

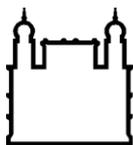
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PAPEL DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO1) NA  
NEUROPATIA HANSENIANA

MYLENA MASSENO DE PINHO PEREIRA

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*MYLENA MASSENO DE PINHO PEREIRA*

Papel da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO1) na neuropatia hanseniana

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

**Orientadora:** Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

**RIO DE JANEIRO**

Fevereiro de 2020

Masseno de Pinho Pereira, Mylena.

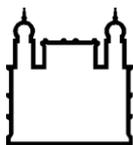
Papel da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO1) na neuropatia hanseniana /  
Mylena Masseno de Pinho Pereira. - Rio de janeiro, 2020.  
79 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia  
Parasitária, 2020.

Orientadora: Roberta Olmo Pinheiro.

Bibliografia: f. 66-79

1. Indoleamina 2,3 dioxigenase. 2. Via das quinureninas. 3. Célula de Schwann. 4.  
Mycobacterium leprae. 5. Neuropatia hanseniana. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***AUTOR: MYLENA MASSENO DE PINHO PEREIRA***

### **PAPEL DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO1) NA NEUROPATIA HANSENIANA**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro**

**Aprovada em: 18 / 02 / 2020**

#### **EXAMINADORES:**

**Dra. Marcia de Berredo Pinho Moreira – Presidente e Titular**

Laboratório de Microbiologia Celular e Molecular / IOC - FIOCRUZ

**Dr. Vinicius de Frias Carvalho – Titular**

Laboratório de Inflamação / IOC - FIOCRUZ

**Dra. Luciana Silva Rodrigues – Titular**

Faculdade de Ciências Médicas / UERJ

**Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes – 1º suplente**

Laboratório de Interdisciplinar de Pesquisas Médicas / IOC - FIOCRUZ

**Dr. Robson Vital – 2º suplente**

Faculdade de Ciências Médicas / UERJ

Rio de Janeiro, 18 de fevereiro de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais por sempre incentivarem minhas escolhas, por todo amor e compreensão, e por todo esforço e dedicação à minha formação.

Amo vocês;

À minha orientadora, Dra. Roberta Olmo Pinheiro, por todo carinho e dedicação com nosso trabalho e pela oportunidade de realizar meu mestrado;

À Dra Danuza Esquenazi, que me acolheu como aluna de iniciação científica no laboratório de Hanseníase, e por estar sempre disposta a ajudar nos momentos que precisei;

Aos alunos de pós-graduação e amigos Pedro Henrique Lopes, Katherine Kelda, Julia Leal e Dilzamar Veloso pela amizade e ensinamentos diários;

Às alunas de doutorado e pós-doutorado Tatiana Silva, Rhana Prata, Mariana Martins e Jéssica Paixão, por toda a ajuda e contribuição aos meus experimentos;

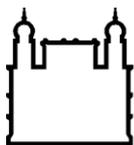
A todos os integrantes do laboratório de hanseníase (LAHAN) que se dispuseram a me ajudar, de alguma forma, nas atividades do dia a dia sejam elas técnicas ou científicas;

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

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite;

À pós-graduação em Biologia Parasitária;

Ao CNPq e ao IOC pelo suporte financeiro para que esta pesquisa fosse possível.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

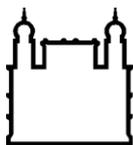
### PAPEL DA ENZIMA INDOLEAMINA 2,3 DIOXIGENASE (IDO1) NA NEUROPATIA HANSENIANA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Mylena Masseno de Pinho Pereira**

A hanseníase é uma doença infecciosa, desmielinizante, que pode levar à incapacidades e deformidades físicas permanentes. Dados anteriores demonstraram que *Mycobacterium leprae*, o agente etiológico da doença, consegue modular a biologia das células de Schwann. Um ponto ainda não elucidado é se o dano neural na hanseníase é causado diretamente pelo bacilo ou se é dependente do infiltrado inflamatório. Sabe-se que durante os episódios reacionais, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , pode contribuir para o incremento do dano neural por um mecanismo ainda desconhecido e, uma correlação positiva entre concentrações séricas de TNF- $\alpha$  e desmielinização em pacientes com hanseníase já foi demonstrada. IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são citocinas capazes de induzir a expressão de Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO1), enzima chave na regulação da via das quinureninas, em diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Diversos estudos envolvendo patologias do sistema nervoso central apontam que as quinureninas produzidas pela degradação do triptofano podem ter uma função neurotóxica, mas pouco se sabe sobre o envolvimento de IDO1 e seus metabólitos na patogênese de doenças do sistema nervoso periférico. O presente estudo teve como objetivo avaliar a possível contribuição de IDO1 e seus metabólitos na neuropatia hanseniana. Inicialmente foi demonstrado que *M. leprae* aumenta a expressão de IDO1 em células de Schwann primárias e da linhagem ST88-14. No entanto, o bacilo não é capaz de aumentar a atividade de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14. Foi observado que as citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  isoladamente não são capazes de induzir a expressão proteica de IDO1, mas aumentam significativamente sua atividade em células ST88-14. Em associação com *M. leprae*, IFN- $\gamma$  exerce um forte estímulo na indução da atividade enzimática de IDO1. A infecção com *M. leprae* diminui a expressão gênica de Quinurenina aminotransferase II (*AADAT*), sugerindo que o mesmo possa estar direcionando a via para a produção de metabólitos neurotóxicos como o ácido quinolínico (QUINA), 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA). A análise de viabilidade celular demonstrou que 3-HAA é capaz de induzir apoptose em células ST88-14 e, a análise por ELISA, dos sobrenadantes de 24h de cultura, demonstrou que *M. leprae* viável induz aumento na concentração do metabólito ácido quinurênico (KYNA) que é significativamente reduzida na presença de IFN- $\gamma$ , enquanto IFN- $\gamma$  aumenta significativamente a concentração de QUINA, principalmente quando associado à *M. leprae* morto. Foi observado um aumento na atividade de IDO1 em soro de pacientes com neuropatia hanseniana em relação a pacientes com outras neuropatias periféricas. Uma correlação positiva foi observada entre a atividade de IDO1 e a gravidade do dano neural, conforme avaliado pelo exame de eletroneuromiografia. Em conjunto, os dados apresentados sugerem o envolvimento da via das quinureninas no dano neural na hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ROLE OF THE INDOLEAMINE 2,3 DIOXYGENASE (IDO1) ENZYME IN LEPROSY NEUROPATHY

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

**Mylena Masseno de Pinho Pereira**

Leprosy is an infectious, demyelinating disease that can lead to permanent physical disabilities and deformities. Previous data demonstrated that *Mycobacterium leprae*, the etiologic agent of the disease, can modulate the biology of Schwann cells. An unclear point is whether the neural damage in leprosy is caused directly by the bacillus or if it is dependent on the inflammatory infiltrate. It is known that during the reactional episodes, the increase in proinflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , can contribute to the increase in neural damage by a still unknown mechanism. Altogether, a positive correlation between serum TNF- $\alpha$  concentrations and demyelination in leprosy patients has been demonstrated. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are cytokines able of inducing the expression of Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO1), a key enzyme in the regulation of the kynurenine pathway, in several cell types such as monocytes, macrophages and dendritic cells. Several studies involving pathologies of the central nervous system indicate that the kynurenines produced by the degradation of tryptophan may have a neurotoxic function, but little is known about the involvement of IDO1 and its metabolites in the pathogenesis of diseases of the peripheral nervous system. The present study aimed to evaluate the possible contribution of IDO1 and its metabolites in leprosy neuropathy. Initially, it was demonstrated that *M. leprae* increases the expression of IDO1 in primary and ST88-14 Schwann cell lineage. However, the bacillus is not able to increase the IDO1 activity in ST88-14 Schwann cells. It was observed that the proinflammatory cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  alone are not able to induce protein expression of IDO1, but significantly increase their activity in ST88-14 cells. In association with *M. leprae*, IFN- $\gamma$  exerts a strong stimulus in inducing the enzymatic activity of IDO1. Infection with *M. leprae* decreases the gene expression of kynurenine aminotransferase II (*AADAT*), suggesting that it may be directing the pathway for the production of neurotoxic metabolites such as quinolinic acid (QUINA), 3-hydroxykynurenine (3-HK) and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA). Cell viability analysis demonstrated that 3-HAA is capable of inducing apoptosis in ST88-14 cells, and ELISA analysis of 24h culture supernatants demonstrated that viable *M. leprae* induces an increase in the concentration of the kynurenine acid metabolite (KYNA) which is significantly reduced in the presence of IFN- $\gamma$ , while IFN- $\gamma$  significantly increases the QUINA concentration, especially when associated with irradiated *M. leprae*. An increase in IDO1 activity was observed in the serum of patients with leprosy neuropathy, but not in the serum of patients with other peripheral neuropathies. A positive correlation was observed between IDO1 activity and the severity of neural damage, as assessed by electroneuromyography examination. Taken together, the data presented here suggest the involvement of the kynurenine pathway in neural damage in leprosy.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VI</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 A hanseníase</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Epidemiologia .....	1
1.1.2 <i>Mycobacterium leprae</i> .....	2
1.1.3 Mecanismos de Transmissão .....	4
1.1.4 Formas Clínicas .....	5
1.1.5 Diagnóstico e Tratamento.....	8
<b>1.2 A neuropatia hanseniana</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 Diagnóstico da neuropatia hanseniana</b> .....	<b>13</b>
<b>1.4 Tratamento da neuropatia hanseniana</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5 Mecanismos de patogênese do dano neural</b> .....	<b>16</b>
<b>1.6 Importância imunomoduladora deIDO1 e sua relevância na Hanseníase</b> .....	<b>22</b>
<b>1.7 Indoleamina 2,3 dioxigenase no sistema nervoso</b> .....	<b>23</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>27</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Pacientes e amostras clínicas</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2 <i>M. leprae</i> e reagentes</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3 Análise de Microarranjo</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4 Cultura de célula de Schwann ST88-14</b> .....	<b>35</b>
<b>4.5 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)</b> .....	<b>36</b>
<b>4.6 Imunofluorescência</b> .....	<b>36</b>
<b>4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)</b> .....	<b>37</b>
<b>4.8 Citometria de fluxo</b> .....	<b>38</b>
<b>4.9 Viabilidade Celular</b> .....	<b>38</b>

4.10	Análise Estatística.....	39
5	RESULTADOS	40
5.1	<i>M. leprae</i> modula a expressão gênica de enzimas da via das quinureninas em células de Schwann primárias.....	40
5.2	<i>M. leprae</i> aumenta a expressão, mas não a atividade de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14.....	40
5.3	Efeito antagônico do <i>M. leprae</i> viável e IFN- $\gamma$ nos metabólitos finais da via das quinureninas .....	45
5.4	Avaliação da toxicidade dos metabólitos da via das quinureninas na célula de Schwann ST88-14.....	48
5.5	Atividade de IDO1 está aumentada no soro de pacientes com neuropatia hanseniana .....	50
5.6	Concentração de ácido quinurênico e quinolínico no soro de pacientes com neuropatia hanseniana é similar aos controles	53
6	DISCUSSÃO	57
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
8	CONCLUSÕES	65
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2018.....	2
Figura 2 - Modelo esquemático da parede celular de <i>M. leprae</i> .....	4
Figura 3 - Espectro de formas clínicas da hanseníase e resposta imune ao <i>M. leprae</i> de acordo com a classificação de Ridley e Jopling.....	7
Figura 4 - Tratamento Poliquimioterápico da Hanseníase.....	9
Figura 5 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase com grau II de incapacidade em 2018. ....	13
Figura 6 - Unidade anatômica dos nervos periféricos .....	17
Figura 7 - Interação entre <i>M. leprae</i> e a célula de Schwann. ....	19
Figura 8 - Diagrama esquemático do metabolismo do triptofano em mamíferos. ....	24
Figura 9 - Efeitos dos metabólitos neurotóxicos da via das quinureninas em neurônios glutamatérgicos. ....	25
Figura 10 - <i>M. leprae</i> é capaz de aumentar a expressão de IDO e inibir AADAT. ....	40
Figura 11 - <i>M. leprae</i> aumenta a expressão de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14.....	41
Figura 12 – Células de Schwann da linhagem ST88-14 estimuladas com IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ na presença de <i>M. leprae</i> morto aumentam a expressão de IDO1. ....	42
Figura 13 - <i>M. leprae</i> é capaz de aumentar a expressão proteica de IDO1. ....	43
Figura 14 - As citocinas IFN- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ induzem aumento na atividade de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14.....	44
Figura 15 - IFN- $\gamma$ , mas não TNF- $\alpha$ , possui capacidade sinérgica com <i>M. leprae</i> na indução de aumento da atividade de IDO1 em células de Schwann. ....	45
Figura 16 - Avaliação intracelular de KYNA e QUINA em células estimuladas/infectadas com <i>M. leprae</i> é semelhante aos controles. ....	47
Figura 17 - <i>M. leprae</i> viável aumenta a concentração KYNA, enquanto IFN- $\gamma$ aumenta a concentração de QUINA no sobrenadante de células de Schwann. ....	48
Figura 18 - 3-HAA induz apoptose em células de Schwann humanas. ....	50
Figura 19 - Atividade de IDO1 está aumentada em pacientes com neuropatia hanseniana.....	51

<b>Figura 20 - Atividade de IDO1 no soro de pacientes com neuropatia hanseniana aumenta de acordo com a gravidade do dano neural.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 21 - Atividade de IDO1 de acordo com a presença ou não de dor neural. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 22 - Concentração de KYNA e QUINA em soro de pacientes com neuropatia hanseniana é similar aos controles.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 23 - A concentração de KYNA é diretamente proporcional a atividade de IDO1 em pacientes do grupo Neural Pura.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 24 - Concentração de KYNA está aumentada no soro de pacientes com dor neural.....</b>	<b>56</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 - Classificação do grau de força muscular de acordo com as observações clínicas na hanseníase.....</b>	<b>14</b>
<b>Tabela 2 - Dados demográfico e histopatológicos dos pacientes com neuropatia hanseniana.....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 3 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes com outras neuropatias periféricas. ....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3-HAA – Ácido 3-hidroxiantranílico	NGS - Soro Normal de Cabra
3-HK - 3-hidroxiquinurenina	NMDA - receptor N-metil-D-ácido aspártico
5-HTP - 5-hidroxitriptofano	NP – Neural Pura
AADAT / KATII - quinurenina aminotransferase II	OMS - Organização Mundial de Saúde
BAAR - Bacilo Álcool-Ácido Resistente	ON – Outras Neuropatias
BB - Forma borderline-borderline	PA - Ácido Picolínico
BL - Forma borderline-lepromatoso	PB - Paucibacilar
BSA - do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>	PBS - do inglês, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
BT - Forma borderline-tuberculoide	PCR - do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
ELISA - Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	PFA - Paraformaldeído
ENH - Eritema Nodoso Hansênico	PGL-1 - do inglês, <i>Phenolic Glycolipid</i>
HPLC – do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i>	PQT – poliquimioterapia
IDO – Indoleamina 2,3 dioxigenase	pSLC - do inglês, <i>progenitor/stem-like cells</i>
IFN- $\gamma$ – Interferon gamma	QUINA – Ácido quinolínico
IL- Interleucina	ROS – do inglês, <i>reactive oxygen species</i>
KAT I - quinurenina aminotransferase I	RR - Reação Reversa
KMO - quinurenina 3-monooxigenase	SFB - Soro Fetal Bovino
Kyn – do inglês, <i>Kynurenine</i>	SNC - Sistema Nervoso Central
KYNA – Ácido quinurênico	SNP - Sistema Nervoso Periférico
LL - Forma lepromatoso-lepromatoso	TNFR1- receptor 1 de TNF
LPS - lipopolissacarídeo	TNF- $\alpha$ - do inglês, Tumor Necrosis Factor
MB – Multibacilar	TP - Tampão de Permeabilização
ML - <i>Mycobacterium leprae</i>	Treg - células T reguladoras
MMP-9 - metaloproteinase-9 de matrix	Tryp – do inglês, <i>Tryptophan</i>
MOI - multiplicidade de infecção	TT - Forma tuberculoide-tuberculoide
MS- Ministério da Saúde	XA - ácido xanturênico
mTNF -TNF- $\alpha$ ligado a membrana	

# 1 INTRODUÇÃO

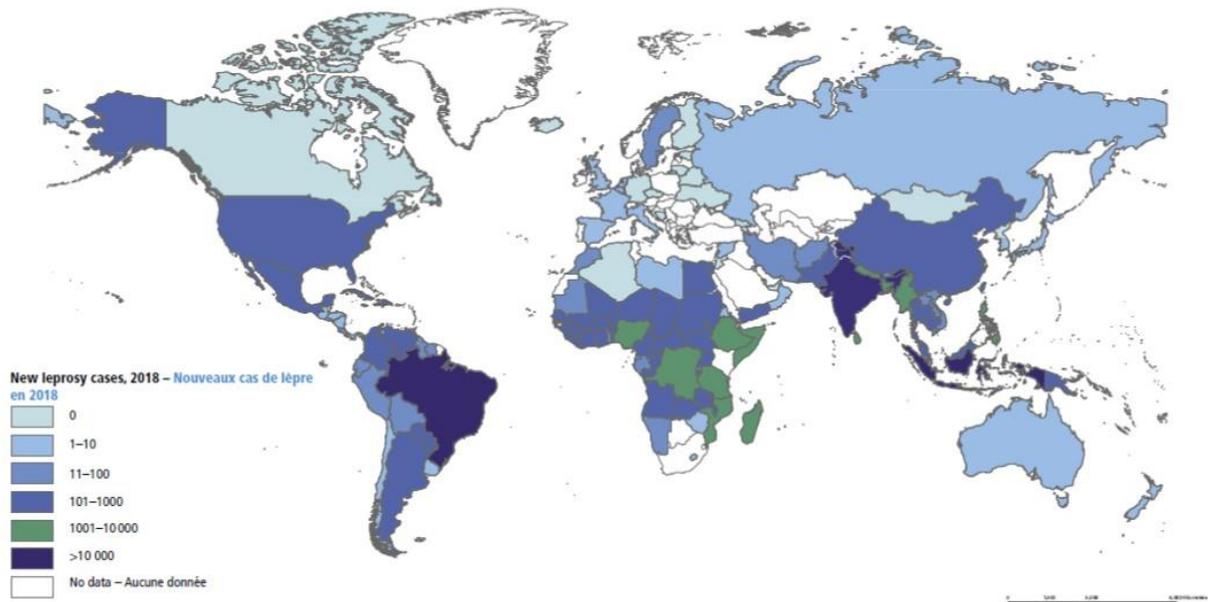
## 1.1 A hanseníase

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, causada por *Mycobacterium leprae*, bacilo intracelular obrigatório que apresenta tropismo por macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos (Pinto, 1995). Este tropismo do bacilo, somado à resposta imunológica do hospedeiro, resulta em danos teciduais. Desse modo, a doença é caracterizada por lesões na pele e nervos periféricos, causando perda de sensibilidade, atrofias, paresias e deformações principalmente nos pés, mãos e face (Lockwood & Suneetha, 2005). Tais manifestações estão associadas ao estigma da doença.

### 1.1.1 Epidemiologia

A hanseníase atinge principalmente a população mais pobre, estando relacionada às condições precárias de saneamento e acesso aos serviços de saúde, sendo considerada, portanto, uma doença negligenciada (OMS, 2013). Em 1991, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu uma meta para a eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública, sendo considerada como eliminação uma taxa de prevalência inferior a 1 caso para cada 10.000 indivíduos (Lockwood & Suneetha, 2005).

Em 2018, mundialmente, a prevalência da doença apresentou uma diminuição de 4%, enquanto a incidência apresentou uma queda de 1,2%. Atualmente, a prevalência da doença é de 0,24 casos por 10.000 habitantes e a incidência é de 2,74 casos por 100.000 habitantes. No entanto, uma análise do número de novos casos por região mostrou um aumento de notificações nas Américas, Europa e Mediterrâneo Oriental (OMS, 2019). Segundo a OMS, tal aumento foi decorrente de campanhas ativas que visam melhorar a detecção de casos e triagem de contatos. Ainda assim, alguns países apresentam elevados números de novos casos. Brasil, Índia e Indonésia contribuíram com 79,6% dos novos casos da doença no mundo em 2018 (OMS, 2019). A Figura 1 representa a distribuição global de novos casos de hanseníase relatados em 2018.



**Figura 1 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2018.**

Extraído de OMS, 2019

No Brasil, houve uma diminuição considerável da taxa de prevalência nas últimas duas décadas passando de 19,54 casos por 10.000 habitantes em 1990 para 1,01 em 2015, no entanto, nos últimos três anos essa taxa sofreu um aumento, chegando a 1,48 casos por 10.000 em 2018. Tal aumento ocorreu em todas as regiões do país, sendo mais evidente na região centro-oeste (4,54), seguida pela região norte (3,34) (MS, 2019a).

O número de novos casos de hanseníase no Brasil, após vários anos seguidos em queda, também apresentou um aumento nos últimos três anos, chegando a mais de 28 mil novos casos em 2018, o que representa 93% de todos os novos casos nas Américas (MS, 2019b).

### **1.1.2 *Mycobacterium leprae***

*M. leprae*, agente causador da hanseníase, foi identificado em 1873, na Noruega, por Gerhard Henrik Armauer Hansen, o mesmo pertence à família Mycobacteriaceae da ordem *Actinomycetales*. É um parasito intracelular obrigatório que infecta predominantemente macrófagos, células endoteliais e células de

Schwann, sendo a única espécie de micobactéria capaz de infectar o nervo periférico (Scollard *et al.*, 2006).

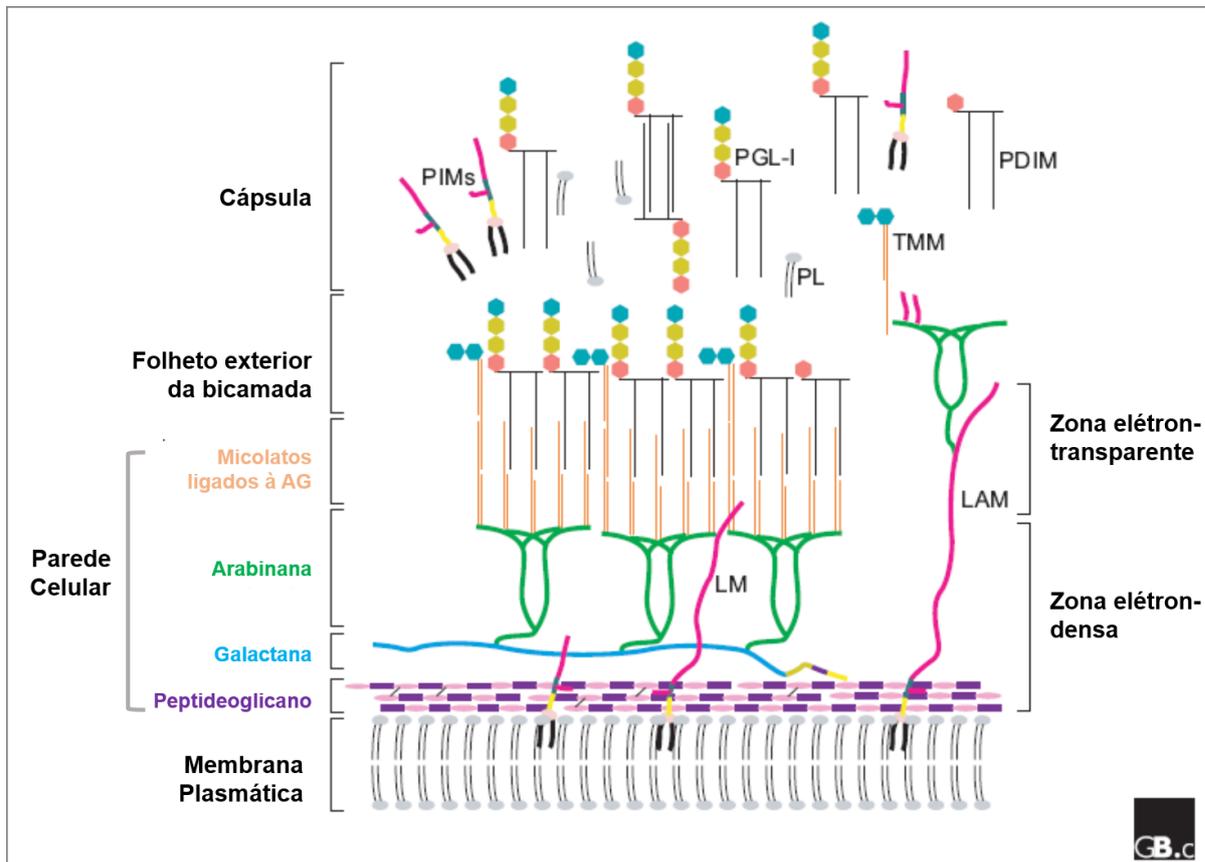
O *M. leprae* é uma bactéria microaerófila, que não apresenta estruturas locomotoras e não forma esporos, possui crescimento lento e quando observada em microscopia ótica apresenta forma de bastonete. É um bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) uma vez que se utilizando o método de Ziehl-Neelsen o bacilo é corado em vermelho pela fucsina e não sofre descoloração pela lavagem com álcool e ácido. A temperatura ótima de crescimento do *M. leprae* é abaixo de 37° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos (Shepard, 1965).

O bacilo é incapaz de crescer em meios de cultura artificiais, sendo necessário a utilização de modelos animais para sua proliferação (Scollard *et. al.*, 2006). Em 1959, Shepard desenvolveu a técnica de cultivo do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos (Shepard, 1960), e, posteriormente a Dra. Eleanor Storrs introduziu a utilização do tatu de nove bandas, *Dasyus novencintus* (Kirchheimer & Storrs, 1971). Em 2001, foi publicada a análise completa do genoma do *M. leprae*, que apresenta um tamanho de 3.3 Mb, significativamente menor do que as demais micobactérias. Acredita-se que tal redução no genoma do *M. leprae* esteja relacionada à eliminação de certas vias metabólicas e conseqüentemente à impossibilidade de cultivo *in vitro* do bacilo (Cole *et al.*, 2001).

O envelope de *M. leprae* é constituído por três compartimentos: membrana plasmática, parede celular e a cápsula e constitui 40% do peso seco da bactéria e, como para todos os membros do gênero *Mycobacterium*, contém lipídeos, glicolipídeos, proteínas e porinas. A membrana plasmática é uma bicamada assimétrica composta principalmente de fosfolipídeos e proteínas. O lipoarabinomannan (LAM), componente de *M. leprae*, encontra-se ancorado à membrana plasmática via fosfatidilinositol. A parede celular consiste de peptídeoglicana covalentemente ligada a arabinogalactana, que por sua vez se liga aos ácidos micólicos (Figura 2) (Vissa & Brennan, 2001).

O parasito apresenta uma densa cápsula de lipídeos, externa à parede celular, que é rica em PGL-1 (glicolípido fenólico específico de *M. leprae*). Sua estrutura é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico. Esta cápsula vem sendo relacionada à resistência a radicais livres, permitindo a

sobrevivência intracelular da micobactéria e limitando a penetração de drogas antimicrobianas (Hunter *et al.*, 1982).



**Figura 2 - Modelo esquemático da parede celular de *M. leprae*.**

Adaptado de Vissa & Brennan, 2001.

### 1.1.3 Mecanismos de Transmissão

A hanseníase consiste em uma doença que apresenta uma alta infectividade, uma vez que *M. leprae* é capaz de infectar um grande número de indivíduos, porém, o bacilo apresenta uma baixa patogenicidade, já que mesmo em contato com a bactéria poucos indivíduos adoecem (Scollard *et al.*, 2006).

Acredita-se que a principal fonte de infecção sejam pacientes multibacilares (MB), também conhecidos como lepromatosos, não tratados, que apresentam alta carga bacilar, entretanto, uma outra fonte de infecção possível consiste em indivíduos infectados que não apresentam manifestações clínicas, porém, assim como os pacientes MB apresentam a micobactéria na mucosa nasal (Martinez *et al.*, 2011). Enquanto nenhum bacilo é liberado a partir da pele lesionada dos pacientes

hansenianos, um grande número de micobactérias viáveis são liberadas a partir das secreções nasais de indivíduos lepromatosos (Martinez et al., 2011). Desta forma, a mucosa nasal corresponde ao principal sitio de entrada e saída do *M. leprae* estando muito relacionada ao início da infecção (Suneetha et al, 1998).

Outras possíveis formas de transmissão da hanseníase estão relacionadas à inoculação acidental, tatuagem, ou via animais vetores e/ou reservatórios (Scollard et al., 2006; Deps et al., 2008). Com relação a este último, o tatu silvestre de nove bandas (*Dasypus novencintus*) é considerado um hospedeiro natural altamente susceptível a *M. leprae*, sendo confirmada a presença de tais animais infectados no centro-sul dos Estados Unidos (Sharma et al., 2015). O impacto destes animais na infecção por *M. leprae* em humanos é difícil de ser determinado; entretanto, os tatus são um grande reservatório natural e podem ser um veículo para a exposição a grandes quantidades do bacilo (Scollard et al., 2006). No Brasil, 10,6% dos tatus examinados em um estudo realizado no estado do Espírito Santo apresentaram sorologia positiva para *M. leprae* e este mesmo estudo apontou para uma associação entre o aumento da incidência da hanseníase e o contato direto com os tatus, principalmente em decorrência da caça e alimentação com a carne de tais animais (Deps et al., 2008).

#### **1.1.4 Formas Clínicas**

O desenvolvimento da hanseníase está relacionado a fatores genéticos do hospedeiro, assim como a condições ambientais, tais como fatores nutricionais, vacinação prévia com BCG e nível de exposição ao bacilo. A hanseníase é uma doença que apresenta um amplo espectro clínico, com características específicas que não podem ser explicadas pela variedade genética do patógeno, visto que esta é extremamente baixa, sendo assim, o principal fator para o desenvolvimento das diferentes formas da doença parece estar relacionado à resposta imune do hospedeiro ao bacilo (Moraes et al., 2006). Uma vez infectado pelo bacilo de Hansen, o indivíduo pode evoluir para a cura espontânea ou desenvolver a doença, sendo que devido à baixa patogenicidade do bacilo, menos de 5% dos indivíduos infectados são susceptíveis à hanseníase (Scollard et al., 2006).

Em 1953, no congresso Internacional de Madri, foi proposta uma classificação que dividia o espectro clínico da doença em duas formas: a tuberculóide, que envolve lesões localizadas e baciloscopia negativa, e a virchowiana, em que as lesões encontram-se disseminadas e a baciloscopia é positiva. Porém, em 1966, Ridley e

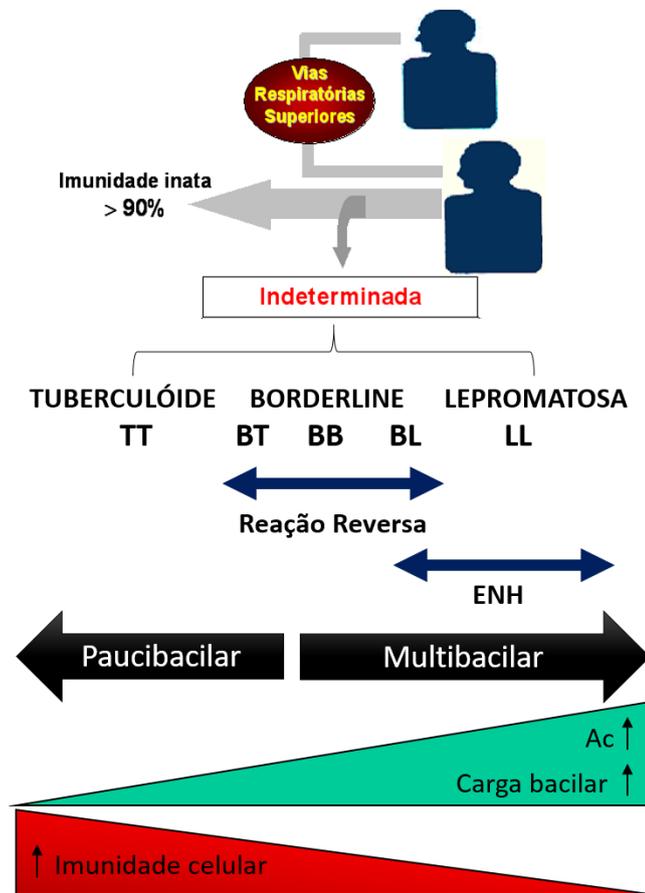
Jopling propuseram uma nova classificação levando em consideração a imunidade do hospedeiro em relação ao bacilo, que passou a ser amplamente aceita principalmente no meio científico. Nesta nova classificação, além de duas formas polares da doença (tuberculóide e lepromatosa), há três formas intermediárias classificadas como *borderlines* (Ridley & Jopling, 1966).

A forma tuberculóide (TT) é caracterizada por uma resposta imune celular expressiva e por lesões que se apresentam como grandes placas eritematosas, com as bordas externas elevadas, aparência áspera, sem pelos, escamosas e com perda de sensibilidade. O número de lesões é pequeno, muitas vezes sendo observada apenas uma, além disso, o nervo periférico na proximidade da lesão encontra-se espessado e doloroso. Nestes pacientes, o teste cutâneo da lepromina (reação de Mitsuda) geralmente é positivo, a presença de bacilos nas lesões é rara e na análise histopatológica da lesão cutânea são observados granulomas e infiltrado linfocitário (Ridley & Jopling, 1966).

Já em relação a forma lepromatosa (LL), as lesões iniciais apresentam-se como pápulas e máculas pequenas e com bordas vagas, as lesões são múltiplas e geralmente não é observado o espessamento do nervo periférico. A medida que a doença progride comumente observa-se a presença de edemas nos membros inferiores, aprofundamento das linhas na testa e espessamento do nariz (face leonina), além disso, pode haver perda das sobrancelhas e cílios. O teste da lepromina costuma ser negativo devido à baixa resposta imune celular ao patógeno e, a análise histopatológica das lesões demonstra a presença de numerosos macrófagos ricos em bacilos e ausência de granulomas (Ridley & Jopling, 1966).

Com relação às formas *borderline*, que são subdivididas em *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatosa* (BL), estas encontram-se em uma posição intermediária entre os dois polos, tanto em relação à carga bacilar, como em relação a capacidade do hospedeiro em montar uma resposta imune do tipo celular ao patógeno (Figura 3; Ridley & Jopling, 1966).

Apesar de não ter sido descrita por Ridley & Jopling, uma outra forma clínica possível no curso da hanseníase é a forma neural pura, que corresponde ao desenvolvimento de neuropatia periférica (mononeuropatias simples ou múltiplas e / ou polineuropatia) na ausência de lesões cutâneas (Pannikar et al., 1983, Girdhar, 1996). A confirmação de um diagnóstico de neural pura requer identificação de *M. leprae* em um fragmento de qualquer nervo sensitivo afetado.



**Figura 3 - Espectro de formas clínicas da hanseníase e resposta imune ao *M. leprae* de acordo com a classificação de Ridley e Jopling.**

(TT, Tuberculóide Tuberculóide; BT, *Borderline* Tuberculóide; BB, Borderline Borderline; BL, Borderline Lepromatosa; LL, Lepromatosa Lepromatosa; ENH, Eritema Nodoso Hansênico; Ac, anticorpo). Adaptada de *Dermatologia - Guias de Actualización Clínica - Cilad, 2015*.

Além da variedade de formas clínicas observadas na hanseníase, outro fator que contribui para a singularidade desta doença são os episódios reacionais. Os episódios reacionais são definidos como complicações inflamatórias agudas que podem ocorrer durante o curso da hanseníase, antes, durante ou após o tratamento, podendo ser de dois tipos: Reação do tipo 1 ou Reação Reversa (RR) e Reação do tipo 2 ou Eritema Nodoso Hanseniano (ENH). A reação do tipo 1 acomete principalmente pacientes *borderline* (BT, BB e BL) e apresenta-se com endurecimento e edema de lesões já existentes, muitas vezes acompanhado de neurite progressiva causando neuropatia sensitiva e motora. Além disso, a reação do tipo 1 apresenta um curso gradual se desenvolvendo ao longo de muitas semanas. Já a reação do tipo 2 ocorre principalmente em pacientes multibacilares (LL e BL), caracterizando-se pelo aparecimento abrupto de nódulos eritematosos sem predileção por lesões já existentes. Pacientes acometidos por este tipo de reação geralmente apresentam um

quadro de febre, mal-estar e algum grau de neurite com neuropatia sensitiva e motora, sendo que o curso natural da reação dura em média de 1 a 2 semanas (Scollard et al., 2006).

### **1.1.5 Diagnóstico e Tratamento**

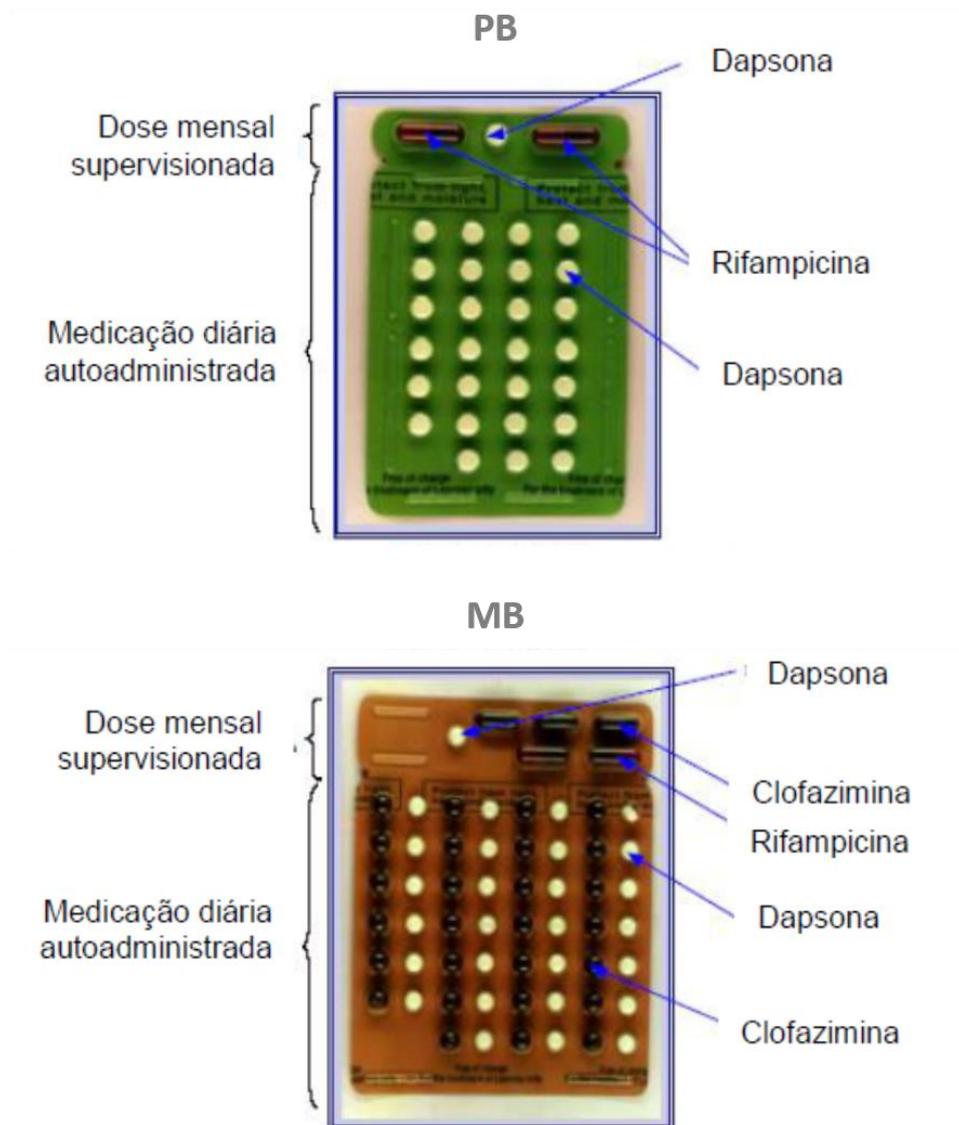
O diagnóstico da hanseníase é basicamente clínico, estando relacionado à identificação dos sintomas que incluem lesões de pele características e espessamento dos nervos periféricos com perda de sensibilidade e função motora. Além disso, alguns exames podem ser utilizados para auxiliar no diagnóstico, principalmente quando há dúvida sobre a classificação operacional do paciente. Entre tais exames encontram-se principalmente a baciloscopia e a análise histopatológica (Saunderson & Groenen, 2000).

O exame baciloscópico visa identificar a presença de bacilo em raspado intradérmico coletado nos lóbulos auriculares, cotovelos e locais de lesão cutânea visível ou áreas com alteração de sensibilidade. A baciloscopia positiva pode classificar o paciente como multibacilar independentemente do número de lesões (MS, 2010). Já em relação ao método da hematoxilina e eosina, as principais características a serem reconhecidas neste método são os padrões histológicos da resposta imunológica do hospedeiro, além do envolvimento dos nervos cutâneos e da presença de bacilos corados pelo método Ziehl-Neelsen (Scollard et al., 2006).

No Brasil, o Ministério da Saúde utiliza a classificação operacional, proposta pela OMS em 1982, para definir a estratégia terapêutica indicada para o paciente, sendo considerados paucibacilares (PB) pacientes com as formas TT e BT que apresentam índice baciloscópico inferior a 2, já pacientes LL, BL e BB que apresentam índice baciloscópico igual ou superior a 2 são classificados como multibacilares (MB). Além disso, na impossibilidade da realização da baciloscopia, os pacientes com até 5 lesões de pele são classificados como PB e os que apresentam mais de 5 lesões como MB. (MS, 2013)

O tratamento poliquimioterápico definido pela OMS desde 1981 determina a utilização de dois esquemas principais de tratamento. O esquema padrão para pacientes paucibacilares é realizado em um período de 6 meses, sendo composto por uma dose mensal supervisionada de Rifampicina 600mg em associação à Dapsona 100 mg em uma dose mensal supervisionada e uma dose diária, autoadministrada. O esquema padrão para pacientes multibacilares tem duração de 12 meses, neste

esquema além da dose mensal de Rifampicina e das doses diária e mensal de Dapsona, como descrito acima, também há a administração da Clofazimina 300mg em dose mensal supervisionada e 50 mg/dia (Figura 4). Tal esquema terapêutico possui uma importância fundamental na interrupção da cadeia de transmissão de *M. leprae*, uma vez que o paciente deixa de expelir o bacilo logo após o início do tratamento (Gallo et al., 2005).



**Figura 4 - Tratamento Poliquimioterápico da Hanseníase.**

Cartelas para tratamento das formas PB (superior) e MB (inferior) conforme preconizado pela OMS. Adaptado do Guia para o controle da hanseníase, 2002.

Com relação ao tratamento das reações, o medicamento é específico para cada tipo reacional e o tratamento poliquimioterápico não deve ser interrompido neste período. No caso da reação do tipo 1, o tratamento é realizado com corticosteróide,

geralmente prednisona 1 a 2 mg/kg ao dia (Naafs, 1996). Já na reação do tipo 2, a droga de escolha no Brasil é a talidomida de 100 a 400 mg/dia, devendo-se sempre levar em consideração seus efeitos teratogênicos durante a gestação. Em países onde a talidomida é proibida o tratamento da reação é realizado com prednisona (Ito & Handa, 2012).

## 1.2 A neuropatia hanseniana

A neuropatia hanseniana é complexa e envolve a sobreposição de eventos sensitivos agudos e crônicos, motores e/ou autonômicos (Charosky et al., 1983). A neuropatia periférica que ocorre na hanseníase corresponde a uma patologia inflamatória dos nervos. O infiltrado inflamatório dos nervos afetados pode ser composto de um granuloma epitelióide maduro ou de macrófagos carregados com bacilos álcool-ácido resistentes que exibem alterações espumosas. A patogênese da neuropatia da hanseníase está longe de ser totalmente compreendida, especialmente em relação aos mecanismos envolvidos nas lesões de fibras nervosas (Antunes et al., 2012).

O acometimento dos nervos periféricos durante a infecção por *M. leprae* está diretamente associado à capacidade do bacilo de invadir as células de Schwann, células gliais do sistema nervoso periférico, responsáveis por envolver e sustentar os axônios dos neurônios sensitivos e motores. A infecção das células de Schwann causa alterações biológicas e patológicas complexas, incluindo desmielinização, desdiferenciação e reprogramação das células de Schwann (Scollard et al. 2006). Dessa forma, a degeneração axonal após a morte de células de Schwann, a desmielinização e as mudanças ambientais induzidas pelo processo inflamatório específico podem ser o mecanismo patogênico responsável pelo comprometimento da função nervosa (Antunes et al., 2012).

O comprometimento neural pode ocorrer em qualquer momento no curso da doença, tratada ou não, inclusive após alta medicamentosa. A intensidade e extensão do dano estão relacionados com fatores como a forma clínica e o desenvolvimento de episódios reacionais. As manifestações neurológicas são classificadas em mononeurites, mononeurites múltiplas e polineurite. Nos pacientes paucibacilares são mais comuns as manifestações do tipo mononeuropatia ou mononeuropatia múltipla,

já nos pacientes multibacilares, o envolvimento dos nervos geralmente ocorre como mononeuropatia múltipla ou polineuropatia (Lau, 2019).

Em relação as manifestações clínicas, estas são resultado do acometimento de fibras autonômicas, resultando em anidrose e alopecia; alterações sensitivas, caracterizada pela perda de sensibilidade à dor, frio, calor e, mais tardiamente ao tato e; alterações motoras, com o desenvolvimento de paresia, paralisia e atrofia muscular. A evolução dos sintomas varia consideravelmente entre as manifestações neurológicas, dessa forma, a neuropatia pode ser classificada em aguda ou crônica (Garbino et al., 2003).

A neuropatia aguda ocorre de forma abrupta, sendo caracterizada por hipersensibilidade à palpação; dor intensa, que pode ser espontânea ou desencadeada pelo toque e edema das estruturas neurais, que resulta em espessamento dos nervos com alterações da função sensitiva e sensitivo-motora. Já a neuropatia crônica é mais silenciosa e de progressão lenta, com quadro inicial caracterizado por leves alterações sensitivas que evoluem para alterações sensitivo-motoras, sendo a presença de dor variável (Garbino et al., 2003).

A presença de dor nos pacientes acometidos por neuropatia é bastante comum, podendo ser dividida de acordo com sua origem em, dor nociceptiva ou neuropática. A distinção dos subtipos de dor nesses pacientes é fundamental para o tratamento adequado (Santos et al., 2016).

A dor nociceptiva é resultante da ativação direta de nociceptores da pele e de outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, é fisiológica e desencadeada por estímulo externo nocivo. No entanto, processos inflamatórios associados a alterações na função do sistema nervoso resultam em hipersensibilidade à dor, devido a redução do limiar de ativação dos nociceptores. Dessa forma, a dor passa a ter um caráter patológico (Klaumann et al., 2008). Já a dor neuropática está relacionada à disfunção ou lesão de nervos periféricos ou do sistema nervoso central, sendo, portanto, fundamentalmente de caráter patológico, caracterizando-se pela ocorrência de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia e alodinia mecânica e por frio. Tais sintomas geralmente persistem após a resolução da causa primária (Lasry-Levy et al., 2011).

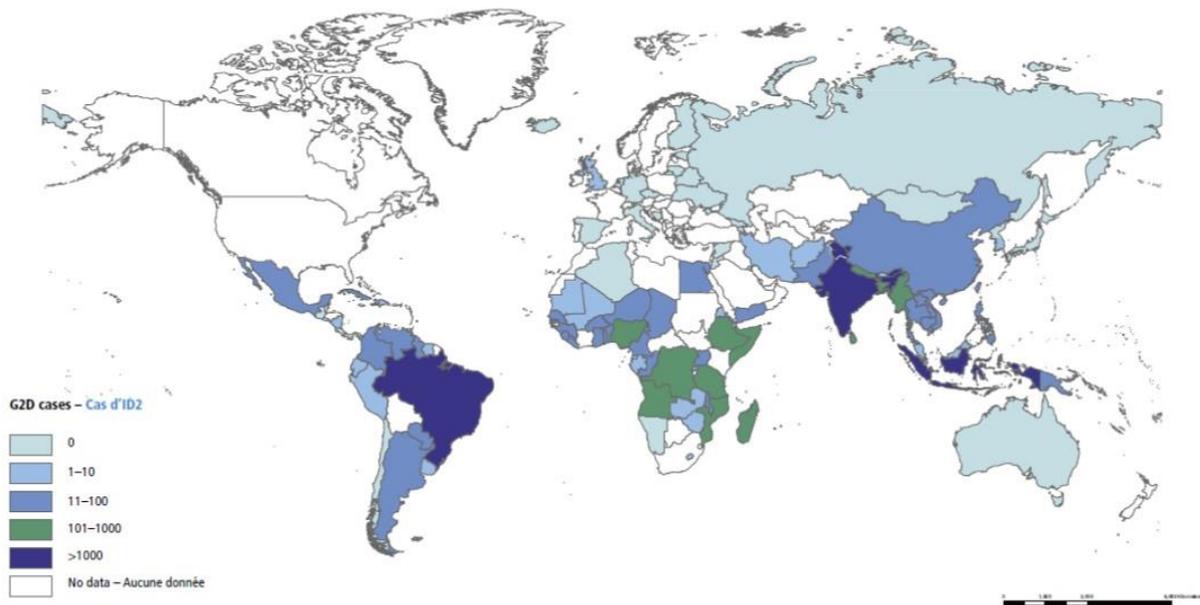
Na hanseníase, a dor nociceptiva ocorre de forma aguda estando relacionada aos quadros de neurites agudas geralmente associados aos episódios de reação. Já a dor neuropática, que corresponde ao tipo mais comum de dor na hanseníase, tem caráter crônico e, frequentemente, se apresenta como sequela de quadros de neurite

(Lasry-Levy et al., 2011). Segundo estudo realizado no Brasil, a dor pode estar presente em até 75% dos pacientes com hanseníase, sendo a dor neuropática correspondente a 85% dos casos. Além disso, o desenvolvimento de dor, tanto nociceptiva quanto neuropática, tem associação com a forma clínica (mais comum em pacientes multibacilares), ocorrência de incapacidades e episódios reacionais (Santos et al., 2016).

O dano neural causado pela hanseníase pode ocorrer de forma lenta e silenciosa, sendo de difícil identificação e tratamento (Job, 1989). Desde modo, a OMS padronizou um instrumento de avaliação das incapacidades decorrentes das lesões neurológicas, o qual considera como incapacidade somente as lesões dos olhos, pés e mãos, por serem mais frequentes, severas e diagnosticadas mais facilmente. A avaliação do grau de incapacidade física possui valores que variam de 0 (zero) a II (dois), sendo 0 a ausência de comprometimento neural nos olhos, mãos e pés, I a diminuição ou perda da sensibilidade nessas regiões, e II a presença de incapacidades e deformidades (MS, 2016).

Em 2016, a OMS lançou uma estratégia global para controle da hanseníase no período de 2016-2020 que tem como um dos objetivos principais eliminar o grau de incapacidade II entre pacientes pediátricos, e diminuir o número de novos casos de hanseníase com grau de incapacidade II para um caso por um milhão de habitantes (OMS, 2016).

Globalmente, 11.323 novos casos de hanseníase apresentaram grau II de incapacidade no momento do diagnóstico em 2018. Um total de 141 países relataram o grau de incapacidade nos casos diagnosticados (OMS, 2019). Desses, 60 países não relataram casos com grau II de incapacidade, 31 relataram de 1 a 10 casos, 33 relataram 11 a 100 casos, 14 países relataram 101 a 1000 casos e 3 países relataram mais de 1000 casos. O Brasil relatou 2109, Índia 3666 e Indonésia 1118 casos (Figura 5). No Brasil, a taxa de novos casos de hanseníase com grau II de incapacidade apresentou um aumento nos últimos três anos, passando de 8,42 casos por 1.000.000 de habitantes em 2016 para 10,08 em 2018, sinalizando que o diagnóstico precoce da doença no país continua sendo uma dificuldade (MS, 2019c).



**Figura 5 - Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase com grau II de incapacidade em 2018.**

Extraído de OMS, 2019.

### 1.3 Diagnóstico da neuropatia hanseniana

O diagnóstico da neuropatia hanseniana é basicamente clínico, sendo realizado através do exame físico dos pacientes para identificação de áreas com alterações de sensibilidade e/ou comprometimento de nervos periféricos, com alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas (MS, 2016). O Ministério da Saúde recomenda que a avaliação neurológica seja realizada no momento do diagnóstico, a cada 6 meses durante o tratamento e no momento da alta da poliquimioterapia. Também é recomendada a avaliação, com maior frequência, quando o paciente apresenta queixas e durante o desenvolvimento de neurites e reações. (MS, 2001).

O exame físico para identificação de comprometimento neural deve avaliar a forma, consistência e espessamento dos nervos, através da palpação dos troncos nervosos mais comumente acometidos (ulnar, mediano, radial, fibular e tibial); mapear a sensibilidade do tato cutâneo através da utilização do conjunto de monofilamentos de nylon de Semmes – Weintein e, testar a força de músculos mais frequentemente acometidos em membros superiores e inferiores para identificar lesões nervosas

periféricas (Garbino et al., 2003). O kit de Semmes – Weintein é utilizado para avaliar alterações da sensibilidade ao tato, e consiste em um conjunto de monofilamentos de nylon com seis diâmetros calibrados para exercer forças específicas entre 0,05g a 300g. O teste é realizado em ordem crescente do filamento mais fino para o mais grosso. O profissional aplica uma pressão na pele do paciente até obter a curvatura do filamento, e o registro é feito através da identificação do primeiro monofilamento que o paciente relata sentir. Já o teste de força muscular avalia a amplitude dos movimentos e a resistência muscular, graduando a força muscular de zero a cinco de acordo com a tabela 1 (MS, 2001).

**Tabela 1 - Classificação do grau de força muscular de acordo com as observações clínicas na hanseníase.**

GRAU DE FORÇA MUSCULAR	OBSERVAÇÃO CLÍNICA	CONDIÇÃO FUNCIONAL
5	Amplitude de movimento completo contra a gravidade e resistência máxima	Normal
4	Amplitude de movimento completa contra a gravidade e resistência manual moderada	Paresia
3	Amplitude de movimento completa contra gravidade	Paresia
2	Amplitude de movimento incompleta	Paresia
1	Evidência de contração muscular, sem movimento articular	Paresia
0	Sem evidência de contração muscular	Paralisia

Extraído de MS, 2001.

Nos casos de difícil diagnóstico ou classificação, quando há necessidade de diagnóstico diferencial de outras neuropatias periféricas e nos casos suspeitos de comprometimento neural sem lesão cutânea, recomenda-se o encaminhamento para serviços especializados, ambulatorial e/ou hospitalar. Nesses serviços, além da reavaliação pelo exame dermatoneurológico, o paciente deve passar por exames complementares como baciloscopia, histopatologia (cutânea e/ou nervo periférico sensitivo), reação em cadeia de polimerase (PCR) e eletroneuromiografia (MS, 2016).

A histopatologia é uma ferramenta valiosa no auxílio do diagnóstico da doença, principalmente quando realizada a partir de fragmento de nervo periférico. As principais características a serem reconhecidas neste método são as alterações morfológicas e padrões histológicos da resposta imunológica do hospedeiro, bem como a identificação da presença de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Desse modo, o exame histopatológico é de grande relevância para o diagnóstico da neuropatia na hanseníase, permitindo a identificação da forma neural pura da doença

e contribuindo para o diagnóstico diferencial de outras neuropatias. Além disso, pode ser uma ferramenta de monitorização pós-tratamento (Antunes et al., 2012).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) corresponde a uma técnica molecular simples e muito sensível, que permite a amplificação de ácidos nucleicos de *M. leprae*. Apesar de tal exame apresentar um custo alto, o que dificulta sua utilização na rede pública de saúde, essa técnica vem apresentando uma importância cada vez maior, principalmente, nos casos de hanseníase neural pura, quando a histopatologia é inconclusiva (Banerjee et al., 2011; Martinez et al., 2011; Rosa et al., 2013).

Outro exame importante no auxílio do diagnóstico e extensão da neuropatia na hanseníase é a eletroneuromiografia. Corresponde a um exame neurofisiológico que combina eletromiografia e estudo da condução nervosa, permitindo assim a avaliação dos componentes sensitivos e motores dos nervos assim como dos músculos. Desse modo, a eletroneuromiografia permite a identificação da localização e grau de comprometimento, além de fornecer informações sobre a fisiopatologia das lesões. O resultado dos estudos de condução permite a classificação dos pacientes em 4 grupos de acordo com os tipos de achados: 1. sem alterações; 2. lesão desmielinizante - definida quando a latência do potencial de ação muscular e/ou do nervo sensitivo é maior que o valor de referência e a redução na velocidade de condução sensitiva e/ou motora é inferior a 85% do valor de referência; 3. lesão axonal - definida quando há uma redução da amplitude do potencial de ação do componente muscular e/ou do potencial de ação do nervo sensitivo e, 4. Mista - quando há lesão axonal e desmielinizante (Jardim et al., 2004).

#### **1.4 Tratamento da neuropatia hanseniana**

Uma vez que os episódios reacionais comumente são acompanhados de neurites que agravam o dano neural, o tratamento das reações com controle das alterações imuno-inflamatórias associadas deve ser prioritário. A identificação e tratamento precoce das neurites é fundamental para prevenir as deficiências e deformidades na hanseníase (Garbino et al., 2003).

Os fármacos de escolha para o tratamento das neurites são os corticosteróides, como a prednisona, nas doses de 1 a 2 mg/kg/dia. A dosagem inicial dos fármacos deve ser mantida até a regressão dos sinais e sintomas, posteriormente, uma dose mínima pode ser mantida por alguns meses até a recuperação da função neural.

Atenção especial deve ser dada aos pacientes com quadro de ENH devido à grande porcentagem de sequelas neurológicas nesse grupo. Desse modo, a avaliação do acometimento neural e o início da corticoterapia deve ocorrer de forma rápida nos pacientes com ENH. Nesses casos, a talidomida pode ser acrescentada ao tratamento. Apesar do tratamento de escolha para as neurites ser o uso de corticosteróides por via oral, nos quadros neurológicos de difícil controle e/ou com sintomatologia muito intensa, pode-se utilizar metilprednisolona intravenosa na dose de 1 mg/dia (Garbino et al., 2003).

Em relação ao tratamento da dor neuropática, os fármacos de escolha são antidepressivos tricíclicos, neurolépticos e anticonvulsivantes (MS, 2016). Uma vez que esses fármacos são exclusivamente analgésicos de ação central, sem nenhum efeito na recuperação da função neural, é fundamental a correta identificação do tipo de dor desses pacientes (Garbino et al., 2003). Recomenda-se, portanto, a monitorização frequente da função neural para assegurar que o quadro sensitivo e motor permaneça normal ou sem piora (MS, 2016).

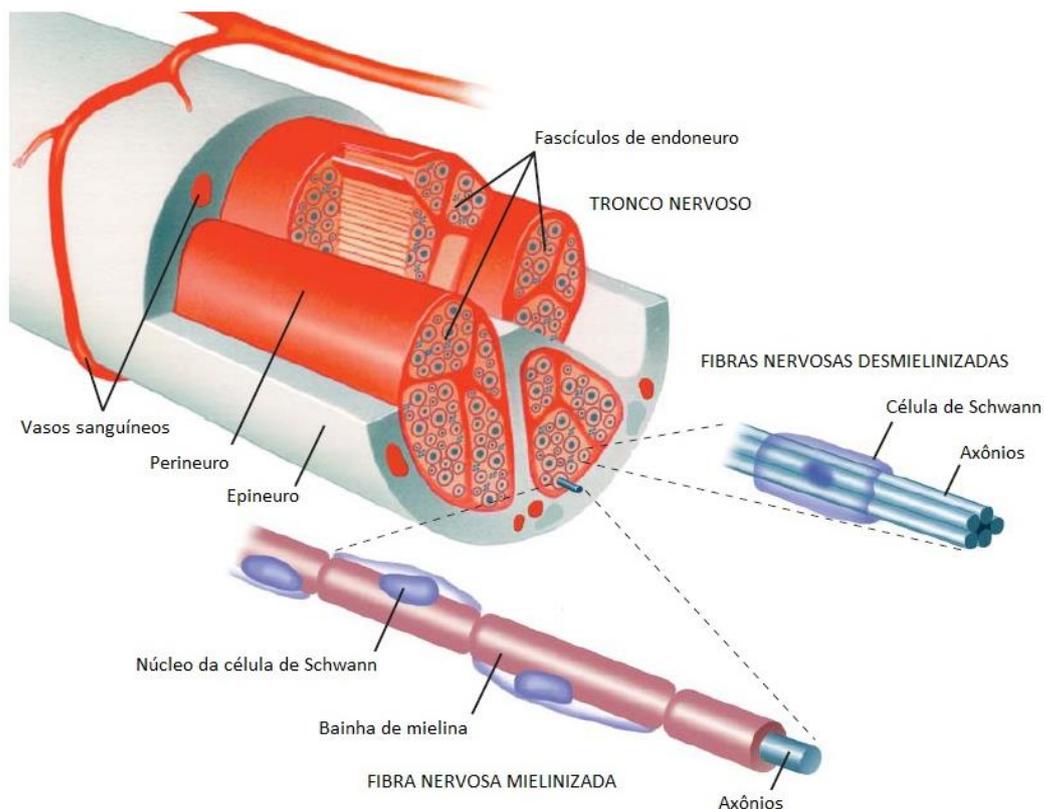
Além do tratamento medicamentoso, outra opção para a melhora do quadro neurológico desses pacientes é o tratamento cirúrgico, que deve ser considerado após o esgotamento dos recursos clínicos. O principal objetivo da atenção cirúrgica é reduzir a compressão do nervo por estruturas anatômicas constrictivas próximas. As indicações para o tratamento cirúrgico são: abscesso de nervo; neurite que não responde ao tratamento clínico dentro de quatro semanas; neurites subentrantes ou reentrantes (neurites que respondem bem ao tratamento, porém os sintomas reaparecem assim que os fármacos são retirados); neurite do nervo tibial com ou sem presença de úlcera plantar, por ser normalmente silenciosa e não responder bem ao corticoide; neurite deficitária crônica com dor crônica e, neurite com outras comorbidades associadas (glaucoma, diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica) que contraindicam o uso do corticoide (MS, 2016).

## **1.5 Mecanismos de patogênese do dano neural**

O sistema nervoso periférico (SNP) é formado por gânglios e nervos, que podem ser classificados em sensitivos, motores ou mistos. O componente motor do SNP pode ainda ser subdividido em autonômico (responsável pelo controle da musculatura lisa, glândulas e outros sistemas internos do corpo) ou somático

(responsável pelo controle da contração da musculatura esquelética). Desse modo, enquanto os nervos sensitivos são formados por fibras aferentes, responsáveis por conduzir informações obtidas na periferia ao sistema nervoso central (SNC), os nervos motores são constituídos por fibras eferentes, que conduzem os impulsos do SNC para os órgãos efetores (Guyton & Hall, 2017).

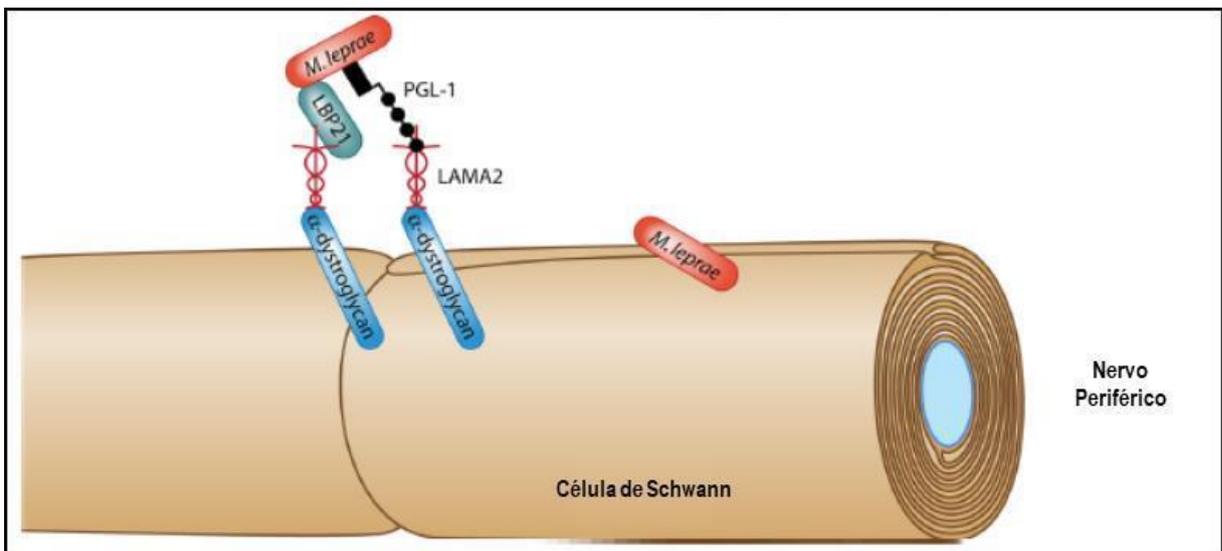
Quanto à unidade anatômica dos nervos periféricos, essa é formada por axônios condutores, células de Schwann isolantes e matriz de tecido conjuntivo circundante. Cada fibra nervosa é revestida por um tecido conjuntivo frouxo que forma o endoneuro que, por sua vez, é circundado por uma camada compacta composta por células perineurais denominada perineuro. Mais externamente, encontra-se o epineuro, camada de tecido conjuntivo denso, tecido adiposo e vasos sanguíneos, que reveste os perineuros. As fibras nervosas podem ainda ser classificadas em fibras mielínicas e amielínicas. Enquanto as fibras mielínicas são encapsuladas individualmente pela célula de Schwann, no caso das fibras amielínicas, uma única célula de Schwann é responsável por revestir um grupo de fibras (Figura 6) (Grant *et al.*, 1999).



**Figura 6 - Unidade anatômica dos nervos periféricos**  
Extraído de Chalk CH, 2008.

Na hanseníase, *M. leprae* possui grande tropismo por células de Schwann, que oferecem um ambiente favorável para sua sobrevivência e replicação (Scollard et al., 2006). Os mecanismos envolvidos na ligação e invasão das células de Schwann por *M. leprae* ainda não são totalmente conhecidos, no entanto, representam etapas cruciais no desenvolvimento do dano neural. Acredita-se que a migração do bacilo para os nervos periféricos ocorra de dois modos principais. Uma possibilidade é através da disseminação direta de uma lesão de pele para um tronco nervoso subjacente, visto que há maior ocorrência de neuropatia em nervos periféricos com lesão cutânea sobrejacente (Van Brakel et al., 2005). Outro mecanismo seria através da disseminação hematogênica, uma vez que o bacilo é comumente encontrado em fagócitos mononucleares circulantes, e que mesmo em condições homeostáticas, ocorre o extravasamento de macrófagos dos vasos sanguíneos para o epineuro (Madigan et al., 2017).

Uma vez em contato com a célula de Schwann, a capacidade de *M. leprae* de aderir à célula vem sendo atribuída à ligação de PGL-1 ao complexo formado pelo receptor distroglicana- $\alpha$  e pelo domínio G da cadeia  $\alpha 2$  da laminina-2 localizada na lâmina basal das células de Schwann (Figura 7) (Rambukkana et al., 1997). No entanto, esse mecanismo de adesão via  $\alpha 2$ -laminina não explica a capacidade única de *M. leprae* de infectar os nervos periféricos, visto que foi demonstrado que outras micobactérias (*M. tuberculosis*, *M. chelonae* e *M. smegmatis*) possuem capacidade de se ligar à célula de Schwann via  $\alpha 2$ -laminina. Desse modo, acredita-se que o tropismo de *M. leprae* pela célula de Schwann é resultado de um conjunto de fatores derivados tanto do hospedeiro quanto do bacilo, os quais ainda não são completamente conhecidos (Marques et al., 2001).



**Figura 7 - Interação entre *M. leprae* e a célula de Schwann.**

A proteína de ligação à laminina 21 (LBP21) e o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) na parede celular de *M. leprae* se ligam à cadeia  $\alpha 2$  da lamina-2 (LAMA2) e  $\alpha$ -dystroglycana na membrana da célula de Schwann. Adaptado de Misch et al., 2010.

O dano neural presente na hanseníase envolve neuropatias desmielinizantes e axonais. Enquanto a neuropatia desmielinizante corresponde ao processo que afeta principalmente as células de Schwann mielinizadas e se traduz na diminuição da velocidade de condução do potencial de ação; na neuropatia axonal, os neurônios, particularmente os sensitivos, são inicialmente afetados. Tanto o dano axonal quanto desmielinizante estão presentes nas etapas iniciais da infecção por *M. leprae*, no entanto, as manifestações clínicas tendem a ocorrer em estágios mais tardios, quando a desestabilização do microambiente desencadeia respostas celulares que recrutam células da imunidade inata e adaptativa, causando danos permanentes aos nervos periféricos (Rambukkana, 2004).

O processo de diferenciação e mielinização das células de Schwann é fortemente dependente da comunicação com os axônios para manter suas propriedades funcionais e de sobrevivência. Essa comunicação ocorre principalmente através da interação entre o ligante axonal neuregulina com o complexo ErbB2/ErbB3 na membrana da célula de Schwann. No entanto, *M. leprae* é capaz de se ligar e ativar ErbB2 sem a heterodimerização de ErbB3, induzindo uma via não clássica de sinalização Erk1/2 que resulta na desmielinização precoce das células de Schwann (Tapinos et al., 2006).

O processo desmielinizante desencadeado por *M. leprae* é altamente vantajoso para o bacilo, uma vez que aumenta a susceptibilidade da célula de Schwann à invasão bacteriana. Além disso, esse processo induz desdiferenciação e proliferação celular favorecendo a sobrevivência e disseminação do bacilo (Hess & Rambukkan, 2019).

As células de Schwann adultas, apesar de possuírem um programa sofisticado de diferenciação e mielinização, apresentam grande plasticidade. Essa plasticidade permite à célula adquirir um estado de desdiferenciação semelhante a um fenótipo imaturo, que é fundamental no processo regenerativo dos nervos periféricos em decorrência de lesões (Jessen & Mirsky., 2008). Após a invasão das células de Schwann, *M. leprae* é capaz de aproveitar tal plasticidade para estabelecer um nicho bacteriano favorável, protegido do ataque imunológico pela barreira hemato-nervosa. Desse modo, *M. leprae* é capaz de induzir um processo de reprogramação celular que resulta na desdiferenciação de células de Schwann infectadas em células progenitoras altamente imaturas (pSLC do inglês *progenitor/stem-like cells*) através da inativação de genes associados à diferenciação e mielinização e ativação de genes e fatores de transcrição associados ao desenvolvimento embrionário (Masaki et al., 2013).

Tal processo de reprogramação desencadeado pelo bacilo contribui para a disseminação bacteriana através de dois mecanismos principais. A disseminação pode ocorrer passivamente através da migração de pSLC infectadas que, sob estímulos inflamatórios, irão se diferenciar espontaneamente em músculos lisos e esqueléticos, ou através do recrutamento de macrófagos para posterior expansão e disseminação do bacilo através das propriedades imunomoduladoras da pSLC (Masaki et al., 2013). Após a infecção por *M. leprae*, as células de Schwann passam a expressar um grande número de genes associados à resposta imunológica, principalmente imunidade inata, que atingem o pico de expressão após a mudança de fenótipo para pSLCs, e que contribuem para o recrutamento de macrófagos (Masaki et al., 2014).

O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é uma das citocinas produzidas pela célula de Schwann, em resposta a infecção por *M. leprae*, capaz de induzir maciçamente o infiltrado de macrófagos e contribuir direta e indiretamente para o dano neural (Liefner et al., 2000). Um trabalho do nosso grupo observou um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  juntamente com seu receptor em populações de células de Schwann de

pacientes com a forma neural pura da hanseníase (Teles et al., 2007). Além disso, Andrade e colaboradores (2016) demonstraram em modelo experimental *in vitro* que *M. leprae* é capaz de aumentar a expressão proteica de TNF- $\alpha$  ligado a membrana (mTNF) bem como seu receptor (TNFR1) em células de Schwann, e que a estimulação de células de Schwann com TNF- $\alpha$  é capaz de induzir a secreção de IL-6 e IL-8 (duas citocinas envolvidas na desmielinização e perda axonal), bem como metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) (Teles et al., 2007, Andrade et al., 2016). As MMPs são proteases extracelulares capazes de contribuir diretamente para a desmielinização durante a neuropatia periférica, estando envolvida na ativação de células de Schwann e recrutamento de macrófagos (Chattopadhyay et al., 2007).

Uma vez no local da lesão, os macrófagos reconhecem e respondem a *M. leprae*, liberando mediadores inflamatórios que irão mobilizar mais macrófagos e neutrófilos ao sítio de infecção. Neutrófilos, macrófagos e citocinas pró-inflamatórias irão ativar respostas imunes adaptativas que contribuem para o agravamento da desmielinização e dano axonal. Visto que o bacilo tem predileção principalmente por células de Schwann não mielinizantes, que estão presentes em grande quantidade nos axônios sensitivos, um dos primeiros sintomas da neuropatia hanseniana é a perda sensitiva. Esse fenômeno causado pela resposta imunológica, tem início com a liberação de antígenos de *M. leprae* por essas células, que resulta no recrutamento de macrófagos e células T com liberação de citocinas pró-inflamatórias, levando à destruição de células de Schwann não mielinizadas e mielinizadas e subsequente perda sensitiva e motora (Rambukkana, 2004).

Outro fator que contribui consideravelmente para o dano neural é o desenvolvimento de episódios reacional no curso da hanseníase. Durante tais eventos há uma maior infiltração de células T CD4+ nas lesões e exacerbação da resposta imune celular, que se torna mais responsiva aos antígenos de *M. leprae* (Cooper et al., 1989). Pacientes em quadro reacional apresentam uma alteração no perfil imunológico com ativação de células T, mudança do perfil de células Th2 para Th1 e produção de Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) em resposta ao *M. leprae*. Desse modo, pacientes reacionais, principalmente reação do tipo 1 (RR), apresentam um aumento na expressão de IFN- $\gamma$  quando comparados a pacientes não reacionais tanto em amostras de PBMC como em lesões de pele (Andrade et al., 2015; Moraes et al., 1999). O IFN- $\gamma$  é um mediador central da hipersensibilidade tardia e resposta celular do tipo Th1. Além disso, está envolvido na indução de TNF- $\alpha$  e estimulação da

liberação de espécies reativas de oxigênio por macrófagos, contribuindo para a patogênese do dano neural (Billiau, 1996).

## 1.6 Importância imunomoduladora de IDO1 e sua relevância na Hanseníase

A enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO) é responsável por catalisar o passo inicial e limitante da via das quinureninas, através da conversão do triptofano em N-formil-quinurenina (Mellor & Munn, 2004). Essa enzima possui duas isoformas, IDO1 e IDO2. Enquanto IDO1 possui papel imunomodulador e neuroativo bem conhecidos, IDO2 foi recentemente descoberta, e é expressa constitutivamente no fígado, cérebro e tireóide (Ball et al., 2007). Além disso, a deleção do *gene ido2* em camundongos não afeta o desenvolvimento embrionário, a hematopoiese ou a resposta imunológica, nem afeta os níveis de triptofano ou quinurenina no sangue, sugerindo uma atuação mais restrita dessa enzima (Prendergast et al., 2018).

Diversos estudos apontam a participação de IDO1 em processos imunológicos, tanto em relação a infecções, como em relação a doenças autoimunes e câncer. IDO1 é expressa em vários tipos celulares, como macrófagos, células epiteliais e células dendríticas. Tal expressão pode ser regulada por células apresentadoras de antígenos, lipopolissacarídeo (LPS) ou por citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$  (Araújo et al., 2017).

Em relação ao papel de IDO1 frente às infecções, esse ainda é controverso, uma vez que IDO1 vem sendo descrita como uma enzima com papel dúbio, possuindo um caráter bactericida ou tolerogênico, dependendo do microambiente (Thomas et al., 1993; Mellor et al., 2017). Apesar da maioria dos patógenos ser capaz de sintetizar triptofano, alguns microrganismos, como *Chlamydia pneumoniae*, *Toxoplasma gondii* e as micobactérias, dependem do triptofano exógeno para replicação (Pfefferkorn et al., 1984; Hayashi et al., 2001; Rottenberd et al., 2000). Desde modo, uma vez que IDO1 é responsável pela degradação do triptofano, a indução de sua expressão está relacionada à inibição do crescimento de tais microrganismos (Mellor & Munn, 2004). Além disso, a indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais de óxido nítrico pela ativação da via das quinureninas contribui para o impedimento do crescimento bacteriano (Schmidt & Schultze, 2014).

Estudos em modelos de autoimunidade apontam um papel imunossupressor de IDO1, uma vez que a inibição de sua atividade resulta na exacerbação dos

sintomas e severidade da doença (Sakurai et al., 2002). A imunossupressão desencadeada por IDO1 é decorrente dos metabólitos imunomoduladores e citotóxicos da via, capazes de inibir a ativação de células T e modular a diferenciação de células T virgens em células T reguladoras (Treg) (Terness et al., 2002).

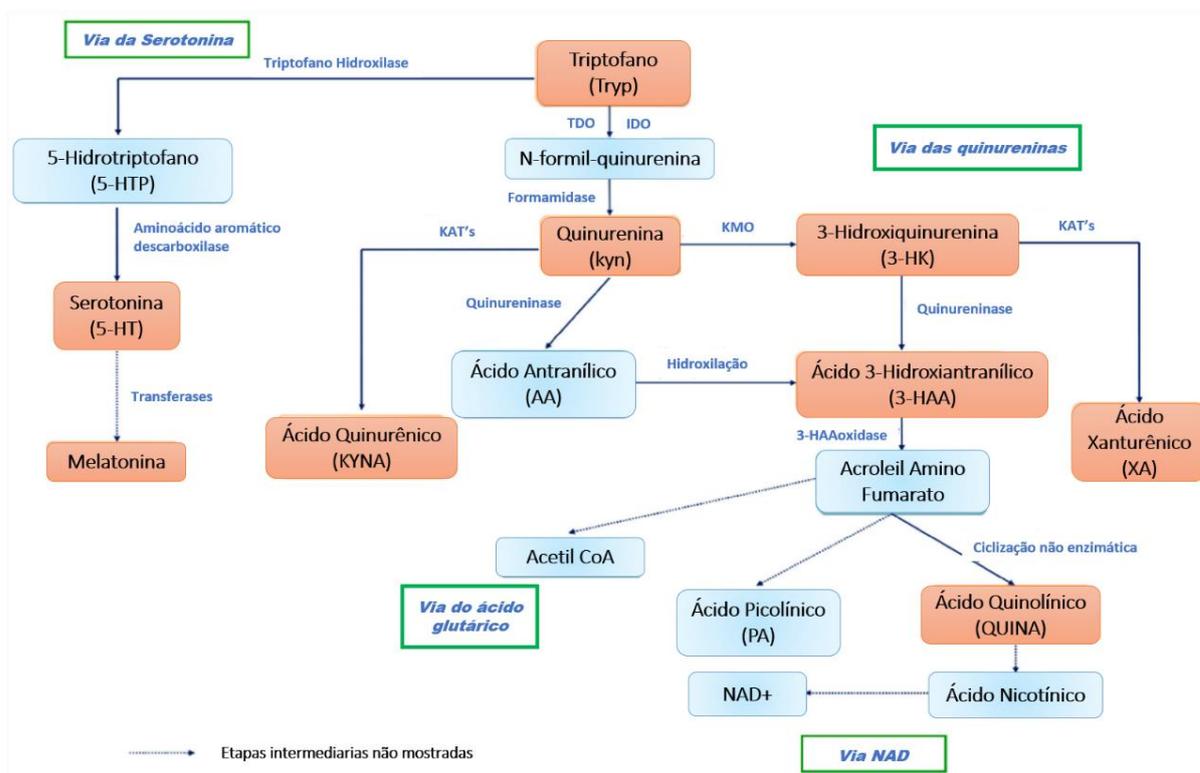
Na Hanseníase, foi demonstrado um aumento de células IDO1+ em lesões de pele de pacientes lepromatosos, bem como uma maior atividade de IDO1 no soro de pacientes LL quando comparados a pacientes BT (De Souza Sales et al., 2011). Em conjunto, foi demonstrado que *M. leprae* é capaz de induzir a expressão proteica de IDO1 em monócitos humanos por um mecanismo dependente de IL-10 (Moura et al., 2012) e que IDO1 é importante para a sobrevivência do bacilo em macrófagos humanos (Barbosa et al., 2017). Tais achados sugerem que no polo lepromatoso, *M. leprae* induz IL-10 que aumenta a expressão de IDO1 contribuindo para a persistência do bacilo. Uma conclusão preliminar é a de que IDO1, induzida por *M. leprae*, teria um papel tolerogênico, contribuindo para a imunossupressão específica observada no polo lepromatoso da hanseníase. No entanto, Andrade e colaboradores (2015) observaram um aumento de IDO1, dependente de IFN- $\gamma$ , em células de lesão de pele de pacientes multibacilares que desenvolveram reação reversa, sugerindo que IDO1 pode apresentar efeitos antagônicos na patogênese da doença.

## 1.7 Indoleamina 2,3 dioxigenase no sistema nervoso

O triptofano é um aminoácido essencial, sendo necessário para a síntese de proteínas e substrato para a produção de diversas moléculas neuroativas, como a serotonina, melatonina, ácido quinolínico, ácido quinurênico, entre outros. A degradação do triptofano ocorre por duas vias principais, a via da serotonina e das quinureninas (Carvalho et al., 2017).

O catabolismo do triptofano através da via das quinureninas tem início com a conversão do triptofano em N-formil-quinurenina pela ação de IDO e posterior conversão em quinurenina (Figura 8). A quinurenina pode ser convertida a ácido quinurênico (KYNA) pela enzima quinurenina aminotransferase I ou II (KATI ou KATII / AADAT) ou ácido antranílico (AA) pela enzima quinureninase (KINU). A quinurenina pode ainda ser convertida em 3-hidroxiquinurenina (3-HK) pela enzima quinurenina 3-monooxigenase (KMO). 3-HK pode levar a formação de ácido xanturênico (XA) pela enzima quinurenina aminotransferase ou a ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) pela

enzima quinureninase. 3-HAA, por sua vez, pode ser oxidado pela enzima 3-HAAoxidase para formar o ácido quinolínico (QUINA) (Braidy & Grant, 2017).



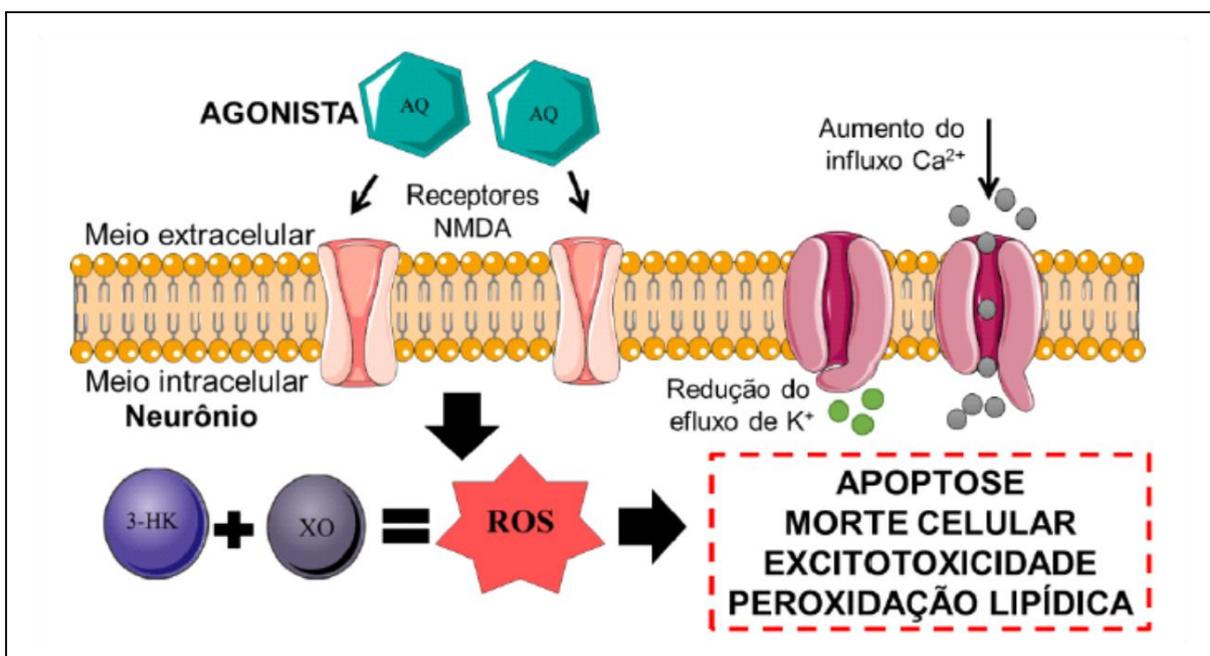
**Figura 8 - Diagrama esquemático do metabolismo do triptofano em mamíferos.**

Adaptado de Xu et al., 2017.

O catabolismo do triptofano pode ainda ser desviado para a via da serotonina, principalmente quando a via das quinureninas é *down* regulada. A partir da hidrólise do triptofano ocorre a formação de 5-hidroxitriptofano (5-HTP), que é rapidamente metabolizado à serotonina e posteriormente em melatonina pela ação de transferases (Figura 8) (Majumdar et al., 2019).

Diversas propriedades neuroativas vêm sendo atribuídas aos metabólitos da via das quinureninas. Enquanto o ácido quinolínico (QUINA) atua como agonista do receptor N-metil-D-ácido aspártico (NMDA) e pode causar excitotoxicidade neural, o ácido quinurênico (KYNA) tem um papel neuroprotetor através de sua atuação como antagonista do receptor NMDA (Stone, 2001). A estimulação do receptor glutamatérgico NMDA aumenta o influxo de cálcio nos neurônios, contribuindo para a produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, além de estimular a peroxidação lipídica da membrana, contribuindo para o dano neural (Carvalho et al., 2017).

Além disso, 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) são potentes geradores de radicais livres e espécies reativas de oxigênio capazes de induzir a clivagem do DNA nuclear, levando a célula neural à apoptose (Figura 9) (Okuda et al., 1998). Desse modo, o desbalanço da via das quinureninas vem sendo descrito em diversas doenças neurodegenerativas, entre elas depressão, esquizofrenia, Alzheimer, doença de Huntington, Parkinson e dor neuropática (Bonda et al., 2010; Heng et al., 2009; Guillemin et al., 2005; Veen et al., 2016; Sathyaikumar et al., 2001; Rojewska et al., 2018).



**Figura 9 - Efeitos dos metabólitos neurotóxicos da via das quinureninas em neurônios glutamatérgicos.**

AQ: ácido quinolínico; 3-HK: 3-Hidroxiquinurenina; XO: xantina oxidase; ROS: espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Carvalho et al., 2017.

Outro receptor estimulado pelos metabólitos da via das quinureninas, e que pode estar envolvido na interação glia-axônio, é o receptor de hidrocarboneto aril (AhR). O AhR é um fator de transcrição ativado por ligante, originalmente descrito como envolvido no metabolismo xenobiótico (Wirthgen et al., 2017). Atualmente, seu papel na regulação imunológica em processos inflamatórios está bem descrito, estando envolvido na prevenção de uma indução pró-inflamatória excessiva (Thatcher et al., 2016; Zhang et al., 2015; Nguyen et al., 2014; Sekine et al., 2009).

O ácido quinurênico, assim como a quinurenina, são agonistas do receptor AhR. Apesar da quinurenina estar mais disponível para interagir com o receptor, apresentando concentrações plasmáticas mais elevadas que KYNA, este último é descrito como um ligante de AhR mais potente, além de possuir uma estabilidade mais alta que a quinurenina (DiNatale et al., 2010). Shackleford e colaboradores (2017) demonstraram a expressão desse receptor em células de Schwann, bem como o envolvimento do mesmo na mielinização do sistema nervoso periférico. A inibição de tal receptor em modelo de camundongo levou a alterações na expressão de genes associados a mielina e na estrutura da bainha, com consequente deficiências locomotoras nesses animais. Por outro lado, a superexpressão desse receptor, assim como dos genes IDO1 e TDO, foram observados em amostras de neurofibromas plexiformes e tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (Shackleford et al., 2017).

O aumento na expressão da enzima KMO, bem como elevação da concentração de QUINA em associação à uma diminuição de KYNA, tem sido relatado em trabalhos que investigam depressão e dor neuropática (Baranyi et al., 2015; Bay-Richter et al., 2015; Laument et al., 2017). Além disso, foi demonstrado, em modelo animal de dor neuropática, que a inibição de IDO e KMO pode diminuir os efeitos negativos do dano neural e, consequentemente, diminuir os sintomas da dor neuropática (Rojewska et al., 2018). No entanto, até o momento, não tivemos conhecimento de nenhum trabalho que tenha investigado o papel da via das quinureninas e seus metabólitos neuroativos na patogênese de doenças do sistema nervoso periférico.

## 2 JUSTIFICATIVA

A hanseníase é a principal causa de neuropatia periférica não traumática em países endêmicos. A neuropatia é frequentemente silenciosa ao longo de sua evolução, o que dificulta o seu diagnóstico nos estágios iniciais e impede que sejam estabelecidas medidas capazes de prevenir o dano neural (Job, 1989). Visto que as células de Schwann oferecem um ambiente ideal para a preservação e proliferação de *M. leprae*, o entendimento dos mecanismos envolvidos na infecção e modulação dessas células pelo bacilo representam um passo crucial para a melhor compreensão do dano neural na hanseníase (Neal & Gasque, 2016).

Richardus e colaboradores (1996) demonstraram que um percentual maior de pacientes multibacilares apresentam impedimento da função nervosa no diagnóstico quando comparados aos paucibacilares. Estima-se que 30 a 60% dos pacientes multibacilares apresentem dano difuso no nervo periférico no momento do diagnóstico, que continua progredindo mesmo após o uso da PQT e corticosteroides (Van Veen et al., 2008). Estudo anterior do nosso grupo demonstrou uma frequência diferente na alteração da função nervosa, tanto sob o ponto de vista clínico quanto neurofisiológico, quando comparado pacientes multibacilares e paucibacilares (Vital et al., 2012). Tais achados sugerem que, apesar dos pacientes multibacilares apresentarem pouca ou nenhuma sintomatologia de comprometimento de nervos periféricos, esses pacientes possuem grande risco de desenvolvimento extenso de neuropatia no curso da doença.

Desta forma, um dos principais desafios atuais, para as áreas endêmicas da hanseníase, é o tratamento efetivo da neurite, bem como a detecção precoce de dano neural em pacientes multibacilares, prevenindo as incapacidades permanentes. Atualmente, os pacientes são tratados com poliquimioterapia (PQT) e corticosteróides, que não têm sido eficazes em impedir a evolução da neuropatia periférica. Assim, estudos com o objetivo de contribuir para o entendimento da patogênese da neuropatia podem auxiliar em futuras intervenções mais específicas e efetivas.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que há um aumento da atividade de IDO1 em soro de pacientes multibacilares com hanseníase quando comparado aos pacientes paucibacilares (De Souza Sales et al., 2011). Visto que esses pacientes apresentam uma imunidade celular pouco efetiva contra o bacilo e que o papel IDO1 na imunomodulação está bem descrito, nossa hipótese inicial foi a

do envolvimento desta enzima na indução de tolerância imunológica, permitindo a manutenção da infecção por *M. leprae* (De Moura *et al.*, 2012; De Mattos Barbosa *et al.*, 2017). No entanto, também foi observado o aumento da expressão de IDO1 em amostras de pacientes multibacilares que desenvolveram reação reversa (Andrade *et al.*, 2015). Uma vez que durante tais episódios há uma intensa morte micobacteriana e um incremento do dano neural, hipotetizamos que o papel dessa enzima na imunopatogênese da hanseníase pode estar relacionado a outros processos que não necessariamente a indução de tolerância.

O estudo da via das quinureninas tem demonstrado a existência de metabólitos com atividade neurotóxica, de modo que é possível que exista uma associação entre o aumento da atividade de IDO1 e de seus metabólitos com o desenvolvimento de neuropatia em pacientes com hanseníase. Pouco se sabe sobre a produção de IDO1 em células de Schwann e o presente estudo torna-se necessário para entender a complexa interação entre o aminoácido triptofano, IDO1 e as quinureninas com o dano neural na hanseníase.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO1) e seus metabólitos na patogênese da neuropatia hanseniana.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1- Re-analisar dados de microarranjo com o objetivo de avaliar se *M. leprae* modula a expressão de genes da via das quinureninas em células de Schwann primárias humanas;

2 - Avaliar a capacidade de *M. leprae* e das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em induzir aumento na expressão e atividade de IDO1 em células de Schwann humanas da linhagem ST88-14;

3- Avaliar a capacidade de *M. leprae* e das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em influenciar as concentrações dos metabólitos finais da via das quinureninas em cultura de células de Schwann humanas da linhagem ST88-14

4- Investigar se os metabólitos da via das quinureninas afetam a viabilidade das células de Schwann humanas da linhagem ST88-14;

5- Determinar a atividade de IDO1 em amostras de soro de pacientes com neuropatia hanseniana comparando com pacientes com outras neuropatias não hansenianas;

6 – Correlacionar a atividade de IDO1 com achados da eletroneuromiografia e com a presença ou não de dor neural (neuropática ou nociceptiva);

7 – Determinar as concentrações séricas de ácido quinurênico (KYNA) e ácido quinolínico (QUINA) em amostras de pacientes com neuropatia hanseniana em comparação com pacientes com outras neuropatias e voluntários sadios.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Grupo de estudo e amostras clínicas

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ (protocolo CAAE: 26611618.1.0000.5248). Foi utilizada uma coorte inicial de 74 pacientes atendidos no Ambulatório Souza Araújo (ASA) no período de 2008 a 2016. Como critérios de inclusão, utilizamos amostras de indivíduos com diagnóstico fechado de hanseníase pela clínica e pela histopatologia, com comprometimento neurológico no momento da coleta do soro e que tenham realizado exame de eletroneuromiografia. Como controles foram utilizadas amostras de pacientes com outras neuropatias periféricas. Os critérios de exclusão foram: pacientes menores de 18 anos, doença autoimune, diabetes, gestantes e pacientes com HIV. Tais pacientes foram classificados de acordo com as alterações histopatológicas dos fragmentos de nervo da seguinte forma: Neural pura (NP), Multibacilar ou outras neuropatias periféricas não hansenianas (ON). Os pacientes Multibacilar foram subdivididos em pacientes com neurite reacional (MB em reação) ou recidiva (MB recidiva).

Treze pacientes (6 mulheres e 7 homens) com idade média de  $52,1 \pm 17,6$  foram classificados com a forma clínica neural pura da hanseníase; onze pacientes (1 mulher e 10 homens) com idade média de  $41,5 \pm 12,6$  classificados como multibacilar em reação; vinte e sete pacientes (7 mulheres e 20 homens) com idade média de  $39,4 \pm 12,4$  classificados como multibacilar em recidiva; e vinte e três pacientes (10 mulheres e 13 homens) com idade média de  $56,7 \pm 11,6$  com outras neuropatias periféricas. A avaliação do tipo de dano neurológico foi baseada nos dados da eletroneuromiografia de acordo com o descrito por Jardim e colaboradores (2004). Os dados demográficos e clínicos dos pacientes com neuropatia hanseniana e dos pacientes com outras neuropatias periféricas encontram-se na tabela 1 e 2, respectivamente. Para os ensaios de avaliação da concentração de ácido quinunrênico (KYNA) e quinolínico (QUINA) foram utilizadas amostras de 11 voluntários sadios como controle (8 mulheres e 3 homens) com idade média de  $26,5$  anos  $\pm 6,2$ .

**Tabela 2 - Dados demográfico e histopatológicos dos pacientes com neuropatia hanseniana**

Forma Clínica	Sexo	Idade (anos)	PCR	BAAR	Dor	Classificação de dano
MB em reação	M	39	SI	Neg	N	SI
MB em reação	M	37	Pos.	Pos	N	Desmielinização + degeneração axonal sec.
MB em reação	M	35	Pos.	Pos	N	Sem resposta sensitiva, motora normal
MB em reação	M	52	SI	Neg	SI	Sem resposta sensitiva e motora
MB em reação	M	48	SI	Neg	N	axonal
MB em reação	M	18	Neg	Neg	N	Sem resposta sensitiva, motora normal
MB em reação	F	36	Neg	Neg	SI	Desmielinização + degeneração axonal sec.
MB em reação	M	52	Neg	SI	N	Axonal
MB em reação	M	54	SI	Neg	S	Sem resposta sensitiva, motora normal
MB em reação	M	33	Pos.	Neg	S	Axonal
MB em reação	M	57	SI	Neg	N	Sem resposta sensitiva, motora normal
MB em recidiva	M	39	Pos	+++	N	Desmielinização segmentar
MB em recidiva	F	26	Pos	++++	S	SI
MB em recidiva	M	29	Pos	Pos	N	Sem resposta sensitiva e motora
MB em recidiva	M	31	Pos	Pos	S	SI
MB em recidiva	M	35	Pos	Pos	S	Desmielinização segmentar
MB em recidiva	M	35	Pos	++	S	Axonal
MB em recidiva	F	53	SI	+++	S	Sem resposta sensitiva e motora
MB em recidiva	M	22	SI	++++	S	Sem resposta sensitiva, motora normal

<b>MB em recidiva</b>	M	30	SI	+	S	SI
<b>MB em recidiva</b>	M	37	SI	Pos	S	Sem resposta sensitiva e motora
<b>MB em recidiva</b>	M	32	SI	++++	S	Desmielinização segmentar
<b>MB em recidiva</b>	M	35	SI	+	S	Desmielinização segmentar
<b>MB em recidiva</b>	M	39	SI	++	S	Sem resposta sensitiva, motora normal
<b>MB em recidiva</b>	M	30	SI	+++	N	Desmielinização segmentar
<b>MB em recidiva</b>	M	72	SI	++	N	Sem resposta sensitiva, motora normal
<b>MB em recidiva</b>	M	54	Pos	+++	S	Axonal
<b>MB em recidiva</b>	F	44	Neg	Pos	N	Desmielinizante
<b>MB em recidiva</b>	F	38	Pos	++	S	SI
<b>MB em recidiva</b>	M	35	SI	Pos	S	Desmielinização segmentar
<b>MB em recidiva</b>	F	28	SI	++	S	Sem resposta sensitiva e motora
<b>MB em recidiva</b>	M	67	Pos	+++	S	Desmielinização + degeneração axonal sec.
<b>MB em recidiva</b>	M	60	Pos	++++	N	SI
<b>MB em recidiva</b>	M	33	Neg	+++	SI	SI
<b>MB em recidiva</b>	F	41	SI	++	S	SI
<b>MB em recidiva</b>	F	50	Pos	++	S	Sem resposta sensitiva, motora normal
<b>MB em recidiva</b>	M	36	Pos	++	S	Lesão mista
<b>MB em recidiva</b>	M	32	SI	++++	S	Axonal
<b>NP</b>	F	51	SI	Neg	N	Sem condução
<b>NP</b>	M	70	Pos	neg	N	Sem condução
<b>NP</b>	M	64	SI	Neg	N	Axonal
<b>NP</b>	M	71	Pos	Neg	N	Sem condução

<b>NP</b>	M	77	SI	Neg	S	Sem condução
<b>NP</b>	M	39	SI	SI	N	Sem condução
<b>NP</b>	F	51	Pos	Neg	N	Sem condução
<b>NP</b>	F	60	Pos	Neg	SI	Sem condução
<b>NP</b>	F	39	Pos	Neg	S	Sem condução
<b>NP</b>	M	34	Pos	Neg	S	Sem condução
<b>NP</b>	F	67	Neg	Neg	N	Sem condução
<b>NP</b>	F	36	SI	Pos	N	Desmielinização segmentar
<b>NP</b>	M	19	SI	Neg	N	Sem resposta sensitiva e motora

Legenda: MB = Multibacilar; NP = Neural Pura; M = Masculino; F = Feminino; SI = Sem informação; N = Não; S= Sim; Neg = Negativo e Pos = Positivo.

**Tabela 3 - Dados demográficos e clínicos dos pacientes com outras neuropatias periféricas.**

Patologia	Sexo	Idade	PCR	Dor
		(anos)		
SI	F	47	SI	S
Síndrome do túnel do carpo	F	56	SI	N
SI	M	64	SI	N
Síndrome do túnel do carpo	M	50	Neg	S
Doença reumatológica	M	47	Neg	S
SI	F	53	Neg	SI
SI	F	68	SI	S
SI	M	47	SI	S

SI	M	54	SI	N
SI	M	42	SI	S
Neuropatia diabética	M	49	SI	S
SI	F	66	SI	N
SI	M	62	SI	N
Mal perfurante plantar	F	84	SI	N
Doença reumatológica	F	77	SI	S
SI	F	68	SI	N
Doença reumatológica	F	67	SI	S
SI	M	57	Neg	SI
SI	M	45	SI	S
Doença reumatológica	F	49	Neg	S
SI	M	65	Neg	N
SI	M	48	Neg	N
SI	M	39	Neg	N

Legenda: M = Masculino; F = Feminino; SI = Sem informação; N = Não; S= Sim; Neg = Negativo e Pos = Positivo.

#### 4.2 *M. leprae* e reagentes

Foram utilizados para os experimentos *in vitro* os seguintes reagentes: *M. leprae* viável (MOI 50:1) fornecido pelo Instituto Lauro de Souza Lima – SP; *M. leprae* morto por irradiação (50 µg/mL) obtido pelo consórcio BEI resources (NIAID, NIH - cat. NR-19329); TNF- $\alpha$  recombinante humano (1ng/mL), comprado da empresa PeproTech (Rocky Hill, USA - cat. 300-01A); IFN- $\gamma$  recombinante humano (40ng/mL), comprado da empresa PeproTech (Rocky Hill, USA - cat. 300-02); Ácido Picolínico (cat. P42800), Ácido Quinurênico (cat. K3375), Ácido Quinolínico (cat. P63204) e

Ácido 3-Hidroxiantranílico (cat. 148776) (62,5µM, 125 µM, 250µM e 500 µM) comprados da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

### 4.3 Análise de Microarranjo

Para esta análise foram recuperados os dados brutos de microarranjo do estudo de Toledo-Pinto e colaboradores de 2016 (DOI: 10.1093/infdis/jiw144). Toledo-Pinto e colaboradores fizeram uma avaliação abrangente do mRNA de células de Schwann primária infectadas com *M. leprae* a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100:1 (bacilos: célula) por 24 ou 48 horas à 33°C usando microarranjos de chips de DNA. Os dados foram recuperados do banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO), sob o acesso GSE35423. Os arquivos já normalizados foram importados para o ambiente R, v. 3.4.1. Os dados normalizados e em escala logarítmica de base 2 foram utilizados na construção do *heatmap* (com agrupamento hierárquico euclidiano com distância completa) para os genes de interesse, utilizando a biblioteca *pheatmap* v. 1.0.12.

### 4.4 Cultura de célula de Schwann 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) e doada pelo Dr. J.A. Flechter (Dana Farber Câncer Institute, Boston Massachusetts). As células da linhagem ST88-14 foram mantidas em meio RPMI (Gibco Invitrogen Corporation 1640, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gnco Invitrogen Corporation, USA), L-glutamina (Gibco Invitrogen Corporation, USA) a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100µg/mL (Gibco Invitrogen Corporation, USA), em garrafas de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os experimentos foram realizados após a terceira passagem de cultivo celular, conforme protocolo já estabelecido em estudos anteriores de nosso grupo (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 ST88-14 aderentes foram incubadas com Tripsina/EDTA (Gibco Invitrogen Corporation, USA) 0,25%/1mM por 1 min a 37°C e ressuspensas em meio de cultura suplementado. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços para os ensaios de imunofluorescência ( $7 \times 10^4$  células/poço) e citometria de fluxo ( $1 \times 10^5$  células/poço). Após o tempo de estímulo, os sobrenadantes da cultura foram coletados e armazenados a -20°C para posterior utilização nos ensaios de ELISA e Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC). Para todos os experimentos, após o plaqueamento as células foram incubadas *overnight* para aderir à placa e posteriormente estimuladas e/ou infectadas por 24 horas.

#### **4.5 Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC)**

As concentrações de quinurenina e triptofano nos sobrenadantes de cultura da célula de Schwann ST88-14 e no soro dos pacientes foram determinadas com o objetivo de mensurar a atividade de IDO1 por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (HPLC). Em um tubo eppendorf, 400µL de soro ou sobrenadante de cultura foram homogeneizados com 5 µL de tirosina (10mM; Sigma-Aldrich, USA) e 25µL de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados por 10 minutos a 14000xg para precipitação de proteínas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para frascos apropriado para injeção na coluna analítica de fase reversa Shim-pack CLC-ODS(M)® C18 da Shimadzu (equipamento LC 20 AT Shimadzu). As fases móveis utilizadas foram tampão de acetato de sódio à 15mM e acetonitrila + 0,1% de ácido trifluoroacético. A detecção da corrida foi feita em 365nm, para detectar a quinurenina, e 285nm, para detectar o triptofano. O normalizador interno, tirosina, foi detectado em ambos os comprimentos de onda. A atividade de IDO1 foi avaliada através da razão da área do pico de quinurenina sobre triptofano, como descrito por Widner e colaboradores (1997).

#### **4.6 Imunofluorescência**

As células foram plaqueadas ( $7 \times 10^4$  células/poço) em lamínulas de vidro e infectadas/estimuladas com *M. leprae*. Antes do estímulo/infecção das células de

Schwann com *M. leprae* viável ou morto, os bacilos foram marcados em verde com o kit PKH67 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma-Aldrich, USA – cat. PKH67GL) de acordo com as instruções do fabricante. Após o tempo de estímulo/infecção, as células de Schwann ST88-14 foram fixadas por 20 minutos com PFA 4% à temperatura ambiente, lavadas com tampão fosfato salina (PBS) (Gibco Invitrogen Corporation, USA), bloqueadas e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 + 10% de Soro Normal de Cabra (NGS) (Sigma-Aldrich, USA) e 5% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) em PBS por 1h.

Foram utilizados o anticorpo monoclonal feito em coelho anti IgG humano IDO (Santa Cruz, Texas, USA 1:100 – cat. SC25808) e, os anticorpos policlonais feitos em coelho anti ácido quinurênico (MyBioSource, Califórnia, USA 1:100 - cat. MBS2090492) e ácido quinolínico (MyBioSource, Califórnia, USA 1:100 - cat. MBS2032185). Os anticorpos primários foram incubados *overnight* a 4°C. Após lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-coelho IgG 568 (Molecular Probes, Oregon, USA 1:1000 – cat. A11011) e 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes, Oregon, USA) para visualização do núcleo. A montagem das lâminas foi feita com o meio de montagem Prolong™ Diamond Antifade Mountant (Invitrogen™ – Cat. P36961). As imagens das marcações foram capturadas e examinadas ao microscópio confocal LSM 510-META (Zeiss) e com auxílio do programa Zen 2.3 (Carl Zeiss).

#### **4.7 Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Foram utilizados kits de ELISA comercial da MyBioSource (Califórnia, USA) para dosagem de ácido quinurênico (cat. MBS7254726) e ácido quinolínico (cat. MBS773155). Os sobrenadantes e soros foram processados, conforme orientação do fabricante.

As amostras e o tampão do ensaio foram incubados em conjunto com o conjugado da enzima HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*) em placa pré-revestida com os anticorpos de interesse e incubadas por 1 hora a 37°C. Após o período de incubação e lavagens, os poços foram então incubados com um substrato para a enzima HRP. Finalmente, uma solução de parada foi adicionada para interromper a reação. A leitura de absorbância foi obtida a 450 nm, sendo a intensidade da cor inversamente proporcional à concentração do metabólito de interesse (método

competitivo). As leituras foram obtidas em leitor de ELISA SpectraMax 190 (Molecular Devices - Califórnia, USA). Para a análise dos dados foi utilizado o software SoftMax versão 5.3 (Molecular Devices - Califórnia, USA).

#### **4.8 Citometria de fluxo**

Para a marcação intracelular de IDO1 foi utilizado o anticorpo anti IDO – PE (R&D, Minnesota, USA 3:50 – cat. IC6030P). Para a marcação e posterior análise por citometria, as células foram retiradas do poço com Tripsina/EDTA 0,25%/1mM após o tempo de estímulo e lavadas com PBS-FACS (PBS + 0,1% de BSA). Após a lavagem, as células foram fixadas com PFA 4% por 30 minutos a 4°C, permeabilizadas (1% de BSA + 0,1% de saponina em PBS) e bloqueadas (2% de NGS em tampão de permeabilização). Em seguida foram incubadas com anticorpo primário por 30min à temperatura ambiente. Ao término da incubação as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário por 30min à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida foram lavadas, fixadas e ressuspensas para posterior leitura em citômetro de fluxo (FACScalibur). Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos no *gate*. A análise foi realizada no software BD FlowJo (Oregon, USA).

#### **4.9 Viabilidade Celular**

A porcentagem de células viáveis, em apoptose e/ou em necrose foi determinada através do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen™, Califórnia, USA) e contabilizada em citômetro de fluxo.

Após o tempo de estímulo, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos de citometria apropriados e lavadas duas vezes com PBS gelado. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100µL de tampão de ligação e incubadas com 1,5µL de anexina V-FITC por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação, foram adicionados 200µL de tampão de ligação e 1,5µL de iodeto de propídio (PI). Em seguida as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACScalibur) em um intervalo de até 30 minutos conforme instruções do fabricante. Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos no *gate*. A análise foi

realizada no software BD FlowJo e, para a determinação da viabilidade celular relativa foram utilizados como referência a porcentagem de células viáveis (duplo-negativas) em meio livre de metabólitos (célula não estimulada).

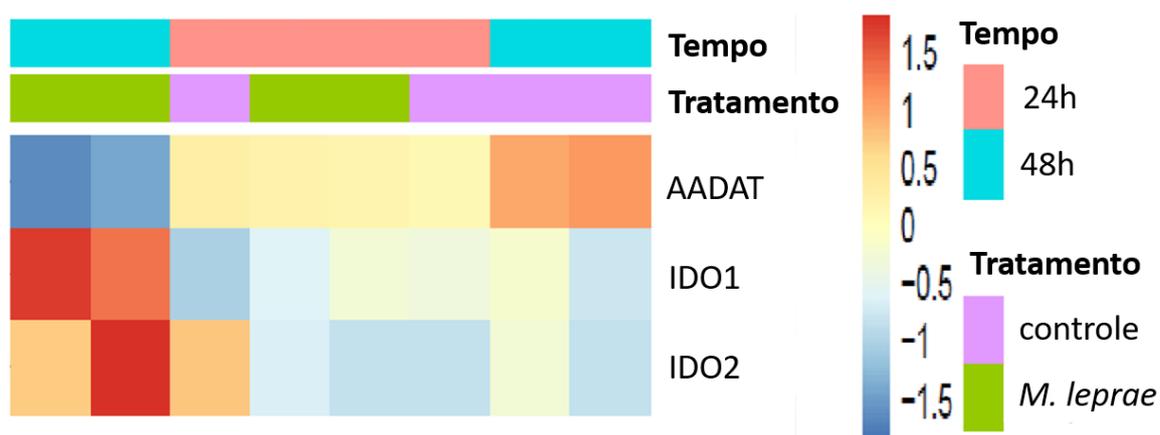
#### **4.10 Análise Estatística**

Para estabelecer os testes estatísticos, todos os experimentos passaram *a priori* pelo teste de normalidade D'Agostino & Pearson. Para as amostras classificadas como não-paramétricas, a significância estatística foi calculada pelo teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós-teste de comparação múltipla de Dunn e valor de  $p$  ajustado pelas múltiplas comparações. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Para os testes de correlação foi utilizado o método de correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas o valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 *M. leprae* modula a expressão gênica de enzimas da via das quinureninas em células de Schwann primárias.

Inicialmente foi realizada a análise dos dados de microarranjo depositados no banco de dados *Gene Expression Omnibus* sob o número de acesso GSE35423. Como demonstrado no *heatmap* apresentado na Figura 10, após 48h de infecção (representado em verde) foi observado um aumento na expressão de *IDO1* e *IDO2* como demonstrado pela coloração vermelha, e uma diminuição da expressão de *AADAT* (quinurenina aminotransferase II), representado pela coloração azul. Tais dados apontam que *M. leprae* é capaz de modular a expressão de enzimas da via das quinureninas nas células de Schwann primárias humanas (Figura 10).



**Figura 10 - *M. leprae* é capaz de aumentar a expressão de IDO e inibir AADAT.**

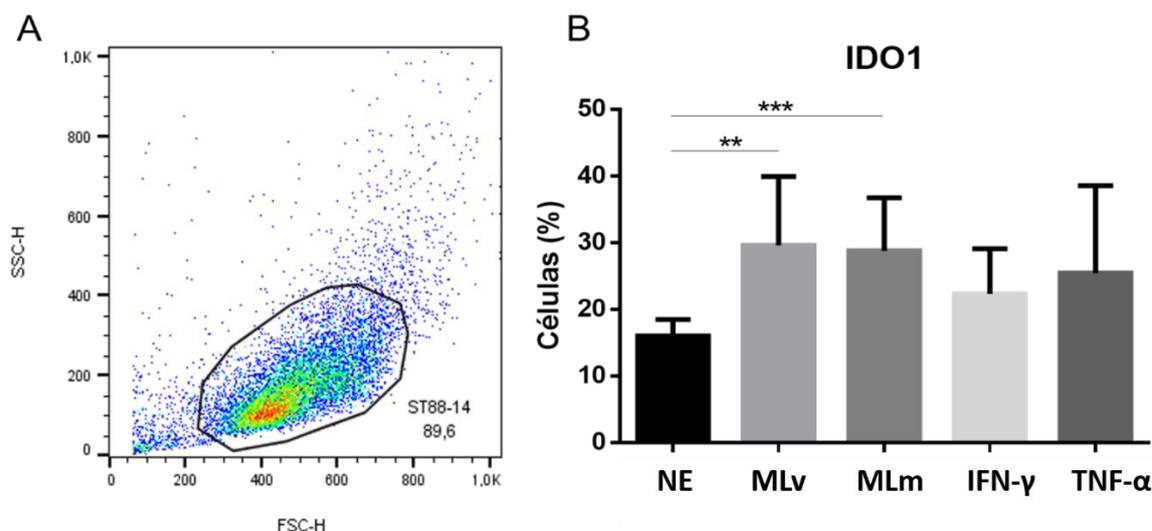
*Heatmap* mostrando a expressão dos genes *AADAT*, *IDO1* e *IDO2* em células de Schwann primárias infectadas (em verde) ou não (em roxo) com *M. leprae* (100:1) por 24h (em rosa) e 48h (em azul). A cor vermelha representa *up* regulação, enquanto a cor azul representa *down* regulação.

### 5.2 *M. leprae* aumenta a expressão, mas não a atividade de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14

No intuito de investigar se os resultados observados na célula de Schwann primária eram reproduzíveis em nosso modelo experimental, avaliamos a capacidade de *M. leprae*, bem como das citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em induzir aumento na expressão proteica de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14. Inicialmente, a expressão de IDO1 foi avaliada em células estimuladas com *M.*

*leprae* morto por irradiação (MLm) nos tempos de 24 e 48h, no entanto, não observamos variação na expressão entre os dois tempos (dados não mostrados). Portanto, as células foram infectadas/estimuladas com *M. leprae* viável (MOI 50:1), *M. leprae* morto (50µg/mL), IFN-γ (40ng/mL) ou TNF-α (1ng/mL) por 24 horas e a expressão de IDO1 foi avaliada por citometria de fluxo. Para isso, inicialmente foi realizado o *gate* na população de ST88-14 através dos parâmetros de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H) (Figura 11A) e a avaliação da porcentagem de células positivas para IDO1 foi realizada dentro do *gate*.

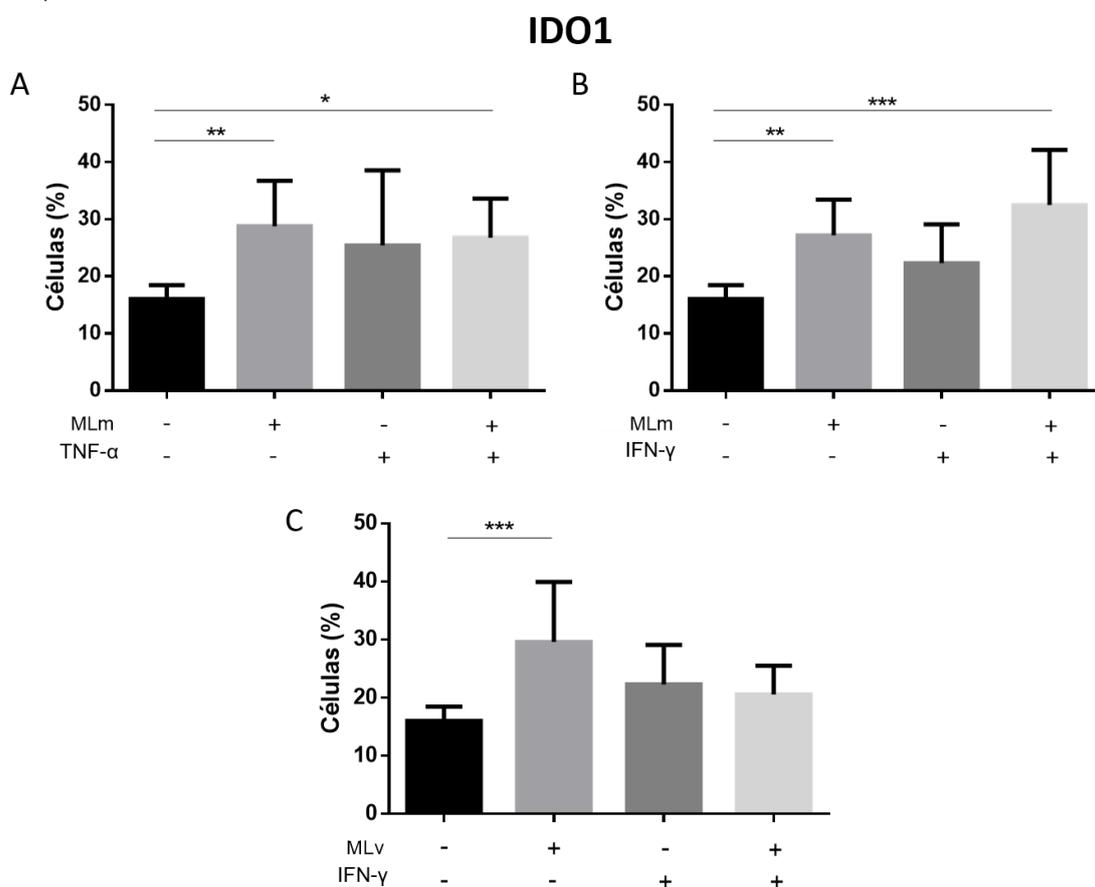
Como observado na Figura 11B, *M. leprae* viável (MLv) e morto (MLm) induziram aumento na expressão de IDO1 em relação às células não estimuladas (NE). Interessantemente, o tratamento com IFN-γ (40ng/mL) e TNF-α (1ng/mL), duas citocinas bem descritas quanto à capacidade de induzir IDO1 em macrófagos (Babcock & Carlin, 2000; Currier et al., 2000), não foram capazes de aumentar significativamente a expressão dessa enzima nas células da linhagem ST88-14 (Figura 11).



**Figura 11 - *M. leprae* aumenta a expressão de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14.**

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células por poço) e infectadas/estimuladas com *M. leprae* viável (MLv - MOI 50:1), *M. leprae* morto (MLm - 50µg/mL), IFN-γ (40ng/mL) e TNF-α (1ng/mL) por 24 hrs, ou não (NE – célula não estimulada). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo intracelular anti-IDO. A) Estratégia de *gate* na população de ST88-14 através dos parâmetros de tamanho (FSC-H) e granulosidade (SSC-H) e B) percentual de células positivas para IDO1 (Células %). A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur e a análise realizada usando o *software* FlowJo. Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentemente realizados. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn em que (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$

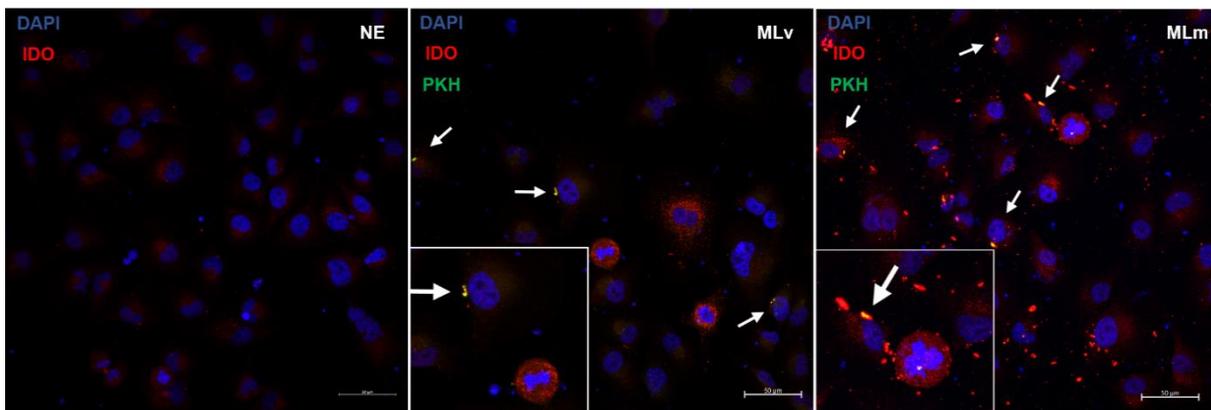
Também avaliamos se na presença de um pré estímulo com *M. leprae*, as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  seriam capazes de induzir aumento na expressão de IDO1. Para isso, as células foram estimuladas/ infectadas com *M. leprae* 30 minutos antes do estímulo com as citocinas. Apesar de ser observado um aumento na expressão de IDO1, em relação ao controle não estimulado, nas células estimuladas com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em associação ao *M. leprae* morto (Figura 12A e 9B), não foi observada diferença em relação ao estímulo apenas com o bacilo. As células estimuladas com IFN- $\gamma$  na presença do *M. leprae* viável não apresentaram aumento de IDO1 (Figura 12C).



**Figura 12 – Células de Schwann da linhagem ST88-14 estimuladas com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  na presença de *M. leprae* morto aumentam a expressão de IDO1.**

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células por poço), estimuladas com *M. leprae* morto ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) e após 30 minutos com A: TNF- $\alpha$  ( $1 \text{ ng/mL}$ ) ou B: IFN- $\gamma$  ( $40 \text{ ng/mL}$ ) por 24 horas ou C: infectadas com *M. leprae* viável (50:1) e após 30 minutos com IFN- $\gamma$  ( $40 \text{ ng/mL}$ ). Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo intracelular anti-IDO e o percentual de células positivas para IDO1 (Células %) foi avaliado. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur e a análise realizada usando o software FlowJo. Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentemente realizados. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn em que (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Com o objetivo de confirmar o aumento na expressão de IDO1 e avaliar a distribuição das células positivas para IDO1 mediante ao estímulo/infecção por *M. leprae*, foi realizado um ensaio de imunofluorescência. Para isso, os bacilos foram previamente corados em verde com PKH, em seguida as células foram estimuladas/infectadas por 24h. É possível observar um aumento na expressão de IDO1 em células adjacentes às células infectadas/estimuladas (Figura 13).



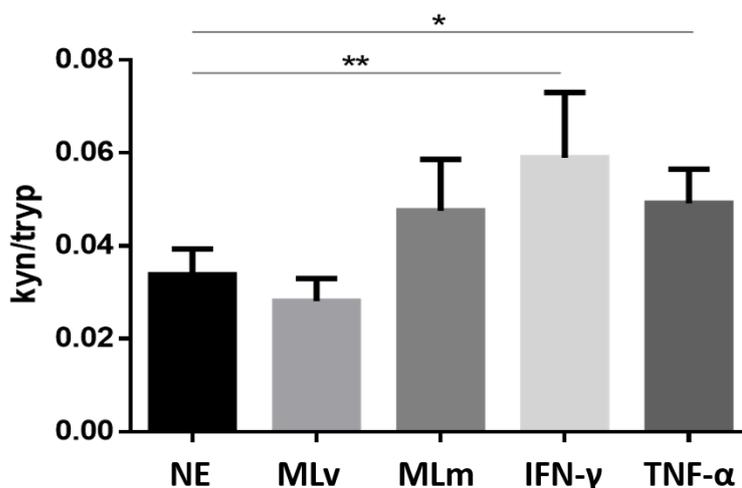
**Figura 13 - *M. leprae* é capaz de aumentar a expressão proteica de IDO1.**

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram plaqueadas ( $7 \times 10^4$ ) e infectadas/estimuladas ou não com *M. leprae* (MLv e MLm) (em verde, PKH) por 24 horas. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo anti-IDO1 (em vermelho, Alexa Fluor 568) e a marcação com DAPI (em azul) foi utilizada para visualizar o núcleo das células. As setas brancas indicam as células infectadas com *M. leprae*. Imagens representativas de 3 experimento independentes. As imagens foram obtidas usando o microscópio confocal LSM 510-META (Zeiss). O tamanho de 50  $\mu\text{m}$  se aplica à barra de escala das imagens. NE = Controle não estimulado.

Levando em consideração que IDO1 é uma enzima ativada por modificações pós traducionais, a avaliação de sua atividade, obtida através da razão quinurenina/triptofano (kyn/trp), é de extrema importância. Desse modo, o sobrenadante da cultura das células de Schwann infectadas com *M. leprae* viável (MOI 50:1), ou estimuladas com *M. leprae* morto (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), IFN- $\gamma$  (40ng/mL) ou TNF- $\alpha$  (1ng/mL) por 24h foi utilizado para avaliar a atividade de IDO1 por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Conforme observado na Figura 14, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram capazes de induzir aumento na atividade enzimática de IDO1, no entanto, *M. leprae* viável e morto não apresentaram variação significativa em relação ao controle não estimulado.

## Atividade de IDO

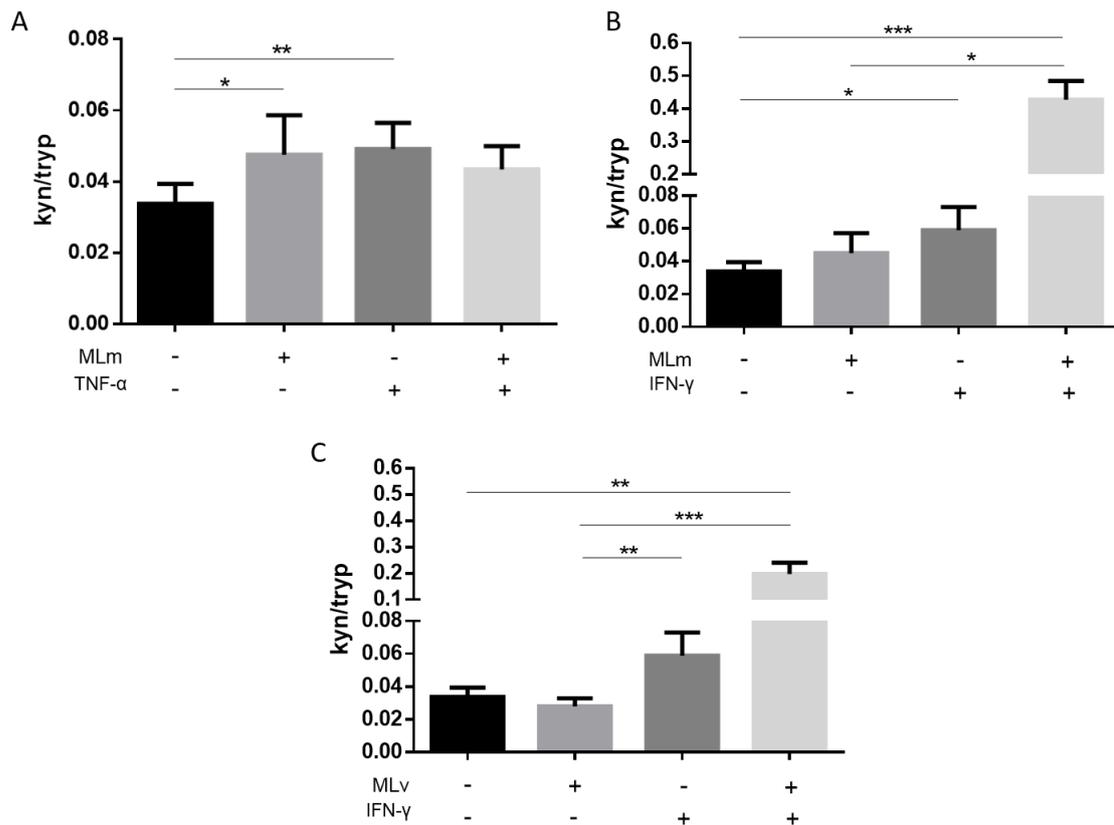


**Figura 14 - As citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  induzem aumento na atividade de IDO1 em células de Schwann da linhagem ST88-14.**

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$ ) e infectadas com *M. leprae* viável (MOI 50:1) ou estimuladas com *M. leprae* morto (50 $\mu$ g/mL), ou IFN- $\gamma$  (40ng/mL) ou TNF- $\alpha$  (1ng/mL) por 24 horas. Em seguida o sobrenadante foi coletado e a atividade de IDO1 mensurada através da razão quinurenina / triptofano (kyn/trypt) por HPLC. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de seis experimentos independentemente realizados. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn em que (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .

Em seguida, fomos avaliar a existência de sinergismo entre *M. leprae* e IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  na modulação da atividade de IDO1. Para isso, as células de Schwann foram estimuladas com *M. leprae* morto (50 $\mu$ g/mL) e, após 30 minutos, estimuladas com TNF- $\alpha$  (1ng/mL) (Figura 15A) ou IFN- $\gamma$  (40ng/mL) (Figura 15B) ou estimuladas com IFN- $\gamma$  (40ng/mL) 30 minutos após serem infectadas com *M. leprae* viável (MOI 50:1) (Figura 15C). Após o período de 24 horas, os sobrenadantes foram recolhidos e a razão quinurenina / triptofano (kyn/trp) foi determinada por HPLC. Como observado na Figura 15A, há um aumento significativo na atividade de IDO1 nas células estimuladas com *M. leprae* morto ou TNF- $\alpha$ , no entanto, não houve aumento na atividade de IDO1 quando as células foram estimuladas com *M. leprae* e TNF- $\alpha$  em comparação aos estímulos isoladamente. Entretanto, foi observado um aumento significativo na razão quinurenina / triptofano quando as células foram incubadas com *M. leprae* e IFN- $\gamma$  (Figura 15B e C). A média da razão quinurenina / triptofano foi duas vezes maior nas células estimuladas com *M. leprae* morto e IFN- $\gamma$  (Figura 15B) em relação as células estimuladas com *M. leprae* viável e IFN- $\gamma$  (Figura 15C).

## Atividade de IDO



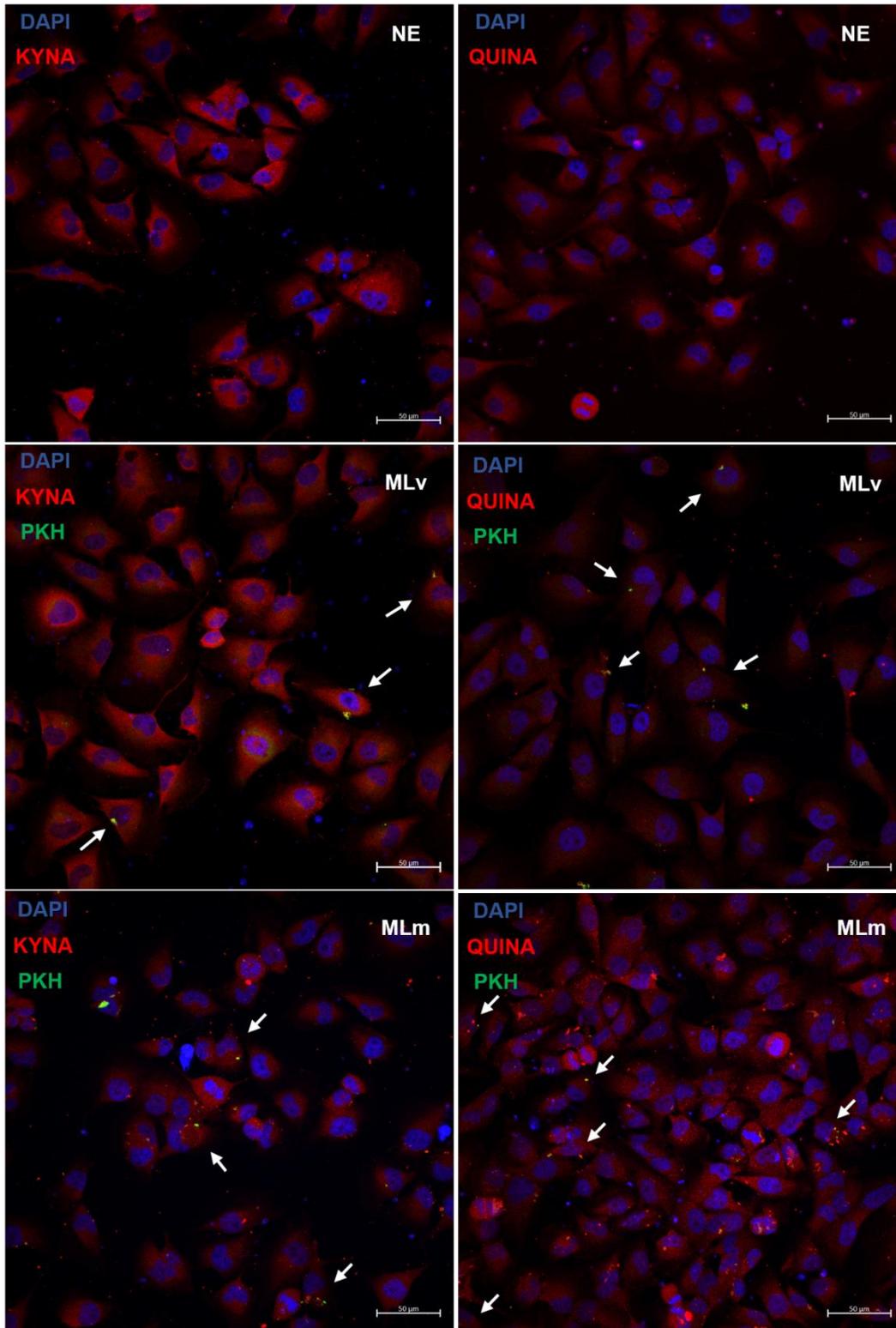
**Figura 15 - IFN- $\gamma$ , mas não TNF- $\alpha$ , possui capacidade sinérgica com *M. leprae* na indução de aumento da atividade de IDO1 em células de Schwann.**

Atividade de IDO avaliada pela razão quinurenina / triptofano (kyn/tryp) por HPLC em sobrenadante de células de Schwann da linhagem ST88-14 estimuladas com A: *M. leprae* morto (50 $\mu$ g/mL) e/ou TNF- $\alpha$  (1ng/mL), B: *M. leprae* morto (50 $\mu$ g/mL) e/ou IFN- $\gamma$  (40ng /mL), e C: *M. leprae* viável (50:1) e/ou IFN- $\gamma$  (40ng /mL) por 24 horas. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentemente realizados. 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  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

### 5.3 Efeito antagônico do *M. leprae* viável e IFN- $\gamma$ nos metabólitos finais da via das quinureninas

Visto que não somente a avaliação da ativação da via das quinureninas, como também o deslocamento do balanço metabólico é fundamental em estudos sobre neurodegeneração (Bonda et al., 2010; Heng et al., 2009; Guillemin et al., 2005; Veen et al., 2016; Sathyaikumar et al., 2001; Rojewska et al., 2018), fomos avaliar a presença dos metabólitos ácido quinurênico (KYNA) e ácido quinolínico (QUINA), dois produtos centrais e antagônicos na via das quinureninas, nas células de Schwann da linhagem ST88-14 frente aos diferentes estímulos.

A avaliação da concentração intracelular dos metabólitos foi realizada através de imunofluorescência em células estimuladas/infectadas ou não com *M. leprae* (Figura 16). Conforme demonstrado na Figura 16, não é possível observar diferença no padrão da marcação intracelular para ambos os metabólitos entre o controle não estimulado e as células estimuladas/infectadas com *M. leprae*.



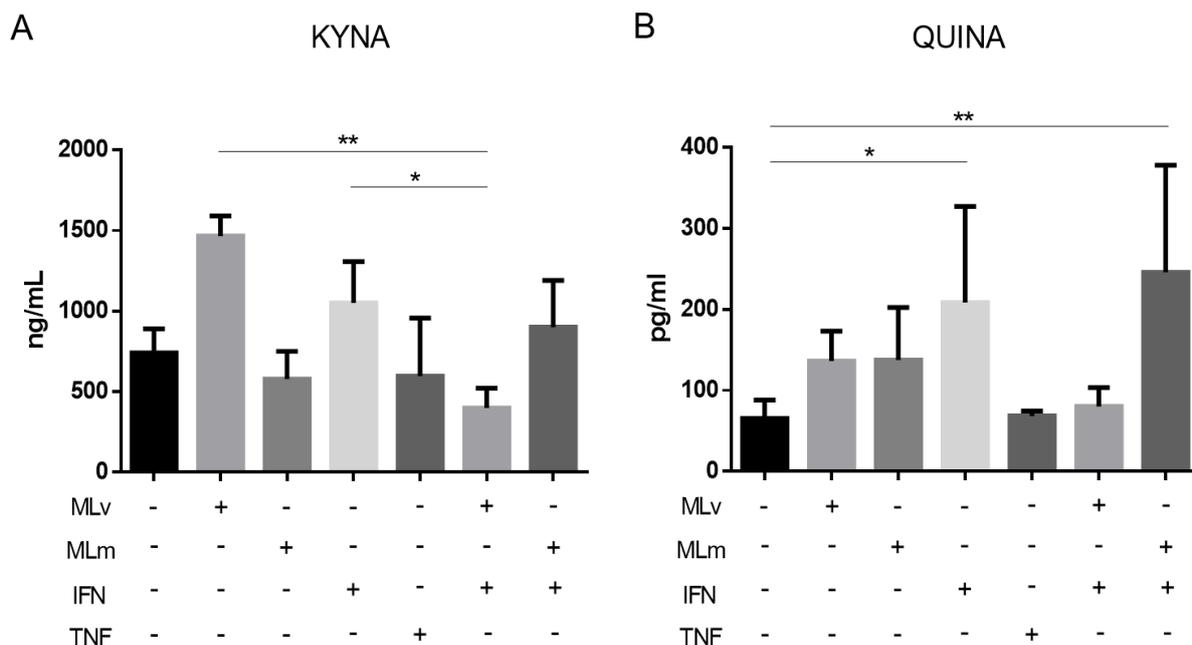
**Figura 16 - Avaliação intracelular de KYNA e QUINA em células estimuladas/infectadas com *M. leprae* é semelhante aos controles.**

As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram plaqueadas ( $7 \times 10^4$ ) e estimuladas/infectadas ou não com *M. leprae* (MLv, 50: 1) e *M. leprae* morto (MLm, 50 $\mu$ g/mL) marcado em verde com PKH por 24h. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpo anti-KYNA e anti-QUINA (em vermelho, Alexa Fluor 568) e a marcação com DAPI (em azul) foi utilizada para visualizar o núcleo das células. Imagens representativas de 3 experimento independentes. As setas brancas indicam as células infectadas com *M. leprae*. As imagens foram obtidas usando o microscópio confocal LSM 510-META (Zeiss) O tamanho de 50  $\mu$ m se aplica à barra de escala das imagens. NE = Controle não estimulado

Em seguida, fomos avaliar a concentração dos metabólitos no sobrenadante das culturas estimuladas. Para isso, as células foram infectadas ou estimuladas com *M. leprae* (MOI 50:1), *M. leprae* morto (50 $\mu$ g/mL), IFN- $\gamma$  (40ng/mL) e TNF- $\alpha$  (1ng/mL). Nos casos onde mais de um estímulo foi utilizado, *M. leprae* viável ou morto foi colocado na cultura 30 minutos antes do IFN- $\gamma$ . Após o período de 24h, os sobrenadantes foram recolhidos e posteriormente utilizados para avaliação dos metabólitos por ELISA (Figura 17).

Conforme observado na Figura 17A, as maiores concentrações de KYNA foram observadas nas células infectadas com *M. leprae* viável, apresentando um aumento de 2x em relação ao controle não estimulado. Ao contrário, as células infectadas com *M. leprae* em conjunto com o estímulo de IFN- $\gamma$  apresentaram uma redução na concentração de KYNA quando comparadas aos estímulos individuais (Figura 17A).

Já em relação a concentração de QUINA, houve um aumento significativo em relação ao controle quando as células foram estimuladas com IFN- $\gamma$  ou *M. leprae* morto e IFN- $\gamma$ . Em contrapartida, as células estimuladas com *M. leprae* viável em conjunto com IFN- $\gamma$  apresentaram uma redução superior a 2x na concentração de QUINA em comparação ao estímulo apenas do IFN- $\gamma$  e de 3x em relação ao estímulo de *M. leprae* morto em conjunto com IFN- $\gamma$ , mantendo os valores próximos ao controle não estimulado (Figura 17B).



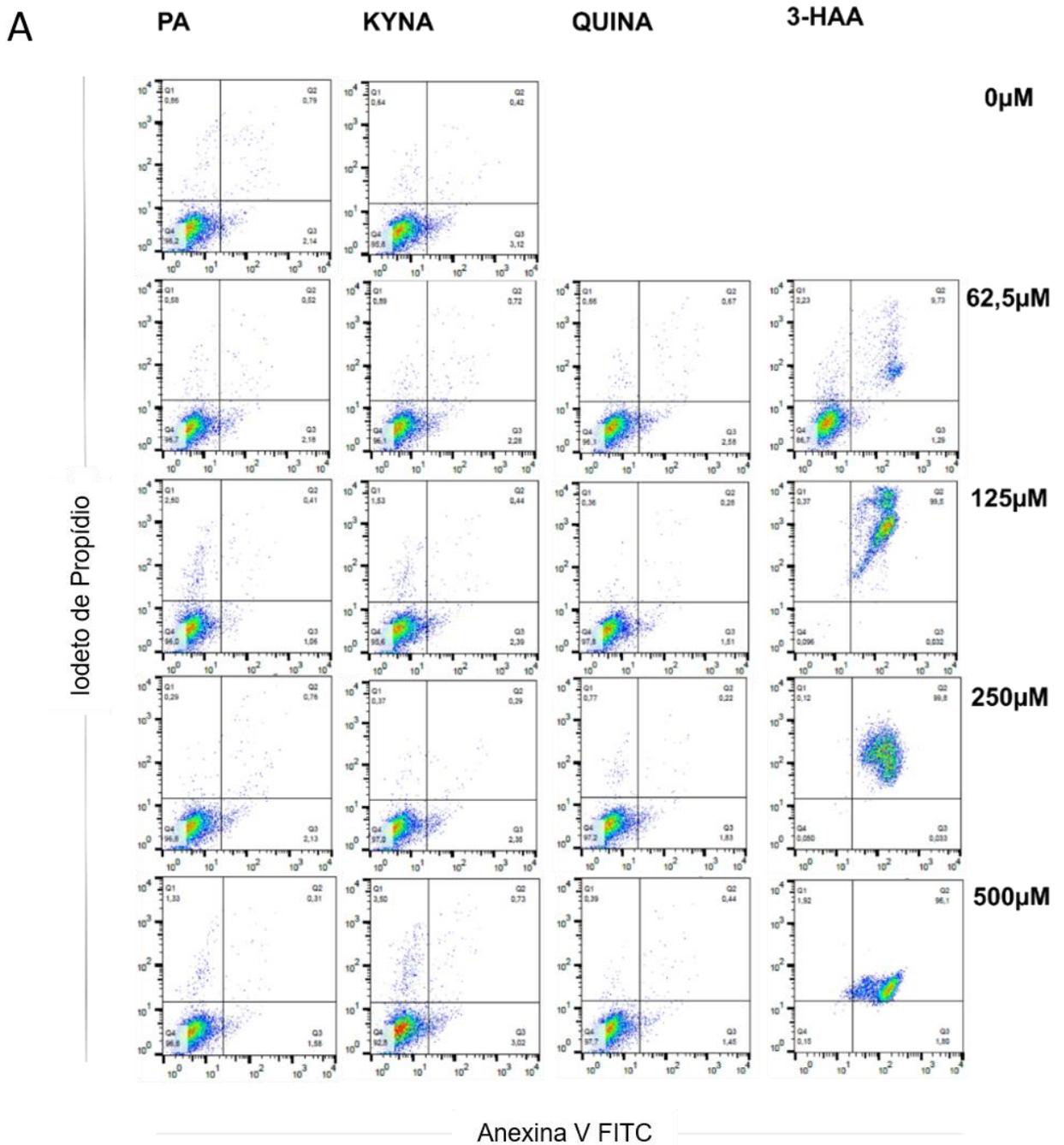
**Figura 17 - *M. leprae* viável aumenta a concentração KYNA, enquanto IFN- $\gamma$  aumenta a concentração de QUINA no sobrenadante de células de Schwann.**

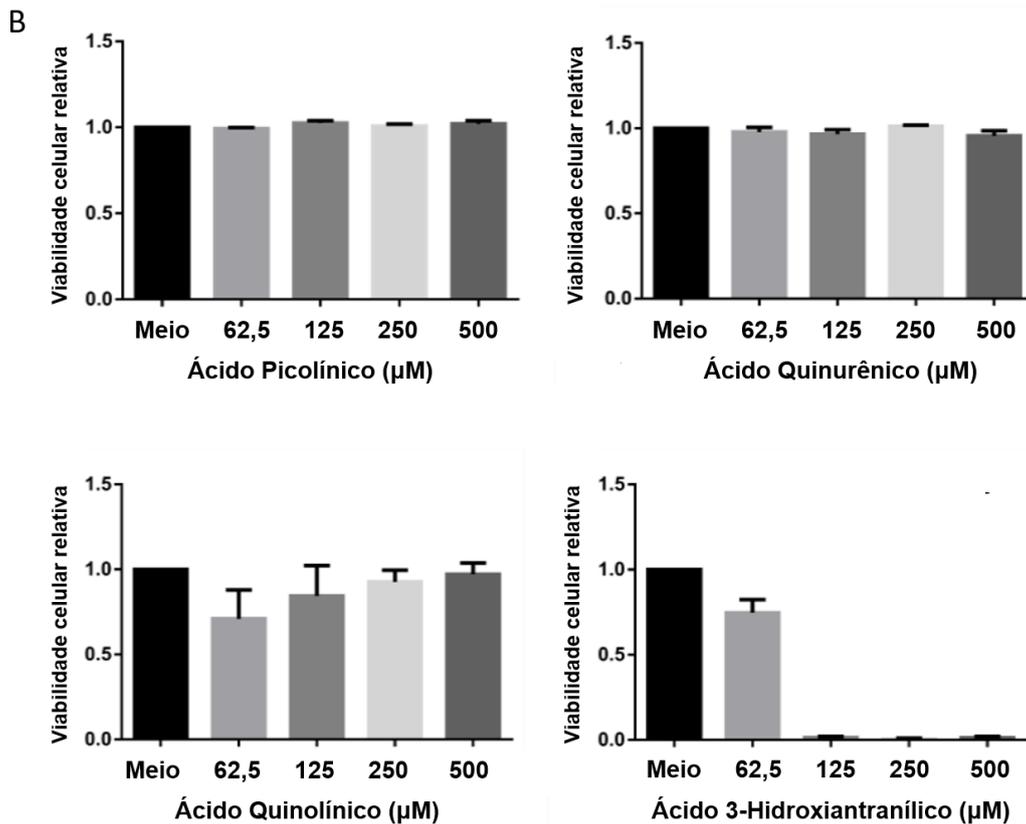
As células de Schwann da linhagem ST88-14 foram infectadas/estimuladas com *M. leprae* na presença ou não de IFN- $\gamma$  (40ng/mL) ou estimuladas com TNF- $\alpha$  (1ng/mL) por 24 horas. A concentração dos metabólitos KYNA (A) e QUINA (B) foi avaliada no sobrenadante de ST88-14 por ELISA. Os resultados são representados pela média  $\pm$  desvio padrão de cinco 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  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .

#### 5.4 Avaliação da toxicidade dos metabólitos da via das quinureninas na célula de Schwann ST88-14

Visto que *M. leprae* e IFN- $\gamma$  foram capazes de modular as concentrações de KYNA e QUINA em células de Schwann da linhagem ST88-14, e que QUINA bem como outros metabólitos da via são descritos na literatura como possuindo atividade neurotóxica (Carvalho et al., 2017), fomos avaliar a toxicidade desses e outros metabólitos da via das quinureninas em nosso modelo experimental. Para isso as células foram incubadas com diferentes concentrações (62,5 $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 250 $\mu$ M e 500  $\mu$ M) de ácido picolínico (PA), ácido quinurênico (KYNA), ácido quinolínico (QUINA) e ácido 3-hidroxiantranílico (3-HAA). Em seguida as células foram marcadas com o kit de detecção de apoptose FITC Anexina V e a marcação foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 18).

A análise da viabilidade celular demonstrou que apenas o ácido 3-hidroxiantranílico causou redução na viabilidade das células ST88-14 (Figura 18A). Como observado na Figura 18B, no ponto mais baixo da curva de concentração (62,  $\mu\text{M}$ ) o metabólito 3-HAA já reduziu a viabilidade relativa das células em 25%, valor que fica próximo aos 100% no segundo ponto da curva (125 $\mu\text{M}$ ) e se mantém nas concentrações de 250 $\mu\text{M}$  e 500 $\mu\text{M}$ . Os demais metabólitos não afetaram de forma significativa a viabilidade das células da linhagem ST88-14.





**Figura 18 - 3-HAA induz apoptose em células de Schwann humanas.**

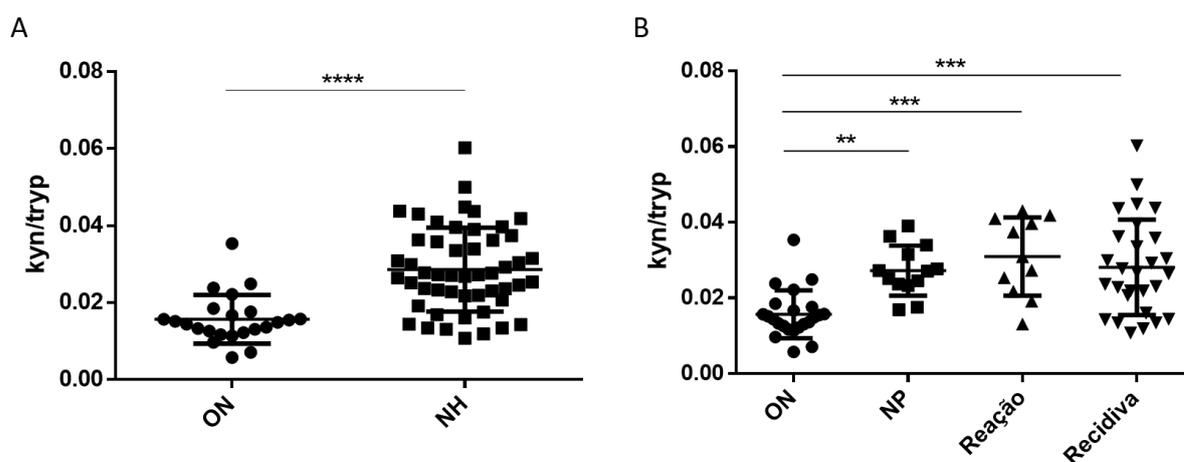
As células de Schwann da linhagem ST88-14 foi estimulada com as concentrações indicadas ( $\mu\text{M}$ ) de ácido picolínico (PA), ácido quinurênico (KYNA), ácido quinolínico (QUINA) e ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA). Após 24 h, a apoptose foi avaliada por Anexina V-FITC (eixo x) e iodeto de propídio (eixo y). (A) São mostrados os *dot blots* de um experimento representativo ( $n = 3$ ). (B) Dados cumulativos de ensaios de viabilidade celular de três experimentos independentes. A porcentagens de células viáveis (duplo-negativas) em meio livre de metabólitos foram tomadas como referência.

## 5.5 Atividade de IDO1 está aumentada no soro de pacientes com neuropatia hanseniana

Alterações na via das quinureninas têm sido relacionadas à fisiopatologia de diversos transtornos neurológicos e doenças inflamatórias, tais como: depressão, esquizofrenia, Alzheimer, doença de Huntington, Parkinson e dor neuropática (Bonda et al., 2010; Heng et al., 2009; Guillemin et al., 2005; Veen et al., 2016; Sathyaikumar et al., 2001; Rojewska et al., 2018). Com o intuito de observar se IDO1 está associado com o dano neural na hanseníase, a atividade enzimática de IDO1 foi avaliada no soro de pacientes com neuropatia hanseniana e comparada com a atividade da enzima em amostras de pacientes classificados como outras neuropatias periféricas não hansenianas (Figura 19).

Como descrito na seção material e métodos, utilizamos 74 soros de pacientes atendidos no Ambulatório Souza Araújo que apresentaram algum tipo de neuropatia. A análise dos dados demográficos demonstrou que houve predomínio de homens em relação às mulheres em todos os grupos, com 56,5% de homens no grupo de neuropatias não hansenianas, 53,8 % no grupo de neural pura, 91% no grupo multibacilar em reação e 74% de homens no grupo multibacilar em recidiva. A análise dos dados clínicos demonstrou que a maioria dos pacientes classificados como recidiva apresentava algum grau de dor neural (77%), enquanto nos grupos em reação e neural pura essa porcentagem foi de 22,2% e 25% respectivamente (Tabela 1). No grupo com outras neuropatias periféricas, a dor neural estava presente em 47,6% dos casos (Tabela 2).

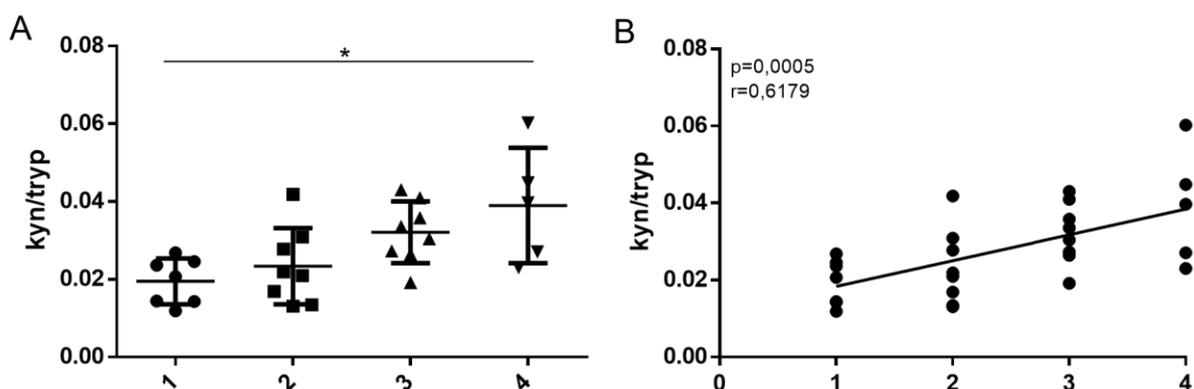
Em relação à avaliação da atividade de IDO1, houve um aumento significativo nos soros de pacientes com neuropatia hanseniana quando comparados aos soros de pacientes com outras neuropatias (Figura 19A). No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os diferentes grupos de pacientes com neuropatia hanseniana (Figura 19B).



**Figura 19 - Atividade de IDO1 está aumentada em pacientes com neuropatia hanseniana.**

(A) Avaliação da atividade de IDO1 por HPLC no soro de pacientes classificados como neuropatias não hanseniana (ON) e neuropatia hanseniana (NH) e (B) comparação da atividade de IDO1 no soro de pacientes classificados com neuropatias não hanseniana (ON) e pacientes com as formas Neural Pura (NP), Reação e Recidiva utilizando a razão quinurenina / triptofano (kyn/trp). Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 74 amostras, sendo 23 do grupo ON e 51 do grupo NH (13 NP, 11 Reação e 27 Recidiva). 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  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , (\*\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

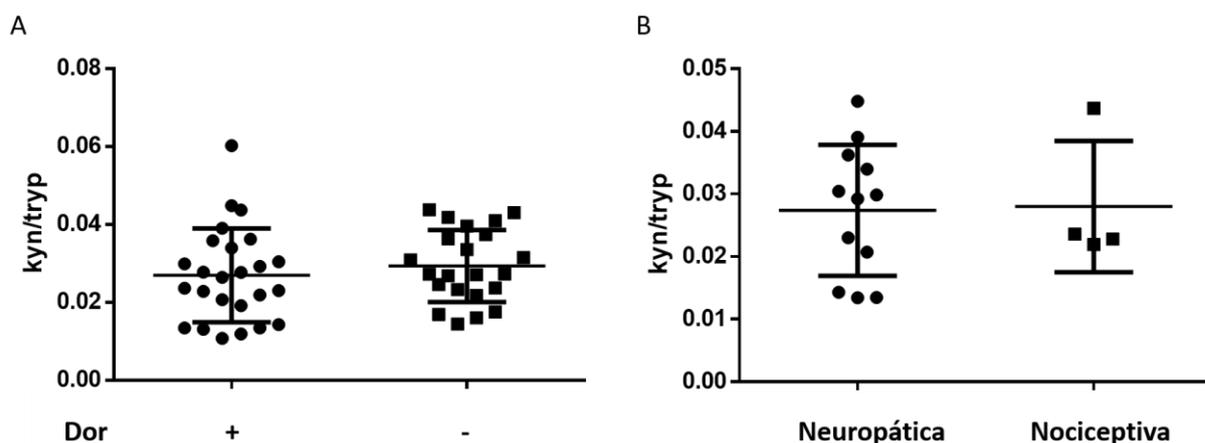
Em seguida, com o objetivo de correlacionar a atividade de IDO1 com o dano neural nos pacientes com hanseníase, estes foram classificados de acordo com o tipo de dano neural determinado através da eletroneuromiografia, em que 1: dano desmielinizante, 2: axonal, 3: sem resposta sensitiva e, 4: sem resposta sensitiva e motora. Como observado na Figura 20A houve um aumento significativo da atividade de IDO1 no soro dos pacientes com dano mais grave, com perda da resposta sensitiva e motora (4), em relação aos pacientes com dano inicial, ou seja, desmielinizante (1). Além disso, através do teste de correlação foi possível observar a tendência de aumento da atividade de IDO1 com a gravidade do tipo de dano (Figura 20B).



**Figura 20 - Atividade de IDO1 no soro de pacientes com neuropatia hanseniana aumenta de acordo com a gravidade do dano neural.**

(A) Avaliação da atividade de IDO1 por HPLC no soro de pacientes classificados de acordo com o tipo de dano neural em 1: desmielinizante (N: 7), 2: Axonal (N: 8), 3: Sem resposta sensitiva (N: 8), 4: Sem resposta sensitiva e motora (N: 5) utilizando a razão quinurenina / triptofano (kyn/tryp) e (B) correlação entre atividade de IDO e tipo de dano neural em pacientes com hanseníase. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn (A) e método de correlação de Pearson (B) em que (\*) significa  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Também investigamos a associação entre atividade de IDO1 e a presença de dor neural (Figura 21A), bem como em relação à classificação do tipo de dor dos pacientes avaliados (Figura 21B). No entanto, não foi observada nenhuma diferença no valor médio da atividade de IDO1 entre os grupos.

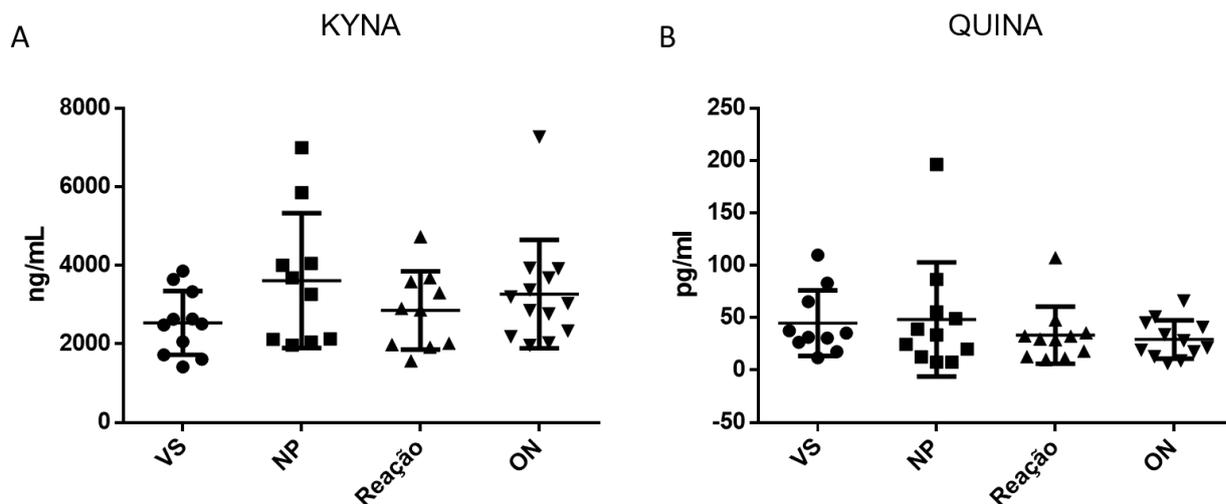


**Figura 21 - Atividade de IDO1 de acordo com a presença ou não de dor neural.**

(A) Avaliação da atividade de IDO1 por HPLC no soro de pacientes com neuropatia hanseniana classificados de acordo com a presença (N: 25) ou não (N: 22) de dor neural e (B) de acordo com a presença de dor neuropática (N: 12) ou nociceptiva (N: 4). O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi determinada pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney.

## 5.6 Concentração de ácido quinurênico e quinolínico no soro de pacientes com neuropatia hanseniana é similar aos controles

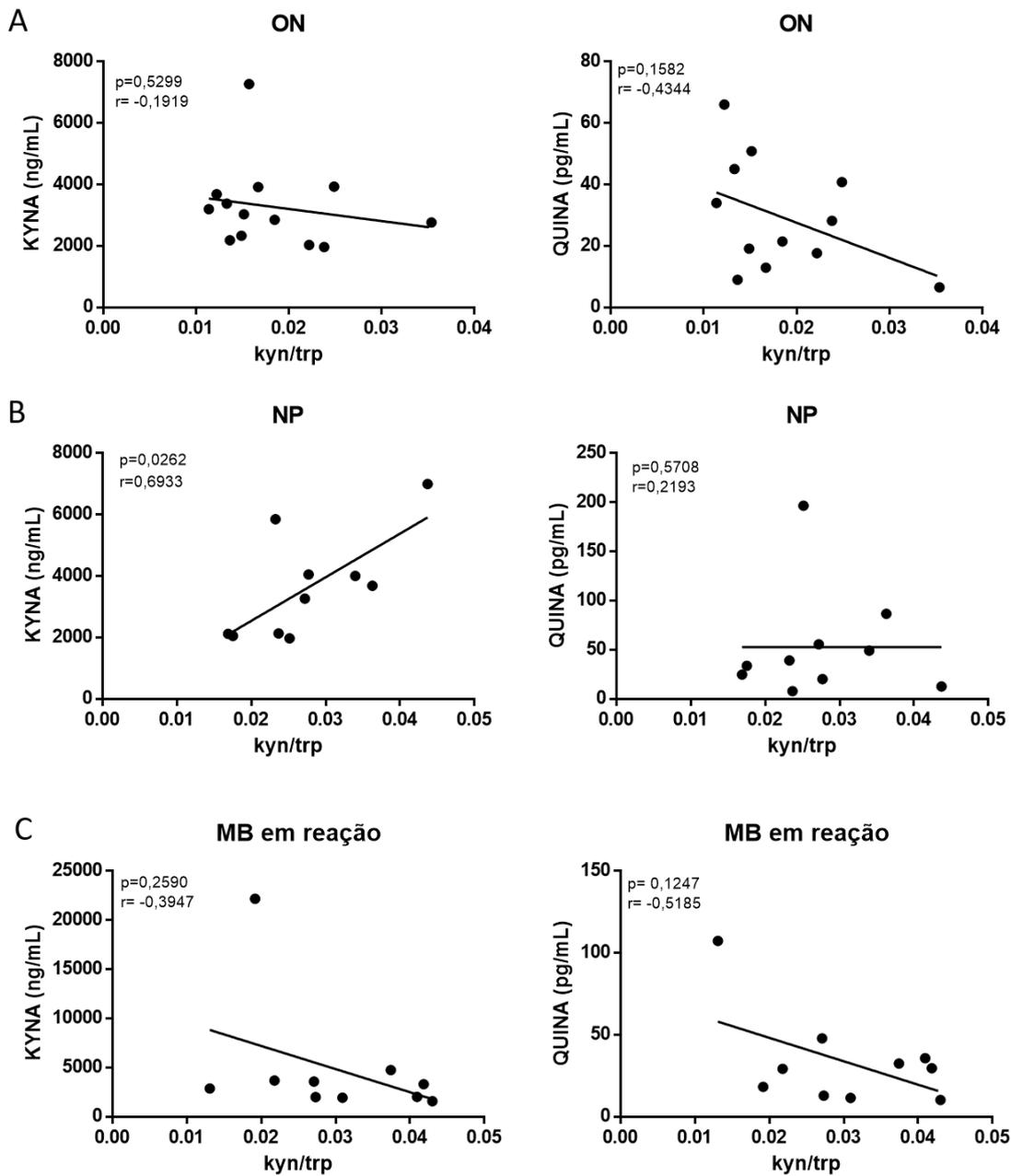
Posteriormente à avaliação da atividade de IDO1 nos pacientes com neuropatia, fomos avaliar a concentração dos metabólitos finais da via, KYNA (Figura 22A) e QUINA (Figura 22B) por ELISA. Foram avaliados 44 soros, dos quais 10 foram de pacientes classificados como Neural Pura, 10 como multibacilares em reação, 13 como neuropatias não hansenianas, e 11 voluntários sadios (VS). Como observado na Figura 22 nenhuma variação significativa foi observada entre os grupos para ambos os metabólitos (KYNA e QUINA).



**Figura 22 - Concentração de KYNA e QUINA em soro de pacientes com neuropatia hanseniana é similar aos controles.**

A concentração dos metabólitos KYNA (A) e QUINA (B) foi avaliada no soro de pacientes com a forma multibacilar em reação e neural pura (NP) da hanseníase em comparação com indivíduos saudáveis e outras neuropatias não hansenianas (ON) por ELISA. Os resultados são representados pela média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi determinada pelo teste One way ANOVA não-paramétrico Kruskal-Wallis com múltiplas comparações e pós - teste de Dunn.

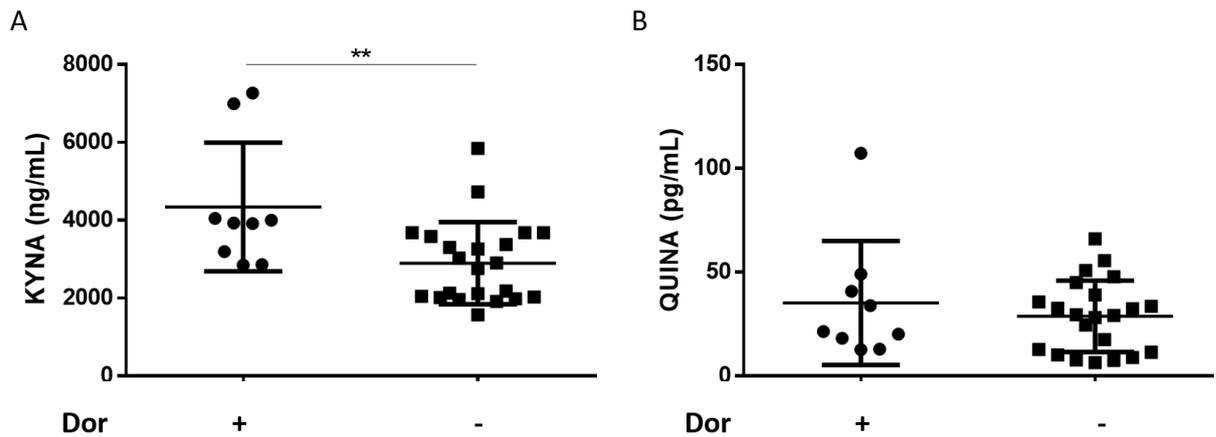
Com o intuito de avaliar se há uma tendência de deslocamento na direção da produção de KYNA ou QUINA quando a via está ativada, fomos avaliar a correlação entre atividade de IDO1 e a concentração desses metabólitos no soro de pacientes com outras neuropatias não hansenianas (Figura 23A), neural pura (Figura 23B) e multibacilar em reação (Figura 23C). Apesar de nenhuma correlação significativa, para ambos os metabólitos, ter sido observada nos grupos ON e Reação (Figura 23 A e B), foi observada uma correlação positiva e significativa entre a atividade de IDO1 e a concentração de KYNA em soros de pacientes com a forma neural pura (Figura 23B).



**Figura 23 - A concentração de KYNA é diretamente proporcional a atividade de IDO1 em pacientes do grupo Neural Pura.**

Correlação entre a atividade de IDO e as concentrações de KYNA ou QUINA em pacientes com outras neuropatias não hansenianas (A), pacientes com a forma neural pura (B) e multibacilar em reação (C). 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.

Também investigamos a associação entre as concentrações de KYNA e QUINA com a presença de dor neural nos pacientes com neuropatia hanseniana ou não (Figura 24). Como observado na Figura 24A, houve um aumento significativo na concentração de KYNA no soro de pacientes com queixa de dor neural em comparação aos pacientes sem dor, independente da etiologia da neuropatia. Em relação as concentrações de QUINA, nenhuma variação foi observada em associação à presença ou não de dor neural (Figura 24B).



**Figura 24 - Concentração de KYNA está aumentada no soro de pacientes com dor neural.** Avaliação da concentração de KYNA (A) e QUINA (B) no soro de pacientes com neuropatia (hanseniana ou não) classificados de acordo com a presença ou não de dor neural. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi determinada pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney em que (\*) significa  $p < 0,05$  e (\*\*)  $p < 0,01$ .

## 6 DISCUSSÃO

O dano neural é uma característica central da patogênese da hanseníase. No entanto, os mecanismos que desencadeiam a lesão do nervo periférico em pacientes com hanseníase permanecem pouco compreendidos. O comprometimento funcional dos nervos cutâneos é uma característica precoce da doença, com anormalidades sensitivas presentes já nas primeiras lesões diagnosticadas, resultante de um processo crônico de degeneração e regeneração das fibras nervosas. Quando não interrompido, os resultados finais da infecção por *M. leprae* e da resposta do hospedeiro nos nervos são desmielinização, degeneração das fibras nervosas e fibrose (Scollard, 2008).

Apesar de não estar claro o quanto a infecção das células de Schwann ou o microambiente inflamatório dentro e ao redor dos nervos influenciam no dano nervoso; acredita-se que as células de Schwann estão diretamente envolvidas na patogênese da lesão nervosa na hanseníase (Scollard et al., 2015). Até pouco tempo, as células de Schwann eram consideradas células comprometidas exclusivamente com as funções da glia, porém muitos autores têm mostrado cada vez mais a plasticidade desta célula. Foi demonstrada a sua capacidade de transdiferenciação em outros tipos celulares como melanócitos, fibroblastos e miofibroblastos (Petito et al., 2013; Real et al., 2005), além do processo de dediferenciação em células semelhantes às células tronco/progenitoras (pSLC) quando infectadas com *M. leprae*, processo este que contribui para a disseminação do bacilo (Masaki et al., 2013). Estes trabalhos evidenciam a importância do estudo da participação das células de Schwann no dano neural em pacientes com hanseníase.

O envolvimento de IDO1 na resposta imunológica contra o bacilo de Hansen vem sendo estudado arduamente pelo nosso grupo (De Souza Sales et al., 2011; Moura et al., 2012; Andrade et al., 2015; Barbosa et al., 2017). Nossos resultados iniciais demonstraram que pacientes multibacilares apresentam um aumento da expressão e atividade de IDO1 em células de lesão de pele e soro quando comparados aos pacientes paucibacilares (De Souza Sales et al., 2011; Moura et al., 2012). Sabe-se que a neuropatia em pacientes multibacilares evolui de forma diversa à neuropatia em pacientes paucibacilares. Estima-se que 30 a 60% dos pacientes multibacilares apresentem dano difuso no nervo periférico no momento do diagnóstico, que continua progredindo mesmo após o uso da PQT e corticosteroides

(Van Veen et al., 2008). A neuropatia no paciente multibacilar evolui de forma silenciosa e, frequentemente, quando o paciente apresenta os sintomas, já se encontra com uma lesão irreversível. Diversos grupos vêm investigando a participação de IDO1 e seus metabólitos em patologias neuro-inflamatórias do sistema nervoso central (Rojewska et al., 2018; Laumet et al., 2017; Rahman et al., 2018). No entanto, até o momento, não tivemos conhecimento de nenhum trabalho que tenha avaliado o papel da via das quinureninas em neuropatias periféricas, somente alguns poucos estudos em modelos experimentais. Assim, no presente estudo fomos avaliar se há alguma relação entre a atividade sérica de IDO1 em pacientes com hanseníase e o dano neural. Em conjunto, nos propusemos a esclarecer se a modulação de IDO1 observada em macrófagos também ocorre nas células de Schwann e se, assim como observado no sistema nervoso central (SNC), essa modulação está envolvida no dano neural na periferia.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que *M. leprae* é capaz de aumentar a expressão e atividade enzimática de IDO1 em monócitos humanos (De Souza Sales et al., 2011). No entanto, pouco se sabe sobre a expressão desta enzima e a modulação da via das quinureninas em células de Schwann. A fim de analisarmos se esse padrão se reproduz nas células de Schwann, realizamos a análise dos dados de microarranjo depositados no banco de dados “Gene expression. Omnibus”, onde as células de Schwann humanas primárias foram infectadas com *M. leprae*. A análise dos dados demonstrou um aumento na expressão de *IDO1* e *IDO2*, bem como uma diminuição na expressão de *AADAT* nas células infectadas, sugerindo que *M. leprae* é capaz de induzir a degradação do triptofano, na célula de Schwann, através da via das quinureninas, visto que IDO1 está *up*-regulada. Além disso, a diminuição da expressão de *AADAT* nas células de Schwann primárias pode ser um indício de que *M. leprae* possa estar levando a um deslocamento do balanço metabólico, favorecendo a formação de produtos neurotóxicos, como 3-HK, 3-HAA e QUINA, em detrimento do produto neuroprotetor da via, KYNA, uma vez que *AADAT* é importante para a formação de ácido quinurênico (Moffett & Nambodiri, 2003).

Com o objetivo de validar os dados observados na célula de Schwann primária, investigamos a expressão de IDO1 na célula de Schwann humana da linhagem ST88-14 frente a diferentes estímulos externos considerados indutores de IDO1. Nossos dados de expressão proteica demonstraram que *M. leprae* induziu aumento significativo na expressão de IDO1 em relação ao controle. Interessantemente, esse

aumento na expressão não se traduziu em aumento da atividade enzimática de IDO1 que se manteve em valores próximos ao controle quando as células foram infectadas.

Estudos anteriores demonstraram que pacientes multibacilares que desenvolvem reação reversa apresentam um aumento na produção de IFN- $\gamma$  em resposta ao *M. leprae*, bem como aumento da atividade de IDO1. Uma vez que os episódios reacionais estão associados a um incremento do dano neural, fomos investigar se, de modo análogo ao observado em macrófagos (Robinson *et al.*, 2005), IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são capazes de induzir a expressão de IDO1 em células de Schwann. Ao contrário do que foi observado em relação a *M. leprae*, a avaliação da expressão de IDO1 em células estimuladas com IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  não demonstrou variação significativa em relação ao controle, no entanto, tais estímulos induziram um aumento significativo em sua atividade enzimática. Observamos ainda que *M. leprae* em associação com o IFN- $\gamma$  exerce um forte estímulo na indução da atividade enzimática de IDO1, sendo ainda mais expressivo nas células estimuladas com *M. leprae* morto em comparação ao *M. leprae* viável. Tais dados sugerem que citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  podem ser importantes para induzir o aumento de IDO1 durante o episódio reacional e o bacilo pode desviar para um eixo da via com geração de metabólitos neurotóxicos, contribuindo para o dano neural.

Recentemente, Majumdar e colaboradores (2019) em estudo *in vitro* de infecção por *Toxoplasma gondii* mostrou que, apesar de induzir aumento na expressão gênica de *IDO1*, o parasito é capaz de inibir a atividade de IDO1 levando o triptofano a ser catabolizado em melatonina. No entanto, na presença de IFN- $\gamma$ , a via das quinureninas é ativada, o que prejudica o crescimento do *T. gondii*. Esse trabalho, em associação com nossos resultados, sugere que o *M. leprae* viável tenha mecanismos para evitar a ativação de IDO1 na célula de Schwann, mecanismo esse revogado na presença do IFN- $\gamma$ .

Os metabólitos KYNA e QUINA são dois produtos centrais e antagônicos na via das quinureninas. O balanço metabólico entre esses dois produtos tem sido frequentemente avaliado em trabalhos sobre distúrbios neurodegenerativos, bem como em processos infecciosos com consequências neurológicas. Laument e colaboradores (2017) constataram que o comportamento depressivo observado em ratos com dor neuropática está associado a *up*-regulação da quinurenina 3-monooxygenase (KMO), enzima chave na metabolização da quinurenina em QUINA. De forma complementar, foi demonstrado que a inibição de KMO é capaz de reduzir

os sintomas de dor neuropática em modelo animal (Rojewska et al., 2018). Paralelamente, estudos em modelos de infecção por malária cerebral, *T. gondii*, *T. cruzi* e HIV, apontam para um aumento da concentração de QUINA e 3-HK no soro e líquido cefalorraquidiano, e que este aumento está associado a um pior prognóstico (Notarangelo et al., 2014; Medana et al., 2003; Knubel et al., 2017; Gelpi et al., 2019).

Nossos dados apontam para um perfil diferente na infecção por *M. leprae*. A avaliação da concentração de KYNA foi maior nas células infectadas com *M. leprae*, apresentando um aumento de duas vezes em relação ao controle, diferença essa não observada nas células estimuladas com *M. leprae* morto. Tal efeito foi revertido na presença do *M. leprae* viável em associação com IFN- $\gamma$ , apresentando uma redução significativa em relação aos estímulos individuais. Em relação a concentração de QUINA houve um aumento significativo nas células estimuladas com IFN- $\gamma$ , sendo tal aumento ainda mais expressivo quando o IFN- $\gamma$  foi associado ao *M. leprae* morto. Tais resultados sugerem que, ao contrário dos achados descritos em outras infecções, a infecção da célula de Schwann por *M. leprae* está associada com o desvio da via das quinureninas em uma direção neuroprotetora, que pode estar contribuindo para a sobrevivência da célula e conseqüentemente do bacilo. Tal efeito parece ser revertido na presença do IFN- $\gamma$ , que individualmente ou em associação com *M. leprae* morto elevam a concentração de QUINA. Tal efeito não ocorre na presença de *M. leprae* viável. Esses achados nos levam a especular que o aumento de IFN- $\gamma$  durante o episódio reacional contribui para a morte dos bacilos e que a remoção desses bacilos mortos leva à ativação de uma alça neurotóxica da via das quinureninas, que não é ativada pelo bacilo viável.

Diversas propriedades neuroativas vêm sendo atribuídas aos metabólitos da via das quinureninas. Enquanto QUINA atua como agonista do receptor N-metil-D-ácido aspártico (NMDA) e pode causar excitotoxicidade neural, KYNA tem um papel neuroprotetor através de sua atuação como antagonista do receptor NMDA. Além disso, 3-hidroxiquinurenina (3-HK) e ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA) são potentes geradores de radicais livres e espécies reativas de oxigênio capazes de causar dano neural (Carvalho et al., 2017; Stone, 2001). Já o ácido picolínico (PA) apresenta efeito neuroprotetor e anti-proliferativo no SNC por mecanismos ainda não conhecidos (Coggan et al., 2009).

Dessa forma, fomos investigar a toxicidade dos metabólitos da via, através da avaliação da viabilidade da célula de Schwann estimulada com diferentes

concentrações de PA, KYNA, QUINA e 3-HAA. Mesmo apresentando um tamanho amostral pequeno e não suficiente para gerar estatística, nossos dados corroboram com a literatura, demonstrando que o ácido picolínico e quinurênico não influenciam na viabilidade celular, enquanto 3-HAA induz apoptose mesmo nas concentrações mais baixas.

Curiosamente, o ácido quinolínico, bem descrito quanto suas características neurotóxicas através da ativação do receptor NMDA, não foi capaz de reduzir a viabilidade da célula de Schwann mesmo nas concentrações mais altas. Entretanto, Campana e colaboradores (2017) demonstraram em modelo murino que a ativação do receptor NMDA em células de Schwann resulta na ativação de Akt, ERK1/2 e outros fatores de sinalização dessa via responsáveis por regular a progressão do ciclo celular durante o desenvolvimento, diferenciação e mielinização, migração e mudança de fenótipo em resposta ao dano neural. Esse mesmo trabalho demonstrou que a ativação do receptor NMDA nas células de Schwann promovem sua migração. Desse modo, acreditamos que, apesar de QUINA não estar interferindo diretamente na viabilidade da célula de Schwann, esse metabólito possa estar envolvido em outros processos como desmielinização e mudança de fenótipo das células de Schwann.

O diagnóstico tardio da hanseníase acarreta a transmissão continuada do bacilo e aumenta o risco de incapacidades permanentes. Este cenário se torna mais preocupante quando levamos em consideração os pacientes que não desenvolvem lesões de pele, com sinais e/ou sintomas estritamente neurais, a chamada hanseníase neural pura (Agrawal et al., 2005; Rodrigues et al., 2011). Nesses casos, o diagnóstico clínico é um desafio, sendo necessário a utilização de ferramentas que possam auxiliar o diagnóstico como a eletroneuromiografia, baciloscopia, análise histopatológica e biologia molecular (PCR) de amostra de nervo. A biópsia de nervo é o teste padrão-ouro para detectar a forma neural pura, porém é um método muito invasivo, além de exigir patologistas bem treinados para diagnosticar a doença corretamente (Rao & Suneetha, 2016).

IDO1 e os metabólitos da via das quinureninas vêm sendo propostos como possíveis biomarcadores em doenças associadas a inflamação e neurodegeneração, como em doenças cardiovasculares, Alzheimer e Esclerose lateral amiotrófica (Tan & Guillemin, 2019; Velpen et al., 2019; Dschietzig et al., 2019; Song et al., 2017). Em relação à hanseníase, De Souza Sales e colaboradores (2011) identificaram um aumento significativo na razão quinurenina / triptofano no soro de pacientes com a

forma multibacilar da doença. No entanto, não encontramos na literatura nenhum trabalho relacionando a atividade de IDO1 e a forma neural pura da hanseníase ou à severidade do dano neural.

Nossos resultados demonstram um aumento significativo na atividade de IDO1 em pacientes multibacilares (com ou sem reação) em relação aos indivíduos com neuropatias não hansenianas, corroborando com dado anterior do nosso grupo. Surpreendentemente, também observamos um aumento significativo nos pacientes com a forma neural pura. É válido ressaltar que todos os pacientes incluídos nesse estudo apresentavam algum grau de comprometimento neural, sugerindo que a atividade de IDO1 pode estar relacionada com o dano neurológico nos pacientes com hanseníase.

Para confirmar essa hipótese, foi realizada a análise da eletroneuromiografia dos pacientes com neuropatia hanseniana e os mesmos foram classificados de acordo com o tipo de dano apresentado. Nós demonstramos pela primeira vez que a atividade de IDO1 no soro de pacientes com hanseníase apresenta uma correlação positiva e significativa com a severidade do comprometimento neural avaliado pela eletroneuromiografia, onde os pacientes com perda sensitiva e motora apresentam as razões quinurenina / triptofano mais elevadas.

As concentrações de KYNA e QUINA também foram avaliadas nos soros dos pacientes com neuropatia hanseniana e comparados com indivíduos saudáveis e pacientes com neuropatias não hansenianas, no entanto, ao contrário dos achados da literatura, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. Em decorrência do tamanho amostral pequeno não foi possível realizar a avaliação da concentração de KYNA e QUINA em função do tipo de dano neural. No entanto, a avaliação da correlação entre as concentrações dos metabólitos e a atividade de IDO1 mostrou uma associação positiva e significativa entre IDO1 e KYNA nos pacientes com a forma neural pura, indicando que, nesse grupo, quando ativada a via das quinureninas tende a deslocar na direção da produção de KYNA.

Rojewska e colaboradores (2018) demonstraram, em modelo experimental, a participação de QUINA na dor neuropática. Por outro lado, uma correlação positiva entre a concentração de KYNA e o nível de dor foi observado no soro e fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (Turska et al., 2013). Desse modo, fomos investigar o possível envolvimento desses metabólitos na dor neural. Nossos

resultados demonstraram um aumento significativo da concentração de KYNA nos pacientes com dor neural, independentemente da etiologia da neuropatia.

KYNA é agonista do receptor de hidrocarboneto aril (AhR), bem como antagonista do receptor NMDA, de modo que propriedades imunomoduladoras e neuroprotetoras vêm sendo atribuídas à esse metabólito ou seus análogos após lesão no SNC (Wirthgen et al., 2018). Elevadas concentrações de KYNA vêm sendo relatadas no líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro de pacientes com vários distúrbios tais como depressão, doença de Huntington, distúrbios bipolares, Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia e epilepsia (Olsson et al., 2010; Rózsa et al., 2008; Olsson et al., 2012; Tan et al., 2012; Linderholm et al., 2010). Apesar disso, os mecanismos envolvidos na associação de maiores concentrações de KYNA e tais transtornos ainda não são conhecidos. Enquanto alguns trabalhos apontam que KYNA possa ter uma participação ativa na fisiopatologia de tais doenças, outros trabalhos afirmam que tal aumento possa ser resultado de um mecanismo compensatório do organismo. Dabrowski e colaboradores (2015) demonstraram, em modelo experimental, que a infusão subdural contínua de KYNA na medula espinhal de ratos resultou em danos e perda da bainha de mielina de maneira dose dependente e sugeriram que o bloqueio prolongado e excessivo dos receptores NMDA possa resultar em destruição da mielina. Tais achados vão de encontro aos resultados de Campana e colaboradores (2017), que apontam que a antagonização do receptor NMDA em células de Schwann pode resultar em desregulação da interação glia-axônio e resultar no desenvolvimento de neuropatias periféricas dolorosas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que *M. leprae* e as citocinas TNF- $\alpha$  e, principalmente, IFN- $\gamma$  modulam de forma diferente a via das quinureninas nas células de Schwann da linhagem ST88-14, tanto em relação à expressão e atividade de IDO1, quanto no balanço metabólico deslocando-o em direção às alças opostas. Constatamos uma associação entre a atividade sérica de IDO1 e a gravidade do dano neural nos pacientes com neuropatia hanseniana e, demonstramos uma associação positiva entre IDO1 e KYNA nos pacientes com a forma neural pura da hanseníase. Obsevamos também um aumento na concentração de KYNA em pacientes com dor neural. No entanto, para a melhor compreensão do papel dos metabólitos finais da via KYNA e QUINA nas neuropatias periféricas, e em particular na hanseníase, faz-se necessário maiores investigações. Nosso estudo teve como objetivo trazer uma melhor compreensão da patogênese da lesão 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

Com base nos resultados demonstrados nesse estudo, podemos sugerir que a via das quinureninas é modulada durante o curso clínico da hanseníase e pode contribuir para o dano neural. As evidências aqui encontradas foram:

- *M. leprae* aumenta a expressão proteica de IDO1, mas não sua atividade enzimática em células de Schwann da linhagem ST88-14 após 24h de cultura.
- As citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , isoladamente não são capazes de induzir a expressão proteica de IDO1, no entanto, aumentam significativamente sua atividade após 24h de cultura. Além disso, em associação com *M. leprae*, IFN- $\gamma$  exerce um forte estímulo na indução da atividade enzimática de IDO1.
- *M. leprae* viável induz aumento na concentração de KYNA que é significativamente reduzido na presença de IFN- $\gamma$ , enquanto IFN- $\gamma$  aumenta significativamente a concentração de QUINA, principalmente quando associado a *M. leprae* morto.
- Os metabólitos da via das quinureninas ácido picolínico, ácido quinurênico e ácido quinolínico não interferem na viabilidade da célula de Schwann da linhagem ST88-14, no entanto, o ácido 3-hidroxi-antranílico foi capaz de induzir apoptose em nosso modelo experimental.
- Pacientes com neuropatia hanseniana apresentam valores da atividade de IDO1 no soro significativamente elevados em comparados a pacientes com neuropatia não hanseniana.
- Os valores da atividade enzimática de IDO1 estão positivamente correlacionados com a gravidade do dano neural avaliado por eletroneuromiografia. No entanto, nenhuma associação foi observada com a presença ou não de dor neural.
- Os níveis séricos de KYNA e QUINA são semelhantes em todos os grupos avaliados. No entanto, somente o grupo de pacientes com a forma neural pura da hanseníase apresentou uma correlação positiva na concentração de KYNA com a atividade de IDO1.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal A, Pandit L, Dalal M, Shetty JP. Neurological manifestations of Hansen's disease and their management. *Clin Neurol and Neurosurg.* 2005; 107(6): 445-54.

Andrade PR, Jardim MR, Silva ACC, Manhaes PS, Antunes SLG, Vital R, Prata RBS, Petito RB, Pinheiro RO, Sarno EN. Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016; 75(3): 272-83.

Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, De Mattos Barbosa MG, Moraes MO, Jardim MR, Nery JAC, Sampaio EP, Sarno EN. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Review of Clinical Immunology.* 2015; 11(3): 391–407.

Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JA, Corte-Real S, Hacker MA, Sarno EN. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107(2): 246-253.

Araújo EF, Feriotti C, Galdino NAL, Preite NW, Calich VLG, Loures FV. The IDO–AhR Axis Controls Th17/Treg Immunity in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1-15.

Babcock TA, Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor  $\alpha$  in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine.* 2000; 12(6): 588-594.

Baranyi A, Meinitzer A, Breitenecker RJ, Amouzadeh-Ghadikolai O, Stauber R, Rothenhausler H. Quinolinic Acid Responses during Interferon-alpha-Induced Depressive Symptomatology in Patients with Chronic Hepatitis C Infection - A Novel Aspect for Depression and Inflammatory Hypothesis. *PLoS One.* 2015; 10(9): e0137022.

Barbosa MG, Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, Silva BJ, Oliveira JA, Assis TQ, Toledo-Pinto TG, Bezerra OC, Nery JA, Rosa PS, Bozza MT, Lara FA, Moraes MO, Schimitz V, Sarno EM, Pinheiro RO. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes and Infection.* 2017; 1-10.

- Bay-Richter C, Linderholm KR, Lim CK, Samuesson M, Traskman-Bendz L, Guillemin GJ, Erhardt S, Brundin L. A role for inflammatory metabolites as modulators of the glutamate N-methyl-D-aspartate receptor in depression and suicidality. *Brain Behav Immun.* 2015; 43: 110-7.
- Billiau A. Interferon-g. Biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol.* 1996; 62:61–129.
- Bonda DJ, Mailankot M, Stone JG, Garrett MR, Staniszewska M, Castellani RJ *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxy-kynurenine modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep.* 2010; 15: 161–168.
- Braidy N, Grant R. Kynurenine pathway metabolism and neuroinflammatory disease. *Neural Regeneration Research.* 2017; 12(1): 39.
- Campana WM, Mantuano E, Azmoon P, Henry K, Banki MA, Kim JH, Pizzo DP, Gonias SL. Ionotropic glutamate receptors activate cell signaling in response to glutamate in Schwann cells. *FASEB Journal.* 2017; 31: 1744–1755.
- Carvalho MS, Dal Mas C, Nunes DFS, Yonamine CM, Hayashi MAF. Tryptophan metabolism in mental disorders: A focus on Schizophrenia. *Vittale.* 2017; 29(2): 44-56.
- Charosky CB, Gatti JC, Cardama JE. Neuropathies in Hansen's disease. *Int J Lepr Other Mycobacter Dis* 1983; 51: 576-86.
- Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, Shubayev V. Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun.* 2007; 21(5): 561–568.
- Coggan SE, Smythe GA, Bilgin A, Grant RS. Age and circadian influences on picolinic acid concentrations in human cerebrospinal fluid. *Journal of neurochemistry.* 2009; 108: 1220-1225.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001; 409(6823):1007-11.

Cooper CL, Mueller C, Sinchaisri TA, Pirmez C, Chan J, Kaplan G, Young SM, Weissman IL, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization. *J Exp Med.* 1989; 169(5):1565-81.

Currier AR, Ziegler MH, Riley MM, Babcock TA, Telbis VP, Carlin JM. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Lipopolysaccharide Enhance Interferon-Induced antichlamydial Indoleamine Dioxygenase Activity Independently. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2000; 20:369-376.

Dabrowski W, Kwiecien JM, Rola R, Klapiec M, Stanisz GJ, Kotlinska-Hasiec E, et al. Prolonged Subdural Infusion of Kynurenic Acid Is Associated with Dose-Dependent Myelin Damage in the Rat Spinal Cord. *PLoS ONE.* 2015; 10(11): e0142598.

Deps PD, Alves BL, Gripp CG, Aragao RL, Guedes B, Filho JB, Andreatta MK, Marcari RS, Prates I, Rodrigues LC. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008; 74(4):338-42.

Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TLSA, Batista-Silva LR, Rosa OS, Toledo-Pinto TG, Costa FMR, Lara FA, Rodrigues LS, Mattos KA, Sarno EM, Bozza PT, Guihot C, Verrêdo-Pinho M, Pessolani MCV. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR $\gamma$  cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLOS Pathogen.* 2018; 14(7):e1007151.

DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, et al. Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci.* 2010; 115(1):89–97.

Dschietzig TB, Kellner K, Sasse K, Boschann F, Klüsener R, Ruppert J, Armbruster FA, Bankovic B, Meinitzer A, Mitrovic V, Melzer C. Plasma Kynurenine Predicts Severity and Complications of Heart Failure and Associates with Established Biochemical and Clinical Markers of Disease. *Kidney Blood Press Res.* 2019; 44: 765–776.

Gallo MEN, Sampaio EP, Nery JAC, Moraes MO, Antunes SLG, Pessolani MCV, Sarno EN. Hanseníase: Aspectos Epidemiológicos, Clínicos e Imunológicos. Em:

Coura, JR (ed.) Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Rio de Janeiro, RJ. Ed. Guanabara Koogan. 2005; p.1383-94.

Garbino JA, Nery JA, Virmond M, Stump PRN, Baccarelli R, Marques Jr W. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento da Neuropatia. Assoc Méd Bras e Conselho Federal de Medicina. [Internet]. 2003 July. Disponível em: [https://diretrizes.amb.org.br/\\_BibliotecaAntiga/hansenia-se-diagnostico-e-tratamento-da-neuropatia.pdf](https://diretrizes.amb.org.br/_BibliotecaAntiga/hansenia-se-diagnostico-e-tratamento-da-neuropatia.pdf)

Gelpi M, Ueland PM, Troseid M, Mocroft A, Lebech A, Ullum H, Midttun O, Lundgren J, Nielsen SD. Abdominal Adipose Tissue Is Associated With Alterations in Tryptophan-Kynurenine Metabolism and Markers of Systemic Inflammation in People With Human Immunodeficiency Virus. *The Journal of Infectious Diseases*. 2019; XX:1–9.

Girdhar BK. Neuritic Leprosy. *Indian J Lepr*. 1996; 68: 35-42.

Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery*, 1999; 44(4):825-39.

Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005 31: 395–404.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 13ª ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2017.

Heng MY, Detloff PJ, Wang PL, Tsien JZ, Albin RL. *In vivo* evidence for NMDA receptor-mediated excitotoxicity in a murine genetic model of Huntington disease. *J Neurosci*. 2009; 29: 3200–3205.

Hess S, Rambukkana A. Cell Biology of Intracellular Adaptation of *Mycobacterium leprae* in the Peripheral Nervous System. *Microbiol Spectr*. 2019; 7(4).

Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem*. 1982; 257(24):15072–8.

Ito T, Handa H. Deciphering the mystery of thalidomide teratogenicity. *Congenit Anom.* 2012; 52(1):1-7.

Jardim MR, Chimelli L, Faria SC, Fernandes PV, Nery JAC, Sales AM, Sarno EN, Antunes SLG. Clinical, electroneuromyographic and morphological studies of pure neural leprosy in a Brazilian referral centre. *Lepr Rev.* 2004; 75:242-253.

Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia.* 2008; 56(14): 1552–1565.

Job CK. Nerve damage in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1989; 57: 532-9.

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971; 39 (3): 693-702.

Klaumann PR, Wouk AF, Sillas T. Pathophysiology of pain; *Archives of Veterinary Science.* 2008; 13(1):1-12.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *Journal of medical microbiology.* 2005; 54(3)235.

Lasry-Levy E, Hietaharju A, Pai V, Ganapati R, Rice AS, Haanpää M, Lockwood DN. Neuropathic Pain and Psychological Morbidity in Patients with Treated Leprosy: A Cross-Sectional Prevalence Study in Mumbai. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(3): e981.

Laument G, Zhou W, Dantzer R, Edralin Jd, Huo XJ, Budac DP, O'connor JC, Lee AW, Heijnen CJ, Kavelaars A. Upregulation of neuronal kynurenine 3-monooxygenase mediates depression-like behavior in a mouse model of neuropathic pain. *Brain Behav Immun.* 2017; 66: 94–102.

Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Bruck W. The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimmunol.* 2000; 108(1-2): 147–52.

Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl M, Holtze M, Engberg G, Samuelsson M, Erhardt S. Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2012; 38(3):426-432.

Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull World Health Organ*. 2005; 83(3):230-5.

Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng T, Zailaa J, Bloom BR, Moody DB, Smale ST, Sagasti A, Modlin RL, Ramakrishnan L. A Macrophage Response to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. *Cell*. 2017; 170: 973–985.

Majumdar T, Sharma S, Kumar M, Hussain MA, Chauhan N, Kalia I, Sahu AK, Rana VS, Bharti R, Haldar AK, Singh AP, Mazumder S. Tryptophan-kynurenine pathway attenuates  $\beta$ -catenin-dependent pro-parasitic role of STING-TICAM2-IRF3-IDO1 signalosome in *Toxoplasma gondii* infection. *Cell Death Dis*. 2019; 10(3): 161.

Marques MAM, Antônio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MCV. Binding of  $\alpha$ 2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J. Med. Microbiol*. 2001; 50: 23 – 28.

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17(11):1653-8.

Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate Immune Response Precedes *Mycobacterium leprae* – Induced Reprogramming of Adult Schwann Cells. *Cell Reprogram*. 2014;16(1):9-17.

Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming Adult Schwann Cells to Stem Cell-Like Cells by Leprosy Bacilli Promotes Dissemination of Infection. *Cell*. 2013; 152(0): 51–67.

Mattos KA, Lara FA, Oliveira VG, Rodrigues LS, D'avila H, Melo RC, Manso PP, Sarno EM, Bozza PT, Pessolani MC. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in

Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol.* 2011;13(2):259-73.

Medana IM, Day NPJ, Salahifar-Sabeth, Stocker R, Smythe G, Bwanaisa L, Njobvu A, Kayira K, Turner GDH, Taylor TE, Hunt NH. Metabolites of the Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism in the Cerebrospinal Fluid of Malawian Children with Malaria. *The Journal of Infectious Diseases.* 2003; 188:844–9.

Mellor AL, Munn DH.IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(10): 762–74.

Ministério Da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de Prevenção de Incapacidades; 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/MANPREV2000.pdf>. Acessado em 16 de nov. 2019

Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS. Casos novos de hanseníase por estados e regiões Brasil, 1990 a 2018; 2019<sup>b</sup>. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/17/Casos-novos-de-hansen--ase-por-estados-e-regi--es--Brasil--1990-a-2018.pdf>. Acessado em 15 de nov. 2019.

Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Diretrizes para Vigilância, Atenção e Eliminação da Hanseníase como Problema de Saúde Pública, com a finalidade de orientar os gestores e os profissionais dos serviços de saúde. 2016. Disponível em: [http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manual\\_de\\_Diretrizes\\_Eliminacao\\_Hansenise.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/Manual_de_Diretrizes_Eliminacao_Hansenise.pdf). Acessado em 15 de nov. 2019.

Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS. Taxa de casos novos de hanseníase com grau 2 de incapacidade estados e regiões, Brasil, 2001 a 2018; 2019<sup>c</sup>. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/17/Taxa-de-casos-novos-de-hansen--ase-com-grau-2-de-incapacidade-estados-e-regi--es--Brasil--2001-a-2018.pdf>. Acessado em 15 de nov. 2019.

Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS. Taxa de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes Estados e regiões, Brasil, 1990 a 2018; 2019<sup>a</sup>. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/17/Taxa-de-preval-ncia-de-hansen--ase-por-10.000%20habitantes,%20Estados%20e%20regi%C3%B5es,%20Brasil,%201990%20a%202018.pdf>. Acessado em 15 de nov. 2019.

Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81:247-265.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev.* 2006; 77(3):189-202.

Moraes MO, Sarno EM, Almeida AS, Saraiva BCC, Nery JAC, Martins RCL, Sampaio EP. Cytokine mRNA expression. In leprosy: a possible role for interferon- $\gamma$  and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol.* 1999; 50(5):541-9.

Moura DF, De Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, Nery JAC, Pinheiro OP, Sarno EN. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages: Immunity to infection. *European Journal of Immunology.* 2012; 42(11): 2925–36.

Naafs B. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Treatment of reactions and nerve damage. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996; 64:S21-8.

Neal JW, Gasque P. The role of primary infection of Schwann cells in the aetiology of infective inflammatory neuropathies. *J Infect.* 2016; 73(5): 402-418.

Nguyen NT, Nakahama T, Le DH, Van Son L, Chu HH, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research. *Front Immunol.* 2014; 5:551.

Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. neurochem.* 1998; 70(1): 299-307.

Oliveira AL, Antunes SL, Teles RM, Costa da Ailva AC, Silva TP, Brandão Teles R, Ferreira Medeiros M, Britto C, Jardim MR, Sampaio EP, Sarno EN. Schwann cells producing matrix metalloproteinases under mycobacterium leprae stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy. *J of Neuropathol Exp Neurol*. 2010; 69(1):27-39.

Olsson SK, Samuelsson M, Saetre P, Lindstrom L, Jonsson EG, Nordim C, Engberg G, Erhardt S, Landen M. Elevated levels of kynurenic acid in the cerebrospinal fluid of patients with bipolar disorder. *J Psychiatry Neurosci*. 2010; 35(5): 195-9.

Olsson SK, Sellgren C, Engberg G, Landen M, Erhardt S. Cerebrospinal fluid kynurenic acid is associated with manic and psychotic features in patients with bipolar I disorder. *Bipolar Disord*. 2012; 14: 719–726.

Organização Mundial De Saúde. Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020: acelerar a ação para um mundo sem lepra. Geneva: Organização Mundial de Saúde; 2016. 21 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/208824/1/7/9789290225201-pt.pdf>. Acessado em 15 de nov. 2019.

Organização Mundial De Saúde. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. *Nos. 35/36 2019*; 94, 389–412.

Organização Mundial De Saúde. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Second WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2013.

Pannikar VK, Arunthathi S, Chacko CJ, Fritschi EP. A clinicopathological study of primary neuritic leprosy. *Lepr India*. 1983; 55: 212-221.

Parada-Turska J, Zgrajka W, Majdan, M. Kynurenic Acid in Synovial Fluid and Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis, Spondyloarthropathy, and Osteoarthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2013; 40(6): 903–909.

Petito RB, Amadeu TP, Pascarelli BM, Jardim MR, Vital RT, Antunes SL, Sarno EN. Transforming Growth Factor- $\beta$  May Be a Key Mediator of the Fibrogenic Properties of Neural Cells in Leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013; 72(4): 351–365.

Pinto PGHR. O estigma do pecado: a lepra durante a idade média. *Revista de saúde coletiva*. 1995; Vol. 5, No.1.

Prendergast GC, Malachowski WJ, Mondal A, Scherle P, Muller AJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase and its therapeutic inhibition in cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2018; 336: 175–203.

Rahman A, Rao MS, Khan KM. Intraventricular infusion of quinolinic acid impairs spatial learning and memory in young rats: a novel mechanism of lead-induced neurotoxicity. *Journal of Neuroinflammation*. 2018; 15:263.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EL. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin alpha 2 chain. *Cell*. 1997; 88:811–821.

Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16:511–518.

Rao PN, Suneetha S. Pure neuritic leprosy: Current status and relevance. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2016; 82(3): 252-61.

Real C, Glavieux-Pardanaud C, Vaigot P, Le-Douarin N, Dupin E. The instability of the neural crest phenotypes: Schwann cells can differentiate into myofibroblasts. *Int J Dev Biol*. 2005; 49(2-3): 151–159.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis*. 1966; 34(3):255-273.

Robinson CM, Hale PT, Carlin JM. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res*. 2005; 25(1):20-30.

Rodrigues Lc, Lockwood DNJ. Leprosy now: Epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(6): 464–470.

Rojewska E, Ciapala K, Piotrowska A, Makuch W, Mika J. Pharmacological inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-2 and kynurenine 3-monooxygenase, enzymes of the

kynurenine pathway, significantly diminishes neuropathic pain in a rat model. *Front. Pharmacol.* 2018; 9:724.

Rozsa E, Robotka H, Vecsei L, Toldi J. The Janus-face kynurenic acid. *J Neural Transm.* 2008; 115:1087-1091.

Sakurai K, Zou J, Tschetter J, Ward J, Shearer G. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2002; 129: 186–196.

Santos VS, Santana JCV, Castro FDN, Oliveira LS, Santana JCV, Feitosa VLC, Gurgel RG, Cuevas LE. Pain and quality of life in leprosy patients in an endemic area of Northeast Brazil: a cross-sectional study. *Infectious Diseases of Poverty.* 2016; 5:181.

Sathyaikumar KV, Stachowski EK, Wonodi I, Roberts RC, Rassouli A, McMahon RP, et al. Impaired kynurenine pathway metabolism in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia. *Schizophrenia bulletin.* 2011; 37(6):1147-56.

Saunderson P, Groenen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. *Leprosy Review.* 2000; 71: 34-42.

Schmidt SV, Schultze JL. New Insights into IDO Biology in Bacterial and Viral Infections. *Front. Immunol.* 2014; 5: 1-12.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19(2):338-81.

Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clinics in Dermatology.* 2015; 33(1): 46–54.

Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Leprosy review.* 2008; 79(3): 242-53.

Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, et al. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Cell Biol.* 2009; 29(24):6391– 400.

Shackleford G, Sampathkumar NK, Hichor M, Weill L, Meffre D, Juricek L, Laurendeau I, Chevallier A, Ortonne N, Larousserie F, Herbin M, Bièche I, Coumoul X, Beraneck M, Baulieu EE, Charbonnier F, Pasmant E, Massaad C. Involvement of Aryl hydrocarbon receptor in myelination and in human nerve sheath tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115(6): E1319-E1328.

Sharma R, Singh P, Loughry WJ, Lockhart JM, Inman WB, Duthie MS, Pena MT, Marcos LA, Scollard DM, Cole ST, Truman RW. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(12):2127-34.

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med*. 1960; 112(3):445-54.

Song P, Ramprasath T, Wang H, Zou M. Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2017; 74(16): 2899–2916.

Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, De Oliveira Fulco T, Da Costa Nery JA, Sampaio EP, Pinheiro RO, Sarno EN. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression: IDO is involved in immunosuppression during lepromatous leprosy. *Clinical & Experimental Immunology*. 2011; 165(2): 251–63.

Stone TW. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol* 2001; 64: 185-218.

Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr Rev*. 1998; 69(4):358-66.

Tan L, Yu J, Tan L. The kynurenine pathway in neurodegenerative diseases: Mechanistic and therapeutic considerations. *Journal of the Neurological*. 2012; 323(1-2): 1-8.

Tan VX, Guillemin GJ. Kynurenine Pathway Metabolites as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Neurosci*. 2019; 13:1013.

Tapinos N, Ohnishi M, Rambukkana A. ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nat Med*. 2006; 12(8):961-6.

Teles RMB, Antunes SLG, Jardim MR, Oliveira AL, Nery JAC, Sales AM, Sampaio EP, Shubayev V, Sarno EN. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and

TACE) and TNF- $\alpha$  in the nerves of leprosy patients. *J peripher Nerv Syst.* 2007; 12(3): 195-204.

Terness P, Bauer TM, Röse L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002; 196: 447–57.

Thatcher TH, Williams MA, Pollock SJ, McCarthy CE, Lacy SH, Phipps RP, et al. Endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor regulate lung dendritic cell function. *Immunology.* 2016; 147(1):41–54.

Trautman JR. A brief history of hansen's disease. *Bulletin of the New York academy of medicine.* 1984; 60(7):689-695.

Van Brakel WH, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Suneetha SK, Jadhav RS, Maddali P, Lockwood DNJ, Wilder-Smith E, Desikan KV. The INFIR Cohort Study: investigating prediction, detection and pathogenesis of neuropathy and reactions in leprosy. Methods and baseline results of a cohort of multibacillary leprosy patients in north India. *Lepr. Rev.* 2005; 76: 14–34.

Van Veen NH, Nicholls PG, Smith WC, Richardus JH. Corticosteroids for treating nerve damage in leprosy. A cochrane review. *Lepr Ver.* 2008; 79(4): 361-71.

Veen C, Myint AM, Burgerhout KM, Schwarz MJ, Schutze G, Kushner SA, et al. Tryptophan pathway alterations in the postpartum period and in acute postpartum psychosis and depression. *Journal of affective disorders.* 2016; 189:298-305.

Velpen V, Teav T, Gallart-Ayala H, Mehl F, Konz I, Clark C, Oikonomidi A, Peyratout G, Henry H, Delorenzi M, Ivanisevic J, Popp J. Systemic and central nervous system metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy.* 2019; 11:93.

Vicente Lau, KH. Neurological Complications of Leprosy. *Semin Neurol.* 2019; 39(04): 462-471.

Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* 2001; 2(8):1023.

Vital Rt, Illarramendi X, Nascimento O, Hacker Ma, Sarno EN, JARDIM MR. Progression of leprosy neuropathy: a case series study. *Brain Behav.* 2012; 2: 249-55.

Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin Chem.* 1997; 43(12): 2424–2426.

Wirthgen E, Hoeflich A, Rebl A, Günther J. Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions. *Front. Immunol.* 2018; 8:1957.

Zhang S, Patel A, Chu C, Jiang W, Wang L, Welty SE, et al. Aryl hydrocarbon receptor is necessary to protect fetal human pulmonary microvascular endothelial cells against hyperoxic injury: mechanistic roles of antioxidant enzymes and RelB. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015; 286(2):92–101.