

# 14<sup>o</sup> CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROSA

## RELATÓRIOS DAS COMISSÕES DAS OFICINAS DE TRABALHO.

### Oficina de Trabalho 1: Microbiologia

**Presidente:** F. Portaels

**Relator:** V.M. Katoch

#### Participantes

V.P. Bharadwaj  
A.K. Chakrabarty  
S.T. Cole S.G.  
Dastidar  
A.M. Dhople  
S.G. Franzblau  
T.P. Gillis

S.R. Pattyn  
C. Pessolani R.  
Rivoire  
U. Seydel  
V. Stich-Groh  
P.R. Wheeler  
D.L. Williams

#### Observadores

S. Chetale

S. Schunicht

Os progressos realizados sobre os vários aspectos microbiológicos foram revistos da seguinte maneira:

#### **Purificação do *Mycobacterium leprae*.**

O *Mycobacterium leprae* derivado de tatus continua a ser utilizado para vários estudos bioquímicos, estruturais e antigênicos. Desenvolveu-se um protocolo híbrido modificado (contendo tratamento alcalino e 30% de Percoll com gradiente de densidade variando de 1/79 & 1/77) com o intuito específico de remover o material pigmentado do hospedeiro e útil para purificação do *M. leprae* de fígado de tatu. Além disso foi descrito um teste baseado na estimativa do conteúdo de arabinose para checar a pureza de bacilos (conteúdo micobacteriano) após a purificação. Contudo verificou-se que não está inteiramente compreendido o efeito da irradiação gama sobre os vários marcadores ou testes de viabilidade e a integridade do DNA (O que pode

influenciar os sinais do PCR). Além disso não se dispõe de técnicas objetivas para monitorizar a contaminação do *M. leprae* purificado com material solúvel do hospedeiro e outras micobactérias.

**Cultivo:** Nos últimos 5 anos descreveram-se tentativas para o crescimento do *M. leprae* em meios convencionais modificados, descritos antigamente, (7H9, Dubos e DH) bem como em meios não convencionais (Meios simples para quimioautótrofos). Foram isolados e reisolados repetidamente organismos nocardioformes quimioautotróficos (CAN) de tecidos infectados com o *M. leprae* e demonstrou-se que eles são semelhantes ao *M. leprae* por critérios enzimáticos, químicos (micolatos e PGL), antigênicos (lepromina), 36 kDa PCR e de patogenicidade (inoculação de camundongo). Além disso em recentes publicações foram admitidas formas cocóides, miceliais, císticas e semelhantes a esporos (artrosporos e

biastosporos nocardioformes) no ciclo de desenvolvimento do bacilo da lepra. Estas investigações necessitam ser continuadas e os isolamentos caracterizados inteiramente do ponto de vista taxonômico. Houve apresentações que demonstraram que o PCR está sendo proposto para ser usado como um instrumento taxonômico. Contudo, sugeriu-se ter em mente o perigo das "sobras", e a necessidade de testar outros marcadores genômicos DNA/DNA, DNA/RNA, hibridização (total e usando sondas específicas), bem como análises de RFLP (Polimorfismo de fragmentos de restrição).

Enfatizou-se também a necessidade de se confirmar a presença de organismos "puros" e "viáveis" nas tentativas de cultivo.

**Fisiologia/Bioquímica:** Durante este período de 5 anos, relataram-se investigações sobre a fisiologia do *M. leprae*, utilizando-se para isto métodos bioquímicos e moleculares. Identificaram-se no *M. leprae* exoquelinas e ferritinas. Outros estudos demonstraram que enquanto a biosíntese de purinas não é detectável no *M. leprae*, este microrganismo é capaz de biosíntese e degradação de pirimidina. Demonstrou-se que o *M. leprae* tem a capacidade de utilizar e hidrolizar vários lipídios do hospedeiro. Não se desenvolveu a presença de acetato no *M. leprae*, possivelmente devido à ausência de fosfoacetilase; detectaram-se sintetases de ácidos graxos embora com baixa atividade. Por outro lado ácidos graxos longos foram prontamente detectáveis no *M. leprae*. Observou-se que fosfolipídios não são hidrolizados pelo *M. leprae*, mas isto obviamente não causa danos as membranas do hospedeiro. Relatou-se que os microrganismos são capazes de utilizar acil-gliceróis (até agora usando um modelo mas não substrato:naturais). Não se sabe ainda se o *M. leprae* pode utilizar esfingolipídios, que são os principais lipídios neurais. Sugeriu-se o planejamento de drogas dirigidas contra a biosíntese do PGL e LAM e imunoterapia para bloquear a entrada e impedir a persistência em células de Schwann e macrófagos.

Durante este período de 5 anos, foram identificadas mais proteínas do *M. leprae* e foram inferidas funções para muitas delas. Seus

gens foram clonados e seqüenciados em vários graus. Os mais importantes são: 10 kDa (gro ES); LSR; 28 kDa (SOD); 28 kDa (IRG); as principais proteínas da parede celular (histona derivada do tecido do hospedeiro); essa importante proteína da membrana (homologia com a bacteroferritina) e seis proteínas "menos abundantes" (dois possíveis fatores de virulência mostrando homologia com alquil hidroxiperoxidase redutase e uma tiosulfato sulfurtransferase e uma terceira com uma proteína ribossomal homóloga LT/LIC). Algumas dessas proteínas podem ter um papel na resposta de organismos a choques (stresses) oxidativos ou outras e também em uma possível virulência.

Vários estudos recentes tem focalizado fatores físico químicos importantes no crescimento do *M. leprae*.

Usando bioluminescência, captação da timidina marcada (3H) e outros parâmetros foram identificados, vários fatores físico-químicos tais como nutrientes (gelatina, piruvato, malato, silicone, derivados de combustível fóssil, purinas, uréia, glicerol, asparagina, etc) e condições físicas (pH mais baixos 6 - 6,5, temperaturas de 300C - 330C, níveis de oxigênio mais baixos) como possivelmente relevantes para o crescimento "in vitro" do *M. leprae*. Sugeriu-se que estes fatores e procedimentos apropriados tais como o processamento de espécimes, adição de grandes quantidades de lipídios como o complexo de ciclodextrina (esfingolipides, ácido palmítico) etc, para melhorar a síntese de ATP e possível crescimento em estudos futuros. Enfatizou-se a necessidade de analisar as experiências com outras micobactérias de difícil cultivo para identificar fatores críticos possivelmente importantes para o *M. leprae*.

#### **Sequenciamento de gens do *M. leprae*:**

Dispõe-se de informação acerca de várias seqüências de gens do *M. leprae* e com base nos dados publicados acerca dos gens do RNA ribossomal, o bacilo da lepra mostrou pertencer ao grupo das micobactérias de crescimento lento. Além disso o projeto de sequenciamento do genoma do *M. leprae* tem progredido e cerca de 15% do genoma já foi sequenciado.

Relatou-se que a informação gerada é

complementada aos dados emergentes acerca de vários gens que codificam proteínas estruturais do *M. leprae*. Se os níveis atuais de financiamento forem mantidos o genoma inteiro poderá ser seqüenciado em cerca de 3 anos.

**Sondas genéticas/Métodos de amplificação:** Durante este período foram desenvolvidas diversas sondas genéticas e técnicas de amplificação para detectar as seqüências gênicas do *M. leprae* e existem algumas outras em desenvolvimento. Entre as mais importantes técnicas de amplificação gênica estão aquelas que têm como alvo as proteínas de 18 kD, 36 kD, 65 kD, RNA ribossômico e respectivas seqüências de DNA. Técnicas genéticas rápidas também estão sendo desenvolvidas para detectar mutações que conferem resistência do *M. leprae* à rifampicina. Dados acerca da aplicação de diferentes ensaios de PCR em espécimes clínicos bem como espécimes padrões (incluindo os ensaios da IMMLEP) demonstraram que estas técnicas são exequíveis. Estes ensaios parecem ser geralmente sensíveis para casos MB, entretanto têm uma sensibilidade de 50% para casos PB, com bacifoscopia negativa. A melhor metodologia para coleta de espécimes, estocagem, extração e critérios de positividade (se por EB ou autoradiografia) necessitam ser mais aperfeiçoadas para sua aplicação no diagnóstico clínico e em epidemiologia.

**Determinação da viabilidade in vitro:** Na ausência de uma definição aceitável de "unidades cultiváveis" do *M. leprae*, todos os outros critérios continuam ser indiretos. A discussão dos dados mostrou que os métodos "in vitro" são mais úteis para a seleção dos agentes sem enfrentar os problemas da farmacocinética do camundongo. Além dos métodos discutidos no início, tais como o índice morfológico, eletromicroscopia, a coloração pelo FBA/EB, os ensaios de captação de metabolitos substrato, vários testes com macrófagos, foram descritas como alternativa para o coxim plantar do camundongo, técnicas mais novas ou modificadas, baseadas em abordagens bioquímicas, moleculares e de bioluminescência.

Os dados apresentados acerca da aplicação da coloração FDA/EB, da medida do ATP bacilar, da medida da razão Na/K pelo LAMMA, radioespirometria (BACTEC/Sistemas Buddemeyer) e amplificação de sonda genética (PCR com diluição limitada, PCRs quantitativamente diferentes), sistemas baseados no RNA ribossomal, mostraram que várias abordagens podem ser úteis para monitorizar as respostas a quimioterapia, a seleção de drogas e as medidas "in vitro" do estado metabólico do *M. leprae*. Como estes métodos avaliam diferentes aspectos da viabilidade, até mesmo mais do que um método pode ser útil ou necessário para um objetivo particular. Relataram-se com o uso da radioespirometria novos compostos ativos contra o *M. leprae*, que mostraram mais tarde serem promissores em testes clínicos. Também mostraram-se úteis para a seleção de drogas o LAMMA, outros testes de captação e o consumo de ATP. Requerem-se estudos para avaliar e adaptar esses métodos para sua aplicação definitiva clínica ou laboratorial.

**Possíveis fontes ambientais de *M. leprae*:** Parece haver relações entre a distribuição de combustíveis fósseis e a endemia leprótica que necessita ser investigada do ponto de vista epidemiológico. As novas tecnologias fornecerão os instrumentos necessários para investigar mais a possibilidade de um reservatório para o *M. leprae*.

#### Áreas de futuras pesquisas.

a) Da mesma forma que com a tuberculose onde além do cultivo também requerem-se métodos rápidos e alternativos, tem-se a sensação de que devem ser continuados os esforços paralelos sobre o cultivo bem como o desenvolvimento e a aplicação de métodos suplementares para a viabilidade, detecção e características para a identificação do *M. leprae* nos pacientes, no ambiente e no laboratório.

b) Necessitam ser experimentadas em futuros estudos abordagens da biologia molecular para preencher as lacunas críticas, na fisiologia, bioquímica, aspectos estruturais, resistência a drogas e fatores de virulência.

c) Há necessidade de se dar especial atenção a estudos sobre o desenvolvimento e aplicação de sondas genéticas e métodos de amplificação de gens para diagnosticar e investigar a epidemiologia da lepra.

d) Além das já conhecidas características taxonômicas, Instrumentos moleculares mais novos devem ser usados para estabelecer a identidade de qualquer forma "cultivável" do *M.leprae*.

e) Permanecem altas para vários

propósitos as exigências de bacilos e suas partes componentes e será importante encontrar as respostas a várias questões( por exemplo, mesmo quando o projeto do sequenciamento do genoma estiver completo, será necessário saber quais gens estão expressados).Para atender a esses requisitos da pesquisa, será necessário o fornecimento de *M.leprae* "puro" e os suprimentos de tatus e camundongos nus("nude mice") deverão continuar a ser uma prioridade.