

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mariana Martins de Athaide

**Estudo da participação do PDGF nas células de Schwann humanas ST88-14:
possível envolvimento na fibrose neural na hanseníase**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO
2018

de Athaide, Mariana Martins.

Estudo da participação do PDGF nas células de Schwann humanas ST88-14: possível envolvimento na fibrose neural na hanseníase / Mariana Martins de Athaide. - Rio de Janeiro, 2018.

77 f.; il.

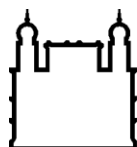
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Maria Cristina Vidal Pesolani.

Bibliografia: f. 65-77

1. Fator de crescimento derivado de plaquetas. 2. Célula de Schwann. 3. Mycobacterium leprae. 4. Hanseníase. 5. Fibrose. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Mariana Martins de Athaide

**Estudo da participação do PDGF nas células de Schwann humanas ST88-14:
possível envolvimento na fibrose neural na hanseníase**

ORIENTADOR: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Mariana Caldas Waghabi - Instituto Oswaldo Cruz - Presidente

Dr. Victor Túlio Ribeiro de Resende - Universidade Federal do Rio de Janeiro;

Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins - Instituto Oswaldo Cruz

SUPLENTE:

Dra. Veronica Schmitz Pereira - Instituto Oswaldo Cruz - Revisora

Dra. Cristiana Santos de Macedo - Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde

Rio de Janeiro, 10 de Outubro de 2018

**À Deus pelo fôlego de vida.
Aos meus pais por todo amor do mundo e por tornar possível toda minha formação.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado toda sabedoria e ter me sustentado até aqui;

À minha orientadora Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani por toda atenção dada e pela oportunidade que me destes. É uma honra trabalhar com a Senhora;

À minha família, pai, mãe e irmã por todo amor, carinho e compreensão. Vocês são a minha base! Nunca vou conseguir retribuir todo esforço e dedicação de vocês, meus pais. Amo muito vocês;

Ao meu namorado Carlos Mauricio por estar comigo em todos os momentos, me apoiando e ajudando desde o início. Você foi essencial para tudo dar certo e será até o fim de nossas vidas! Te amo!;

À Dra. Thaís Porto Amadeu por confiar em mim a todo o momento e me ensinar a ter pensamento crítico. Obrigada por me acompanhar no decorrer de toda minha formação e por não me oferecer somente suporte profissional, mas também sua amizade;

À Dra. Euzenir Nunes Sarno pela preocupação com a nossa formação e, principalmente, por representar um exemplo de profissionalismo e amor à ciência;

À Dra. Roberta Olmo Pinheiro, por todo o debate científico e por sempre acreditar em meu potencial;

Às alunas de pós-graduação e grandes amigas Tamiris Bittencourt (doutoranda), Jéssica Paixão (doutoranda), Mayara Mendes (doutoranda) e Ana Carolina Duarte (mestranda) por toda amizade e ensinamentos diários. Com vocês os meus dias se tornaram mais alegres e divertidos! Amo vocês quinteto;

À todos os integrantes do laboratório de hanseníase (LAHAN) desde os funcionários responsáveis pelos serviços gerais e cafézinho de cada dia, aos funcionários públicos, técnicos e alunos de pós-graduação e pós-doutorado que se dispusera a me ajudar em todos os serviços sejam eles técnicos ou científicos;

Aos funcionários do Ambulatório Souza Araújo (ASA), pela colaboração e por todo o cuidado com nossos pacientes;

Aos meus amigos do dia-a-dia que entenderam toda minha ausência e estão comigo sempre;

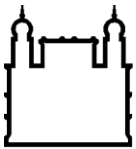
À memória de Paulo Salles, o famoso “Seu Salles”, que era muito mais que um porteiro do pavilhão da hanseníase. Muito obrigada por todo o companheirismo do turno da noite. Seus lanchinhos faziam toda a diferença. Descanse em paz!;

Aos membros da banca examinadora e à minha revisora Dra Verônica Schmitz, por aceitarem o convite;

À pós-graduação em Biologia Celular e Molecular;

Ao Instituto Oswaldo Cruz pelo suporte financeiro para que fosse possível esta pesquisa.

**"Pesquisar é ver o que outros viram, e pensar o que nenhum outro pensou."
- Albert Szent-Gyorgyi**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

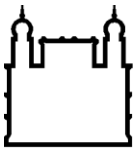
ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO PDGF NAS CÉLULAS DE SCHWANN HUMANAS ST88-14: POSSÍVEL ENVOLVIMENTO NA FIBROSE NEURAL NA HANSENÍASE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Mariana Martins de Athaide

A fibrose causa danos irreversíveis ao nervo periférico de pacientes com hanseníase, e as células de Schwann (CS) podem estar diretamente envolvidas, visto que o *Mycobacterium leprae* (ML), o agente etiológico da doença, apresenta um tropismo por estas células. Considerando que a hanseníase possui diferentes formas clínicas e que os pacientes apresentam diferentes graus de inflamação e fibrose, se faz necessário avaliar quais mediadores pró-fibróticos, além do TGF- β 1, poderiam contribuir para este processo. O PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) tem sido identificado como um dos principais mediadores envolvidos na fibrogênese de diversos órgãos, contudo, são necessários mais estudos para investigar a relação entre este fator e as doenças infecciosas caracterizadas por fibrose, como a hanseníase. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a possível contribuição do PDGF e de seus receptores na lesão neural da hanseníase no modelo *in vitro* com CS humanas da linhagem ST88-14, e *ex vivo* a partir da avaliação dos níveis séricos de pacientes com hanseníase com a forma neural pura (HNP). Este estudo mostrou que as CS da linhagem ST88-14 produzem constitutivamente PDGF-BB e esta produção é aumentada por ML + TGF β -1 em 7 dias. Também observamos que o estímulo com ML induz a expressão do receptor PDGFR- α . Além disso, mostramos que a via de sinalização TGF β -1/TGF β R é importante tanto para a expressão de PDGFR α e β , quanto para a mudança funcional das CS, pois regula a deposição/secreção de matriz extracelular (MEC) induzida nestas células. Adicionalmente, observamos que PDGF-BB induz o aumento da expressão de TGF β RI e II pelas CS. De maneira geral, os resultados *ex vivo* fortaleceram a hipótese de que o PDGF é um potencial indutor da fibrose neural na hanseníase junto aos efeitos já descritos exercidos pelo TGF β -1, uma vez que pacientes HNP apresentam níveis séricos elevados de PDGF-BB e MCP-1 comparados aos pacientes não hansenianos. Visto que juntos esses fatores atuam na fibrose, poderemos compreender melhor a patogênese que leva à fibrose e impede a regeneração neural em pacientes com hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF PDGF PARTICIPATION IN HUMAN SCHWANN CELLS ST88-14: POSSIBLE INVOLVEMENT IN NEURAL FIBROSIS IN LEPROSY

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Mariana Martins de Athaide

Fibrosis causes irreversible damage to the peripheral nerve of leprosy patients, as well as Schwann cells (CS), which may be directly involved with *Mycobacterium leprae* (ML), the etiological agent of the disease, presenting a tropism by these cells. Considering that leprosy presents different clinical forms and their patients present different degrees of inflammation and fibrosis, it becomes necessary to evaluate which pro-fibrotic mediators besides TGF- β 1 could contribute to this process. PDGF (platelet-derived growth factor) has been identified as one of the main mediators involved in the fibrogenesis of various organs, however, further studies are needed to investigate the relationship between this factor and infectious diseases, characterized by fibrosis, such as leprosy. Thus, this study had a possible contribution of the PDGF and its receptors in the leprosy neural lesion in the *in vitro* model with the human CS of the ST88-14 lineage, and *ex vivo* by the evaluation of serum levels of pure neural form patients with leprosy. Our data showed that the CS of the ST88-14 lineage produces constitutively PDGF-BB and this production is increased by ML + TGF β -1 in 7 days. We also observed that the ML stimuli, induces PDGFR- α expression. Furthermore, we have shown that the TGF β -1 / TGF β R signaling pathway is important for both the expression of PDGFR α and β , as well as the functional change of CS, as it regulates the deposition / secretion of extracellular matrix (ECM) induced in these cells. Additionally, we also observed that PDGF-BB induces the increase of the expression of TGF β R1 and II and the secretion of soluble TGF β -1 by CS. Overall, *ex vivo* results have reinforced the hypothesis that PDGF is a potential inducer of neural fibrosis in leprosy along with the previously described effects exerted by TGF β -1, since HNP patients have elevated serum levels of PDGF-BB and MCP -1 compared to non-Hansen patients. Since these factors act together in fibrosis, we can better understand the pathogenesis leading to fibrosis and prevent neural regeneration in patients with leprosy.

LISTA DE ABREVIATURAS

AG - Arabinogalactanos	HNP - Hanseníase forma Neural Pura
BAAR - Bacilo Álcool-Ácido Resistente	HSC - do inglês, <i>Hepatic Stellate Cells</i>
BB - Forma <i>borderline-borderline</i>	IL - Interleucina
BDNF - do inglês, <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>	LAM - Lipoarabinomanana
BL - Forma <i>borderline</i> -lepromatoso	LIF - do inglês, <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
BSA - do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>	LL - Forma lepromatoso-lepromatoso
BT - Forma <i>borderline</i> -tuberculoide	LM- Lipomanana
CS - Células de Schwann	MB - Multibacilar
CSP - Células de Schwann Precursoras	MCP-1 - do inglês, <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
CTGF/CCN2 - do inglês, <i>Connective Tissue Growth Factor</i>	MEC - Matriz Extracelular
EDTA - do inglês, <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>	ML - <i>Mycobacterium leprae</i>
ELISA - Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	MMPs - do inglês, <i>Matrix Metalloproteinases</i>
ENH - Eritema Nodoso Hansênico	MOPS - do inglês, <i>3-(N-Morpholino) Propanesulfonic Acid</i>
ES - Esclerose Sistêmica	MTT - do inglês, <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
FGF - do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i>	NF-1 - Neurofibromatose 1
FGFb - do inglês, <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>	NGS - do inglês, <i>Normal Goat Serum</i>
GDNF - do inglês, <i>Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor</i>	NH - Não Hanseniano
	OMS - Organização Mundial da Saúde
	PB - Paucibacilar
	PBS - do inglês, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>

PCR - do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PDGF - do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor*

PDGFR - do inglês, *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*

PDIMs - do inglês, *Phthiocerol Dimycocerosates*

PFA - Paraformaldeído

PGL - do inglês, *Phenolic Glycolipid*

PLGF - do inglês, *Placental Growth Factor*

PRRs - do inglês, *Pattern Recognition Receptors*

pSLC - do inglês, *progenitor/stem-like cells*

RIPA - do inglês, *Radioimmunoprecipitation Assay Buffer*

RR - Reação Reversa

SFB - Soro Fetal Bovino

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SNPA - Sistema Nervoso Periférico Autônomo

SNPM - Sistema Nervoso Periférico Motor

TGF- β - do inglês, *Transforming Growth Factor β*

Th2 - do inglês *T helper 2*

TIMPs - do inglês, *Tissue inhibitors of metalloproteinases*

TNF - do inglês, *Tumor Necrosis Factor*

TP - Tampão de Permeabilização

TT - Forma tuberculoide-tuberculoide

UUO - do inglês, *Unilateral Ureteral Obstruction*

VEGF - do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*

WB - do inglês, *Western Blotting*

WHO - do inglês, *World Health Organization*

α -SMA - do inglês, *α - Smooth Muscle Actin*

β NGF - do inglês, *β -Nerve Growth Factor*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase no ano de 2017.....	2
Figura 2: Coeficiente de detecção de hanseníase no Brasil em 2015.....	3
Figura 3: Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley & Jopling.....	6
Figura 4: Morfologia do <i>M. leprae</i>. A.....	7
Figura 5: Modelo esquemático do envelope celular do <i>M. leprae</i>.....	9
Figura 6: Arquitetura das fibras mielinizadas no SNP.....	12
Figura 7: Principais estágios do desenvolvimento da Célula de Schwann originadas da crista neural.....	13
Figura 8: Receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs) e seu padrão de ligação às isoformas.....	22
Figura 9: <i>Mycobacterium leprae</i> aumenta a expressão gênica de <i>pdgfb</i> pelas CS da linhagem ST88-14.....	39
Figura 10: A combinação TGF-β1+ML aumenta a produção de PDGF-BB pelas CS da linhagem ST88-14 em 7 dias.....	40
Figura 11: <i>Mycobacterium leprae</i> é capaz de regular a expressão gênica de PDGFR.....	41
Figura 12: TGFβ-1 aumenta a expressão protéica de PDGFRβ nas CS da linhagem ST88-14.....	42
Figura 13: PDGFRβ em CS da linhagem ST88-14 após 7 dias de cultura.....	43
Figura 14: Expressão de fibronectina em CS humanas da linhagem ST88-14 mediante o estímulo com PDGF-BB.....	45
Figura 15: PDGF-BB aumenta a expressão dos receptores de TGFβ-1 nas CS humanas ST88-14.....	46
Figura 16: Pacientes com hanseníase neural pura apresentam níveis séricos de PDGF-BB elevados.....	48
Tabela 1: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes HNP e seus respectivos nervos biopsiados.....	49
Tabela 2: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes NH e seus respectivos nervos biopsiados.....	50
Figura 17: Os níveis séricos de PDGF-BB são diretamente proporcionais aos níveis séricos de MCP-1 em pacientes do grupo HNP.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes HNP e seus respectivos nervos biopsiados.....	49
Tabela 2: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes NH e seus respectivos nervos biopsiados.....	50

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.2	Hanseníase.....	1
1.2.1	A doença e sua epidemiologia	1
1.2.2	Formas clínicas	4
1.2.3	O agente etiológico	7
1.3	O Sistema Nervoso Periférico e as Células de Schwann.....	10
1.3.1	Células de Schwann no contexto da inflamação.....	14
1.3.2	Interação do <i>M. leprae</i> com as CS	15
1.4	Dano neural e a fibrose.....	17
1.5	Fator de crescimento derivado de plaquetas.....	20
1.5.1	Ligantes, seus receptores e sinalização celular	20
1.5.2	Papel do PDGF na cicatrização e fibrose.....	22
2	Justificativa.....	26
3	Objetivos.....	29
3.1	Objetivo Central:.....	29
3.1.1	Objetivos específicos:	29
4	Materiais e Métodos	30
4.1	Pacientes e amostras clínicas.....	30
4.2	<i>M. leprae</i> e reagentes.....	30
4.3	Culturas de CS ST88-14.....	31
4.4	Ensaio imunoenzimático (ELISA)	32
4.5	Western blotting (WB)	32
4.6	Imunofluorescência	33
4.7	Análise da matriz extracelular (MEC) secretada e imobilizada por ELISA indireto	34
4.8	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	35
4.8.1	Extração de RNA	35
4.8.2	Quantificação de ácidos nucleicos	35

4.8.3	Análise da integridade do RNA	36
4.8.4	Tratamento do DNA com DNase.....	36
4.8.5	Síntese de cDNA	36
4.8.6	RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (RT-qPCR)	37
4.9	Análise estatística	38
5	Resultados.....	39
5.1	<i>Mycobacterium leprae</i> e TGF β -modulam positivamente a expressão/produção de PDGF-BB em células de Schwann ST88-14.....	39
5.2	<i>Mycobacterium leprae</i> regula a expressão gênica do receptor α de PDGF	40
5.3	Secreção/deposição de fibronectina nas CS da linhagem ST88-14 após estímulo com PDGF-BB exógeno	44
5.4	Expressão de TGF β -1 e seus receptores mediante o estímulo com PDGF-BB	45
5.5	PDGF-BB está aumentado no soro de pacientes com hanseníase neural pura em relação a outras neuropatias periféricas não hansenianas	47
5.6	A correlação dos níveis séricos de PDGF-BB e MCP-1 é inversamente proporcional entre os grupos HNP e NH.....	51
6	Discussão	53
7	Considerações finais	60
8	Conclusões.....	61
9	Referências	63

1 Introdução

1.2 Hanseníase

1.2.1 A doença e sua epidemiologia

Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas estão infectadas com uma ou mais doenças negligenciadas, o que representa um sexto da população mundial, dentre elas se destaca a hanseníase (BRASIL. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, 2010). Em meio a uma gama de doenças infecciosas, a hanseníase quando diagnosticada e tratada tardiamente pode trazer graves consequências para os portadores e seus familiares, pelas lesões que os incapacitam fisicamente. Ela é considerada uma das principais causas de incapacidades físicas, e é devido a este poder incapacitante que a doença ainda constitui relevante problema de saúde pública.

O comprometimento dos nervos periféricos é uma das características principais da doença, dando-lhe um grande potencial para provocar incapacidades físicas que podem, inclusive, evoluir para deformidades. Estas incapacidades e deformidades podem acarretar alguns problemas, tais como diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social e problemas psicológicos. São responsáveis, também, pelo estigma e preconceito contra a doença (SILLO et al., 2016). Este potencial incapacitante está diretamente relacionado ao poder imunogênico do *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório que possui afinidade por macrófagos e células de Schwann (CS), esta última possui grande importância na manutenção dos neurônios e na produção da bainha de mielina no sistema nervoso periférico (SNP). A neuropatia periférica pode afetar os nervos motores, sensoriais e autonômicos. Estima-se que 30 a 60% dos pacientes terão dano neural no momento do diagnóstico (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2012). A hanseníase é caracterizada como uma doença

granulomatosa crônica curável, porém permanece como uma das principais causas de neuropatias em todo o mundo (BREEN et al., 2015; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

Com base nas estatísticas anuais de hanseníase realizadas em 150 países de 6 regiões da OMS, em 2017 foram registrados 192.713 casos em tratamento, representando uma taxa de prevalência de 0,25 a cada 10.000 habitantes, um aumento de 20.713 casos em relação a 2016 (WHO, 2018). Durante esse mesmo período foram registrados e notificados cerca de 210.671 novos casos, contabilizando uma prevalência de 2,77 casos a cada 100.000 habitantes no mundo. A distribuição dos novos casos em 2017 foi bastante heterogênea, mas como mostrado na Figura 1, o Brasil, a Índia e a Indonésia continuaram sendo os países com o maior número de ocorrências notificadas. É importante ressaltar que vários pacientes já apresentavam grau elevado de incapacidade e até deformidades físicas no momento do diagnóstico. Este dado indica que o diagnóstico da hanseníase ainda é feito tardiamente, o que facilita a ocorrência de incapacidades e dificulta sua eliminação (WHO, 2018).

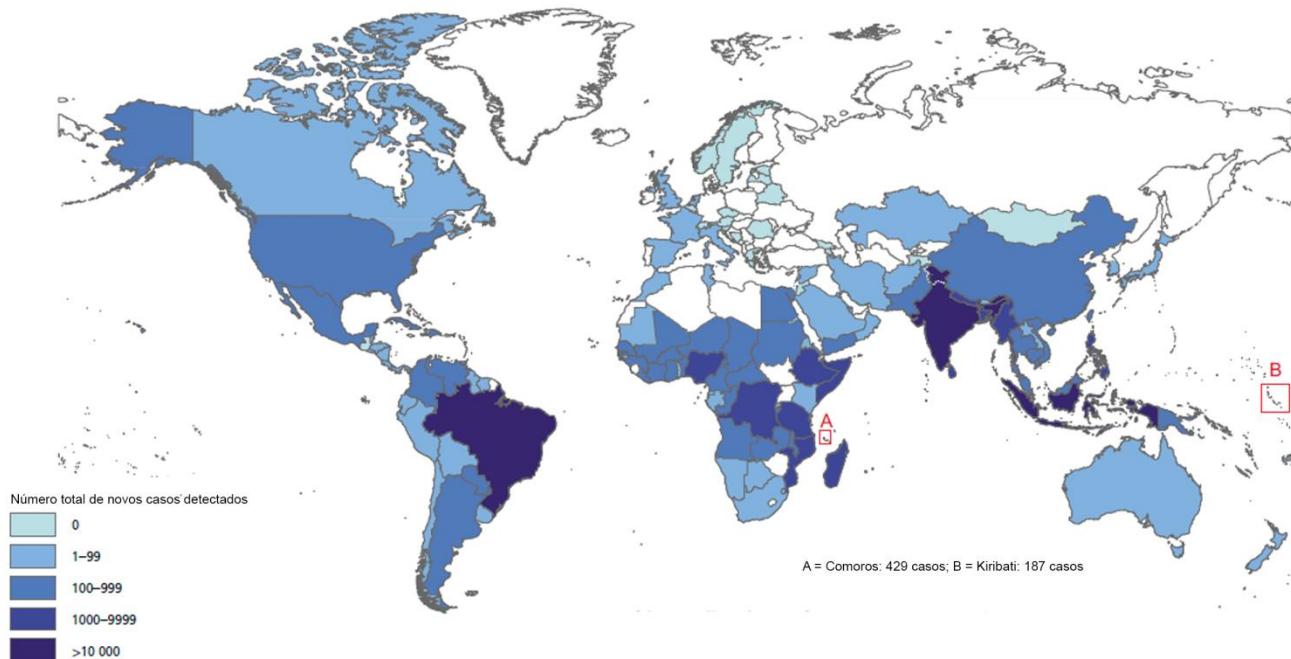


Figura 1: Mapa da distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase no ano de 2017. Fonte: Adaptado de WHO, 2018.

Globalmente, do número total de casos da doença registrados em 2017, 82.922 (39,3%) eram

mulheres. Em relação aos novos casos detectados em crianças, das 16.979 diagnosticadas 39% eram multibacilar (MB) e 61% paucibacilar (PB); além disso, foram reportados 238 novos casos de crianças com grau 2 de incapacidade física decorrente da hanseníase, e 5% dos casos globais de pacientes MB detectados consistiam em menores de 15 anos (WHO, 2018).

No Brasil, o cenário não é diferente de outros países endêmicos. Apesar de uma redução global no número de novos casos detectados comparados com 2016, foi observado um aumento dos casos em 7 países, dentre eles o Brasil (WHO, 2018). Em 2017, o número de novos casos de hanseníase no Brasil foi de 26.875, representando uma taxa de incidência de 12,94 por 100.000 habitantes. Dos 28.067 casos da doença registrados em 2017, 44,6% eram mulheres, 73,8% apresentavam a forma MB e 8,3% dos pacientes apresentavam grau 2 de incapacidade física decorrente da hanseníase.

Como pode ser observado no mapa da Figura 2, a hanseníase possui distribuição heterogênea no Brasil. Enquanto alguns estados já atingiram a meta de baixa endemicidade e até a eliminação, como é o caso do Rio Grande do Sul, outros apresentam hiper endemicidade, especialmente aqueles das regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

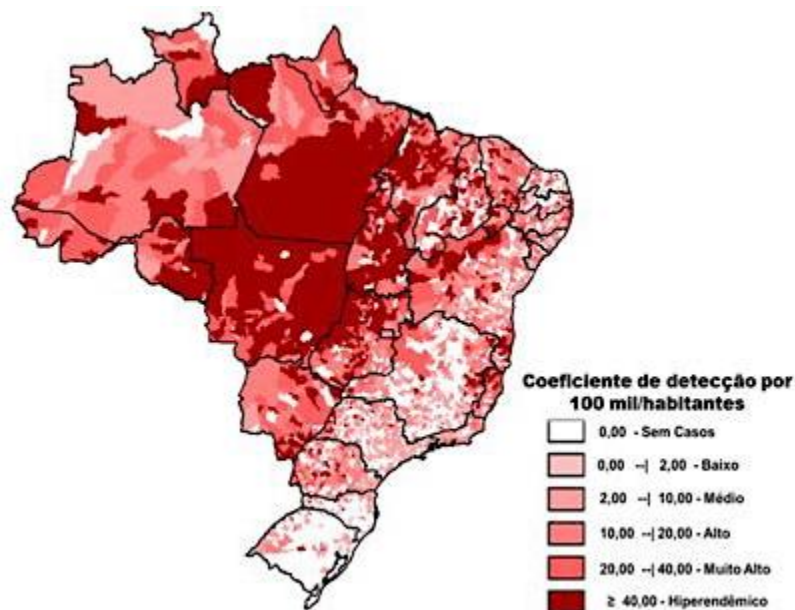


Figura 2: Coeficiente de detecção de hanseníase no Brasil em 2015. Fonte: (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Nos últimos 50 anos a prevalência da hanseníase caiu substancialmente, porém a deficiência do diagnóstico precoce, e conseqüentemente a falta do tratamento imediato para evitar as incapacidades físicas e a redução da transmissão na comunidade continua fazendo com que a doença permaneça como um grande problema de saúde pública. Frente a estes desafios foi elaborada a chamada “Estratégia global para a hanseníase 2016-2020”, que visa realizar ações rumo a um mundo sem hanseníase, que está assentada em três pilares: 1 - fortalecer o controle, a coordenação e a parceria do governo; 2 - combater a hanseníase e suas complicações; e 3 - combater a discriminação e promover a inclusão (WHO, 2016).

Outra questão não menos importante, é a compreensão do modo de transmissão da doença, na qual muitos resultados sugeriram que o *M. leprae* seja propagado principalmente pelas vias aéreas de pacientes multibacilares sem tratamento (SCOLLARD et al., 2006). Estudos anteriores demonstraram que o gene *mce1a* é encontrado no genoma do *M. leprae* e que seu produto está associado à entrada do bacilo nas células epiteliais respiratórias (SATO et al., 2007). A hipótese de transmissão respiratória é ainda validada por estudos que demonstraram que adesinas presentes na superfície do *M. leprae*, podem se ligar em células epiteliais alveolares e nasais e ambos os tipos celulares são capazes de sustentar a sobrevivência bacteriana (DE LIMA et al., 2009; SILVA et al., 2013). MORGADO DE ABREU e colaboradores (2014) observaram a presença do *M. leprae* na mucosa oral de pacientes com hanseníase (PB e MB) a partir da observação de seu antígeno (PGL-1) pela técnica de imunohistoquímica e a expressão do gene presente no genoma do bacilo (*MntH*) por PCR, sugerindo que a mucosa é uma importante fonte do *M. leprae*, favorecendo sua transmissão.

1.2.2 Formas clínicas

A resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo determina a evolução clínica na hanseníase. O sistema de Ridley & Jopling de 1966, adota subgrupos dentro de um espectro, que obedece, critérios clínicos e bacteriológicos, assim como aspectos imunológicos e histopatológicos da doença. Como

mostrado na Figura 3, siglas são utilizadas para indicar as duas formas polares tuberculoide-tuberculoide (TT), que apresentam poucas lesões, raros bacilos detectáveis e intensa resposta imune celular, e lepromatoso-lepromatoso (LL), onde a doença é difusa, com intensa multiplicação bacilar e ativação da imunidade humoral em detrimento da resposta celular. Os indivíduos que apresentam respostas intermediárias entre esses dois polos desenvolvem formas classificadas como *borderline*, que é dividida em três subgrupos: *borderline-tuberculoide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatoso* (BL), que se caracterizam por aspectos clínicos e imunológicos também intermediários de acordo com sua proximidade a cada polo do espectro. Os indivíduos que não se encaixam nesses perfis, ou seja, que apresentam uma resposta insuficientemente diferenciada para permitir sua classificação são denominados de indeterminados, e podem ao longo da doença evoluir para qualquer uma das formas mencionadas anteriormente ou até evoluir para cura espontânea (RIDLEY, 1966).

Tendo em vista que essas classificações exigem um conhecimento mais aprofundado sobre a doença e que em muitos locais o programa de controle da hanseníase não conta com especialistas, a OMS introduziu uma classificação simplificada para orientar as decisões de tratamento. Atualmente, esta classificação tem como base os critérios clínicos utilizando o número de lesões cutâneas e quando disponível o índice baciloscópico de raspado intradérmico. Na presença de até cinco lesões cutâneas com baciloscopia de raspado intradérmico negativo o paciente é classificado como PB, porém, se apresentar seis ou mais lesões de pele e baciloscopia de raspado intradérmico positiva será classificado como MB (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Além das diferentes formas clínicas, existe a forma em que o comprometimento neurológico antecede o comprometimento dermatológico, conhecido como hanseníase forma Neural Pura (HNP) (OOI; SRINIVASAN, 2004; WALKER; LOCKWOOD, 2007). É válido ressaltar que a invasão dos nervos pelo *M. leprae* e sua destruição são aspectos da hanseníase presentes em todos os estágios e em todas as formas clínicas da doença (SCOLLARD et al., 2006).

A clínica do paciente pode ser agravada por episódios inflamatórios agudos da resposta imunológica, denominados estados reacionais. Em torno de 30 a 40% dos pacientes com hanseníase sofre com as consequências dessa inflamação exacerbada, que representa a principal causa de lesão nervosa irreversível e deformidades antes, durante e até anos após o tratamento. Tais episódios são classificados como reação tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH), conforme as características clínicas e imunológicas das reações (POLYCARPOU; WALKER; LOCKWOOD, 2017; RAFFE et al., 2013; SCOLLARD et al., 1994).

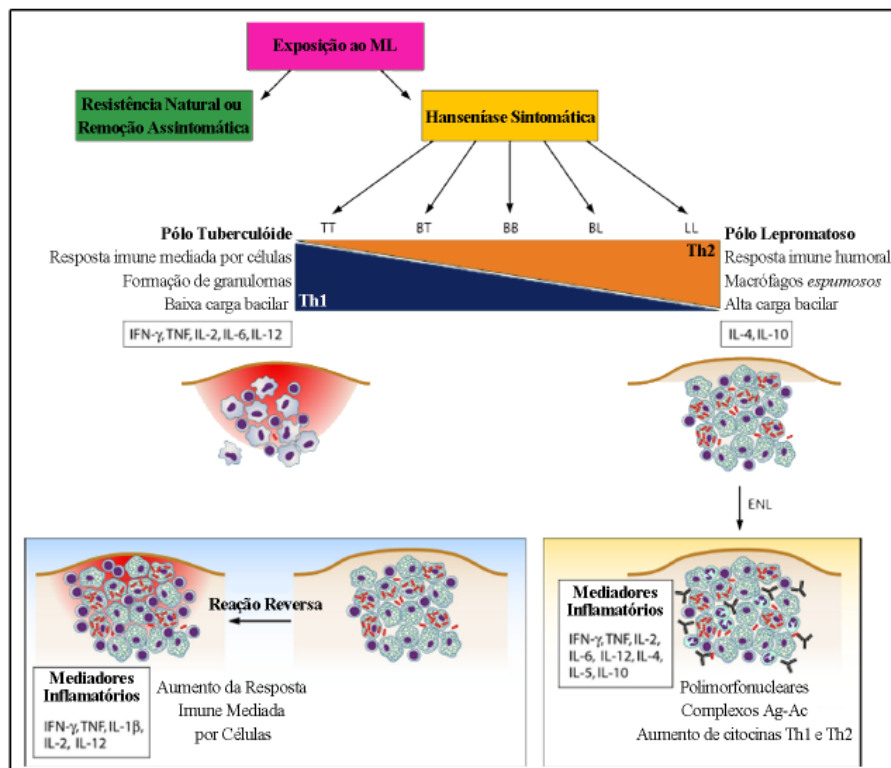


Figura 3: Espectro de formas clínicas da hanseníase segundo Ridley & Jopling. A classificação de Ridley & Jopling divide a hanseníase em um amplo espectro clínico que abrange dois polos opostos e suas formas intermediárias. O polo TT engloba indivíduos capazes de controlar a proliferação e disseminação do bacilo, através de uma eficiente resposta mediada por células. Já os indivíduos do polo LL, por exibir uma resposta essencialmente humoral, com um perfil T-helper 2 (Th2 do inglês *T helper 2*), não conseguem eliminar nem controlar o bacilo. As formas *borderline* são distribuídas ao longo do espectro de acordo com as semelhanças aos dois polos, entretanto a instabilidade imunológica característica desses pacientes pode levar a evolução para outras formas do espectro. Os quadros reacionais descritos por esse sistema são a reação reversa e o eritema nodoso hansênico, que são resultantes de alterações abruptas da resposta imune frente ao *M. leprae*. Fonte: Adaptado de MISCH et al., 2010.

1.2.3 O agente etiológico

Descoberto em 1873, por Armauer Hansen em amostras de biópsias de pele, o *M. leprae* foi o primeiro agente etiológico de uma doença humana a ser identificado (COUTO DAL SECCO et al., 2017). O *M. leprae*, é um bacilo gram-positivo, reto ou ligeiramente encurvado, álcool-ácido resistente por corar-se em vermelho pela fucsina e não se descorar pela lavagem com álcool-ácido (BAAR) (Figura 4). O longo período de incubação da doença está relacionado ao fato de o bacilo possuir um crescimento lento, fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias. Este microrganismo é um patógeno intracelular obrigatório que prefere uma temperatura de crescimento frio, influenciando a localização de lesões clínicas em áreas mais frias do corpo (SCOLLARD et al., 2006).

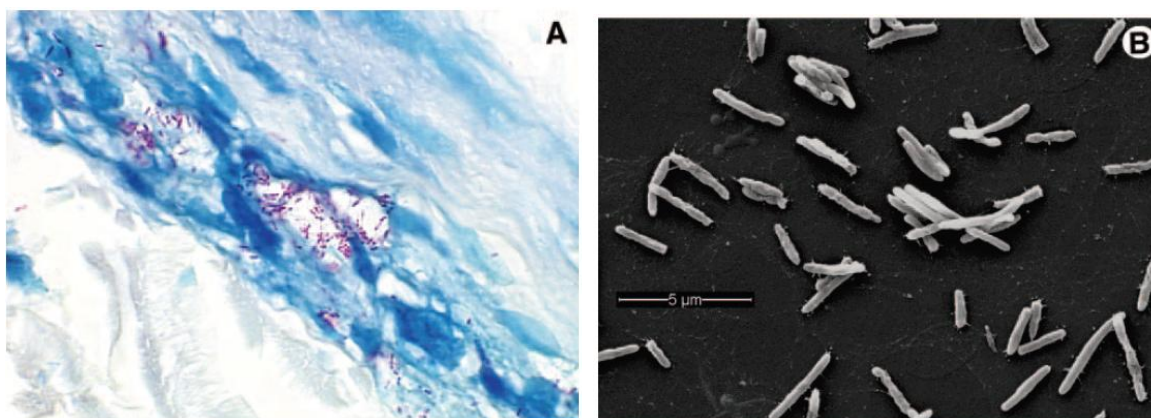


Figura 4: Morfologia do *M. leprae*. A. Bacilos em vermelho no formato de bastonetes corados com o método de Fite-Faraco, dentro de um nervo humano corado com azul de metileno. Ampliado 800X. B. Microscopia eletrônica de varredura de *M. leprae* derivado da pata de camundongo *nude*. Fonte: Adaptado de SCOLLARD et al., 2006

O *M. leprae* compartilha com outras micobactérias características como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em seu envelope celular. Além disso, mais externamente, estão localizados glicolipídeos, como o PGL-1 (glicolipídeo fenólico-1 do inglês *Phenolic Glycolipid*), encontrado exclusivamente no *M. leprae*. Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico, como pode ser observado na Figura 5 (HUNTER; BRENNAN, 1981). Já foi demonstrado que o PGL-1 pode ser

encontrado em tecidos, no sangue circulante e na urina de doentes multibacilares. Além disso, ele também foi detectado em tatus *Dasypus novemcinctus* infectados com o *M. leprae*. O PGL-1 pode estar relacionado aos acometimentos neuronais observados na doença. Estudos mostram que o PGL-1 está envolvido na interação do bacilo com a laminina da parede de CS, indicando um possível papel na interação do bacilo com o nervo periférico (NG et al., 2000). Em estudo publicado recentemente, foi demonstrado que o excesso da produção de óxido nítrico por macrófagos, em resposta ao PGL-1, pode danificar as mitocôndrias axonais e iniciar o processo de desmielinização (MADIGAN et al., 2017). Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que o PGL-1 da bactéria viável induz a expressão do receptor de manose (CD206) via receptor nuclear ativado por proliferadores de peroxissomos (PPAR- γ), e que o “*crosstalk*” entre estes receptores é responsável pela formação de corpúsculos lipídicos no fagossoma que a bactéria está contida, favorecendo a sobrevivência intracelular do bacilo nas CS e possivelmente contribuindo para a neuroinflamação (DÍAZ ACOSTA et al., 2018). Esta relação entre formação de corpúsculos lipídicos pela presença do *M. leprae* e sobrevivência do bacilo vêm sendo bastante discutido na literatura (JIN; AN; LEE, 2017; MATTOS et al., 2011, 2014).

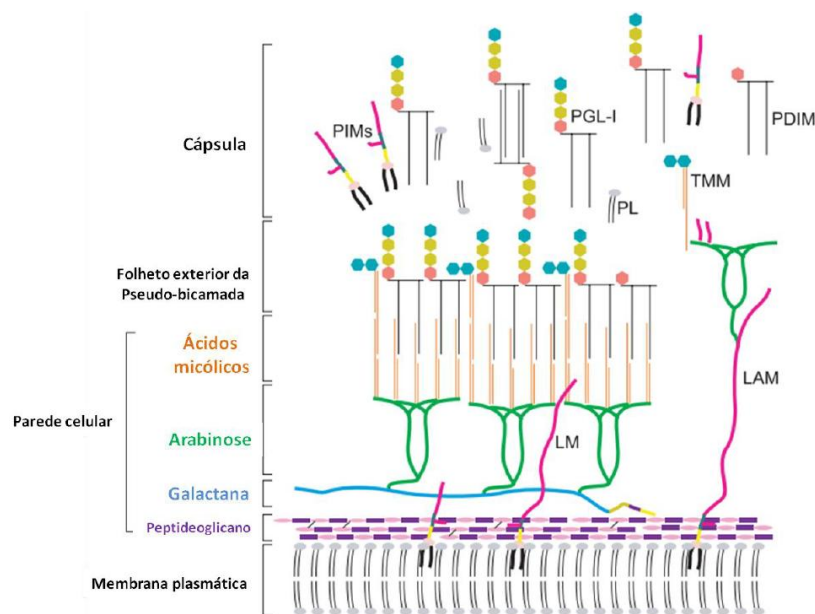


Figura 5: Modelo esquemático do envelope celular do *M. leprae*. A membrana plasmática é envolvida pela camada da parede celular formada de peptidoglicanos ligados covalentemente a galactanos por uma ponte de arabinogalactanos (AG). Ligados à camada de galactano estão moléculas de arabinano, aos quais ácidos micólicos estão acoplados, formando a porção interna de uma bicamada pseudolipídica. A porção externa dessa bicamada é constituída por monomicilatos de trealose, ácidos micocerosáticos de dimicocerosatos de fitiocerol (PDIMs do inglês *Phthiocerol Dimycocerosates*) e glicolípideos fenólicos (PGLs). A cápsula provavelmente composta de PGLs e PDIMs envolve a bactéria. O lipomano (LM) e lipoarabinomano (LAM) são observados tanto ancorados a membrana plasmática quanto na constituição da cápsula. Fonte: Adaptado de SCOLLARD et al., 2006.

O *M. leprae* não é uma bactéria cultivável em meio de cultura artificial, mas pode ser mantido em culturas axênicas por apenas algumas semanas, o que resulta na dificuldade de estabelecer estudos que elucidariam vários aspectos da patogenia causada por este microrganismo (TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001). A temperatura é um importante fator para a sobrevivência do bacilo nas células hospedeira. Em macrófagos humanos, o *M. leprae* mantém a sua viabilidade quando cultivadas a 35°C durante 4 semanas. No entanto, a viabilidade do *M. leprae* é praticamente perdida em duas semanas, quando este é cultivado a 37°C (FUKUTOMI et al., 2009). Desta forma, o cultivo do *M. leprae* é feito *in vivo* e está restrito a alguns modelos animais, incluindo o tatu e camundongos (TRUMAN, 2005), o que limita a quantidade de informações disponíveis sobre esse bacilo, quando comparado às outras micobactérias. Com exceção de tatus, camundongo e alguns primatas, os seres

humanos eram os únicos reservatórios de infecção do *M. leprae* (SPIERINGS et al., 2000). Recentemente descobriu-se que esquilos vermelhos da espécie *Sciurus vulgaris* são considerados reservatórios do *M. leprae* nas Ilhas Britânicas (AVANZI et al., 2016). Na impossibilidade de estudar a interação de *M. leprae in vivo* com células humanas, ensaios com outras micobactérias patogênicas têm sido amplamente utilizadas para analisar alguns aspectos da infecção por micobactérias.

A rota de entrada do *M. leprae* e sua migração até o nervo periférico, bem como os mecanismos envolvidos na invasão das CS por tal organismo continuam pouco esclarecidos. Sabe-se, contudo, que esta invasão leva ao desenvolvimento da neuropatia periférica típica observada na hanseníase que resulta em dano nas CS, desmielinização e degeneração axonal, que correspondem a uma série de eventos que levam frequentemente, a deformidades. A prevenção e reparação estão entre os principais desafios da doença, sua detecção precoce e intervenções imediatas podem minimizar as incapacidades, responsáveis pelo estigma e elevada morbidade na hanseníase.

1.3 O Sistema Nervoso Periférico e as Células de Schwann

O SNP é constituído por gânglios e nervos, com a função de conectar o sistema nervoso central (SNC) às demais partes do corpo humano. Aglomerados de corpos celulares de neurônios sensitivos formam os gânglios nervosos, enquanto que os nervos consistem de feixes dispostos paralelamente e classificados como sensitivos, motores e mistos (GRANT; GOODKIN; KLIOT, 1999). O SNP é formado pelo SNP motor (SNPM) ou somático e SNP autônomo (SNPA) ou visceral. As fibras nervosas motoras do SNPM conduzem impulsos do SNC aos músculos estriados esqueléticos, com a função de controlar estímulos provenientes do ambiente externo. Os gânglios das quais partem as fibras do SNPM localizam-se no encéfalo ou na medula e seguem em direção aos órgãos-alvo (CHANG et al., 2015).

Os nervos sensitivos são aqueles que possuem fibras aferentes, que conduzem informações obtidas do meio externo e do interior do organismo para o SNC; e nervos motores, aqueles que possuem fibras

eferentes, que levam impulsos produzidos no SNC para órgãos efetores. Existem ainda nervos mistos, que possuem fibras de dois tipos e representam a maioria dos nervos periféricos adultos, compostos por fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas (ORDOVAS-MONTANES et al., 2015; SALZER, 2012).

A Figura 6 mostra a arquitetura de um nervo mielinizado no qual, cada fibra nervosa é composta por axônios envolvidos por CS. As CS mielinizantes e não mielinizantes são divididas de acordo com o padrão de interação com os axônios. Enquanto a fibra nervosa mielinizada é composta de um único axônio encapsulado por CS, a fibra não mielinizante possui múltiplos axônios envolvidos por uma única célula de Schwann (NAMGUNG, 2014). Cada fibra nervosa é circundada por uma lâmina basal que forma o endoneuro, uma delicada camada de tecido conjuntivo frouxo, além de outros tipos celulares, como fibroblastos e pericitos. O agrupamento de fibras nervosas, denominado feixe ou fascículo, é revestido pelo perineuro, um invólucro mecanicamente resistente, também constituído por fibras colágenas e vasos sanguíneos. Mais externamente, recobrendo grupos de feixes nervosos, encontra-se o epineuro, composto por tecido conjuntivo denso, tecido adiposo e vasos sanguíneos (ZISKIND-CONHAIM, 1988).

A estrutura de nervos mielinizados ou não, depende da relação axônio-glia estabelecida, desse modo, as CS destinadas a mielinizar envolvem axônios individuais e produzem uma bainha de mielina compacta, promovendo a rápida condução do estímulo nervoso (JESSEN; MIRSKY, 2005). As CS não mielinizantes, por sua vez, envolvem múltiplos axônios de pequeno diâmetro, formando os chamados feixes Remak (QUINTES et al., 2010; TAVEGGIA et al., 2005).

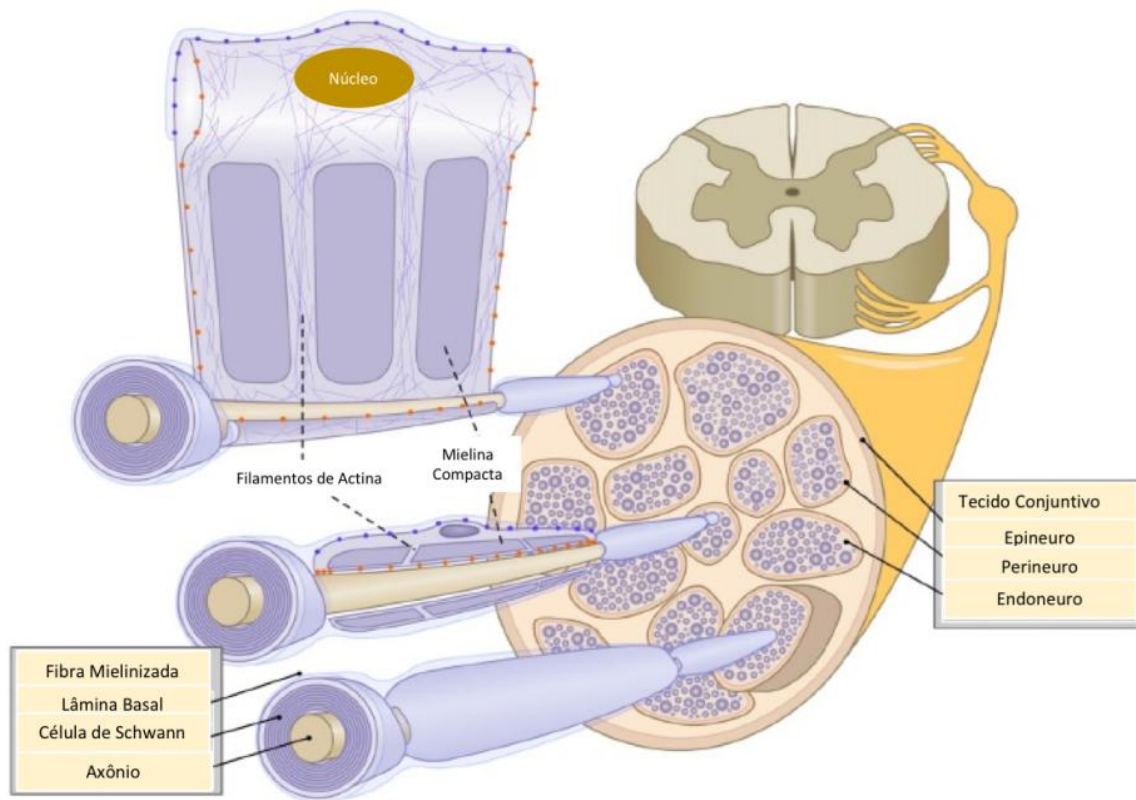


Figura 6: Arquitetura das fibras mielinizadas no SNP. Fonte: Adaptado de BELIN; ZULOAGA; POITELON, 2017.

Em vertebrados, a glia compreende principalmente quatro tipos de células: os astrócitos, os oligodendrócitos e a microglia no SNC; e as CS no SNP, cujas funções principais são de fornecer suporte, proteção e nutrição aos neurônios e facilitar a condução dos impulsos nervosos, também estando envolvidas em outros eventos importantes, como na migração dos neurônios durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (DOETSCH, 2003). O desenvolvimento da linhagem glial no SNP abrange uma rica sequência de eventos moleculares e celulares, na qual células-tronco da crista neural se diferenciam em CS precursoras, seguidas de células imaturas que, por fim, geram CS mielinizantes e não mielinizantes (LIU et al., 2015). A diferenciação terminal das CS é regulada por sua relação com axônios de calibres diferentes. Axônios de diâmetros maiores expressam fatores de crescimento que promovem a diferenciação mielinizante, ao passo que axônios de pequeno diâmetro apresentam níveis mais baixos desses fatores, levando à diferenciação em CS não mielinizantes (JESSEN; MIRSKY, 2008).

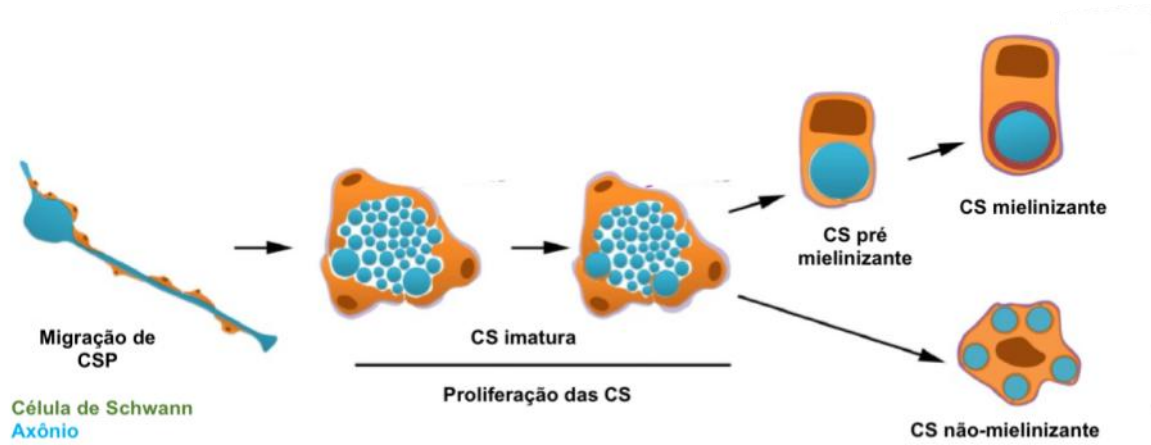


Figura 7: Principais estágios do desenvolvimento da Célula de Schwann originadas da crista neural. O desenho descreve o desenvolvimento das CS. CS estão mostradas em laranja e os axônios de azul. Da esquerda, as CS Precursoras (CSP) proliferam e migram com axônios em crescimento. CSP tornam-se CS imaturas ainda associadas a muitos axônios. CS imaturas deixam de migrar, mas permanecem proliferativas, porém agora com a formação de uma lâmina basal imatura ao redor (lilás). CS começam a se enrolar no entorno dos axônios. As CS pré-mielinizantes formam seus processos citoplasmáticos envolta de um segmento axonal. CS mielinizantes enrolam sua membrana inúmeras vezes ao redor de um segmento axonal para formar a bainha de mielina. CS não-mielinizantes, formam as chamadas CS Remak, onde uma única CS comporta vários axônios de pequeno calibre. Fonte: Adaptado de MONK; FELTRI; TAVEGGIA, 2015.

Essas camadas de mielina secretadas pelas CS envolvem seus respectivos axônios em um arranjo espiral e segmentado ao longo da fibra nervosa, formando assim uma bainha isolante descontínua. Entre os segmentos de mielina, localizam-se os nódulos de Ranvier, região onde há uma alta densidade de canais de sódio voltagem-dependentes que produzem potenciais conduzidos pelo modo saltatório ao longo do axônio por entre os nódulos (MASAKI, 2012).

A obtenção de CS primárias é uma grande dificuldade que existe no estudo da hanseníase. Essas células podem ser obtidas de animais de laboratório, de nervo ciático de ratos, isoladas de humanos ou podem ser imortalizadas. As células derivadas de schwannoma humano, em particular da linhagem ST88-14, vêm sendo usada como modelo do sistema celular primário por vários trabalhos realizados no laboratório de hanseníase (IOC/FIOCRUZ) (ANDRADE et al., 2016; MEDEIROS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2010, 2005; PETITO et al., 2013; TELES et al., 2007).

1.3.1 Células de Schwann no contexto da inflamação

Como discutido anteriormente, o acometimento neural é um dos marcos da hanseníase e a principal causa de morbidade entre os indivíduos afetados. As CS sofrem a ação de mediadores secretados pelas células inflamatórias presentes na lesão, que podem não apenas causar efeitos deletérios para a unidade CS-axônio, mas também determinar o perfil da contribuição desse tipo celular para o dano neurológico.

No contexto da lesão neurológica, as CS apresentam funções imunes importantes em resposta à lesão e aumenta a inflamação, os mediadores por elas liberados tanto contribuem com as lesões nervosas, como medeiam o reparo e a regeneração dos tecidos. Desta forma, a secreção de moléculas de componentes da matriz extracelular (MEC) e fatores neurotróficos (BDNF, FGF, TGF- β , PDGF, GDNF) ajudam na regeneração do axônio lesionado (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011; GRIFFIN; THOMPSON, 2008). A restrição da atividade de genes relacionados ao perfil mielinizante, dos importantes fatores neurotróficos citados e proteínas de superfície celular limitam o potencial regenerativo do SNP (ARTHUR-FARRAJ et al., 2012; PAINTER et al., 2014).

Essas células expressam em sua superfície muitos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs do inglês *Pattern Recognition Receptors*), assim como RAGE, CD206, receptores de lectina tipo C, e constitutivamente receptores do tipo Toll (TRL-3, TRL-4 e TRL-7) (GOETHALS et al., 2010). Como revisado por J.W. Neal & P. Gasque (2016) em resposta à lesão, as CS podem expressar TRL-1 e TRL-2 e sofrer alterações morfológicas, onde elas passam a liberar citocinas e quimiocinas como: IL-1 β , Fator de Necrose Tumoral (TNF do inglês *Tumor Necrosis Factor*), IL-6, fator inibidor de leucemia (LIF do inglês *Leukemia Inhibitory Factor*), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1 do inglês *Monocyte chemoattractant protein-1*) e óxido nítrico. As duas primeiras citocinas, IL-1 β e TNF, são necessárias para o reparo funcional do nervo. As CS também podem secretar IL-10, uma citocina anti-inflamatória, que pela sua liberação, regula a resposta inflamatória e atrai outras células

imunes para o local da lesão. Este mecanismo auxilia na remielinização e no reparo da lesão do SNP (GOLDSTEIN et al., 2016; SIQUEIRA MIETTO et al., 2015).

A ligação do TNF na CS pode alterar seu fenótipo levando à produção de diversas moléculas, como as proteases, e também pode alterar funções normais da célula, induzindo a morte celular e a degradação da mielina. Esta citocina pode contribuir para o desenvolvimento de neuropatias periféricas pela indução da lesão neural e participando do reparo tecidual (ANDRADE et al., 2016; LINDENLAUB; SOMMER, 2003). O TGF- β (fator transformante do crescimento β), apesar de apresentar um papel fundamental na proliferação e diferenciação de CS, e de estar diretamente envolvido nos efeitos neurotróficos, também contribui in vitro em combinação ao TNF para a morte das CS (OLIVEIRA et al., 2005). Em contrapartida, outro importante fator neurotrófico denominado fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF do inglês Platelet-Derived Growth Factor), tem participação no desenvolvimento de células precursoras da glia, como oligodendrócitos e CS imaturas, assim como na promoção do reparo tecidual e mielinização em modelo de injúria de medula espinal de camundongos e ratos. Semelhante ao TGF- β , o PDGF também é de suma importância para sobrevivência, proliferação e migração destas células tanto in vivo como em modelos de regeneração in vitro (COHEN; MCKAY; ALMAZAN, 1999; KIM et al., 2017; TANG et al., 2014; YAO et al., 2017).

1.3.2 Interação do *M. leprae* com as CS

A neuropatia ocorre de maneira silenciosa e lentamente progressiva em pacientes com todas as formas da hanseníase, inclusive nos episódios reacionais (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015). Aparentemente, as CS oferecem um ambiente ideal para a preservação e proliferação do *M. leprae*. O entendimento da infecção do *M. leprae* nas CS representa um passo crucial para a melhor compreensão do dano no nervo na hanseníase (NEAL; GASQUE, 2016). Sabe-se que o *M. leprae* possui a capacidade única de infectar os nervos periféricos, provavelmente através do endotélio

vascular, por mecanismos ainda desconhecidos. Uma vez no endoneuro, o *M. leprae* se liga às CS por várias moléculas presentes na sua membrana (SCOLLARD et al., 2006).

Até o momento, a base para o tropismo do *M. leprae* é um processo pelo qual ocorre a ligação de um componente da parede do *M. leprae*, o PGL-1, com o complexo formado pelo receptor distroglicana- α e pelo domínio G da cadeia $\alpha 2$ de laminina-2 localizada na lâmina basal das CS (NG et al., 2000). Este patógeno também se liga ao ErbB2, um receptor da CS para neuregulina-1 que é um mediador crítico da interação CS-axônio (TAPINOS; OHNISHI; RAMBUKKANA, 2006). Apesar do pouco conhecimento sobre a infecção do *M. leprae* nas CS e que isso se dá pelas moléculas presentes em sua membrana, ainda são desconhecidos os mecanismos que levam os bacilos a penetrar no nervo periférico.

Atualmente, evidências em ensaios *in vitro* mostram uma nova interação do *M. leprae* e CS com base da reprogramação das células iniciada pela interação com o patógeno. Masaki et al. (2013) constataram que o *M. leprae* explora a plasticidade de CS adultas ao subverter seu programa de diferenciação. Os autores demonstraram que CS infectadas *in vitro*, sofrem reprogramação ao ponto de se converter em células semelhantes às da crista neural, denominadas células progenitoras *stem-like* (pSLC do inglês *progenitor/stem-like cells*), contribuindo com a disseminação sistêmica do bacilo e desencadeando um processo de reparo do nervo periférico. Apesar destes achados, os detalhes das vias de sinalização envolvidas com a reprogramação da célula hospedeira pelo patógeno, continuam a ser elucidados (MASAKI et al., 2013a).

CS mielinizantes e não-mielinizantes exibem respostas funcionais distintas à infecção pelo *M. leprae*, que preferencialmente invade as células não-mielinizantes. Nessas células maduras e quiescentes, o bacilo induz o reingresso no ciclo de divisão celular a fim de gerar maior disponibilidade de células-alvo (RAMBUKKANA et al., 2002; SCOLLARD et al., 2006). Aparentemente, a mielina compacta confere certa resistência ao *M. leprae*, além disso, nos estágios iniciais da infecção, o comprometimento da integridade celular, e subsequente desmielinização,

favorece a disseminação do patógeno (RAMBUKKANA, 2004). Assim, o uso de CS não mielinizantes como modelo *in vitro* de infecção é fisiologicamente relevante e pode revelar aspectos fundamentais da neuropatogênese da infecção pelo *M. leprae*.

Além de possuir funções no processo de mielinização do nervo, as CS possuem papel importante no reparo no nervo periférico. A proliferação celular está diretamente ligada a este processo, contribuindo diretamente para a reparação de danos axonais. A presença do *M. leprae* no nervo periférico causa inflamação na região e, conseqüente, proliferação das CS e fibroblastos na tentativa de reparar o tecido danificado (NOON; LLOYD, 2005). Outras células do sistema imune como, por exemplo, os macrófagos, são recrutados para o sítio da lesão, contribuindo para o processo inflamatório.

O dano neural é seguido do fenômeno denominado “degeneração Walleriana”, que consiste em uma série de respostas celulares direcionadas para a remoção e reciclagem de fragmentos oriundos da destruição celular, gerando assim, um ambiente permissivo ao início da regeneração axonal (GAUDET; POPOVICH; RAMER, 2011). Os macrófagos são recrutados para o local comprometido, e juntamente com as CS promovem a retirada dos *debris* celulares e, desta forma, enquanto a porção distal do axônio sofre degeneração, a região proximal inicia a sua recuperação (CHEN; PIAO; BONALDO, 2015).

1.4 Dano neural e a fibrose

A hanseníase é considerada um dos melhores modelos de neuropatia inflamatória, na qual tanto os sintomas motores, sensoriais e autonômicos são decorrentes da inflamação ou consequência do processo regenerativo, lesionando as respectivas fibras. No nervo periférico, o infiltrado inflamatório pode ser constituído por macrófagos espumosos também conhecidos como macrófagos virchowianos repletos de bacilos, plasmócitos e linfócitos ou por um granuloma epitelióide, circundado por halo linfocitário, com ocasional presença de necrose caseosa. Este infiltrado ocupa o endoneuro, perineuro e epineuro (ANTUNES et al., 2012). Isso levará ao comprometimento progressivo das fibras neurais mielinizadas e não mielinizadas, seguido por uma substituição do parênquima do nervo periférico por

tecido fibroso (Revisado por AGRAWAL et al., 2005).

A fibrose é um achado muito frequente no estágio final da neuropatia hanseniana, em contraste com muitas outras neuropatias inflamatórias que não transformam o nervo em um cordão fibroso como faz a neuropatia da hanseníase. A fibrose do nervo na hanseníase ocorre de forma branda, moderada ou mais intensa. Antunes e colaboradores 2012, ao analisar amostras de biópsias de nervos de pacientes com outras neuropatias não relacionadas com a hanseníase, não detectaram fibrose endoneural e perineural, embora houvesse um aumento de matriz extracelular em face da redução do número de fibras nervosas próprias dessas outras neuropatias; entretanto, a celularidade do endoneuro se mantinha preservada e não havia o aspecto hialinizado acelular encontrado na neuropatia hanseniana. A fibrose endoneural hanseniana prejudica a regeneração da fibra nervosa, o que explica a irreversibilidade do dano causado pela hanseníase ao nervo, mesmo após a infecção ter sido curada (TELES et al., 2007). A fibrose neural está normalmente associada à perda parcial ou total de fibras nervosas no decorrer da neuropatia hanseniana (ANTUNES et al., 2012). Esta regeneração da fibra decorre de uma complexa interação entre o axônio e a CS envolvendo numerosos fatores tróficos e modificações fenotípicas da CS. Apesar de muitos aspectos desta interação já serem conhecidos, os processos envolvidos na lesão neural no nervo adulto permanecem não totalmente esclarecidos.

Apesar de ter manifestações clínicas e etiológicas distintas, a maioria dos distúrbios fibróticos crônicos têm em comum um estímulo persistente que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas, que estimulam a deposição de elementos do tecido conjuntivo que remodelam e destroem progressivamente a arquitetura do tecido normal. Praticamente todas as situações fibróticas são caracterizadas por retração tecidual, deposição e remodelamento de MEC (TOMASEK et al., 2002; WYNN, 2007). Subsequente ao dano, o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão desencadeia a ativação dos fibroblastos e macrófagos residentes, de forma que estes fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, que são as

principais células presentes na cicatrização. A inflamação crônica desencadeia um acúmulo excessivo de componentes da MEC, que desta forma irão contribuir para uma fibrose permanente. O desbalanço entre a síntese de MEC e a sua degradação pelas metaloproteinases de matriz (MMPs do inglês *Matrix Metalloproteinases*) e inibição pelos respectivos inibidores de metaloproteinases (TIMPs do inglês *Metalloproteinase Inhibitor*), ou seja, quando a taxa de síntese sobrepõe a sua inibição, ocorre fibrose (WYNN, 2007).

Vários trabalhos na literatura vêm confirmando a importância dos miofibroblastos no processo de reparo tecidual anormal e na patogênese de algumas doenças crônicas fibrosantes (AMADEU et al., 2003; COELHO et al., 2018; SARRAZY et al., 2011). Por outro lado, estudos demonstraram a capacidade de transdiferenciação das CS em miofibroblastos sob o estímulo do TGF- β 1 (PETITO et al., 2013; REAL et al., 2005), permitindo hipotetizarmos que este processo possa estar envolvido na evolução da lesão neural observada em indivíduos com hanseníase. Outros trabalhos já demonstraram *in vitro* que as CS da linhagem ST88-14 em cultura aumentam a expressão de TGF- β 1 e de seus receptores quando estimuladas pelo *M. leprae* (OLIVEIRA et al., 2005). Interessantemente, o TGF- β 1 também estimula as CS ST88-14 a expressarem alfa actina de músculo liso (α SMA do inglês *α - Smooth Muscle Actin*) e a aumentar a secreção de componentes da MEC (colágeno I e fibronectina) pelas CS da linhagem ST88-14 (PETITO et al., 2013).

Muitos estudos têm sugerido que o aumento crônico dos níveis de angiotensina II, endotelina-1, TGF- β , fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF/CCN2 do inglês *Connective Tissue Growth Factor*) e o PDGF são, provavelmente, fatores importantes para que ocorra o processo de fibrose, pois coletivamente estes mediadores resultam na ativação de células mesenquimais do tecido conjuntivo (LEASK, 2015). Depois do TGF β -1, o PDGF tem sido considerado o segundo mediador mais importante envolvido na fibrogênese de doenças, tal como a fibrose hepática, bem como na ativação e diferenciação de células estreladas do fígado (BORKHAM-KAMPHORST et al., 2007).

1.5 Fator de crescimento derivado de plaquetas

1.5.1 Ligantes, seus receptores e sinalização celular

O PDGF e seus receptores (PDGFRs) representam uma das famílias mais intensamente estudadas de fatores de sinalização nas últimas quatro décadas. Eles constituem uma família com quatro cadeias polipeptídicas diferentes codificadas por quatro produtos gênicos (PDGFA, PDGFB, PDGFC e PDGFD), localizados nos cromossomos 7, 22, 4 e 11 em humanos, e nos cromossomos 5, 15, 3 e 9 em camundongos, respectivamente. As isoformas PDGF-A e PDGF-B formam tanto heterodímeros quanto homodímeros, resultando na isoforma PDGF-AB. Enquanto as isoformas PDGF-C e PDGF-D existem apenas como homodímeros. Estes ligantes atuam por meio de dois receptores do tipo transmembrana, o PDGFR- α e o PDGFR- β , que pertencem à classe dos receptores tirosina quinase; estes são codificados pelos genes PDGFRA e PDGFRB e estão localizados nos cromossomos 4 e 5 em humanos e 5 e 18 em camundongos (FREDRIKSSON; LI; ERIKSSON, 2004; KANAAN; STRANGE, 2017; KAZLAUSKAS, 2017).

Para que as isoformas se tornem biologicamente ativas se faz necessário um processamento, que pode ser extra ou intracelular, visto que todos os PDGFs são produzidos e secretados por suas respectivas células. Alguns deles são secretados em sua forma latente assim, tornam-se ativos somente após serem processados por proteases como plasminogênio tecidual, ativador de plasminogênio uroquinase, plasmina e matriptase. Este processamento proteolítico necessário é extracelular para as isoformas PDGF-C e PDGF-D, enquanto que nas isoformas PDGF-A, PDGF-B e PDGF-AB esta etapa ocorre intracelularmente antes da secreção. Após o processamento, as isoformas agora biologicamente ativas, são denominadas PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD (FREDRIKSSON; LI; ERIKSSON, 2004; LEWANDOWSKI et al., 2016).

A sinalização de PDGF é iniciada pela ligação de suas isoformas pelo lado extracelular do

receptor, este contém 5 domínios semelhantes a imunoglobulinas, dos quais o domínio 2-3 está envolvido na ligação ao PDGF. A interação PDGF/PDGFR leva a indução da dimerização do PDGFR e a autofosforilação dos resíduos de tirosina no seu domínio intracelular. Assim, a exposição ao ligante dimeriza os PDGFRs, que *a priori* são monoméricos, gerando PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$ e PDGFR- $\alpha\beta$ (CHEN; UNGER; HE, 2015; HYE-RYONG SHIM et al., 2010). Os ligantes ligam-se a esses pares de receptores com diferentes afinidades como podemos observar na Figura 8. O PDGF-AA e o PDGF-CC ligam-se com alta afinidade ao PDGFR- $\alpha\alpha$ *in vitro* e *in vivo*. O PDGF-BB apresenta afinidade a todos os três dímeros de PDGFR *in vitro* e sinaliza através de PDGFR- $\beta\beta$ *in vivo*. PDGF-AB liga-se a PDGFR- $\alpha\alpha$ e PDGFR- $\alpha\beta$ *in vitro*. O PDGF-DD mostra afinidade ao PDGFR- $\beta\beta$ *in vitro*. O PDGF-CC e -DD ativam o heterodímero PDGFR- $\alpha\beta$ *in vitro*. A afinidade de ligação *in vivo* para os diferentes PDGFRs é desconhecida para PDGF-DD e -AB (KANAN; STRANGE, 2017). Ambos receptores são estruturalmente similares e ativam vias de transdução de sinal sobrepostas, incluindo fosfatidilinositol-3-quinase, Ras-MAPK, família Src de 42 quinases e fosfolipase C γ 0020 (TROJANOWSKA, 2009). Estas vias podem afetar várias funções celulares, incluindo crescimento, proliferação e diferenciação celular.

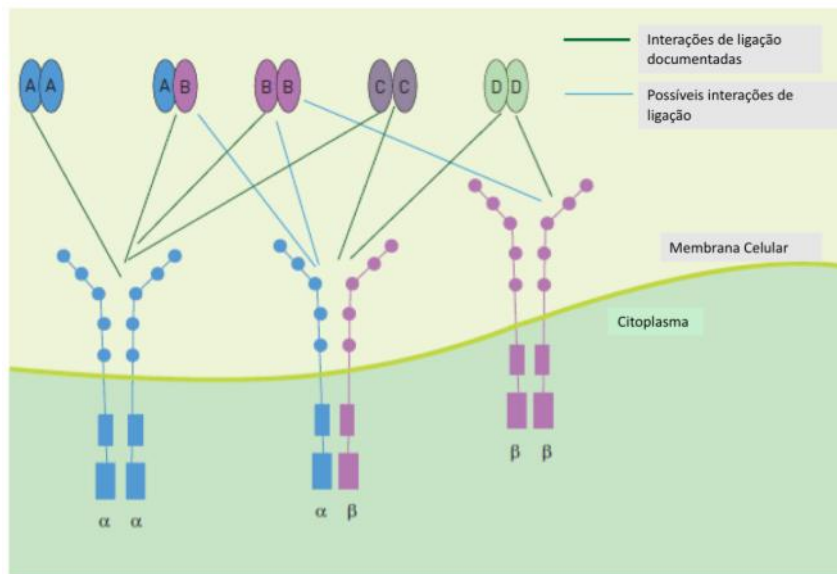


Figura 8: Receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRs) e seu padrão de ligação às isoformas. Os PDGFRs são proteínas transmembranares. O domínio extracelular consiste em cinco domínios do tipo imunoglobulina; a ligação ocorre nos domínios 2 e 3. O domínio intracelular é tirosina quinase. Existem três formas diméricas de PDGFRs ($-\alpha\alpha$, $-\beta\beta$ e $-\alpha\beta$). Sabe-se que cinco isoformas de isoformas diferentes se ligam aos PDGFRs (AA, AB, BB, CC e DD). Fonte: Adaptado de KANAAN; STRANGE, 2017.

1.5.2 Papel do PDGF na cicatrização e fibrose

O PDGF, um potente mitógeno e quimioatraente para células de origem mesenquimal, tem sido demonstrado em lesões fibróticas de vários órgãos (KLINKHAMMER; FLOEGE; BOOR, 2017; TROJANOWSKA, 2009). Todas as isoformas dos ligantes e de seus receptores apresentam um importante papel na patogênese da fibrose tanto em modelo murino quanto em humanos, sendo o papel do PDGF-A e PDGF-B bem mais caracterizado e estabelecido do que o PDGF-C e PDGF-D, que foram descobertos mais recentemente (CHAABANE et al., 2014).

No contexto da fibrose, o PDGF vem sendo descrito por diversos autores pela sua função em estimular a proliferação e ativação de determinados tipos celulares como as células estreladas do fígado (HSC inglês *Hepatic Stellate Cells*), células estreladas pancreáticas, pericitos, fibroblastos e miofibroblastos, e por estimular a produção de colágeno, fibronectina e outros componentes da MEC,

tanto por via autócrina quanto parácrina. Os efeitos do PDGF e seus receptores no desenvolvimento da fibrose em uma variedade de desordens, como fibrose pulmonar, renal, hepática, cardíaca, escleroderma, mielofibrose, entre outras, vêm sendo amplamente demonstrado por estudos *in vitro* e *in vivo* em modelos animais (revisado por BONNER, 2004; KLINKHAMMER; FLOEGE; BOOR, 2017).

Uma das situações patológicas modelo mais bem descrita em relação ao papel do PDGF na fibrose é a fibrose hepática (YING et al., 2017). O PDGF é o principal fator envolvido na diferenciação, ativação, proliferação e migração das HSC, além de promover a produção e deposição de colágeno e a transdiferenciação destas células em miofibroblastos. (KOCABAYOGLU et al., 2015). O “*crosstalk*” entre PDGF e TGF β -1, também tem sido descrito como influenciador da fibrose hepática (KOCABAYOGLU et al., 2015; THIERINGER et al., 2008). A ativação das HSC, pela ação do TGF β -1, de fonte autócrina ou parácrina, estimula a transcrição de PDGFR- β que, por sua vez, é ativado pelo PDGF-BB de maneira parácrina, principalmente, pelos macrófagos residentes. Este mecanismo também é responsável pela transdiferenciação destas células em miofibroblastos produtores de colágeno (BONNER, 2004).

Na fibrose renal, tanto em modelo humano quanto em modelo animal, o PDGF é regulado positivamente. Este fato é confirmado por um trabalho recentemente publicado em 2016, onde os autores verificaram um aumento de PDGF-D e PDGFR- β em amostras de biópsias do glomérulo de camundongos e humanos com fibrose renal. Ao utilizarem um modelo de obstrução ureteral unilateral (UUO do inglês *Unilateral Ureteral Obstruction*) e injúria por reperfusão isquêmica unilateral com camundongos *pdgfd*^{-/-}, observaram uma diminuição da fibrose renal. Esta melhora foi claramente associada pela redução da fosforilação de seu receptor PDGFR- β e seu mediador p38 da via de sinalização *downstream*. Além disso, a super expressão de PDGF-D por um sistema de adenovírus em camundongos saudáveis resultou no aumento da deposição de colágeno no interstício renal (BUHL et al., 2016). O PDGF-BB tem sido associado também à diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos

com o consequente aumento da expressão de α SMA e produção de colágeno em modelo de glomerulonefrite em roedores. E este aumento pode ser devido à habilidade do PDGF-BB em regular positivamente a produção de TGF β -1 (FRASER; WAKEFIELD; PHILLIPS, 2002; YAMABE et al., 2000).

O tecido cardíaco, composto por células altamente especializadas, também é alvo de situações que levam a formação da matriz fibrosa, como por exemplo, no processo de reparo após infarto do miocárdio, acarretando sérios problemas cardíacos como a disfunção ventricular (ZHAO et al., 2009). O PDGF e seus receptores também estão expressos nas células que compõem esse tecido, como as células musculares lisas, pericitos, macrófagos e fibroblastos, porém essa expressão está aumentada na fibrose. Em face a este aumento, a produção de MEC induzida por estas células é drasticamente aumentada (ZHAO et al., 2011). Assim como mencionado acima para a fibrose hepática, estudos isolando fibroblastos cardíacos de ratos também mostraram o “*crosstalk*” entre o PDGF e o TGF β -1 favorecendo o processo de fibrose cardíaca, mostrando mais uma vez o sinergismo entre esses dois fatores de crescimento (ZHAO et al., 2013).

O PDGF também apresenta um importante papel no início e na progressão da fibrose na esclerose sistêmica (ES). Tanto seus ligantes quanto seus receptores estão presentes em células das lesões de pele de pacientes. Níveis elevados de PDGF também foram encontrados no lavado broncoalveolar destes pacientes (IWAYAMA; OLSON, 2013). Moroncini e colaboradores 2015 detectaram auto-anticorpos circulantes anti-PDGFR em pacientes com ES (MORONCINI et al., 2015). Abordagens terapêuticas utilizando crenolanib, um inibidor farmacológico dos PDGFRs, em cultura de fibroblastos derivados de biópsias de pele de pacientes com ES, provocou a diminuição da produção de MEC por estas células. Além disso, experimentos *in vivo* realizados com camundongos, em modelo de fibrose induzida por angiotensina II, mostraram a diminuição da fibrose frente ao uso do mesmo inibidor (MAKINO et al., 2017).

Em suma, estes trabalhos nos evidenciam o papel do PDGF na promoção da fibrose em vários tipos de situações patológicas, e que o TGF β -1 pode atuar em sinergismo a este fator de crescimento ampliando seus efeitos. Visto que Petito e colaboradores (2013) demonstraram que CS da linhagem ST88-14 se transdiferenciam em miofibroblastos expressando α SMA sob o estímulo de TGF β -1, e que o *M. leprae* seria um importante indutor deste evento, a ligação PDGF/PDGF-R pode estar influenciando o estado funcional das CS.

No presente estudo investigaremos *in vitro* e *ex vivo* a presença ou a ausência dos receptores α e β de PDGF nas CS e em amostras de biópsias de pacientes com a forma neural pura da hanseníase, o comportamento destas células mediante ao *M. leprae*, e sua relação com o TGF β -1, elucidando seus efeitos nas CS, e a consequente secreção de componentes da MEC, elucidando assim a possível contribuição na fibrose neural na hanseníase.

2 Justificativa

O infiltrado inflamatório causado pela invasão do bacilo nas CS leva ao dano nas fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas. Este evento é seguido pela substituição do parênquima do nervo periférico por tecido fibroso (BREEN et al., 2015). O processo de fibrose é a principal causa dos danos irreversíveis ao nervo periférico de pacientes com hanseníase, pois prejudica a regeneração da fibra nervosa mesmo após a infecção ter sido curada e parece que as CS estão diretamente envolvidas (MIKO; LE MAITRE; KINFU, 1993; TELES et al., 2007).

Alguns estudos demonstraram a capacidade de transdiferenciação das CS em miofibroblastos, células produtoras de MEC, sob o estímulo do TGF- β 1 (PETITO et al., 2013; REAL et al., 2005). Já foi mostrado *in vitro* que as CS da linhagem ST88-14 aumentam a expressão de TGF β -1 e de seus receptores quando estimuladas pelo *M. leprae* (OLIVEIRA et al., 2005). Interessantemente, este mediador também estimula as CS desta mesma linhagem a expressar α SMA e a aumentar a secreção de componentes da MEC (colágeno I e fibronectina) (PETITO et al., 2013). Estes dados sugerem que a transdiferenciação das CS em miofibroblastos possa estar envolvida na evolução da lesão neural observada em indivíduos com hanseníase.

Naturalmente, o PDGF possui como algumas de suas funções estimular o crescimento, a proliferação, a migração, a sobrevivência, a angiogênese, a quimiotaxia, a síntese de MEC, entre outras, tanto em humanos como em modelos experimentais com animais (HELDIN; WESTERMARK, 1999). Desta forma, este fator de crescimento é de suma importância para a remodelamento tecidual e cicatrização. Porém, como mencionado anteriormente, em condições patológicas o PDGF culmina na formação de fibrose. Além disso, está envolvido na mudança do perfil fenotípico e funcional de diversas células de origem mesenquimal, tornando-as células produtoras de componentes da MEC ou exacerbando a produção desta por células que já são produtoras por natureza, como *a priori* explicado. Embora esteja envolvido nos processos de homeostasia, é lícito perguntar quais os fatores que

poderiam levar a uma ativação inapropriada do PDGF, desviando o processo de reparo da normalidade.

A dicotomia funcional do PDGF se torna interessante a partir do momento que este mesmo fator que outrora é de suma importância para a homeostase tecidual, também leva a perda funcional do mesmo. No que diz respeito ao sistema nervoso, o PDGF via de regra é de suma importância para o desenvolvimento e manutenção do nervo periférico, atuando junto a outros fatores neurotróficos no desenvolvimento inicial de CS (LOBSIGER et al., 2000). Um estudo recente com pericitos cerebrais humanos demonstrou a capacidade do PDGF-BB de estimular a produção de microvesículas contendo citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias, além de fatores neurotróficos como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb do inglês *Basic Fibroblast Growth Factor*), fator de crescimento nervoso beta (β NGF do inglês *β -Nerve Growth Factor*), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) e fator de crescimento placentário (PLGF do inglês *Placental Growth Factor*), sugerindo seu envolvimento na regulação da neuroinflamação e contribuição na neuroregeneração (GACEB et al., 2017).

Já se sabe que estímulos inflamatórios promovem a regulação positiva dos PDGFRs em células mesenquimais. Esta regulação pode ser característica da maioria das inflamações crônicas (BONNER, 2004). Como mencionado anteriormente, a hanseníase é uma doença de curso crônico, e orquestrada por uma série de fatores pró- e anti-inflamatórios de acordo com a proximidade de cada polo, e apesar de se conhecer uma gama de mediadores envolvidos no curso da doença, pouco se sabe ainda sobre o envolvimento de alguns fatores envolvidos na evolução do processo de fibrose, além do TGF β -1 (PETITO et al., 2013).

Stefani e colaboradores (2009) identificaram um aumento significativo de PDGF-BB no plasma de pacientes com hanseníase durante o ENH, um processo inflamatório agudo que leva ao agravamento das lesões neurais nos pacientes (STEFANI et al., 2009), mostrando pela primeira vez o envolvimento do PDGF em pacientes com hanseníase. Não há trabalhos até o momento mostrando o envolvimento do

PDGF na fibrose neural da hanseníase, apesar de este fator de crescimento ser muito bem caracterizado em outras condições patológicas que desencadeiam fibrose, como já comentado. O PDGF se mostra tão bem caracterizado nestes casos, que alguns trabalhos já sugerem sua utilização como um biomarcador sérico não-invasivo tanto para a evolução dos estágios da fibrose na hepatite B crônica (ZHOU et al., 2016) como para detecção em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (ZIORA et al., 2015).

Considerando os dados da literatura e da necessidade de novos trabalhos que investiguem a relação do PDGF e TGF- β 1 na fibrose, este trabalho se justifica pela necessidade de encontrar novos mediadores que estejam contribuindo para o processo de fibrose nos nervos periféricos na hanseníase. Desta forma, a hipótese deste trabalho é que o *M. leprae* induz o aumento da produção de PDGF-BB assim como a expressão de seus receptores, e que esta modulação influencia diretamente ou indiretamente (em sinergismo aos efeitos já descritos do TGF β -1) a função das CS. Com este estudo teremos uma melhor compreensão da patogênese que impede a regeneração neural e leva à fibrose em pacientes com hanseníase, o que futuramente nos permitirá criar uma base para a elaboração de estratégias e intervenções para o diagnóstico, prevenção e recuperação das lesões neurais.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Central:

Investigar a possível contribuição do PDGF e de seus receptores na lesão neural da hanseníase no modelo *in vitro* de interação *M. leprae*-CS humanas da linhagem ST88-14, e *ex vivo* a partir da avaliação dos níveis séricos de pacientes com hanseníase forma neural pura.

3.1.1 Objetivos específicos:

- 1 - Avaliar a expressão constitutiva do gene *pdgfb* e de seus receptores *pdgfra* e *pdgfrb*, assim com sua modulação frente ao estímulo com *M. leprae* e TGF β -1 nas CS da linhagem ST88-14;
- 2 - Avaliar a expressão proteica de PDGF-BB e seus receptores α e β em resposta ao *M. leprae* e ao TGF β -1 nas CS da linhagem ST88-14;
- 3 - Analisar o efeito do PDGF na expressão de fibronectina nas CS da linhagem ST88-14;
- 4 - Mensurar os níveis séricos de PDGF-BB em pacientes com hanseníase da forma neural pura comparando com pacientes com outras neuropatias não hansenianas.

4 Materiais e Métodos

4.1 Pacientes e amostras clínicas

Este projeto faz parte de dois projetos maiores intitulados: 1) “A lesão neural da hanseníase: análise da expressão de mediadores imunoinflamatórios e do seu papel na patogenia da doença” (protocolo nº538/09) que dispõem autorização do Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ; e 2) “A plasticidade da célula de Schwann nas lesões do nervo periférico” (protocolo CAAE: 38100914.0.0000.5248), submetido e aprovado na Plataforma Brasil.

Os soros dos pacientes foram coletados no ambulatório Sousa Araújo (ASA) na Fiocruz, com o consentimento escrito dos indivíduos. A classificação das alterações histopatológicas dos fragmentos de nervo dos respectivos pacientes para o diagnóstico foi baseado em critério estabelecido pelo nosso grupo publicado por JARDIM et al., 2003. Onze pacientes (3 mulheres e 8 homens) com idade média de $64,18 \pm 5,16$ com a forma clínica neural pura da hanseníase e dezessete pacientes (9 mulheres e 8 homens) com idade média de $59,12 \pm 2,6$ com outras neuropatias periféricas. Para a avaliação do grau de fibrose utilizou-se o sistema de cruces. Os dados demográficos e histopatológicos dos pacientes com a forma neural pura da hanseníase e dos pacientes com outras neuropatias periféricas, encontram-se na tabela 1 e 2, respectivamente.

4.2 *M. leprae* e reagentes

Foram utilizados para os experimentos *in vitro* os seguintes reagentes: *M. leprae* irradiado comprado da BEI resources (NIAID, NIH - cat. NR-19329), o TGF β -1 recombinante humano foi comprado da empresa Peprotech (Rocky Hill, USA - cat. AF-100-21C) e o PDGF-BB recombinante humano também foi comprado pela empresa Peprotech (Rocky Hill, USA - cat. 100-14B)

4.3 Culturas de CS ST88-14

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular humana ST88-14, que foi isolada de um tumor maligno da bainha de mielina do nervo periférico, obtida de um paciente diagnosticado com neurofibromatose 1 (NF- 1) doada pelo Dr. J.A. Flechter (Dana Farber Câncer Institute, Boston Massachusetts). As células da linhagem ST88-14 foram mantidas em meio RPMI suplementado com 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (inativado – Hyclone, USA), em garrafas de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera úmida, a 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados após a terceira passagem de cultivo celular, conforme protocolo já estabelecido no laboratório (ANDRADE et al., 2016; DÍAZ ACOSTA et al., 2018; MATTOS et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2010, 2005; PETITO et al., 2013; TELES et al., 2007).

Para os ensaios experimentais, as CS ST88-14 aderentes foram soltas com Tripsina/EDTA 0,25%/1mM por 1 min e ressuspensas no meio de cultura suplementado. Em seguida as células foram plaqueadas em placas de 24 poços por 24h (5×10^5 células/poço), 72h (5×10^5 células/poço) e por 7 dias (4×10^4 células/poço) para western blotting; por 24h (2×10^5 células/poço) para citometria de fluxo; e por 7 dias (7×10^4 células/poço) para imunofluorescência; em placas de 96 poços de fundo chato por 24h, 72h e 7 dias (4×10^3 células/poço) para ELISA indireto de MEC; em placas de 12 poços por 24h (5×10^5 células/poço) para PCR em tempo real quantitativo para posterior adição *in vitro* de estímulos a serem descritos mais adiante.

Nos experimentos para a expressão protéica por western blotting de PDGFR-β as CS foram estimuladas com *M. leprae* irradiado (50 µg/mL) e TGFβ-1 (10 ng/mL), combinados ou não por 24h e 7 dias. Além disso, a expressão de TGFβRI e II após o estímulo com TGFβ-1 (10 ng/mL), PDGF-BB (20 ng/mL e 50ng/mL) após 72h também foi avaliada. No ensaio de imunofluorescência as CS foram estimuladas com *M. leprae* irradiado (50 µg/mL) e TGFβ-1 (10 ng/mL), combinados ou não por 7 dias.

Nos experimentos de ELISA indireto para fibronectina as CS foram estimuladas com TGF β -1 (10 ng/mL) e PDGF-BB (10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL) por 24h, 72h e 7 dias. Para os experimentos de expressão gênica por PCR em tempo real quantitativo as CS foram estimuladas com *M. leprae* irradiado (50 μ g/mL) e TGF β -1 (10 ng/mL), combinados ou não por 24h.

Para os ensaios imunoenzimáticos os sobrenadantes de culturas de CS estimuladas com *M. leprae* irradiado (50 μ g/mL) e TGF β -1 (10 ng/mL) por 1h, 3h, 6h, 24h (5×10^5 células/poço) e 7 dias (4×10^5 células/poço), foram coletados e congelados a -20°C. Além dos sobrenadantes, foram utilizados soros dos pacientes da forma neural pura e pacientes com outras neuropatias, armazenados no biorepositório mantido pelo Laboratório de hanseníase.

4.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para dosagem de PDGF-BB foi utilizado o kit de ELISA comercial (Peprotech, USA - cat. 900-K04), onde os sobrenadantes e soros foram processados, conforme orientação do fabricante. A leitura de absorvância foi obtida a 405 nm com correção de comprimento de onda ajustada em 605 nm com uma faixa de detecção de 32 a 3000 pg/mL. Este kit apresenta 100% de reação cruzada com PDGF-AB e 1% com FGFb e PDGF-AA.

As leituras foram obtidas em leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices - EUA/Canadá). Para a análise dos dados foi utilizando o software SoftMax versão 5.3 (Molecular Devices - EUA/Canadá).

4.5 Western blotting (WB)

A expressão protéica de PDGF-B, PDGFR- β , TGF β RI e TGF β RII foi avaliada por WB. Após as dosagens pelo método de Bradford (Bio-Rad), 20 μ g das proteínas extraídas a partir do tampão de lise RIPA (SIGMA) na presença de inibidores de protease (1:100, SIGMA) foram diluídas em tampão de amostra 4 vezes concentrado (0,05 M Tris-HCL em pH 6,8; 10% Glicerol; 2% SDS; 0,5 mL de 5% β -

Mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol), desnaturadas a 100°C por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida - SDS 10% ou 12% junto ao padrão de peso molecular (Bio-Rad - broad - cat. 161-0317). Após corrida eletroforética a 100 V em tampão contendo Tris a 25 mM e glicina a 250 mM, foi realizada a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences, NJ, EUA). A transferência foi feita em tampão de transferência (Tris a 25 mM, glicina a 190 mM e metanol a 20%), a 100 V por 45 min (Bio-Rad).

Após transferência, as interações inespecíficas foram bloqueadas com tampão contendo Tris a 20 mM pH 7,4, NaCl a 137 mM e Tween a 0,15% (TBS-Tween) acrescido de leite desnatado 5% por 1 hora. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas “overnight” a 4°C com os anticorpos primários: monoclonal de camundongo IgG anti-PDGFR- β (175 kDa; Santa Cruz 1:2500 - cat. SC-374573), policlonal de coelho IgG anti-TGF β RI (55 kDa; Sigma 1:1000 - cat. SAB 4502958), policlonal de coelho IgG anti-TGF β RII (64 kDa; Sigma 1:1000 - cat. SAB 4502960), monoclonal de camundongo IgG anti-GAPDH (37 kDa; Santa Cruz 1:1000 - cat. SC-47724) e monoclonal de camundongo IgG anti- α -tubulina (50 kDa; Sigma 1:5000).

Ao término da incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-Tween por 5 min e então incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com seus respectivos anticorpos secundários anti-IgG de coelho HRP (DAKO 1:2000 - cat. P0448) ou anti-IgG de camundongo HRP (DAKO 1:1000 - cat. P0447). Finalmente, foram realizadas 3 lavagens de 5 min com TBS-Tween e a detecção das bandas foi realizada por quimioluminescência utilizando o reagente Western blotting Luminol (Santa Cruz). Em seguida, a membrana foi exposta a um filme radiográfico X (X-OMAT LS; Kodak, NY, USA). A determinação dos níveis proteicos foi realizada por densitometria pelo programa *Image J*.

4.6 Imunofluorescência

As CS ST88-14 cultivadas foram fixadas por 20 minutos com PFA 4% a T.A, lavadas com PBS, bloqueadas e permeabilizadas com Triton X-100 0,5%/Soro Normal de Cabra (NGS) 10%/PBS/BSA

5% por 1h. Foi utilizado o anticorpo monoclonal feito em camundongo anti IgG humano PDGFR- β (Santa Cruz 1:50 - cat. SC-374573) por 1h a T.A. Após lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo IgG Alexa fluor® 488 (Molecular Probes, 1:1000 - cat. A11017) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes) para visualização do núcleo. A montagem das lâminas foi feita com o meio de montagem Permafluor (Cell Marque, CA). As imagens das marcações foram capturadas e examinadas ao microscópio Axio Observer.Z1 equipado com os sistemas Colibri.2 e ApoTome.2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). As imagens foram capturadas com a câmera digital AxioCam HRm e auxílio do programa AxioVision Rel. 4.8.2.0 (Carl Zeiss).

4.7 Análise da matriz extracelular (MEC) secretada e imobilizada por ELISA indireto

A análise qualitativa da MEC secretada foi feita por teste de ELISA indireto de acordo com ALVES et al., 2011. As CS ST88-14 cultivadas por 24h, 72h e 7 dias foram lisadas com tampão contendo Triton X-100 0,5%, NH_4OH 0,1 M em PBS- Ca^{2+} a 4°C, contendo inibidor de protease - PMSF 1mM. Os restos celulares foram eliminados por lavagens sucessivas e suaves com PBS com Ca^{2+} , gelado. A rede protéica restante, invisível ao microscópio óptico, é o que chamaremos de matriz imobilizada livre de células.

Após o bloqueio com 5% de BSA a 37°, foi utilizado o anticorpo policlonal de coelho IgG anti-fibronectina (SIGMA, 1:4000 - cat. F3648). O anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de coelho conjugado a HRP (DAKO, 1:2000 - cat. P0448). As matrizes receberam o anticorpo primário, na diluição apropriada em PBS/ Ca^{2+} / Tween 20 0,05% (PBST), por uma hora a 37°C. Após 3 lavagens com PBST o anticorpo secundário foi adicionado por mais 1 hora a 37°C. A revelação foi feita em tampão citrato 0,1 M pH 4,5 contendo 0,002% H_2O_2 e OPD a 1mg/mL. A paralisação da reação de cor foi feita com H_2SO_4 3M. A leitura de absorbância foi obtida em leitor de ELISA (BioRad) a 405 nm.

4.8 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

4.8.1 Extração de RNA

O RNA total das culturas de ST88-14 cultivadas por 24h foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Lif technologies, EUA) segundo a metodologia descrita pelo fabricante. Após os períodos de estimulação, o sobrenadante das culturas foi retirado e aliquoteado, e então adicionado 500µL de TRIzol® em cada poço, para lise das células aderentes. Posteriormente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Após isso, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA (fase superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL contendo 500µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, EUA), misturada por inversão e incubada a -70° C por no mínimo um dia. Após o período de incubação, foi adicionado 1 µL de GlycoBlue® (Ambion, EUA) em cada tubo, para melhor visualização do sedimento, e então centrifugados a 14000 x g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 500 µL de etanol 70% por centrifugação a 10000 x g por 10 min a 4° C. Em seguida os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 10 min e em seguida ressuspensos em 15 µL de água ultrapura (Invitrogen™, EUA).

4.8.2 Quantificação de ácidos nucleicos

A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada por espectrofotometria utilizando o instrumento NanoDrop® ND-1000 (Thermo scientific, EUA). Inicialmente foi lido 1 µL de água ultrapura para determinar o “branco”. Em seguida, 1 µL 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: $A_{260}/280$ indica o grau de contaminação por proteínas, enquanto $A_{260}/230$ indica o grau de contaminação por compostos orgânicos. As amostras foram consideradas com alto grau de pureza quando as razões $A_{260}/280$ e $A_{260}/230$ apresentaram valores $> 1,8$.

4.8.3 Análise da integridade do RNA

A integridade do RNA extraído foi avaliada por gel desnaturante de 1,2% de agarose (Life technologies, EUA) em tampão MOPS 1X (Sigma-Aldrich, EUA). Inicialmente as amostras foram desnaturadas adicionando-se 200 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 fotodocumentação (L-Pix touch, Loccus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observadas as subunidades ribossomais esperadas (28S e 18S).

4.8.4 Tratamento do DNA com DNase

Após a quantificação e confirmada a integridade do RNA extraído, o mesmo foi submetido ao tratamento com DNase. Para tal, foi utilizado o kit TURBO DNA-*free*TM (Life technologies, EUA) seguindo as recomendações do fabricante, em uma reação com volume final de 30 µL. Inicialmente, em tubos de 0,6 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 min. 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 min, 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 min, os sobrenadantes contendo o RNA foram cuidadosamente transferidos para novos tubos e o RNA novamente quantificado como descrito no item 4.10.2

4.8.5 Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir do RNA total das culturas de ST88-14 mediante o uso da enzima transcriptase reversa Superscript III® (Life Technologies, EUA) em uma reação com volume final de

20 μ L. Inicialmente, o RNA e Oligo (dT) foram incubados a 65° C por 5 min para a linearização da molécula de RNA. Após a incubação foi adicionado o tampão da enzima em concentração de 1X, dNTP 0,125 mM, DTT 10 mM, 40 U de RNase Out® e 200 U da enzima Superscript III®. Essa mistura foi incubada a 50° C por 50 min para transcrição, seguida de incubação a 85° C por 5 min para inativação da enzima. Após a incubação as amostras foram armazenadas a -20° C.

4.8.6 RT-PCR em tempo real para análise da expressão gênica (RT-qPCR)

Para análise da expressão gênica, a reação de RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o reagente TaqMan®Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para o RT-PCR em tempo real foram utilizadas amostras de cDNA, obtidas anteriormente, na concentração de 10 ng por reação. Para isso, a reação de PCR foi realizada com volume final de 10 μ L, onde foram adicionados 1 μ L de cada cDNA, 3,5 μ L de água destilada ultrapura, livre de DNase / RNase (Life Technologies, USA) e 5 μ L de TaqMan®Fast Universal PCR MasterMix (2x) (Applied Biosystems). Para cada amostra foram amplificados os genes de interesse e o gene constitutivo GAPDH (Hs99999905_m1) (Life Life Technologies, USA). As reações foram incubadas no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus® (Applied Biosystems, USA) e submetidas a ciclos de 95° C por 20 segundos, 40 ciclos de 95° C por 1 segundo e 60° C por 20 segundos.

Para os ensaios acima, os seguintes ensaios TaqMan® foram utilizados: PDGFB (Hs00966522_m1), PDGFRA (Hs00998018_m1), PDGFRB (Hs01019589_m1) (Life Technologies, USA). A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta C_T ($\Delta\Delta C_T$) de acordo com LIVAK; SCHMITTGEN, 2001. Inicialmente foi calculado o ΔC_T , subtraindo-se os valores de C_T (do inglês *threshold cycle*, limiar do ciclo) do gene alvo dos valores de C_T do gene normalizador (*GADPH*). Uma vez determinado o ΔC_T das amostras, foi escolhido como amostra normalizadora o cDNA referente à condição experimental de células não estimuladas. Para calcular o $\Delta\Delta C_T$ foi utilizada

a seguinte fórmula: $[\Delta C_T (\text{amostra}) - \Delta C_T (\text{amostra normalizadora})]$. Por fim, os valores de expressão gênica relativa foram obtidos aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

4.9 Análise estatística

Para estabelecer os testes estatísticos, todos os experimentos passaram *a priori* pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. As amostras classificadas como não-paramétricas, quando pareadas, a significância estatística foi calculada pelo teste de Friedman e quando não pareadas pelo teste Kruskal-Wallis, todos com o pós-teste de comparação múltipla de Dunn e valor de p ajustado pelas múltiplas comparações. As amostras classificadas como paramétricas e não pareadas, foram calculadas pelo teste t -student com correção de Welch, utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão para os experimentos com linhagem e média geométrica com 95% de intervalo de confiança para as amostras de soro dos pacientes.

5 Resultados

5.1 *Mycobacterium leprae* e TGFβ-modulam positivamente a expressão/produção de PDGF-BB em células de Schwann ST88-14

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que o aumento progressivo dos níveis de alguns fatores de crescimento, tal como o PDGF, representa um evento importante ou essencial para o desenvolvimento da fibrose (revisado por LEASK, 2015). Considerando este fato, primeiramente, fomos avaliar como o efeito combinado do *M. leprae* (50 µg/mL) e do TGFβ-1 (10 ng/mL) modulava a expressão gênica de PDGF-BB após 24h de cultura (Figura 9). A partir da técnica de RT-PCR quantitativo pudemos verificar que o *M. leprae* regula positivamente a expressão gênica de *pdgfb* e que este aumento foi significativo em relação ao controle não estimulado ($p < 0,05$) (Figura 9).

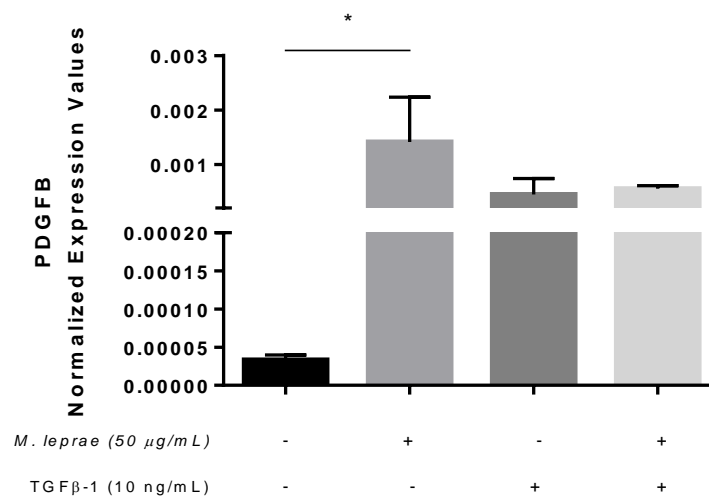


Figura 9: *Mycobacterium leprae* aumenta a expressão gênica de *pdgfb* pelas CS da linhagem ST88-14. As CS da linhagem ST88-14 foram incubadas com *M. leprae* (50µg/mL) e/ou TGFβ-1 (10 ng/mL) por 24h. O gráfico representa os valores da expressão gênica do mRNA de *pdgfb* normalizados (delta-delta Ct), pela técnica de RT-PCR quantitativo. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn em que (*) significa $p < 0,05$.

Em seguida, fomos investigar o efeito nos níveis de PDGF-BB no sobrenadante de culturas de CS da linhagem ST88-14 (Figura 10) com as mesmas concentrações de TGFβ-1 e *M. leprae* do

experimento anterior. A partir de uma cinética (1h, 3h, 6h, 24h e 7 dias), observamos um crescente aumento nos níveis de PDGF-BB em sobrenadantes de CS, em todas as condições analisadas, sendo este aumento tempo-dependente (Figura 10). Em 7 dias, observamos uma diferença significativa na produção de PDGF-BB a partir da combinação TGF β -1 + *M. leprae* em relação às CS estimuladas somente com TGF β -1 ($p < 0,001$) e em relação às CS não estimuladas ($p < 0,05$) (Figura 10). Desta forma, adotamos os tempos de 24h e/ou 7 dias para os demais experimentos, uma vez que a partir de 24h já foi possível observar a produção do alvo de estudo.

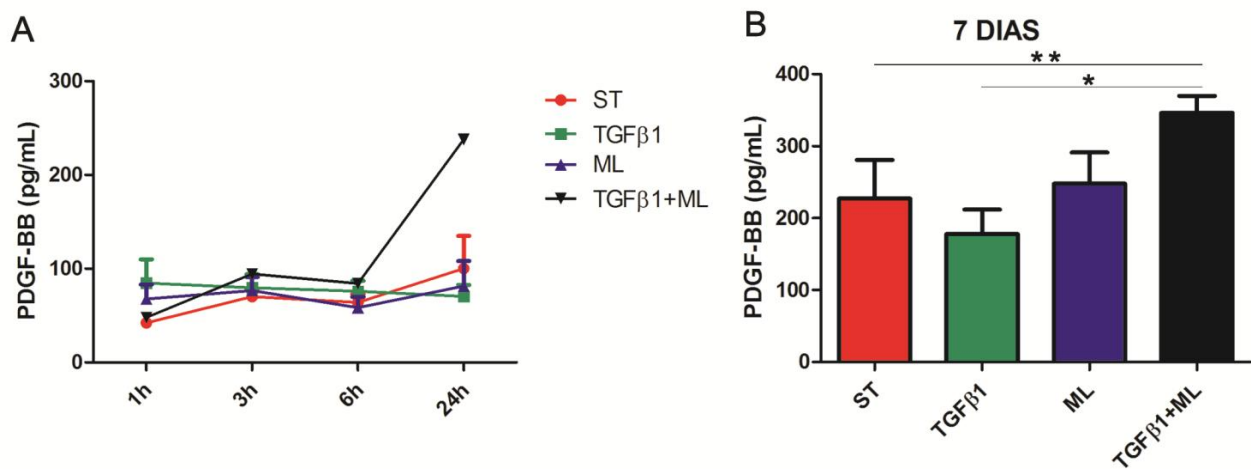


Figura 10: A combinação TGF- β 1+ML aumenta a produção de PDGF-BB pelas CS da linhagem ST88-14 em 7 dias. (A;B) Análise da cinética de produção de PDGF-BB pelas CS da linhagem ST88-14 após o estímulo com *M. leprae* (50 μ g/ mL) e TGF β -1 (10 ng/mL) por ELISA nos tempos de (A) 1h, 3h, 6h e 24h e (B) 7 dias. Os valores representam a média \pm desvio padrão de experimentos independentes (A) $n \leq 9$; (B) $n \leq 5$. A análise estatística foi determinada pelo teste One Way ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós-teste de Dunn em que (*) significa $p < 0,05$ e (**) $p < 0,001$. ST = Controle não estimulado. ML = *Mycobacterium leprae*.

5.2 *Mycobacterium leprae* regula a expressão gênica do receptor α de PDGF

Após verificarmos pela primeira vez que o nosso modelo de estudo com CS da linhagem ST88-14 era capaz de liberar constitutivamente o PDGF em seu microambiente, e que o estímulo com TGF β -1 combinado ao *M. leprae* favorecia sua produção, fomos avaliar se estes estímulos eram capazes de regular a expressão gênica dos receptores de PDGF (genes *pdgfra* e *pdgfrb*) nas CS da linhagem ST88-14. Observamos que após 24h de estímulo o *M. leprae* foi capaz de regular positivamente a expressão

gênica de *pdgfra* quando comparado ao controle não estimulado, sendo este aumento significativo ($p < 0,05$) (Figura 12). Curiosamente, o estímulo com TGF β -1 não teve efeito sobre a expressão gênica deste receptor, sugerindo que o aumento gerado pelo estímulo combinado de *M. leprae* e TGF β -1 tenha sido devido à presença apenas da micobactéria (Figura 11). Em relação ao receptor β , não observamos significância estatística em nenhuma das condições testadas. Desta forma, estes resultados nos permitem dizer que os efeitos do PDGF nas CS da linhagem ST88-14 podem ser mediados tanto por via autócrina ou parácrina na presença de *M. leprae*.

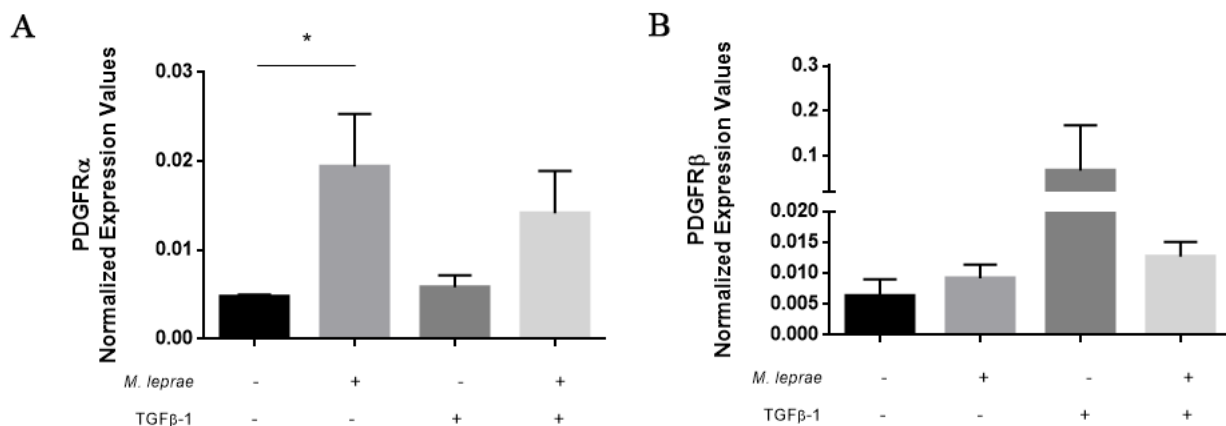


Figura 11: *Mycobacterium leprae* é capaz de regular a expressão gênica de PDGFR. As CS da linhagem ST88-14 foram incubadas com *M. leprae* (50 μ g/mL) e/ou TGF β -1 (10 ng/mL) por 24h. O gráfico representa os valores da expressão gênica do mRNA de (A) *pdgfra* e (B) *pdgfrb* normalizados (delta-delta Ct), pela técnica de RT-PCR quantitativo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn em que (*) significa $p < 0,05$.

Seguindo o mesmo racional fomos avaliar a expressão protéica do receptor β no extrato celular por western blotting (Figura 12). Desta forma, as CS da linhagem ST88-14 foram estimuladas com *M. leprae* (50 μ g/mL) e/ou TGF β -1 (10 ng/mL) por 24h e 7 dias obtendo ao final de cada tempo o respectivo extrato celular que foi corrido em gel SDS-PAGE e revelado em filme fotográfico. Em 24h o *M. leprae* parece aumentar em 3x (ML 3,405 \pm 0,575) a expressão do PDGFR- β em relação ao controle não estimulado. Porém, o TGF β -1 combinado ou não ao *M. leprae* parece dobrar a expressão

deste receptor em relação ao aumento já exercido pelo *M. leprae* sozinho em 24h (TGFβ-1 $6,47 \pm 0,52$; TGFβ-1+ML $6,72 \pm 2,45$). Interessantemente, este aumento parece ser revertido em 7 dias (Figura 12).

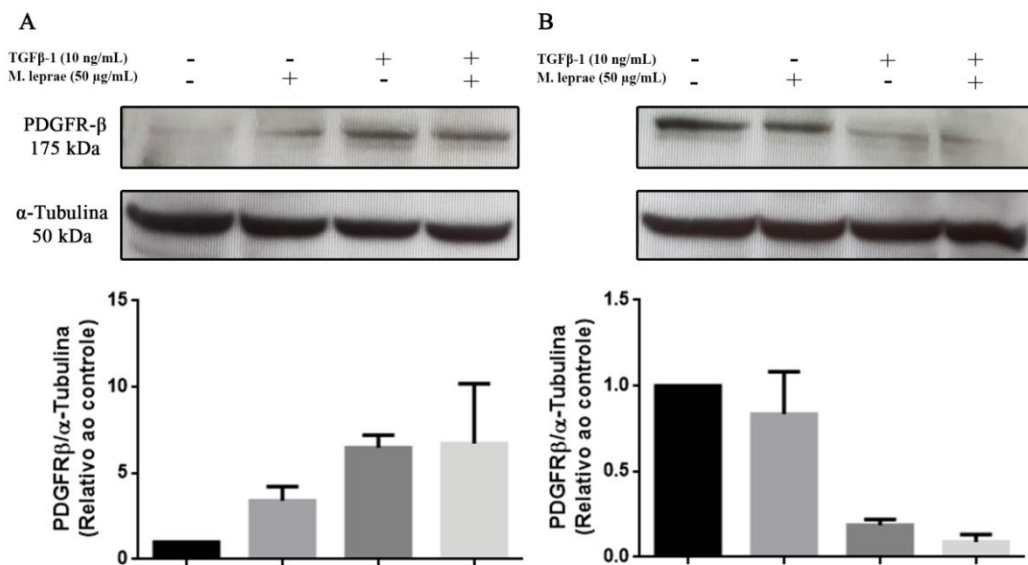


Figura 12: TGFβ-1 aumenta a expressão protéica de PDGFRβ nas CS da linhagem ST88-14. Análise por western blotting do efeito do estímulo com *M. Leprae* (50 µg/mL), TGFβ-1 (10 ng/mL) e TGFβ-1+*M. leprae* na expressão protéica de PDGFRβ em extratos de CS ST88-14 em (A) 24h e (B) 7 dias de cultura, ambos com sua respectiva densitometria dos dados relativos ao controle e normalizados pelo controle de carregamento (α -tubulina), realizada pelo programa Image J. Os valores são representados pela média \pm desvio padrão referentes a dois experimentos independentes. ST = Controle não estimulado. ML = *Mycobacterium leprae*.

Para melhor compreendermos o que estaria levando à diminuição da expressão do PDGFRβ, fomos analisar o padrão de distribuição deste receptor mediante os estímulos supracitados. Assim, as células foram plaqueadas em lamínulas de vidro e cultivadas por 7 dias e, em seguida, foram marcadas com o anticorpo primário anti-PDGFRβ e secundário conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor® 568, e por fim, fotografadas em microscópio de fluorescência (Figura 13). Observamos a presença de punctos no citoplasma das células sem tratamento e que o tratamento com TGFβ-1 e sua combinação com *M. leprae* aumentava a presença destes em 7 dias de cultura (Figura 13).

A

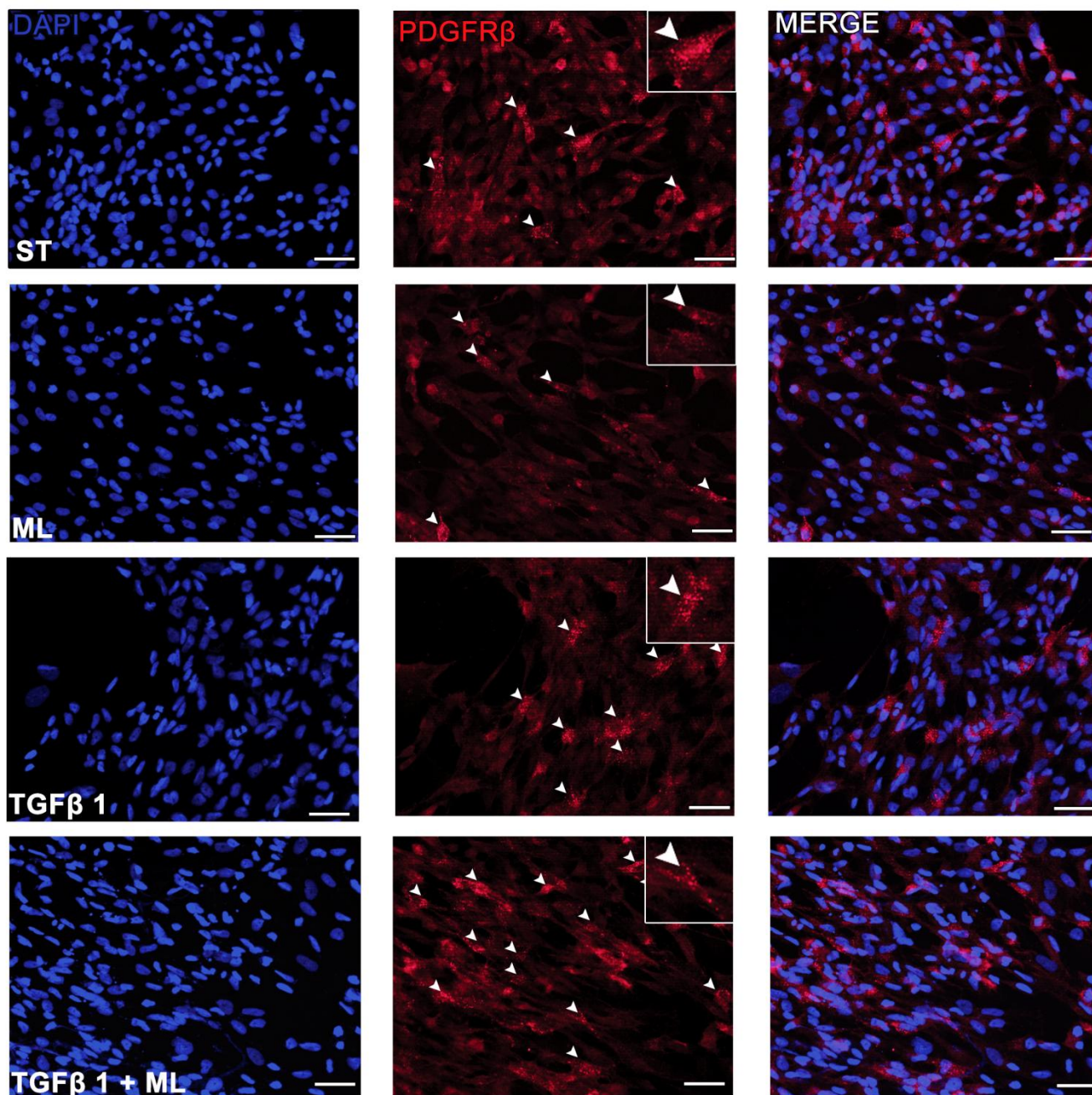


Figura 13: PDGFR β em CS da linhagem ST88-14 após 7 dias de cultura. CS da linhagem ST 88-14 foram estimuladas com TGF β 1 (10 ng/mL) e/ou *M. leprae* (50 μ g/mL) por um período de 7 dias. A marcação com DAPI foi utilizada para visualizar o núcleo das células, e para a visualização do receptor de interesse foi utilizado o anticorpo anti-PDGFR β (em *vermelho*, Alexa Fluor 568). As cabeças de setas brancas indicam os *punctos* de PDGFR β . Estas imagens é representativa de 1 experimento independente realizado em duplicata. As imagens foram obtidas usando o microscópio Colibri (Carl Zeiss). O tamanho de 50 μ m se aplica à barra de escala para todas as imagens. ST = Controle não estimulado. ML = *Mycobacterium leprae*.

5.3 Secreção/deposição de fibronectina nas CS da linhagem ST88-14 após estímulo com PDGF-BB exógeno

A fibronectina é um dos componentes da MEC conhecido por exibir uma deposição exacerbada na fibrose, junto ao colágeno do tipo I. Petito e colaboradores (2013) demonstraram que TGF β -1 e *M. leprae* eram capazes de induzir a secreção de fibronectina pelas CS da linhagem ST88-14 em 7 dias de cultura, e este efeito foi revertido com o uso de SB-431542. Assim como o TGF β -1, o PDGF também é capaz de induzir o aumento de MEC por diversos tipos celulares em doenças com perfil fibrótico (KLINKHAMMER; FLOEGE; BOOR, 2017).

Anteriormente observamos que as CS da linhagem ST88-14 sob o estímulo de TGF β -1 e *M. leprae* levam ao aumento da produção de PDGF-BB, portanto, fomos avaliar a capacidade do PDGF-BB exógeno em induzir a secreção de fibronectina em nosso modelo. Para isso, foi realizada uma curva dose-resposta (10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL) de PDGF-BB exógeno, com base nos valores encontrados na literatura para outros tipos celulares, avaliando três diferentes tempos de cultura, 24h, 72h e 7 dias (Figura 14). Uma análise qualitativa da MEC utilizando ELISA indireto, mostrou um aumento significativo de fibronectina em resposta ao estímulo com TGF β -1 em 24h ($p < 0,05$) (Figura 14a), 72h (0,01) (Figura 14b) e 7 dias ($p < 0,001$) (Figura 14c) em relação ao controle não estimulado, confirmando os efeitos já descritos do TGF β -1. As CS da linhagem ST88-14 sob o estímulo de PDGF-BB exógeno na concentração de 100 ng/mL por 7 dias foi capaz de induzir um aumento significativo na produção de fibronectina ($p < 0,05$) (Figura 14c).

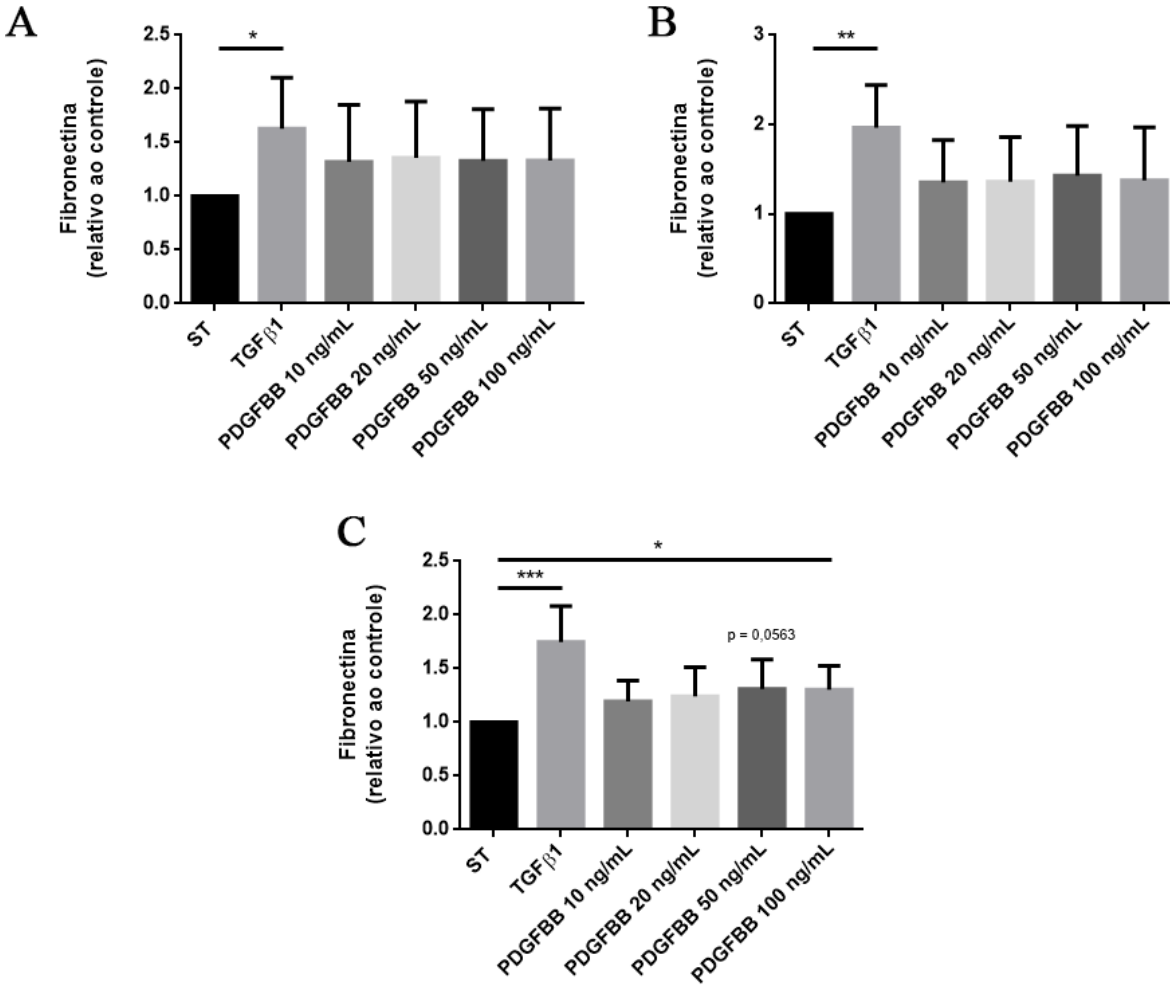


Figura 114: Expressão de fibronectina em CS humanas da linhagem ST88-14 mediante o estímulo com PDGF-BB. As CS ST88-14 foram incubadas com TGF-β1 (10 ng/mL) e PDGF-BB recombinante humano (10 ng/mL, 20 ng/mL, 50 ng/mL e 100 ng/mL) por (A) 24h, (B) 72h e (C) 7 dias. As matrizes imobilizadas foram investigadas por ELISA indireto com anticorpo anti-fibronectina. Os resultados são representados pela média ± desvio padrão de cinco experimentos independentes. O teste não-paramétrico de Friedman com o pós-teste de Dunn foi utilizado para análise estatística, em que (*) significa $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. ST = Controle não estimulado. ML = *Mycobacterium leprae*.

5.4 Expressão de TGFβ-1 e seus receptores mediante o estímulo com PDGF-BB

Uma elevada expressão de PDGF e TGFβ-1 tem sido observada em um grande número de desordens com perfil fibrótico, tais como esclerose sistêmica, fibrose pancreática, hepática e cicatriz hipertrófica. Além disso, as isoformas de PDGF estão diretamente envolvidas com o aumento dos receptores de TGFβ-1 nestas desordens (CZUWARA-LADYKOWSKA et al., 2001; KORDES et al., 2005; MEKALA et al., 2018; TIEDE et al., 2009).

Levando em consideração os efeitos já descritos pelo TGFβ-1 na hanseníase, e os dados aqui demonstrados, é de extrema importância investigar se os receptores de TGFβ-1 estão sendo modulados pelo PDGF-BB. Neste racional, as CS humanas ST88-14 foram estimuladas por 72h com PDGF-BB exógeno nas concentrações de 20 e 50 ng/mL e, em seguida, foi coletado o extrato celular para avaliar a expressão protéica dos dois receptores de TGFβ-1 (TGFβRI e TGFβRII) por western blotting (Figura 15). As duas concentrações de PDGF-BB parecem induzir o aumento da expressão de ambos os receptores quando comparados ao controle sem estímulo e ao TGFβ-1 (TGFβRI: PDGF 20 μg/mL 1,782 ± 0,3099; PDGF 50 μg/mL 1,647 ± 0,4473 - Figura 15a) (TGFβRII: PDGF 20 μg/mL 1,516 ± 0,0757; PDGF 50 μg/mL 1,198 ± 0,2506 - Figura 15b).

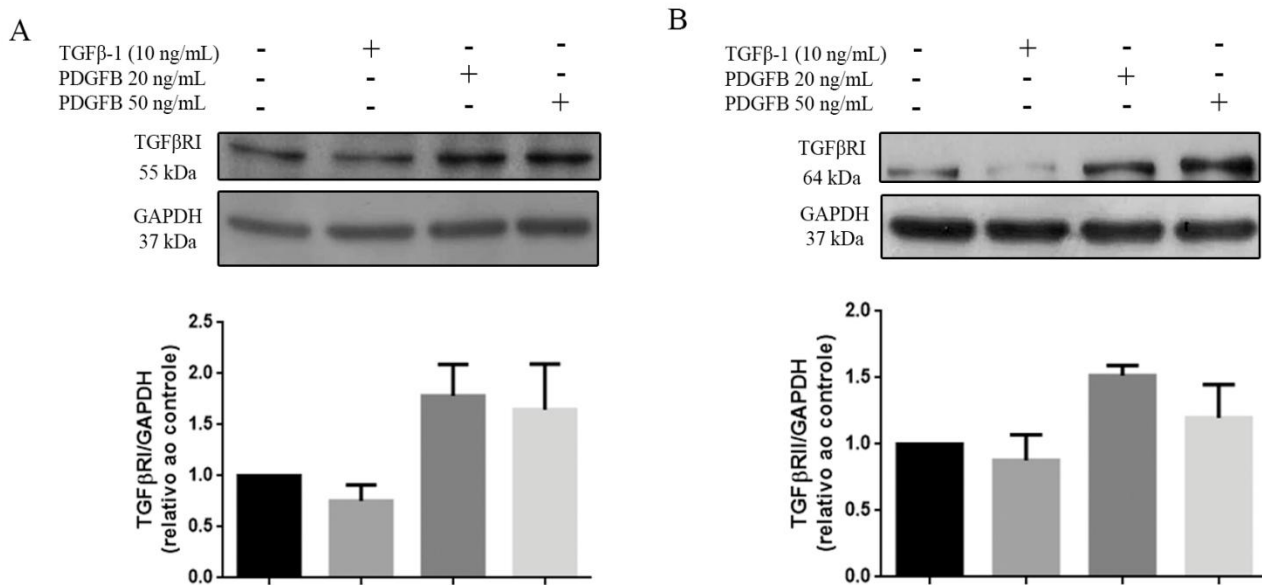


Figura 15: PDGF-BB aumenta a expressão dos receptores de TGFβ-1 nas CS humanas ST88-14. Análise por western blotting do efeito de PDGF-BB na expressão protéica de (A) TGFβRI e (B) TGFβRII em extratos de CS ST88-14 em 72h de cultura, ambos com sua respectiva densitometria dos dados relativos ao controle e normalizados pelo controle de carregamento (GAPDH), realizada pelo programa Image J. Os resultados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Friedman com múltiplas comparações e pós - teste Dunn, porém não houve significância.

5.5 PDGF-BB está aumentado no soro de pacientes com hanseníase neural pura em relação a outras neuropatias periféricas não hansenianas

O PDGF-BB tem sido bastante estudado como forma de diagnóstico a partir de dosagens séricas em doenças como fibrose pulmonar idiopática e fibrose hepática decorrente de hepatite B crônica (ZHOU et al., 2016; ZIORA et al., 2015). Seguindo este racional, fomos comparar os níveis de PDGF-BB no soro de pacientes HNP com pacientes que são classificados como outras neuropatias periféricas não hansenianas (NH) (Figura 22). Utilizamos uma coorte de 28 pacientes atendidos no Ambulatório Souza Araújo (ASA) no período de 2004 a 2014, dos quais 17 eram NH e 11 HNP. Os dados demográficos e histopatológicos dos nervos biopsiados se encontram nas tabelas 1 e 2 para HNP e NH, respectivamente. Houve o predomínio de homens (72,7%) em relação às mulheres (27,3%) no grupo HNP (Tabela 1). Já no grupo NH apenas 47,1% dos pacientes eram homens, enquanto 52,9% eram mulheres. Em relação às dosagens séricas, houve um aumento significativo de PDGF-BB ($p = 0,0441$) no soro de pacientes do HNP quando comparado ao grupo NH (HNP $5.209 \pm 626,5$ versus NH $3.988 \pm 201,3$), mostrando pela primeira vez na literatura a relação entre os níveis séricos de PDGF-BB e o grupo HNP (Figura 22). É válido ressaltar que dos 11 pacientes do grupo HNP, apenas 4 não apresentaram algum grau de fibrose. Os 7 pacientes que apresentaram algum grau de fibrose apresentavam intensidade de forte a muito forte. O que mais uma vez reforça a hipótese de uma possível correlação de PDGF-BB com a fibrose na hanseníase.

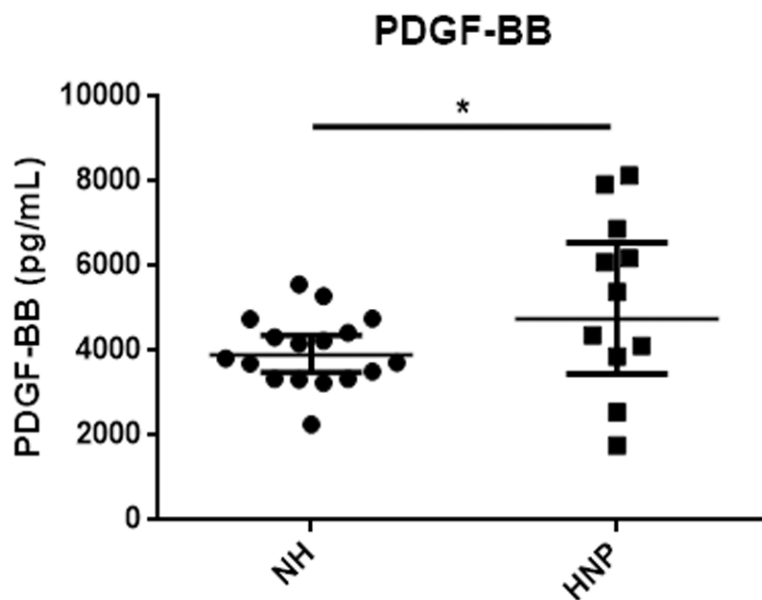


Figura 1612: Pacientes com hanseníase neural pura apresentam níveis séricos de PDGF-BB elevados. Níveis de PDGF-BB (pg/mL) em amostras de soro de pacientes HNP (hanseníase foma neural pura) e pacientes NH (não hansenianos) dosados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados são representados pela média \pm desvio padrão de 28 amostras, sendo 17 do grupo NH e 11 do grupo HNP. O teste paramétrico para amostras não pareadas *t*-student com correção de Welch foi realizado para a análise estatística, em que (*) significa $p < 0,05$.

Tabela 1: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes HNP e seus respectivos nervos biopsiados.

Sexo	Idade (anos)	Nervo Biopsiado	Inf. Peri.	Inf. Endo.	Inf. Epi.	Fibrose Peri.	Fibrose Endo.	Fibrose Epi.	Ang.	PCR
M	35	Sural	N	N	N	+	N	N	N	Neg.
M	70	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	Pos.
M	69	Sural	N	N	+	+++	++++	+++	N	Neg.
F	73	Ulnar	+	N	+	+	N	N	N	Neg.
M	72	Ulnar	++	N	N	N	N	N	N	S.I.
M	97	Sural	N	N	N	N	N	N	N	S.I.
F	63	Ulnar	N	N	N	+	N	N	N	S.I.
M	41	Ulnar	++++	++	+	+++	+++	N	++	S.I.
M	74	Sural	+	++	++	+++	++++	+++	++	Neg.
M	60	Ulnar	+	N	+	N	N	N	N	Pos.
F	52	Ulnar	++	+++	++	++++	++++	++	+++	Neg.

Legenda: Inf. Peri. = Infiltrado inflamatório perineural; Inf. Endo. = Infiltrado inflamatório endoneural; Inf. Peri. = Infiltrado inflamatório perineural; Fibrose Peri. = Fibrose perineural; Fibrose Endo. = Fibrose endoneural; Fibrose Epi. = Fibrose epineural; Ang. = Angiogênese; PCR = Proteína C reativa; Intensidade: (N) ausência, (+) fraca, (++) moderada, (+++) forte e (+++++) muito forte.

Tabela 2: Dados demográficos e histopatológicos dos pacientes NH e seus respectivos nervos biopsiados

Sexo	Idade (anos)	Nervo Biopsiado	Inf. Peri.	Inf. Endo.	Inf. Epi.	Fibrose Peri.	Fibrose Endo.	Fibrose Epi.	Ang.	PCR
F	47	Ulnar	N	N	N	+	++	N	N	S.I.
M	57	Ulnar	+	N	N	+	+	N	N	S.I.
F	52	Sural	+	+	+	++	+	++	+	S.I.
F	55	Sural.	N	N	+++	N	N	N	+	Neg.
M	64	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	Neg.
M	49	Ulnar	N	N	N	N	+	N	N	Neg.
F	53	Sural	N	N	++	N	N	N	N	Neg.
F	66	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	S.I.
M	46	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	S.I.
M	42	Fibular	N	N	+	N	+	N	N	S.I.
M	61	Fibular	N	N	N	N	+	N	N	S.I.
F	77	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	S.I.
F	67	Sural	N	N	N	N	N	N	N	S.I.
F	67	Sural	+	+	N	+	N	N	N	S.I.
M	81	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	Neg.
M	57	Ulnar	N	N	N	N	N	N	N	Neg.
F	64	Fibular	N	N	N	N	N	N	N	Pos.

Legenda: Inf. Peri. = Infiltrado inflamatório perineural; Inf. Endo. = Infiltrado inflamatório endoneural; Inf. Peri. = Infiltrado inflamatório perineural; Fibrose Peri. = Fibrose perineural; Fibrose Endo. = Fibrose endoneural; Fibrose Epi. = Fibrose epineural; Ang. = Angiogênese; PCR = Proteína C reativa; Intensidade: (N) ausência, (+) fraca, (++) moderada, (+++) forte e (++++) muito forte.

5.6 A correlação dos níveis séricos de PDGF-BB e MCP-1 é inversamente proporcional entre os grupos HNP e NH.

Muitas são as quimiocinas que fazem parte do cenário de um processo inflamatório crônico, visto que elas recrutam células do sistema imunológico para combater a infecção, assim como ajuda no processo de reparo tecidual e cicatrização, porém em condições patológicas acabam por participar do processo de fibrose (WYNN; YUGANDHAR; CLARK, 2013). A quimiocina MCP-1 é produzida por CS humanas no momento da injúria no nervo, participando do processo de neuroinflamação (CONDUCTIER et al., 2010; TOFARIS et al., 2002). Medeiros e colaboradores (2015) já mostraram a marcação para MCP-1 aumentada em amostras de biópsias de nervo de pacientes HNP e ainda associaram com a formação de fibrose.

Desta forma, realizamos a correlação dos níveis de PDGF-BB e MCP-1 sérico nos dois grupos de pacientes e observamos que os indivíduos do grupo HNP apresentaram uma correlação positiva e significativa, isto é, quanto maior o nível sérico de MCP-1, maior é de PDGF-BB ($r = 0,6243$, $p = 0,02$). E em pacientes do grupo NH, observou-se uma correlação negativa ($r = -0,2490$, $p = 0,1675$), oposto ao que foi encontrado para o outro grupo, isto é, uma tendência ao declínio nos níveis de MCP-1 a medida que PDGF-BB era aumentado, no entanto, não foi observada alteração significativa (Figura 23).

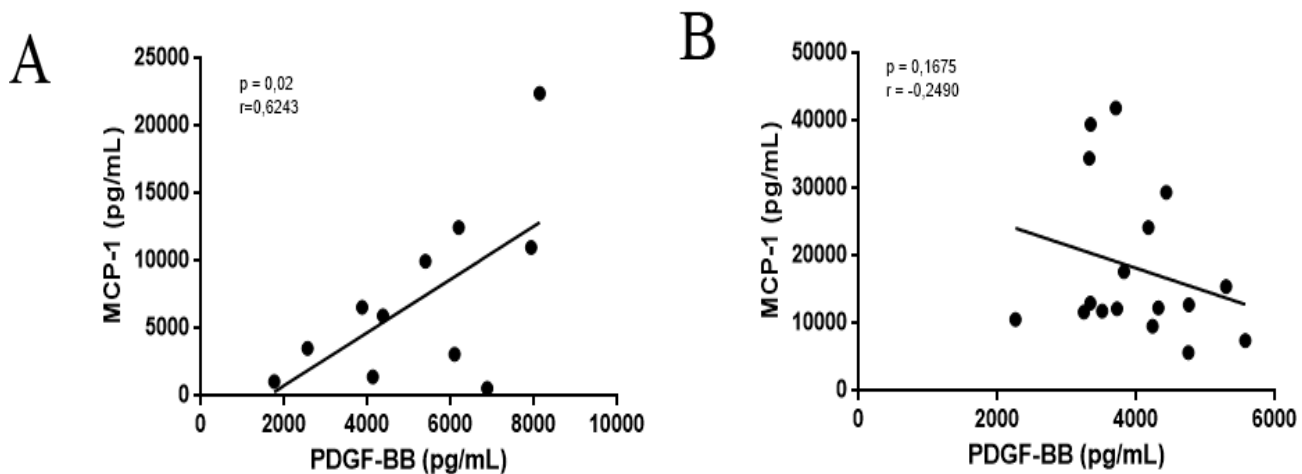


Figura 17: Os níveis séricos de PDGF-BB são diretamente proporcionais aos níveis séricos de MCP-1 em pacientes do grupo HNP Correlação entre os níveis séricos de PDGF-BB e MCP-1 (pg/mL) em pacientes do grupo (A) hanseníase forma neural pura (HNP) e (B) não hansenianos (NH). Dados pareados de 11 pacientes do grupo HNP e 17 pacientes do grupo NH analisados, sendo cada ponto representando um paciente. Os coeficientes de relação são mostrados nas retas (valores de r), assim como o nível de significância (valores de p). A análise estatística foi feita pelo método de correlação de Pearson. As dosagens séricas de MCP-1 fazem parte de outro trabalho do grupo de pesquisa (dados não mostrados) que servirá como parte de outra dissertação de mestrado.

6 Discussão

As lesões do nervo na hanseníase constituem um dos processos em que a inflamação crônica progride para a fibrose, resultando em deformidades e paralisias permanentes, que estigmatizam esta doença há milênios. Poucos estudos científicos em relação à fibrose no nervo vêm sendo realizados porque esta é uma condição incomum entre os distúrbios neurológicos. Além disso, entre os patógenos bacterianos, a infecção dos nervos periféricos é uma propriedade única do *M. leprae*. Visto que esta é uma condição única da hanseníase, os conhecimentos dos mecanismos que desencadeiam a lesão nervosa permanecem pouco compreendidos (SCOLLARD, 2008).

Acredita-se que as CS estão diretamente envolvidas na patogênese da lesão nervosa na hanseníase, no entanto, não se sabe o quanto o microambiente inflamatório dentro e ao redor dos nervos possa influenciar no dano nervoso (SCOLLARD; TRUMAN; EBENEZER, 2015). Até pouco tempo, as CS eram consideradas células comprometidas exclusivamente com o destino da glia, porém muitos autores têm mostrado cada vez mais a plasticidade desta célula. Em uma revisão, SILVA e colaboradores (2018) comentam diferentes populações em que as CS têm a capacidade de se diferenciar, dentre eles encontram-se os melanócitos e fibroblastos endoneurais. Além disso, esta plasticidade também é bem descrita em processos regenerativos na promoção do reparo após a injúria do nervo (JESSEN; MIRSKY, 2016).

No contexto da hanseníase, MASAKI e colaboradores (2013) mostraram pela primeira vez em modelo murino que o desafio com *M. leprae* induz uma reprogramação das CS, onde após a infecção segue-se um processo de desdiferenciação, seguido de conversão em células semelhantes às células tronco/progenitoras (pSLC - “progenitor/stem cell-like cells”). Além disso, estas pSLC detêm a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares e assim servem como forma de disseminação do bacilo. Corroborando a esses achados, alguns estudos demonstraram a capacidade de transdiferenciação das CS em miofibroblastos, que são células produtoras de MEC, sob o estímulo TGF- β 1 (PETITO et

al., 2013; REAL et al., 2005). De fato, estes trabalhos evidenciam a importância do estudo da participação das CS no dano neurológico típico de pacientes com hanseníase.

É válido ressaltar que o infiltrado inflamatório, causado pela invasão do *M. leprae* nas CS, leva ao dano nas fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas. Este evento é seguido pela substituição do parênquima do nervo periférico por tecido fibroso (BREEN et al., 2015). Esta formação de fibrose é a principal causa dos danos irreversíveis ao nervo periférico de pacientes com hanseníase, pois prejudica a regeneração da fibra nervosa mesmo após a infecção ter sido curada. Os fatores que regulam o reparo anormal em várias doenças com perfil fibrótico têm centrado uma atenção considerável ao papel do TGF β -1 e do PDGF (BONNER, 2004; TROJANOWSKA, 2009).

O grande objetivo que nos impulsionou a este estudo foi o de esclarecer alguns aspectos que podem ser críticos para o desenvolvimento da fibrose neural, focando no papel das CS como uma célula pró-fibrogênica induzida por *M. leprae*, TGF β -1 e PDGF *in vitro*. Sabendo que o processo inflamatório crônico gerado nos pacientes com lesão neural na hanseníase pode desencadear diferentes graus de inflamação e fibrose, esse estudo também se propôs a avaliar a liberação de PDGF-BB no soro de pacientes com a forma neural pura da hanseníase, que é uma forma onde há o comprometimento neurológico sem alterações dermatológicas, o que compreende um desafio no diagnóstico (JARDIM et al., 2003).

O eixo PDGF/PDGFR inicia um papel central na patogênese da fibrose, desta forma, observamos que o modelo de CS humanas da linhagem ST88-14, linhagem bem estabelecida no laboratório, produz constitutivamente níveis basais de PDGF-BB já em 1h de cultura e que esta produção é de maneira temporal. Além disso, observamos que a combinação de *M. leprae* e TGF β -1 modulou positivamente a produção de PDGF-BB após 7 dias.

O PDGF é sintetizado por muitos tipos celulares, e esta síntese é frequentemente aumentada em resposta a estímulos externos, como fatores de crescimento e citocinas, como por exemplo o TGF β -1 (CHAN et al., 2010; JESTER et al., 2002). Para a melhor compreensão deste efeito, achamos válido

investigar de que forma o PDGF-BB estava sendo regulado. Nossos dados de expressão gênica demonstram que o *M. leprae* (com aumento significativo) induziu o aumento da expressão do gene *pdgfb* em relação ao controle.

A presença dos receptores α e β de PDGF nas CS da linhagem ST88-14 já foi demonstrada previamente em trabalhos relacionados a neoplasias do SNP como neurofibrosarcoma e neurofibromatose do tipo 1 (BADACHE; DE VRIES, 1998; DANG; DEVRIES, 2005), porém nunca associada à hanseníase. Desta forma, fomos investigar a regulação destes receptores mediante os outros estímulos. Observamos que o *M. leprae* resultou em uma regulação significativamente positiva de *pdgfra*. Observamos um sugestivo aumento tanto da expressão gênica quanto protéica de PDGFR- β 24h após o estímulo com TGF β -1, o que corrobora com os dados encontrados na literatura mostrando haver uma relação entre estes dois fatores de crescimento em outros tipos celulares envolvidos em processos fibróticos. Recentemente, MEKALA e colaboradores (2018) em estudos *in vitro* e *in vivo* de fibrose hepática com HSC de camundongos após injúria induzida por paracetamol, etanol, tetracloreto de carbono ou tioacetamida, mostrou o aumento da expressão gênica de TGF β -1 e PDGFR- β . Além disso, estas HSC quando tratadas com TGF β -1 resultava no aumento da fosforilação de PDGFR- β , evidenciando a relação entre estes dois fatores na promoção da fibrose hepática. Dados atuais de PARFEJEVS e colaboradores (2018) em modelo de injúria cutânea em camundongos mostraram a participação das CS produtoras de TGF β -1 no processo de cicatrização, onde a expressão gênica de PDGFR- β mostrou-se aumentada. Os autores ainda mencionaram que a sinalização PDGF-BB/PDGFR- β regula eventos críticos para a formação de tecido fibroso, como por exemplo, a ativação, migração e proliferação de células produtoras de MEC, como os miofibroblastos. Desta forma, estes trabalhos ajudam a sustentar a hipótese do envolvimento do PDGF-BB na fibrose neural da hanseníase, mediante a modulação da plasticidade das CS.

Adicionalmente, observamos que a expressão protéica de PDGFR- β em 24h pelo estímulo de TGF β -1 foi praticamente abolida após 7 dias de cultura. A ligação PDGF/PDGFR induz a

internalização do complexo receptor-ligante em endossomas. O complexo se dissocia e o receptor é reciclado para a membrana celular ou, alternativamente, o complexo receptor-ligante é degradado após a fusão dos endossomos com os lisossomos. O último caminho parece dominar na maioria dos tipos celulares estudados. Além da degradação nos lisossomos, os receptores de PDGF também sofrem degradação citoplasmática em proteassomos após ubiquitinação (HELDIN; WESTERMARK, 1999; KAZLAUSKAS, 2017). Recentemente foi demonstrado *in vitro* a internalização de PDGFR- β pela presença de *punctos* no citoplasma de pericitos derivados de tecido cerebral humano e que a longa exposição ao PDGF-BB regulava negativamente este receptor, mostrando um efeito de *feedback* negativo pela ligação PDGF-BB/PDGFR- β (GACEB et al., 2017; JANSSON et al., 2016). Dados que podem nos ajudar a entender futuramente os achados da imunofluorescência nas CS. Caso venham a ser confirmados, esses dados poderão explicar a redução da expressão protéica de PDGFR- β em 7 dias, podendo estar relacionada a um mecanismo de *feedback* negativo, uma vez que nossos dados iniciais mostraram um aumento do seu ligante (PDGF-BB) no sobrenadante no mesmo tempo de análise, quando estas células eram estimuladas com TGF- β 1 e sua combinação com o *M. leprae*.

Até o momento observamos que o *M. leprae* associado ao TGF β -1 exerce um forte estímulo nas CS, elevando a secreção de PDGF-BB e a expressão de seus receptores. Tanto o PDGF quanto o TGF β -1 são importantes reguladores da fibrose e têm sido alvo de investigações terapêuticas para desenho de novas terapias anti-fibróticas (WYNN; YUGANDHAR; CLARK, 2013). Alguns trabalhos do nosso grupo já demonstraram que o *M. leprae* tem a capacidade de aumentar os níveis de mRNA dos receptores de TGF β -1, além de aumentar a produção de TGF β -1 pelas CS ST88-14. Além disso, já demonstramos o possível envolvimento do TGF β -1 na alteração da plasticidade das CS em miofibroblastos (OLIVEIRA et al., 2005; PETITO et al., 2013).

É válido ressaltar que o PDGF-BB se liga em seu receptor PDGFR- β para promover seus efeitos fisiológicos, que compreendem desde a sua ação quimiotática recrutando outras células para o sítio da

lesão, como também a transdução do sinal que induz a proliferação e diferenciação celular de células produtoras de MEC.

Um trabalho recente com fibroblastos de cicatriz hipertrófica (um tipo de cicatrização cutânea excessiva) mostrou que ao serem estimulados com PDGF-BB (200 ng/mL) por 72h aumentavam a produção de colágeno do tipo 1 e hidroxiprolina, mediado pela ativação de PDGFR- β . Além da produção de proteínas da MEC, esta via de sinalização PDGF-BB/PDGFR- β induziu a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, mostrando mais uma vez a importância desta via no desenvolvimento da fibrose (LI; REN, 2017). Em pericitos cerebrais esta via de sinalização é importante para a sobrevivência, migração e proliferação, porém, MAKIHARA e colaboradores (2015) mostraram a participação destas células também na promoção de fibrose após acidente vascular cerebral isquêmico. Neste estudo foi utilizado modelo murino de oclusão da artéria cerebral média (MCAO), onde foi verificado o aumento de pericitos PDGFR β^+ na parede vascular dos vasos após a injúria. Além disso, estes pericitos também expressavam componentes da MEC como fibronectina e colágeno do tipo 1. Estes resultados foram confirmados utilizando camundongos *knockout* para PDGFR- β ^{+/-}, e em experimentos *in vitro* com pericitos cerebrais de ratos estimulados com PDGF-BB (10 ng/mL) por 6h, indicando que esta via de sinalização é determinante na formação de fibrose durante o reparo destes vasos.

Além do TGF β -1, o PDGF-BB parece induzir uma mudança no perfil funcional das CS ST88-14 secretando fibronectina, mecanismo este característico do processo de fibrose. Em relação ao seu fenótipo, em apenas um ensaio de imunofluorescência e um ensaio de western blotting não observamos a marcação de α -SMA, um marcador de miofibroblasto (dados não mostrados), porém se faz necessário a repetição destes ensaios para verificarmos se está havendo transdiferenciação de CS em miofibroblastos mediante o estímulo de PDGF-BB. Além disso, a análise da expressão/produção/secreção de outros componentes da MEC, como colágeno do tipo 1, também é importante para que possamos afirmar o envolvimento destas células na fibrose neural da hanseníase.

Com base nos dados do nosso grupo que mostram a importância do TGF β -1 na plasticidade das CS ST88-14 e no conjunto de dados vistos no presente trabalho com relação aos efeitos do PDGF-BB, procuramos entender se esses fatores de crescimento poderiam se intercomunicar montando um programa pró-fibrótico que possa levar a progressão do dano neural. Para caracterizar essa interação, testamos os efeitos do PDGF-BB sobre a expressão dos receptores de TGF β -1 (TGF β RI e TGF β RII). Corroborando os achados da literatura, PDGF-BB parece modular a expressão de ambos os receptores de TGF β -1 nas CS ST88-14. Esta modulação dos receptores de TGF β -1 já foi descrita na literatura em um estudo *in vitro* utilizando fibroblastos dérmicos de cicatrizes hipertróficas. O estímulo prolongado de 2 semanas, com 20 ng/mL de PDGF-AB foi capaz de elevar os níveis de mRNA dos genes *tgfbetaI* e *tgfbetaII* (TIEDE et al., 2009). Outro trabalho utilizando fibroblastos dérmicos humanos em modelo de esclerose sistêmica, mostrou que o estímulo com 10 ng/mL de PDGF (AA, AB e BB) por 24h induziu o aumento diferencial dos receptores, levando ao aumento dos níveis de mRNA de ambos os receptores, mas em relação aos níveis protéicos apenas TGF β RII foi aumentado, sugerindo a interação entre estes fatores para o estabelecimento da fibrose dérmica (CZUWARA-LADYKOWSKA et al., 2001). A modulação negativa de TGF β RI e II pelo estímulo de TGF β -1, observada em nosso modelo de estudo, faz parte de um mecanismo regulatório importante que orquestra a regulação da via de sinalização e o *turnover* destes receptores (DI GUGLIELMO et al., 2003; SHI; MASSAGUÉ, 2003).

O diagnóstico tardio da hanseníase acarreta a transmissão continuada do bacilo e aumento do risco da perda das habilidades físicas e motoras dos pacientes. Tanto a demora no aparecimento dos sintomas, quanto o atraso da política de saúde pública em desenvolver testes diagnósticos rápidos aumentam cada vez mais o estigma que esta doença causa em seus portadores. Este cenário se torna mais preocupante quando levamos em consideração os pacientes que não desenvolvem lesões de pele, e sim apenas sinais e/ou sintomas neurais, a chamada hanseníase neural pura (AGRAWAL et al., 2005; RODRIGUES et al., 2011). Estes casos dificultam ainda mais o diagnóstico clínico da hanseníase, necessitando lançar mão de diversas formas de ferramentas que possam auxiliar o diagnóstico como a

eletro-neuromiografia, baciloscopia, análise histopatológica e biologia molecular (PCR) de amostra de nervo. A biópsia de nervo é o teste padrão-ouro para detectar HNP, porém é um método muito invasivo, além de se destacar a importância da necessidade de patologistas bem treinados para diagnosticar a doença corretamente (RAO; SUNEETHA, 2016).

O PDGF-BB tem sido utilizado atualmente como um biomarcador não invasivo para diversas situações patológicas associadas à fibrose, como a fibrose hepática em pacientes com hepatite B crônica, fibrose pulmonar idiopática e sarcoidose (ZHOU et al., 2016; ZIORA et al., 2015). Em relação à hanseníase, encontramos na literatura apenas um trabalho que relaciona a doença com o PDGF. STEFANI e colaboradores (2009) identificaram um aumento significativo de PDGF-BB no plasma de pacientes com hanseníase durante o ENH, um processo inflamatório agudo que leva ao agravamento das lesões neurais nos pacientes. Curiosamente, observamos o aumento significativo de PDGF-BB no soro de pacientes HNP comparados aos pacientes NH. É válido lembrar, que dos onze pacientes selecionados para esta análise, sete apresentaram algum grau de fibrose (intensidade forte a muito forte), o que mais uma vez confirma que PDGF-BB pode estar diretamente relacionado com o processo de fibrose neural que acomete os pacientes com hanseníase, confirmando a hipótese central do nosso estudo.

A lesão do nervo na hanseníase pode ser diretamente induzida pelo *M. leprae* nos estágios iniciais da infecção, no entanto, os mecanismos imuno-mediados aumentam o comprometimento da função neural em períodos sintomáticos da doença. As CS são as que estão mais intimamente relacionadas com a injúria do nervo periférico. A sua plasticidade lhe confere a capacidade de desdiferenciação, migração, e liberação de citocinas e quimiocinas envolvidas no recrutamento de células inflamatórias (JESSEN; MIRSKY, 2016; MASAKI et al., 2013b). O MCP - 1 é uma quimiocina conhecida por ter um papel central no recrutamento de monócitos e macrófagos para o sítio do nervo lesionado (TOFARIS et al., 2002). Além disso, está relacionada com a promoção de doenças neuroinflamatórias no SNC agudas (acidente vascular cerebral, por exemplo), e crônicas (esclerose

múltipla e doença de Alzheimer, por exemplo) (CONDUCTIER et al., 2010). Esta quimiocina também induz o aumento de TGF β -1 e colágeno do tipo 1 por macrófagos CD-14⁺ circulantes favorecendo a fibrose (SAKAI et al., 2006). Em um trabalho publicado pelo nosso grupo, a expressão de MCP - 1 em amostras de biópsias de nervo de pacientes HNP foi correlacionada com a presença de fibrose. Esta observação foi feita pela comparação das alterações histopatológicas no nervo de pacientes HNP com as de pacientes NH (MEDEIROS et al., 2015). Estes resultados corroboram os nossos dados de correlação positiva de MCP - 1 e PDGF-BB em pacientes HNP e fortalecem a nossa hipótese de que PDGF-BB esteja relacionado com os diferentes graus de fibrose neural na hanseníase. Juntos estes dados fornecem base para mais estudos que utilizem o PDGF-BB como um possível forte biomarcador da fibrose e o seu grau no nervo periférico de pacientes com hanseníase, ou até mesmo para utilização como diagnóstico precoce da forma neural pura em conjunto com outros fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas.

7 Considerações finais

O presente estudo demonstrou que, além dos efeitos já descritos do TGF β -1, o PDGF-BB também pode exercer influência na plasticidade das CS ST88-14, além de juntos iniciarem um programa de indução à fibrose. Mostramos que as CS ST88-14 produzem constitutivamente PDGF-BB e que o *M. leprae* e o TGF β -1 combinados induzem o aumento desta produção *in vitro*. Além disso, *M. leprae* foi capaz de modular positivamente a expressão de PDGFR- α . O perfil funcional das CS ST88-14 foi modificado por PDGF-BB, uma vez que seu estímulo induziu o aumento de fibronectina. Além disso, observamos que o PDGF-BB pode amplificar os efeitos de TGF β -1 nas CS por aumentar a expressão de seus receptores. De fato, estes resultados evidenciam uma relação entre TGF β -1 e PDGF-BB por estimular a produção de componente da MEC e favorecer o processo de fibrose neural na hanseníase.

Nossos dados *ex vivo* utilizando soro de pacientes HNP e NH corroboram os dados *in vitro*, uma vez que os níveis de PDGF-BB se mostram correlacionados com MCP-1, uma quimiocina central para a indução de fibrose em diversas situações patológicas. Além de induzir o aumento de componentes da MEC, o MCP-1 ainda induz o aumento de MMPs que auxiliam o dano tecidual e consequente formação da fibrose. Isso ocorre devido à proporção maior de MMPs em relação aos seus TIMPs (WYNN; YUGANDHAR; CLARK, 2013). Processo este já descrito na hanseníase utilizando o modelo *in vitro* com CS humanas da linhagem ST88-14 (OLIVEIRA et al., 2010; TELES et al., 2007). Nosso estudo teve como grande objetivo trazer uma melhor compreensão da patogênese que leva à fibrose e impede a regeneração neural em pacientes com hanseníase. O conhecimento deste processo futuramente nos permitirá criar uma base para a elaboração de estratégias e intervenções para o diagnóstico, prevenção e recuperação das lesões neurais nestes pacientes.

8 Conclusões

Os dados do presente estudo nos permitem concluir que:

- As CS ST88-14 liberam PDGF-BB constitutivamente, habilitando este modelo para o nosso estudo;
- As CS estimuladas com *M. leprae* + TGF β -1 estimulam o aumento da produção de PDGF-BB;
- O *M. leprae* aumenta a expressão de PDGFR- α ;
- O PDGFR- β pode ser regulado negativamente quando as CS são expostas a altas concentrações de PDGF-BB autócrino;
- O PDGF-BB pode induzir a produção de fibronectina pelas CS independente de tempo e concentração;
- O PDGF-BB pode aumentar a expressão de TGF β RI e TGF β RII nas CS;

- Pacientes HNP apresentam níveis séricos elevados de PDGF-BB quando comparados aos pacientes NH;
- Os níveis séricos de PDGF-BB de pacientes HNP estão positivamente correlacionados com o aumento sérico de MCP - 1;
- Os níveis séricos de PDGF-BB de pacientes NH estão negativamente correlacionados com o aumento de MCP - 1.

9 Referências

- AGRAWAL, A. et al. **Neurological manifestations of Hansen's disease and their management** *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 2005.
- ALVES, T. R. et al. Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. **Experimental Cell Research**, 2011.
- AMADEU, T. P. et al. Cutaneous Wound Healing: Myofibroblastic Differentiation and in Vitro Models. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, 2003.
- ANDRADE, P. R. et al. Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 75, n. 3, p. 272–283, 2016.
- ANTUNES, S. L. G. et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: Obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2012.
- ARTHUR-FARRAJ, P. J. et al. c-Jun Reprograms Schwann Cells of Injured Nerves to Generate a Repair Cell Essential for Regeneration. **Neuron**, 2012.
- AVANZI, C. et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. **Science**, 2016.
- BADACHE, A.; DE VRIES, G. H. Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB. **Journal of Cellular Physiology**, v. 177, n. 2, p. 334–342, nov. 1998.
- BELIN, S.; ZULOAGA, K. L.; POITELON, Y. Influence of Mechanical Stimuli on Schwann Cell Biology. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2017.
- BONNER, J. C. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 4, p. 255–273, 2004.
- BORKHAM-KAMPHORST, E. et al. Pro-fibrogenic potential of PDGF-D in liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 46, n. 6, p. 1064–1074, jun. 2007.

BRASIL. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS, M. DA S. [Neglected diseases: the strategies of the Brazilian Ministry of Health]. **Revista de saude publica**, v. 44, n. 1, p. 200–2, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia para o controle da hanseníase**. [s.l: s.n.].

BREEN, D. P. et al. Leprosy: A ‘common’ and curable cause of peripheral neuropathy with skin lesions. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 45, n. 1, p. 38–42, 2015.

BUHL, E. M. et al. The role of PDGF-D in healthy and fibrotic kidneys. **Kidney International**, 2016.

CHAABANE, S. C. et al. PDGF-D expression is down-regulated by TGF β in fibroblasts. **PLoS ONE**, 2014.

CHAN, M. C. et al. Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGF β family of signalling pathways by control of miR-24 expression. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 3, p. 559–573, 2010.

CHANG, R. B. et al. Vagal sensory neuron subtypes that differentially control breathing. **Cell**, 2015.

CHEN, P. H.; UNGER, V.; HE, X. Structure of Full-Length Human PDGFR β Bound to Its Activating Ligand PDGF-B as Determined by Negative-Stain Electron Microscopy. **Journal of Molecular Biology**, 2015.

CHEN, P.; PIAO, X.; BONALDO, P. Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. **Acta Neuropathologica**, 2015.

COELHO, L. L. et al. Trypanosoma cruzi activates mouse cardiac fibroblasts in vitro leading to fibroblast-myofibroblast transition and increase in expression of extracellular matrix proteins. **Parasites and Vectors**, 2018.

COHEN, R. I.; MCKAY, R.; ALMAZAN, G. Cyclic AMP regulates PDGF-stimulated signal transduction and differentiation of an immortalized optic-nerve-derived cell line. **Journal of Experimental Biology**, 1999.

CONDUCTIER, G. et al. **The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases** **Journal of Neuroimmunology**, 2010.

COUTO DAL SECCO, R. G. et al. A synopsis of the history of Hansen's disease. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, p. 10–13, 2017.

CZUWARA-LADYKOWSKA, J. et al. Differential regulation of transforming growth factor-beta receptors type I and II by platelet-derived growth factor in human dermal fibroblasts. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 569–575, 2001.

DANG, I.; DEVRIES, G. H. Schwann cell lines derived from malignant peripheral nerve sheath tumors respond abnormally to platelet-derived growth factor-BB. **Journal of Neuroscience Research**, v. 79, n. 3, p. 318–328, 1 fev. 2005.

DE LIMA, C. S. et al. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells. **FEMS Microbiology Letters**, 2009.

DI GUGLIELMO, G. M. et al. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. **Nature cell biology**, 2003.

DÍAZ ACOSTA, C. C. et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 7, p. e1007151, 6 jul. 2018.

DOETSCH, F. The glial identity of neural stem cells. **Nature Neuroscience**, 2003.

FRASER, D.; WAKEFIELD, L.; PHILLIPS, A. Independent regulation of transforming growth factor-beta1 transcription and translation by glucose and platelet-derived growth factor. **Am J Pathol**, 2002.

FREDRIKSSON, L.; LI, H.; ERIKSSON, U. The PDGF family: Four gene products form five dimeric isoforms. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 4, p. 197–204, 2004.

FUKUTOMI, Y. et al. Temperature dependency for survival of *Mycobacterium leprae* in macrophages. **Nihon Hansenbyo.Gakkai Zasshi**, 2009.

GACEB, A. et al. Pericytes secrete pro-regenerative molecules in response to platelet-derived growth factor-BB. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, p. 0271678X1771964, 2017.

GAUDET, A. D.; POPOVICH, P. G.; RAMER, M. S. Wallerian degeneration: Gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. **Journal of Neuroinflammation**, 2011.

GOETHALS, S. et al. Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. **GLIA**, 2010.

GOLDSTEIN, E. Z. et al. A silver lining of neuroinflammation: Beneficial effects on myelination. **Experimental Neurology**, 2016.

GRANT, G. A; GOODKIN, R.; KLIOT, M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. **Neurosurgery**, 1999.

GRIFFIN, J. W.; THOMPSON, W. J. Biology and pathology of nonmyelinating schwann cells. **GLIA**, 2008.

HEALTH PROTECTION AGENCY. Memorandum on Leprosy 2012. 2012.

HELDIN, C.-H.; WESTERMARK, B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1283–1316, 1999a.

HELDIN, C.-H.; WESTERMARK, B. Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. **Physiological Reviews**, 1999b.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, 1981.

HYE-RYONG SHIM, A. et al. Structures of a platelet-derived growth factor/propeptide complex and a platelet-derived growth factor/receptor complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2010.

JANSSON, D. et al. Interferon- γ blocks signalling through PDGFR β in human brain pericytes. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, p. 249, 2016.

JARDIM, M. R. et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. **Journal of Neurology**, 2003.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Nat Rev Neurosci**, 2005.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Negative regulation of myelination: Relevance for development, injury,

and demyelinating disease. **GLIA**, 2008.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. **Journal of Physiology**, 2016.

JESTER, J. V. et al. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. **Experimental Eye Research**, v. 75, n. 6, p. 645–657, 2002.

JIN, S. H.; AN, S. K.; LEE, S. B. The formation of lipid droplets favors intracellular Mycobacterium leprae survival in SW-10, non-myelinating Schwann cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2017.

KANAAN, R.; STRANGE, C. Use of multitarget tyrosine kinase inhibitors to attenuate platelet-derived growth factor signalling in lung disease. **European Respiratory Review**, v. 26, n. 146, 2017.

KAZLAUSKAS, A. PDGFs and their receptors. **Gene**, v. 614, p. 1–7, 2017.

KIM, D.-S. et al. Rapid generation of OPC-like cells from human pluripotent stem cells for treating spinal cord injury. **Experimental & Molecular Medicine**, 2017.

KLINKHAMMER, B. M.; FLOEGE, J.; BOOR, P. PDGF in organ fibrosis. **Molecular Aspects of Medicine**, 2017.

KOCABAYOGLU, P. et al. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. **Journal of Hepatology**, 2015.

KORDES, C. et al. Differential and synergistic effects of platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor-beta1 on activated pancreatic stellate cells. **Pancreas**, v. 31, n. 2, p. 156–67, 2005.

LEASK, A. Getting to the heart of the matter: New insights into cardiac fibrosis. **Circulation Research**, v. 116, n. 7, p. 1269–1276, 2015.

LEWANDOWSKI, S. A. et al. Pharmacological targeting of the PDGF-CC signaling pathway for blood–brain barrier restoration in neurological disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, 2016.

LI, Y.; REN, H. Endostatin inhibits fibrosis by modulating the PDGFR/ERK signal pathway: an in vitro study. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**, 2017.

LINDENLAUB, T.; SOMMER, C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. **Acta Neuropathologica**, 2003.

LIU, Z. et al. Specific Marker Expression and Cell State of Schwann Cells during Culture In Vitro. **PLOS ONE**, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, 2001.

LOBSIGER, C. S. et al. Platelet-derived growth factor-BB supports the survival of cultured rat Schwann cell precursors in synergy with neurotrophin-3. **Glia**, v. 30, n. 3, p. 290–300, 2000.

MADIGAN, C. A. et al. A Macrophage Response to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. **Cell**, 2017.

MAKIHARA, N. et al. Involvement of platelet-derived growth factor receptor β in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. **Experimental Neurology**, 2015.

MAKINO, K. et al. Blockade of PDGF Receptors by Crenolanib Has Therapeutic Effect in Patient Fibroblasts and in Preclinical Models of Systemic Sclerosis. **Journal of Investigative Dermatology**, 2017.

MASAKI, T. Polarization and Myelination in Myelinating Glia. **ISRN Neurology**, 2012.

MASAKI, T. et al. Reprogramming diminishes retention of Mycobacterium leprae in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. **F1000Research**, 2013a.

MASAKI, T. et al. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. **Cell**, v. 152, n. 1–2, p. 51–67, 2013b.

MASAKI, T. et al. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. **Cell**, 2013c.

MATTOS, K. A. et al. Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: A

putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, 2011.

MATTOS, K. A. et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cellular Microbiology**, 2014.

MEDEIROS, M. F. et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, 2015.

MEDEIROS, R. C. A. et al. Subversion of schwann cell glucose metabolism by Mycobacterium leprae. **Journal of Biological Chemistry**, 2016.

MEKALA, S. et al. Cellular crosstalk mediated by platelet-derived growth factor BB and transforming growth factor β during hepatic injury activates hepatic stellate cells. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, p. 1–14, 20 mar. 2018.

MIKO, T. L.; LE MAITRE, C.; KINFU, Y. Damage and regeneration of peripheral nerves in advanced treated leprosy. **The Lancet**, v. 342, n. 8870, p. 521–525, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Ministério da Saúde: Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2016.

MISCH, E. A. et al. Leprosy and the Human Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2010.

MONK, K. R.; FELTRI, M. L.; TAVEGGIA, C. New insights on schwann cell development. **GLIA**, 2015.

MORGADO DE ABREU, M. A. M. et al. Mycobacterium leprae is identified in the oral mucosa from paucibacillary and multibacillary leprosy patients. **Clinical Microbiology and Infection**, 2014.

MORONCINI, G. et al. Epitope specificity determines pathogenicity and detectability of anti-platelet-derived growth factor receptor α autoantibodies in systemic sclerosis. **Arthritis and Rheumatology**, 2015.

NAMGUNG, U. The role of schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration. **Cells Tissues Organs**, 2014.

NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–524, out. 2000.

NOON, L. A; LLOYD, A. C. Hijacking the ERK signaling pathway: *Mycobacterium leprae* shuns MEK to drive the proliferation of infected Schwann cells. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, 2005.

OLIVEIRA, A. L. et al. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *mycobacterium leprae* stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 2010.

OLIVEIRA, R. et al. Cytokines and *Mycobacterium leprae* Induce Apoptosis in Human Schwann Cells. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 64, n. 10, p. 882–890, 2005.

OOI, W. W.; SRINIVASAN, J. Leprosy and the peripheral nervous system: Basic and clinical aspects. **Muscle & Nerve**, 2004.

ORDOVAS-MONTANES, J. et al. The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease. **Trends in Immunology**, 2015.

PAINTER, M. W. et al. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. **Neuron**, 2014.

PARFEJEVS, V. et al. Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. **Nature Communications**, 2018.

PETITO, R. B. et al. Transforming Growth Factor- β May Be a Key Mediator of the Fibrogenic Properties of Neural Cells in Leprosy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 72, n. 4, p. 351–365, 2013.

POLYCARPOU, A.; WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, 2017.

QUINTES, S. et al. Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 2010.

RAFFE, S. F. et al. Diagnosis and Treatment of Leprosy Reactions in Integrated Services - The Patients' Perspective in Nepal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. e2089, 7 mar. 2013.

RAMBUKKANA, A. et al. Contact-dependent demyelination by Mycobacterium leprae in the absence of immune cells. **Science**, 2002.

RAMBUKKANA, A. Mycobacterium leprae-induced demyelination: A model for early nerve degeneration. **Current Opinion in Immunology**, 2004.

RAO, PN.; SUNEETHA, S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, 2016.

REAL, C. et al. The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. **International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 151–159, 2005a.

REAL, C. et al. The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. **International Journal of Developmental Biology**, 2005b.

RIDLEY, D. S. & J. W. . Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. **Nature**, v. 33, n. 3, p. 1215, 1966.

RODRIGUES, L. C. et al. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet. Infectious diseases**, 2011.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 6, p. 464–470, 2011.

SAKAI, N. et al. MCP-1/CCR2-dependent loop for fibrogenesis in human peripheral CD14-positive monocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, 2006.

SALZER, J. L. Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. **Journal of the peripheral nervous system : JPNS**, 2012.

SARRAZY, V. et al. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. **Wound Repair and Regeneration**, 2011.

SATO, N. et al. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. **Journal of Dermatological Science**, 2007.

SCOLLARD, D. M. et al. Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association**, 1994.

SCOLLARD, D. M. et al. The Continuing Challenges of Leprosy The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006.

SCOLLARD, D. M. The biology of nerve injury in leprosy. **Leprosy review**, v. 79, n. 3, p. 242–253, 2008.

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 46–54, 2015a.

SCOLLARD, D. M.; TRUMAN, R. W.; EBENEZER, G. J. Mechanisms of nerve injury in leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 46–54, 2015b.

SHI, Y.; MASSAGUÉ, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. **Cell**, 2003.

SILLO, S. et al. A temporal and sociocultural exploration of the stigma experiences of leprosy patients in Brazil. **Lepr Rev**, v. 87, p. 378–395, 2016.

SILVA, C. A. M. et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: Adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. **Infection and Immunity**, 2013.

SILVA, W. N. et al. Role of Schwann cells in cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, n. 55, 11 ago. 2018.

SIQUEIRA MIETTO, B. et al. Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery

after Peripheral Nerve Injury. **Journal of Neuroscience**, 2015.

SPIERINGS, E. et al. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of schwann cells, T cells and Mycobacterium leprae. **Immunology and Cell Biology**, 2000.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 75, 2009.

TANG, Y. et al. PDGF, NT-3 and IGF-2 in combination induced transdifferentiation of muscle-derived stem cells into Schwann cell-like cells. **PLoS ONE**, 2014.

TAPINOS, N.; OHNISHI, M.; RAMBUKKANA, A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. **Nature Medicine**, 2006.

TAVEGGIA, C. et al. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. **Neuron**, 2005.

TELES, R. M. B. et al. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF- α in the nerves of leprosy patients. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 12, n. 3, p. 195–204, 2007.

THIERINGER, F. et al. Spontaneous hepatic fibrosis in transgenic mice overexpressing PDGF-A. **Gene**, 2008.

TIEDE, S. et al. Basic fibroblast growth factor: A potential new therapeutic tool for the treatment of hypertrophic and keloid scars. **Annals of Anatomy**, v. 191, n. 1, p. 33–44, 2009.

TOFARIS, G. K. et al. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 2002.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2002.

TROJANOWSKA, M. Role of PDGF in fibrotic diseases and systemic sclerosis. **Rheumatology**, v. 47, n. SUPPL. 5, p. 5–7, 2009.

TRUMAN, R. Leprosy in Wild Armadillos. **Leprosy Review**, 2005.

TRUMAN, R. W.; KRAHENBUHL, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases : official organ of the International Leprosy Association**, 2001.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy. **Clinics in Dermatology**, 2007.

WHO. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. v. 93, n. 35, p. 444–456, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020: Aceleração rumo a um mundo sem Hanseníase**. [s.l.: s.n.].

WYNN, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **Journal of Clinical Investigation**, 2007.

WYNN, T. A; YUGANDHAR, V. G.; CLARK, M. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**, 2013.

YAMABE, H. et al. Platelet-derived growth factor, basic fibroblast growth factor, and interferon gamma increase type IV collagen production in human fetal mesangial cells via a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. **Nephrol Dial Transplant**, 2000.

YAO, Z.-F. et al. Transplantation of PDGF-AA-Overexpressing Oligodendrocyte Precursor Cells Promotes Recovery in Rat Following Spinal Cord Injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2017.

YING, H. Z. et al. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 6, p. 7879–7889, 2017.

ZHAO, T. et al. Platelet-derived growth factor-D promotes fibrogenesis of cardiac fibroblasts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 2013.

ZHAO, W. et al. Cardiac oxidative stress and remodeling following infarction: role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Pathology**, 2009.

ZHAO, W. et al. Platelet-derived growth factor involvement in myocardial remodeling following infarction. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2011.

ZHOU, J. et al. Serum platelet-derived growth factor BB levels: A potential biomarker for the assessment of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. **International Journal of Infectious Diseases**, 2016.

ZIORA, D. et al. Circulating concentration of markers of angiogenic activity in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. **BMC pulmonary medicine**, 2015.

ZISKIND-CONHAIM, L. Physiological and morphological changes in developing peripheral nerves of rat embryos. **Brain Res**, 1988.