- 42- Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun.* setembro de 2002; 70 (9): 5167-5176.
- 43- Shetty VP, Antia NH. Relapse in a borderline-tuberculoid case of leprosy 5 years after the release from rifampicin monotherapy. *Lepr Rev.* junho 1997; 68 (2): 162-166.
- 44- Rambukkana A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol.* 1 de fevereiro de 2001; 4 (1): 21–27.
- 45- Medeiros R. C, Girardi K. D, Cardoso F. K, Mietto B. S, Pinto T. G, Gomez L. S, Rodrigues L.S, Gandini M., Amaral J. J, Antunes S. L, Corte-Real S , Rosa P. S, Pessolani M.C, Nery J.A, Sarno E.N, Batista-Silva L.R, Sola-Penna M, Oliveira M.F, Moraes M.O, Lara F.A. Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* Novembro 2016; 291 (47): 24803.
- 46- Pol A, Lu A, Pons M, Peiró S, and Enrich, C. Epidermal growth factor-mediated caveolin recruitment to early endosomes and MAPK activation. Role of cholesterol and actin cytoskeleton. *J Biol Chem;* 2000; 275: 30566–30572.
- 47- Boström P, Rutberg M, Ericsson J, Holmdahl P, Andersson L, Frohman M.A, Borén J , Olofsson SO . Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* setembro de 2005; 25 (9): 1945-1951.
- 48- Pacheco P, Vieira-de-Abreu A , Gomes RN , Barbosa-Lima G , Wermelinger LB , Maya-Monteiro CM , Silva AR , Bozza MT , HC Castro-Faria-Neto ,Bandeira-Melo C , Bozza PT. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* dezembro de 2007; 179 (12): 8500-8508.
- 49- Boulant S, Douglas M.W, Moody L, Budkowska A, TargettAdams P, McLauchlan, J. Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule and DyneinDependent Manner. *Traffic.* agosto de 2008; 9: 1268-1282.
- 50- Rodrigues LS. da Silva Maeda E , da Moreira ME , da Tempone AJ , da Lobato LS , da Ribeiro-Resende VT , da Alves L , da Rossle S , da Lopes UG , da Pessolani MC. et al. *Mycobacterium leprae* induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell. Microbiol.* janeiro de 2010; 12 (1): 42-54.

- 51- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2006; 19 (2): 338-81.
- 52-Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev.* setembro de 2008; 79 (3): 242–53
- 53-Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol.* fevereiro de 2015; 33 (1): 46–54.
- 54- Guo Y, Cordes KR, Farese RV, Walther TC. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci.* março de 2009; 122 (6): 749-52.
- 55- Brasaemle DL. *J Lipid Res.* dezembro de 2007; 48 (12): 2547-59.
- 56- Bickel PE, Tansey JT, Welte MA. Proteínas PAT, uma antiga família de proteínas lipídicas que regulam as reservas lipídicas celulares. *Biochim Biophys Acta .* 2009; 1791 (6): 419-440.
- 57- David A. Gross & David L. Silver. Cytosolic lipid droplets: From mechanisms of fat storage to disease, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* julho de 2014; 49 (4): 304-326.
- 58- Walther TC, Farese RV. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem.* abril de 2012; 81: 687-714.
- 59- Yang L , Ding Y , Chen Y , Zhang S , Huo C , Wang Y , Yu J , Zhang P , O Na H , Zhang H , Ma Y , Liu P. *J Lipid Res.* julho de 2012; 53 (7): 1245-1253.
- 60- Ploegh HL. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature.* julho de 2007; 448 (7152): 435-438.
- 61- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* Janeiro de 2004; 279 (5): 3787-3792.
- 62- Bartz R, Zehmer JK, Zhu M, Chen Y, Serrero G, Zhao Y, Liu P. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res.* agosto de 2007; 6 (8): 3256-3265.
- 63- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, Bartenschlager R, Wakita T, Hijikata M, Shimotohno K. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* Setembro de 2007; 9 (9): 1089-1097.
- 64- Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, Li Z, Hui J, Graham BH, Quintana A, Bellen HJ. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell.* janeiro de 2015; 160 (1-2): 177-190.
- 65- Guo Y, Cordes KR, Jr Farese RV, Walther TC. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci.* março de 2009; 122 (6): 749-752

- 66- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004; 279 (45): 46835–46842.
- 67- Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem.* junho 1999; 274 (24): 16825-16830.
- 68- Gross DN, Miyoshi H, Hosaka T, Zhang HH, Pino EC, Souza S, Obin M, Greenberg AS, Pilch PF. Dynamics of Lipid Droplet-Associated Proteins during Hormonally Stimulated Lipolysis in Engineered Adipocytes: Stabilization and Lipid Droplet Binding of Adipocyte Differentiation-Related Protein/Adipophilin, *Molecular Endocrinology. Mol Endocrinol.* fevereiro de 2006; 20 (2): 459-466.
- 69- GUT. Intervención específica sobre la ciclooxigenasa tipo II: un paso adelante en el manejo del dolor. *Nature medicine. Bulletin on the rheumatic diseases.* outubro 1999; 11-16.
- 70- Katherine A Mattos, Viviane CG Oliveira, Marcia Berrêdo-Pinho, Julio J Amaral, Luis Caetano M Antunes, Rossana CN Melo, Chyntia CD Acosta, Danielle F Moura, Roberta Olmo, Jun Han, Patricia S Rosa, Patrícia e Almeida, B Brett Finlay, Christoph H Borchers, Euzenir N Sarno, Patricia T Bozza, Georgia C Atella, e Maria Cristina V Pessolani. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* Junho 2014; 16(6): 797–815.
- 71- Lobato LS, Rosa PS, Ferreira J da S, Neumann A da S, da Silva MG, do Nascimento DC, Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob AgentsChemother.* outubro de 2014; 58 (10): 5766–5774.
- 72- Zaytseva YY, Harris JW, Mitov MI, Kim JT, Butterfield DA, Lee EY, Weiss HL, Gao T, Evers BM. Increased expression of fatty acid synthase provides a survival advantage to colorectal cancer cells via up regulation of cellular respiration. *Oncotarget.* agosto de 2015; 6 (22): 18891-18904.
- 73- Padilla-Benavides T, Velez-Delvalle C, Marsch-Moreno M, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Lipogenic Enzymes Complexes and Cytoplasmic Lipid Droplet Formation During Adipogenesis. *J Cell Biochem.* Março de 2016 *J Cell Biochem.* 2016 Oct; 117 (10): 2315-2326.
- 74- Lieber JG, Evans RM. Disruption of the vimentin intermediate filament system during adipose conversion of 3T3-L1 cells inhibits lipid droplet accumulation. *J Cell Sci.* Dezembro de 1996; 109 (13): 3047-3058.
- 75- Heid H, Rickelt S, Zimbelmann R, et al. On the formation of lipid droplets in human adipocytes: the organization of the perilipin-vimentin cortex. *PLoS One.* Fevereiro de 2014; 9 (2): e90386.
- 76- Brown JD, Plutzky J. Peroxisome Proliferator–Activated Receptors as Transcriptional Nodal Points and Therapeutic Targets. *Circulation.* janeiro de 2007; 115 (4): 518–533.

- 77- Tavares V, Hirata MH, Hirata RDC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* junho de 2007; 51 (4): 526– 533.
- 78- Fantini J, Garmy N, Yahi N. Prediction of glycolipid-binding domains from the amino acid sequence of lipid raft-associated proteins: application to HpaA, a protein involved in the adhesion of *Helicobacter pylori* to gastrointestinal cells. *Biochemistry.* setembro de 2006; 45 (36): 10957-10962.
- 79- Rogue A, Spire C, Brun M., Claude N, & Guillouzo A. Gene Expression Changes Induced by PPAR Gamma Agonists in Animal and Human Liver. *PPAR Research.* outubro de 2010; 325183.
- 80- Sharma AM, Staels B. Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* fevereiro de 2007; 92 (2): 386-395.
- 81- Mendez M, LaPointe MC. PPAR $\gamma$  Inhibition of Cyclooxygenase-2, PGE<sub>2</sub> Synthase, and Inducible Nitric Oxide Synthase in Cardiac Myocytes. *Hypertension.* Outubro 2003; 42 (4): 844-850.
- 82- Duncan MJ, Shin JS, Abraham SN. Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cell Microbiol.* dezembro 2002; 4 (12):783-791.
- 83- Viguier M, Advedissian T, Delacour D, Poirier F, Deshayes F. Galectins in epithelial functions. *Tissue Barriers.* maio de 2014; 2: e29103.
- 84- Baek JH, Kim SJ , Kang HG, Lee HW, Kim JH, Hwang KA, Canção J, Chun KH. Galectin-3 activates PPAR $\gamma$  and supports white adipose tissue formation and high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology.* Janeiro de 2015; 156 (1): 147-156.
- 85- Reddy PH. Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *J Alzheimers Dis.* Janeiro de 2014; 40 (2): 245-256.
- 86- Danelishvili L, Chinison JJJ, Pham T, Gupta R, Bermudez LE. The Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) of *Mycobacterium avium* phagosome are associated with bacterial survival and lipid export in macrophages. *Sci Rep.* agosto de 2017; 7 (1): 7007.
- 87- Skinner JR, Shew TM, Schwartz DM, Tzeko A Lopus, C M, Abumrad NA, Wolins, N. E. Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/TIP47 during lipid storage and mobilization. *The Journal of biological chemistry.* setembro de 2009; 284 (45): 30941-30948.
- 88- Lu X, Gruia-Gray J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Londos C, Kimmel AR. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm Genome.* setembro de 2001; 12 (9): 741-749.

89- Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, et al. A Macrophage Response to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. *Cell*. agosto de 2017; 170 (5): 973-985.

90- Hottz ED, Lopes JF, Freitas C, Valls-de-Souza R, Oliveira MF, MT Bozza, Da Poian AT, Weyrich AS, AG Zimmerman, Bozza FA, Bozza PT. Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood*. Novembro de 2013; 122 (20): 3405–3414.

91- McBrayer SK, Cheng JC, Singhal S, Krett NL, Rosen ST, Shanmugam M. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy. *Blood*. maio 2012; 119 (20): 4686-4697.

92- Dykstra KM, Holstein AS. Effects of Isoprenoid Biosynthetic Pathway Inhibition on Glucose Uptake in Myeloma Cells. *Blood*. dezembro de 2016; 128: 3300.

93- Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *PNAS*. fevereiro de 2003; 100 (4): 1711-1716.

94- Patanè G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM. Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes*. setembro de 2002; 51 (9): 2749-2756.

95- Van der Pouw Kraan TC, Boeije LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, Aarden LA. A prostaglandina-E2 é um potente inibidor da produção de interleucina humana 12. *J Exp Med*. fevereiro de 1995; 181 (2): 775-779.

96- Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, Akiguchi I. New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. *Muscle Nerve*. fevereiro de 2002; 25 (2): 280-282.

97- Kiszewski AE, Becerril E, Baquera J, Ruiz-Maldonado R, Hernández Pando R. Expression of cyclooxygenase type 2 in lepromatous and tuberculoid leprosy lesions. *Br J Dermatol*. abril de 2003; 148 (4): 795-798.

98- Chatterjee KR, DasGupta NN, M.L.De. Electron microscopic observations on the morphology of Mycobacterium leprae. *Exp Cell Res*. novembro de 1959; 18: 521-527.

99- Betaneli V, Petrov EP, Schwille P. The role of lipids in VDAC oligomerization. *Biophys J*. fevereiro de 2012; 102 (3): 523-531.

100- Tsai YC, Tsai SH, Chang EY, Hee SW, Chen WH, Lee SC, Chuang LM. Cytoskeletal protein vimentin interacts with and regulates peroxisome proliferator activated receptor gamma via a proteasomal degradation process. *J Cell Biochem*. julho de 2013; 114 (7): 1559-1567.

- 101- Hall PF, Almahbobi G. The role of the cytoskeleton in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* dezembro de 1992; 43 (8): 769-777.
- 102- Temple R, Wolff J. Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents. *Send to J Biol Chem.* abril de 1973; 248 (8): 2691-2698.
- 103- Kim KR, Choi HN, Lee HJ, Baek HÁ, Park HS, Jang KY, Chung MJ, Moon WS. A peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist induces vimentin cleavage and inhibits invasion in high-grade hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* outubro de 2007; 18 (4): 825-832.
- 104- Luckenbill LL, Cohen AS. The association of lipid droplets with cytoplasmic filaments in avian subsynovial adipose cells. *J Cell Biol.* outubro de 1966; 31 (1): 195–199.
- 105- Wood EM. An ordered complex of filaments surrounding the lipid droplets in developing adipose cells. *Anat. Rec.* março de 1967; 157: 437-448.
- 106- Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM, Rubin CS. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol.* outubro de 1980; 87 (1): 180-96.
- 107- McGookey DJ, Anderson RG. Morphological characterization of the cholesteryl ester cycle in cultured mouse macrophage foam cells. *J Cell Biol.* outubro de 1983; 97 (4): 1156-68.
- 108- Amanuma K, Kanaseki t, Ikeuchi Y, Ohkuma S, Takano T. Studies on fine structure and location of lipids in quick-freeze replicas of atherosclerotic aorta of WHHL rabbits. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1986; 410 (3): 231-238.
- 109- Schweitzer SC, Evans RM. Vimentin and lipid metabolism. *Subcell Biochem.* 1998; 31: 437-462.
- 110- Shen WJ, Patel S, Eriksson JE, Kraemer FB. Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *J Proteome Res.* abril de 2010; 9 (4): 1786-1794.
- 111- Triolo D, Dina G, Taveggia C, Vaccari I, Porrello E, Rivellini C, Domi T, La Marca R, Cerri F, Bolino A, Quattrini A, Previtali SC. Vimentin regulates peripheral nerve myelination. *Development.* abril de 2012; 139 (7): 1359-1367.
- 112- Perides G, Harter C, Traub P. Electrostatic and hydrophobic interactions of the intermediate filament protein vimentin and its amino terminus with lipid bilayers. *J Biol Chem.* outubro de 1987; 262 (28): 13742-13749.
- 113- Gao Y, Sztul E. A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton. *J Cell Biol.* março de 2001; 152 (5): 877-894.
- 114- Chernouvanenko IS, Matveeva EA, Gelfand VI, Goldman RD, Minin AA. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. *FASEB J.* março de 2014; 29 (3): 820-827.

115- Potikha T, Ella E, Cerliani JP, Mizrahi L, Pappo O, Rabinovich GA, Galun E, Goldenberg DS. Galectin-1 is essential for efficient liver regeneration following hepatectomy. *Oncotarget*. maio de 2016; 7 (22): 31738-31744.

116- Viguier M, Advedissian T, Delacour D, Poirier F, Deshayes F. Galectins in epithelial functions. *Tissue Barriers*. maio de 2014; 2: e29103.

117- Kiwaki K, Novak CM, Hsu DK, Liu FT, Levine JA. Galectin-3 stimulates preadipocyte proliferation and is up-regulated in growing adipose tissue. *Obesity*. Janeiro de 2007; 15 (1): 32-39.

118- Baek JH, Kim SJ, Kang HG, Lee HW, Kim JH, Hwang KA, Song J, Chun KH. Galectin-3 activates PPAR $\gamma$  and supports white adipose tissue formation and high-fat diet-induced obesity. *Endocrinology*. janeiro de 2015; 156 (1): 147-156.