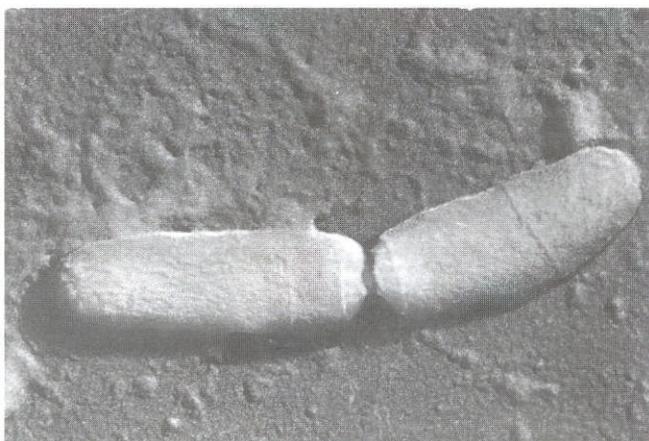


ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DO *Mycobacterium leprae*

Suzana Macieira

Taxonomicamente, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) pertence à ordem *Actinomycetales* e família *Mycobacteriaceae*. Apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado, com ex-tremidades arredondadas, medindo aproximadamente de 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro. O *M. leprae*, ou bacilo de Hansen, é um parasita intracelular obrigatório, predominante em macrófagos onde podem ser observados formando aglomerados ou globias, em arranjos paralelos que lembram um mau de cigarro. A reprodução ocorre pelo processo de divisão binária, é gram-positivo e fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen, na qual apresentam-se, na maioria deles, corados de forma irregular ou granular. Este aspecto foi observado por Hansen e posteriormente confirmado por outros pesquisadores. Em 1895, Hansen e Loeffler consideraram a transformação em grânulos como um fator de degeneração, ou seja, morte bacilar. Finalmente, em 1960, outros pesquisadores observaram, através de microscopia óptica e eletrônica, que os bacilos corados irregularmente não estavam viáveis devido a perda parcial do conteúdo celular que ocorre após a morte bacilar. A perda do material citoplasmático é decorrente de alterações na membrana citoplasmática.



Mycobacterium leprae em processo de divisão celular (microscopia eletrônica de varredura).

A parede celular possui cerca de 20 nm de espessura e sua estrutura química é semelhante a de outras micobactérias, ou seja, constituída de peptidoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídicas, que servem de suporte para os ácidos micólicos. Estes ácidos possuem alto peso molecular, que abrangem cerca de metade do peso da parede celular bacteriana, sendo responsáveis pela natureza hidrofóbica da micobactéria. Análises químicas detalhadas revelaram que o bacilo possui algumas características distintas. No peptidoglicano, a L-alanina é substituída pela glicina, e a forma como os ácidos micólicos estão associados a parede celular é distinto do que se observa em outras espécies de micobactérias. Outro importante componente da parede celular micobacteriana é o lipoarabinomano (LAM). Ele é semelhante ao encontrado em outras espécies de micobactérias, porém, em estudos realizados utilizando-se anticorpos monoclonais, observou-se diferenças entre o IAM encontrado no *M. leprae* e no *M. tuberculosis*. Em bactérias gram negativas, os lipopolissacarídeos possuem propriedades imunorreguladoras; nas micobactérias podem atuar de forma importante para a sobrevivên-

cia no interior da célula do hospedeiro e na patogênese da doença. Além destes componentes, pesquisadores observaram também a presença de um material protéico, que se constitui em um importante alvo imunogênico de células T. A natureza exata dessas proteínas ainda não está totalmente estabelecida. A partir de um extrato da parede celular Hunter et al. identificaram uma proteína com peso molecular de 17 kilodaltons (kD); uma outra proteína de 14 kD, semelhante proteína de choque térmico de *Escherichia (E. coli)(GroES)*, também foi identificada, sendo também encontrada no citoplasma do bacilo. O porque desta proteína estar associada à parede celular e como ela está ligada a outros componentes precisa ser melhor esclarecido.

Além da parede celular, o bacilo apresenta uma estrutura mais externa denominada cápsula. Da mesma forma como se observa em outras espécies de micobactérias patogênicas, a superfície externa do *leprae* é caracterizada pela presença de uma grande quantidade de componentes lipídicos, os quais são provavelmente responsáveis pela "zona elétron transparente" e pelo aspecto espumoso do material visto no interior dos macrófagos de pacientes virchovianos (Fig. 1). Os dois lipídeos capsulares mais importantes são: 1- ftiocerol dimicocerosato (PM), quimicamente distinto daqueles encontrados em outras espécies de micobactérias; 2- glicolípido fenólico 1 (PGL-1) que contém um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e aparentemente único para o *M. leprae*. O PDIM e o PGL-1 podem ser detectados em tecidos infectados de seres humanos e de tatués, indicando que esses componentes podem persistir por um longo período, mesmo após o bacilo ter sido degradado e eliminado. A porção terminal 3,6-di-O-metil glucose do PGL-1 ainda não foi detectada em nenhuma outra molécula natural, constituindo-se na chave para a alta especificidade da resposta imune durante o processo de infecção. O PGL-1 também pode reagir com compostos de radicais livres, sugerindo que este lipídeo capsular pode proteger o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossômicas e metabólitos oxidativos produzidos pelos macrófagos durante a infecção.

A composição lipídica da membrana celular ainda não está totalmente caracterizada, porém, existem evidências indicando a presença de fosfolípidos característicos de membrana, que são encontrados em espécies cultiváveis de micobactérias, incluindo membros sorologicamente ativos de manose fosfatidilinositol (PIM). A diversidade de PIM encontrados no *M. leprae* é menor do que a observada em outras espécies de micobactérias. O "fator corda" (trealose di-micolato), observado no *M. tuberculosis*, não foi detectado no bacilo de Hansen, apenas pequenas quantidades de trealose mono-micolato. Estudos bioquímicos permitiram a identificação de dois importantes polipeptídeos de membrana — MMP-I que é uma proteína de 35kD, sorologicamente ativa e reconhecida por anticorpos monoclonais murinos específicos para o bacilo; e MMP-II que possui peso molecular de 22kD. Embora estas duas proteínas sejam as mais importantes, é provável que outras estejam presentes na membrana celular, porém, os métodos convencionais de análise bioquímica ainda não permitiram a sua identificação.

O citoplasma é eletrodense contendo estruturas comuns a organismos gram positivos. Utilizando-se análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SUS), foi possível identificar três importantes proteínas citoplasmáticas: a primeira possui peso molecular de 28kD, a segunda 17kD (sorologicamente distinta da proteína encontrada na parede celular) e a terceira, que é semelhante à proteína de choque térmico GroES, também encontrada na parede celular. Estudos acerca da composição protéica do bacilo, baseados em técnicas sorológicas, permitiram a identificação de outros componentes, como por exemplo uma proteína de 65kD identificada como sendo homóloga à proteína de choque térmico GroEL e que geralmente é encontrada degradada em preparados de bacilos. Uma outra proteína de 70kD identificada por anticorpos monoclonais também corresponde a uma proteína de choque térmico, homóloga à DnaK de *E. coli*. Estudos realizados com anticorpos monoclonais também permitiram identificar uma proteína de 18kD, estruturalmente ligada a proteínas de choque térmico e uma de 28kD identificada como a enzima superóxido dismutase.

Entre as atividades bioquímicas mais conhecidas, está a capacidade do bacilo de oxidar uma variedade de difenóis, em particular o D-isômero de dihidroxifenilalanina (DOPA). A atividade da DOPA oxidase foi descrita, por Prabhakaran em 1980, como sendo única para o *M. leprae* (entre as micobactérias). A enzima ácido dihidropteroato sintetase é sensível à sulfã (diaminodifenilsulfona - DDS), amplamente utilizada na terapêutica da doença; outra enzima, como por exemplo a dismutase superóxido, esta envolvida em mecanismos de sobrevivência do bacilo no interior dos macrófagos, fazendo com que o bacilo resista aos efeitos tóxicos dos metabólitos oxidativos produzidos pelas células do hospedeiro. Entre outras enzimas de importância, podemos citar a decarboxilase glutamato, beta-glucuronidase e N-acetil beta glucosaminidase, porém não se sabe com certeza se elas são derivadas do bacilo ou do tecido do hospedeiro.

Experimentos realizados para identificar quais substratos poderiam ser utilizados pelo bacilo como fonte de nutrição demonstraram que substâncias comumente adicionadas aos meios de cultura para micobactérias — glicerol e glicose — podem ser utilizados pelo *M. leprae* quando em suspensão. Atividades associadas com enzimas envolvidas na via de Embden-Meyerhoff também foram detectadas a partir de extratos do bacilo. Também observou-se a utilização, pelo bacilo, do composto 6-fosfogliconato. Estas e outras descobertas permitem sugerir que o não crescimento do bacilo in vitro não é devido a falhas na principal via de catabolismo do carbono. Uma indicação de que esta atividade catabólica está efetivamente ligada à produção de energia tem sido comprovada a partir de análise quantitativa da adenosina-tri-fosfato (ATP) contida no bacilo.

Muitas pesquisas relacionadas ao genoma do *M. leprae* têm sido realizadas. Todas as informações que determinam a estrutura do bacilo estão contidas nele. Graças aos avanços das técnicas de biologia molecular foi possível "transferir" o DNA do bacilo para outros microrganismos cultiváveis, como a *E. coli*, e também para outras espécies de micobactérias. O peso molecular estimado para o genoma

das micobactérias é de $2,2 - 4,5 \times 10^9$ daltons e para o bacilo de Hansen é de $2,2 \times 10^9$ daltons. A quantidade de guanina + citosina (G+C) é notavelmente mais baixa (54-58%) quando comparada a outras micobactérias (65-69%). Diversos genes específicos do bacilo têm sido clonados e caracterizados, com a finalidade de se obter uma grande quantidade de antígenos protéicos. Genes que codificam as moléculas de RNA ribossomal são de particular interesse taxonômico, especialmente o gene 16S rRNA. Em comum com outras micobactérias de crescimento lento, o *M. leprae* possui uma única cópia do gene rRNA com grande parte da sequência reconhecida (95%) no gene 16S rRNA, indicando uma estreita relação entre o *M. leprae*, *M. tuberculosis* e *M. avium*. Algumas diferenças na sequência podem ser observadas no *M. leprae*, sendo estas diferentes de outras espécies de micobactérias. Embora tenham sido descritas diferenças genotípicas, tendo como base inoculações em coxim plantar de camundongos, análises feitas no DNA não permitiram identificar nenhuma variação genotípica. Sequências específicas de DNA do bacilo podem ser exploradas através de técnicas capazes de trabalhar com um reduzido número de bacilo e com alto grau de sensibilidade, em particular, a técnica de amplificação de DNA que tem como base a reação em cadeia de polimerase (PCR). Algumas sequências espécie-específicas já são bem conhecidas permitindo que vários pesquisadores possam aplicar esta técnica para detecção do bacilo em condições laboratoriais de rotina. Além da técnica ser utilizada para diagnóstico, inclusive de formas clínicas paucibacilares, ela pode ser aplicada em trabalhos de monitoramento de possíveis reservatórios do bacilo no meio ambiente, como por exemplo a sua detecção em amostras de solo e água de áreas endêmicas. Outros avanços têm sido possíveis graças às novas técnicas de genética molecular, que possibilitam que genes do *M. leprae* possam ser expressos em *E. coli*, contribuindo de forma importante para o estudo de antígenos protéicos, e, mais recentemente, a transferência de genes entre as micobactérias permitindo que se conheça melhor alguns aspectos bioquímicos do bacilo.

Com o avanço da biologia molecular; espera-se que estas novas técnicas permitam aos pesquisadores descobrirem porque ainda não foi possível o cultivo do bacilo in vitro. A reprodução do bacilo ou a ausência dela, constituem ainda o ponto central das pesquisas envolvendo o bacilo de Hansen. Com as novas técnicas de genética molecular, certamente será possível conhecer mais detalhadamente os processos metabólicos pelos quais o bacilo passa. Métodos baseados na oxidação de ácidos graxos representam também uma importante descoberta no desenvolvimento de testes in vitro de sensibilidade a drogas, que sejam mais rápidos do que o método padrão de inoculação em coxim plantar de camundongos. A identificação de componentes envolvidos nos mecanismos de interação com as células do hospedeiro que desencadeiam o processo de doença também é uma importante linha de estudo seguida por muitos microbiologistas e imunologistas.

Para patógenos convencionais, os quais podem ser manipulados in vitro, os fatores de virulência têm sido identificados a partir da "construção" de cepas Imitantes com alterações em genes específicos. Para o *M. leprae* há necessidade de se fazer o caminho contrário, monitorando a expressão de genes específicos em outros organis-

mos cultiváveis. Além disso, os genes que codificam antígenos específicos podem ser utilizados por métodos que permitam identificar componentes do bacilo envolvido na resistência aos macrófagos e na penetração de células do sistema nervoso periférico.

O tempo de geração do bacilo é lento, sendo de aproximadamente 11-13 dias, durante a fase logarítmica de multiplicação bacilar em coxim plantar de camundongos imunocompetentes, porém, em 1971, Rees relatou que em camundongos imunodeficientes o tempo de geração era o mesmo.

A localização das lesões hansênicas no corpo dos pacientes (pele, mucosa nasal e nervos periféricos) sugere que o bacilo tenha preferência por temperaturas menores que 37° C. Isto pôde ser comprovado a partir de estudos realizados em camundongos imunodeficientes nos quais a infecção expande-se predominantemente para lugares mais frios do corpo do animal. Entretanto, evidências mais fortes vieram de estudos realizados por Shepard; a partir de inoculações em coxim plantar de camundongos, ele observou que para o melhor crescimento do bacilo, a temperatura média do tecido plantar deveria estar entre 27-30° C.

Fora do organismo humano, em fragmentos de biópsias ou suspensão, o bacilo pode manter-se viável por até 10 dias sob temperatura de 4°C. Métodos tradicionais de esterilização como autoclavagem e pasteurização são eficientes para matar o bacilo. Em secreção nasal, o bacilo pode sobreviver por até sete dias a temperatura de 20.6°C e umidade de 43.7%, porém com o aumento da temperatura e umidade, a viabilidade tende a diminuir

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HANSEN, G.A. et al. *Leprosy: in its clinical and pathological aspects*. Wright, Bristol, p.43, 1985.

PRABHAKARAN, K. et al. Failure to detect O-diphenyloxidase in cultivable mycobacteria obtained from feral armadillos. *Leprosy rev.*, v. 51, p. 341-49, 1980.

REES, R.J.W. The impact of experimental human leprosy in the mouse on leprosy research. *Int. Leprosy*, v.39, p.210-15, 1971.

BIBLIOGRAFIA

CHAN, J. et al. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, (USA), v.86, 1),2453-57, 1989.

CLARK-CURTISS, J.E. et al. Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. *Bacteria*, v.161, p.1093-1102, 1985.

DAVEY, T.F. et al. The nasal discharge in leprosy; clinical and bacteriological aspects. *Leprosy. Rev.*, v.45, p.121-34, 1974.

DESIKAN, K.V. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Leprosy. Rev.*, v.48, p.231-35, 1977.

DHARIWAL, K.P. et al. Detection of trehalose monomycolate in *Mycobacterium leprae* grown in armadillo tissues. *J. gen. microbiol.*, v.133, p.201-09, 1987.

DRAPER, P. Cell walls of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy*, v.44, p.95-98, 1976.

DRAPER, P et al. Isolation of a characteristic phthiocerol dimycocerosate from *Mycobacterium leprae*. *J. gen. microbiol.*, v.129, p.859-63, 1983.

ENGERS, H.D. et al. Results of a World Health Organization sponsored workshop on monoclonal antibodies to *Mycobacterium leprae*. *Infec. immun.*, v48, p.603-05, 1985.

ESTRADA-G, I.C.E. et al. Partial nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA isolated from armadillo-grown *Mycobacterium leprae*. *J. gen. microbiol.*, v.134, 1),1449-53, 1988.

GARSIA, R.J. et al. Homology of the 70-kilodalton antigen from *Mycobacterium leprae* with the conserved heat shock protein 70 of eukaryotes. *Immun.*, v.57, p.204-12, 1989.

HANSEN, G.A. et al. *Leprosy: in its clinical and pathological aspects*. Wright, Bristol, p.43, 1985.

HARTSKEERL, R.A. et al. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J. gen. microbiol.*, v.135, p.2357-64, 1989.

HUNTER, S.W. et al. Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. biol. chem.*, v.265, p.9272-79, 1990.

HUNTER, S.W. et al. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and a related diacylphthiocerol from *Mycobacterium leprae*. *biol. chem.*, v. 258, p. 7556-62, 1983.

HUNTER, S.W. et al. Isolation and characterization of the highly immunogenic cell wall-associated protein of *Mycobacterium leprae*. *J. Immunol.*, v.142, p.2864-72, 1989.

HUNTER, S.W. et al. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J. biol. chem.*, v.257, p.15072-78, 1982.

HUNTER, S.W. et al. The major native proteins of the leprosy bacillus. *J. biol. chem.*, v. 265, p. 14065-68, 1990.

IMAEDA, T. et al. DNA isolated from *M. leprae*: genome size, base

- ratio and homology with other related bacteria as determined by optical DNA-DNA reassociation. *J. Bacteriol.*, v.150, p.414-17, 1982.
- IVANYI, J. et al. Definition of species-specific and cross-reactive antigenic determinants of *Mycobacterium leprae* using monoclonal antibodies. *in. exp. Immun.*, v.52, p.528-36, 1983.
- KHANOLKAR, S.R. et al. Use of an antigen capture assay for characterization of monoclonal antibodies to mycobacterial lipoarabinomannan. *J. med. microbiol.*, v.28, p.157-62, 1989.
- KULKARNI, V.M. et al. Inhibitory activity and mode of action of diaminodiphenylsulfone in cell-free folate-synthesizing systems prepared from *Mycobacterium leprae* and *M. leprae*. *chemotherapy*, v.29, p.58-67, 1983.
- KUSUNOSE, E. et al. Superoxide dismutase in cell-free extracts from *Mycobacterium leprae* grown on armadillo liver. *Federation of European Microbiological Societies Letters*, v.10, p.49-52, 1981.
- KVACH, J.T. et al. Adenosine triphosphate content of *Mycobacterium leprae* isolated from armadillo tissue by Percoll buoyant density centrifugation. *Int. J. Leprosy*, v.54, p.1-10, 1986.
- LEE, Y.N. et al. Measurement of ATP generation and decay in *Mycobacterium leprae* in vitro. *J. gen. microbiol.*, v.131, p.333137, 1985.
- LEVY, L. Studies of the mouse footpad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae* 3. Doubling time during logarithmic multiplication. *Leprosy. Rev.*, v.47, p.103-06, 1976.
- LIESACK, W et al. Nucleotide sequence of the 16S rRNA from *Mycobacterium leprae*. *Nucleic acids res.*, v.18, p.5558, 1990.
- MEHLERT, A. et al. Biochemical and antigenic characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* 71kD antigen, a member of the 70 kD heat shock protein family. *Mol. microb.*, v.3, p.125-30, 1989.
- MEHRA, V. et al. Characterization of *Mycobacterium leprae* cell wall associated proteins with the use of T lymphocyte clones. *J. immunol.*, v.142, p.2873-78, 1989.
- MELANCON-KAPLAN, J. et al. Immunological significance of *Mycobacterium leprae* cell walls. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, v.85, p.1917-21, 1988.
- MINNIKIN, D.E. et al. The free lipids of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected nine-banded armadillos. *J. gen. microbiol.*, v.131, p.2007-11, 1985.
- NEIL, M. A. et al. The effect of phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. exp. med.*, v.167, p.30-42, 1988.
- NERLAND, A.H. et al. A protein antigen of *Mycobacterium leprae* is related to a family of small heat shock proteins. *J. bacteriol.*, v.170, p.5919-21, 1988.
- PLIKAYFIS, B.B. et al. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J. clin. microbiol.*, v. 28, p. 1913-17, 1990.
- PRABHAKARAN, K. Oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) by *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy*, v. 35, p. 42-51, 1967.
- PRABHAKARAN, K. et al. Failure to detect O-diphenyloxidase in cultivable mycobacteria obtained from feral armadillos. *Leprosy rev.*, v. 51, p. 341-49, 1980.
- REES, R.J.W. et al. Application of quantitative electron microscopy to the study of *Mycobacterium lepraemurium* and *M. leprae*. *J. general microbiol.*, v.22, p.443-57, 1960.
- REES, R.J.W. The impact of experimental human leprosy in the mouse on leprosy research. *Int. J. Leprosy*, v.39, p.210-15, 1971.
- SHEPARD, C.C. et al. *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity and effect of cortisone. *J. bacteriol.*, v.89, p.365-72, 1965.
- SHEPARD, C.C. Temperature optimum of *Mycobacterium leprae* in mice. *J. bacteriol.*, v.90, p.1271-75, 1965.
- SMIDA, let al. Molecular genetic evidence for the relationship of *Mycobacterium leprae* to slow-growing pathogenic mycobacteria. *Int. J Leprosy*, v.56, p.449-53, 1988.
- SNAPPER, S.B. et al. Molecular genetic approaches to mycobacterial investigation. In: McFadden J (ed). *Molecular biology of the mycobacteria*. London: Academic Press, p.199-218, 1990.
- THANGARAJ, H.S. et al. Identification, sequencing and expression of *Mycobacterium leprae* superoxide dismutase, a major antigen. *Infect. immun.*, v.58, p.1937-42, 1990.
- WHEELER, PR. Catabolic pathways for glucose, glycerol and 6-phosphogluconate in *Mycobacterium leprae* in armadillo tissues. *J. gen. microbiol.*, v.129, p.1481-95, 1983.
- WILLIAMS, D.L. et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for a detection of *Mycobacterium leprae*. *J infect. dis.*, v.162, p.193-200, 1990.
- WOODS, S.A. et al. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *Federation of European Microbiological Societies Letters*, v.65, p.305-10, 1989.

YOUNG, D.B. Detection of mycobacterial lipids in skin biopsies from leprosy patients. *Int. J. Leprosy*, v.49, p.198-204, 1981.

YOUNG, D.B. et al. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Nat Acad. Sci. (USA)*, v.85, p.4267-70, 1988.

YOUNG, D.B. Identification of *Mycobacterium leprae*: use of wall-bound mycolic acids. *J. gen. microbiol*, v.121, p.249-53, 1980.

YOUNG, R.A. et al. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. *Nature*, v.316, 450-52, 1985.