

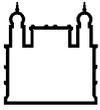
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOPATOGÊNICOS
ASSOCIADOS A INFECÇÃO DE NEURAL NA HANSENÍASE

BEATRIZ JUNQUEIRA DE SOUZA

Rio de Janeiro
Agosto de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

BEATRIZ JUNQUEIRA DE SOUZA

Avaliação dos mecanismos imunopatogênicos associados à infecção neural na Hanseníase

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

Orientador (es): Profa. Dra. Euzenir Nunes Sarno
Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2022

Junqueira de Souza, Beatriz .

Avaliação dos mecanismos imunopatogênicos associados à infecção neural na Hanseníase / Beatriz Junqueira de Souza. - Rio de Janeiro, 2022. 196 f.; il.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2022.

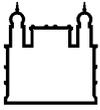
Orientadora: Euzenir Nunes Sarno.

Co-orientador: Bruno de Siqueira Mietto.

Bibliografia: f. 102-125

1. Hanseníase. 2. neuropatia. 3. desmielinização. 4. neuroimunologia. 5. célula de schwann. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: BEATRIZ JUNQUEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS A
INFECÇÃO NEURAL NA HANSENÍASE**

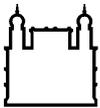
ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno
Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto

Aprovada em: 10/08/2022

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Márcia Berrêdo Pinho Moreira – Presidente (FIOCRUZ)
Profa. Dra. Luciana Silva Rodrigues (UERJ)
Prof. Dr. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira (UNIRIO)
Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira (Instituto Lauro Souza Lima)
Prof. Dr. Vinícius de Toledo Ribas (UFMG)

Rio de Janeiro, 10 de agosto de 2022



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

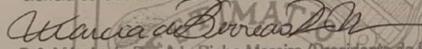
Fundação Oswaldo Cruz

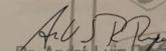


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa da tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de Marcia de Souza, sob orientação da Dr.^a Euzenir Nunes Sarno e coorientada pelo Dr. Bruno de Siqueira Mietto. No décimo dia do mês de agosto de dois mil e vinte e dois, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame de tese de doutorado acadêmico intitulado: "Avaliação dos mecanismos imunopatogênicos associados à infecção neural na Hanseníase", no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Patogênese das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr.^a Márcia de Berrêdo Pinho Moreira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr.^a Luciana Silva Rodrigues - UERJ/RJ, Dr. Carlos Fernando Araújo Lima de Oliveira - UNIRIO/RJ, e como suplentes: Dr. Vinicius de Toledo Ribas - UFMG/MS e Dr.^a Maria Renata Sales Nogueira - ILSL/SP. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da tese de doutorado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 10 de agosto de 2022.


Dr.^a Márcia de Berrêdo Pinho Moreira (Presidente da Banca):


Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Ao meu pai, Wagner e minha vó Zizi (*in memoriam*). Vocês estiveram comigo até o fim dessa caminhada. Me tornaram a primeira da família com graduação; a primeira com mestrado e agora, a primeira da família com doutorado. Obrigada por tudo. Celebrem comigo aí do céu! Amo vocês para sempre.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo agradeço a Deus por ter me sustentado em tantos momentos difíceis que vivi no doutorado. Sempre foi meu sonho estar na FIOCRUZ. E esse sonho foi realizado! Tantas coisas incríveis vivi por aqui, e tantas pessoas maravilhosas pude conhecer.

Agradeço ao meu eterno incentivador, meu pai, Wagner Junqueira de Souza (*in memoriam*). Que sempre fez de TUDO para que eu acreditasse no meu potencial, para que eu me mantivesse firme, que mesmo com pouca instrução educacional, tentava me ajudar a estudar, e quando não sabia o que fazer, fazia lanchinhos pra mim. Não há um dia que eu não sinta sua falta. O peso de ser muito amada é que, quando chega a hora da partida, é difícil demais seguir sem esse amparo. Mas hoje eu só sinto gratidão por ter sido absurdamente privilegiada.

Agradeço a minha vó, Ezenir de Souza (Zizi) (*in memoriam*), por TUDO. Foram 30 anos vivendo neste abraço, morando grande parte da vida com ela, me divertindo demais! Éramos unha e carne, um só coração.

Agradeço ao apoio absoluto dado, pelo meu marido, Mateus Costa Teixeira. Que tanto me ajudou a estudar para seleção de doutorado quando ainda éramos namorados. Que me pediu em casamento antes do anúncio da minha ida para o doutorado sanduíche e que colocou meu futuro – nosso – acima de qualquer coisa! E que lindo cruzar a linha de chegada casados.

A minha mãe e ao meu irmão que, junto comigo, passaram por perdas inenarráveis nestes 4 anos. Mas que foram a minha fortaleza incentivadora para que eu jamais me deixasse cair. Obrigada por sempre me lembrarem que eu sou forte. Obrigada por sempre me levantarem. E de modo especial ao meu irmão, agradeço abrir janelas de luz no contexto da estatística que tanto me ajudaram!

Aos meus queridos orientadores Dra. Euzenir Nunes Sarno, Dr. Bruno de Siqueira Mietto e Dra. Roberta Olmo Pinheiro. Três pessoas que impactaram muito a minha vida de formas tão diferentes. Os caminhos que, por mais que parecessem tantas vezes tortuosos me levaram ao saber. Me levaram a buscar uma ciência fiel, motivadora, destemida, e que não há muros e nem obstáculos que possam impedir a busca pelo conhecimento. Não importa de onde vim, de minhas limitações, o mundo se move pelas perguntas. E a ciência é um ambiente que precisa ser construído sobre empatia.

A minha querida orientadora do meu sanduíche, Dra. Cressida Ariana Madigan, ao qual não tenho palavras para agradecer por tudo que fez por mim desde o primeiro momento. Por todo incentivo, por acreditar na minha capacidade, por não medir esforços e investimentos para que eu pudesse ter o melhor aproveitamento acadêmico, cultural e científico na minha morada nos Estados Unidos. Jamais me esquecerei de tempos tão maravilhosos, onde tanto eu cresci.

Aos meus amigos do Laboratório de Hanseníase, onde gostaria de destacar em especial as minhas plantinhas: Rhana Prata, Tatiana Silva, Arthur Silva e Tayná Quintela, que me acolheram no laboratório desde o primeiro momento e fizeram meus anos de FIOCRUZ muito mais mágicos do que já poderiam ser! Preciso aqui fazer um agradecimento a Rhana, que me conheceu num feriado onde foi me ajudar num ELISA (quem faria isso senão ela?). E hoje é minha madrinha de casamento!

E também aos demais e queridos amigos do lab, Mariana, Jéssica, Tamires, Atta, Marina Nery, Bruno Jorge, Mayara Barbosa, Mayara Mendes. Vocês tornaram esse caminho muito mais doce.

Agradeço imensamente ao laboratório de Microbiologia celular (LAMICEL) por ter me recebido por anos para realizar os experimentos de extração de epineuro (que levava horas), em especial ao Prof. Dr. Flavio Lara, a Dra. Cristina Pessolani e a Dra. Márcia Berredo. E também aos meus queridos amigos com os quais compartilhei momentos tão divertidos: Plínio, Karina, Sabrina, Marcos, Luiza, Fabrício, Débora, Thabatta e Thiago.

Agradeço aos meus amigos do Cressida Madigan Lab (UCSD), Megan Hayes, Melissa Luevanos, Sumedha Ravinskar e Morgan Reitano por terem me recebido tão bem e feito do meu período no exterior, um período maravilhoso e memorável!

Agradeço ao Ambulatório Souza Araújo, em especial na figura da Dra. Márcia Jardim, que me recebeu para a realização de experimentos do meu mestrado na COPPE e sempre me ajudou! Eu não possuía ainda nenhum vínculo com a FIOCRUZ, mas ela foi comigo de congressos até minha defesa de mestrado! Obrigada por tudo!

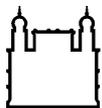
Agradeço de forma substancial aos meus grandes mentores científicos Rosalind Frankin, Marie Curie e Oswaldo Cruz, que me fizeram, desde criança, acreditar que a ciência é transformadora. Que a ciência é um espaço para mulheres e que no Brasil é possível se realizar descobertas, inovações e cura.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro durante o curso do meu doutorado sanduíche e pelo

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro geral.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Santa Madre Teresa de Calcutá.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

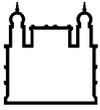
AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS IMUNOPATOGÊNICOS ASSOCIADOS À INFECÇÃO NEURAL NA HANSENÍASE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Beatriz Junqueira de Souza

A neuropatia da Hanseníase é a doença neurodegenerativa do sistema nervoso periférico, de origem infecciosa mais comum, cujo hospedeiro preferencial é a célula de Schwann. A compreensão da relação célula de Schwann - *M. leprae* é fundamental para entender a progressão da doença tanto em modelos experimentais, como em pacientes. Além disso, é de suma importância entender como as bactérias viáveis e mortas afetam a biologia do hospedeiro, uma vez que esse contexto é amplamente desconhecido. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre a célula de Schwann – e o *M. leprae* no contexto da lesão neural, utilizando o modelo de interação patógeno-hospedeiro *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Para isso, a linhagem humana ST88-14 foi utilizada para determinar como bactérias viáveis e mortas modificam a expressão gênica global em resposta a infecção enquanto CSPM de camundongo contribuíram para identificar a relação entre infecção, desmielinização e a viabilidade de *M. leprae*. Além disso, usamos biópsias de nervo de pacientes controles e com Hanseníase para correlacionar os achados experimentais, com o padrão de resposta durante a progressão da doença humana. A partir dos resultados, foi possível correlacionar alterações histopatológicas com o perfil de expressão gênica induzida pela infecção. Ademais, demonstrou-se, pela primeira vez, uma correlação significativa entre a assinatura gênica dos estágios iniciais e as alterações histopatológicas na neuropatia hanseniana. Além disso, observamos que a mielinofagia é fundamental para a manutenção da viabilidade bacteriana em células mielinizantes. O presente trabalho, portanto, avança o conhecimento das bases moleculares e celulares da neuropatia da Hanseníase, através de diferentes modelos experimentais, abrindo portas para novas perspectivas na compreensão da doença Humana.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF IMMUNOPATHOGENIC MECHANISMS ASSOCIATED WITH NEURAL INFECTION IN LEPROSY

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Beatriz Junqueira de Souza

Leprosy neuropathy is the most common infectious neurodegenerative disease of the peripheral nervous system, whose preferred host is the Schwann cell. Understanding the relationship between Schwann cell - *M. leprae* is essential to comprehend the disease progression both in experimental models and in patients. Furthermore, it is of paramount importance to understand how viable and dead bacteria affect the biology of the host, since this context is largely unknown. Therefore, the objective of this work was to investigate the relationship between the Schwann cell – and *M. leprae* in the context of neural injury, using the in vitro, ex vivo and in vivo pathogen-host interaction model. For this, the human strain ST88-14 was used to determine how viable and dead bacteria modify global gene expression in response to infection, while myelinated primary Schwann cells from mice contributed to identify the relationship between infection, demyelination and *M. leprae* viability. In addition, we used nerve biopsies from both control and leprosy patients to correlate the experimental findings with the pattern of response during human disease progression. From the results, it was possible to correlate histopathological changes with the infection-induced gene expression profile. Furthermore, for the first time, a significant correlation between the gene signature of early stages and histopathological changes in leprosy neuropathy was demonstrated. Moreover, we observed that myelinophagy is essential for the maintenance of bacterial viability in myelinated cells. The present work, therefore, advances the knowledge of the molecular and cellular bases of leprosy neuropathy, through different experimental models, opening doors to new perspectives in the understanding of the Human disease.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | XI |
| ABSTRACT | XII |
| 1 INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 Apresentação do problema | 23 |
| 1.2 Histórico, epidemiologia e transmissão | 24 |
| 1.3 Agente etiológico | 27 |
| 1.4 O Sistema Nervoso Periférico | 31 |
| 1.4.1 Anatomia do nervo periférico | 32 |
| 1.4.2 A biologia da célula de Schwann | 34 |
| 1.4.3 Degeneração Walleriana | 38 |
| 1.4.4 As fases do reparo: O clearance de mielina | 41 |
| 1.4.5 A destruição autofágica da mielina | 43 |
| 1.5 A neuropatia da Hanseníase..... | 46 |
| 1.5.1 Episódios reacionais..... | 48 |
| 1.5.2 Classificação independente: Hanseníase neural pura | 50 |
| 1.6 O rearranjo metabólico | 51 |
| 1.6.1 O comportamento inflamatório da CS frente ao bacilo viável e morto | 53 |
| 1.7 O Estado da arte..... | 57 |
| 1.8 Justificativa..... | 59 |
| 1.9 Hipótese | 60 |
| 2 OBJETIVOS | 61 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 61 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 61 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 62 |
| 3.1 Parte 1: Modelo murino..... | 62 |
| 3.1.1 Purificação e infecção por <i>M. leprae</i> | 63 |
| 3.1.2 Imunofluorescência e Microscópio de fluorescência..... | 63 |
| 3.1.3 RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em transcrição reversa quantitativa | 64 |
| 3.1.4 Análise estatística..... | 65 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.2 | Parte 2 | 66 |
| 3.2.1 | Avaliação da expressão gênica em fragmentos de nervo 66 | |
| 3.2.2 | Cultura de células de Schwann | 67 |
| 3.2.3 | Extração de RNA e matriz RT-qPCR | 68 |
| 3.2.4 | Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) | 68 |
| 3.2.5 | Análise estatística | 68 |
| 4 | RESULTADOS | 70 |
| 4.1 | Parte 1 | 70 |
| 4.1.1 | A infecção por <i>M. leprae</i> acelera a quebra de mielina | 70 |
| 4.1.2 | <i>M. leprae</i> induz a degradação da mielina por autofagia e aumenta o número de corpúsculos lipídicos | 75 |
| 4.1.3 | A degradação da mielina favorece a viabilidade de <i>M.</i> <i>leprae</i> dentro das células de Schwann | 79 |
| 4.2 | Parte 2: modelo humano | 82 |
| 4.2.1 | Análise de expressão gênica em fragmentos de nervo de pacientes com neuropatia hanseniana | 82 |
| 4.2.2 | Os genes funcionais das células de Schwann são modulados diferencialmente de acordo com a viabilidade do bacilo | 83 |
| 4.2.3 | Análise de perfil inflamatório sugere que <i>M. leprae</i> morto e viável aumentam a expressão de CCL2 | 86 |
| 4.2.4 | <i>M. leprae</i> viáveis e mortos promovem uma resposta inflamatória distinta em células de Schwann | 88 |
| 4.2.5 | CCL2 correlaciona-se com diminuição de fibras nervosas na histopatologia, BAAR e PCR | 90 |
| 5 | DISCUSSÃO | 94 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 101 |
| 7 | CONCLUSÕES | 102 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 103 |
| 9 | APÊNDICE A – DOUTORADO SANDUÍCHE | 127 |
| 9.1 | Introdução | 127 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 9.2 | Justificativa..... | 129 |
| 9.3 | Objetivos | 129 |
| 9.3.1 | Objetivos específicos | 129 |
| 9.4 | Materiais e métodos | 129 |
| 9.4.1 | Processamento para RT-qPCR e RNAseq | 131 |
| 9.4.2 | Avaliação da integridade do RNA | 133 |
| 9.4.3 | RNAseq | 135 |
| 9.5 | Resultados | 136 |
| 9.5.1 | O método de extração de RNA interfere na qualidade da integridade | 139 |
| 9.6 | Discussão..... | 141 |
| 9.7 | Perspectivas | 142 |
| 10 | APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO | |
| | 143 | |
| 11 | APÊNDICE C – CURRÍCULO LATTES | 193 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Mapa de novos casos de Hanseníase no mundo em 2019. | 25 |
| Figura 2 – Progressão de novos casos de Hanseníase no mundo por regiões, entre 2009 e 2019. | 26 |
| Figura 3 – Grau de incapacidade física (GIF) no Brasil. | 27 |
| Figura 4 – Envoltório celular de <i>M. leprae</i> . | 28 |
| Figura 5 – Micrografia de biópsia de pele apresentando numerosos bacilos (<i>M. leprae</i>), evidenciados por coloração de Ziehl-Neelsen (400x). | 30 |
| Figura 6 – Modelo de cultivo de <i>M. leprae</i> em coxim plantar de camundongos nude. | 31 |
| Figura 7 – Representação esquemática do neurônio. | 32 |
| Figura 8 – Anatomia do nervo periférico. | 34 |
| Figura 9 – Regulação transcricional da célula de Schwann mielinizante. | 36 |
| Figura 10 – Bandas de Cajal na célula de Schwann. | 37 |
| Figura 11 – Degeneração Walleriana. | 40 |
| Figura 12 – A célula de Schwann de reparo. | 42 |
| Figura 13 – Mielinofagia na célula de Schwann mielinizante saudável. | 44 |
| Figura 14 – Células de Schwann mielinizantes, não-mielinizantes (Remak) e em modo de reparo (Bugner) <i>in vivo</i> . | 46 |
| Figura 15 – Episódio reacional tipo 1 (Reação Reversa). Lesões com borda definida, caracterizadas por rubor e calor. | 49 |
| Figura 16 – Episódio reacional tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico). Nódulos e pápulas dolorosas. | 49 |
| Figura 17 – Classificações vigentes para categorização das formas clínicas da Hanseníase. | 51 |
| Figura 18 – O impacto de <i>M. leprae</i> na célula de Schwann. | 52 |
| Figura 19 – Múltiplos papéis dos lipídeos na sobrevivência micobacteriana. | 53 |
| Figura 20 – Aumento da degradação da mielina em resposta à entrada do <i>M. leprae</i> nas células de Schwann primárias mielinizantes de camundongo. | 70 |
| Figura 21 – Interação do <i>M. leprae</i> com ovóides de mielina em CSPM de camundongo infectadas representando a interação <i>M. leprae</i> -mielina. | 71 |
| Figura 22 – Aumento da quebra de mielina em resposta a entrada do <i>M. leprae</i> nas CSPM de camundongo. | 73 |

| | |
|---|----|
| Figura 23 – <i>M. leprae</i> modula negativamente genes pró-mielinizantes em CSPM | 74 |
| Figura 24 – <i>M. leprae</i> modula negativamente genes pró-mielinizantes em biópsias de nervo. | 75 |
| Figura 25 – <i>M. leprae</i> induz a destruição da mielina pelo mecanismo de mielínofagia. | 76 |
| Figura 26 – Aumento da indução de autofagia em biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase | 77 |
| Figura 27 – <i>M. leprae</i> induz o aumento de corpúsculos lipídicos a partir da quebra de mielina em CSPM. | 78 |
| Figura 28 – <i>M. leprae</i> induz a expressão de transcritos para formação de corpúsculos lipídicos e para regulação negativa de lipases. | 79 |
| Figura 29 – A inibição farmacológica da degradação de mielina altera a fisiologia do <i>M. leprae</i> . | 81 |
| Figura 30 – A viabilidade bacteriana é afetada pela inibição farmacológica de JNK. | 82 |
| Figura 31 – Alteração na expressão gênica da biologia da célula de Schwann em pacientes com Hanseníase NP. | 83 |
| Figura 32 – Padrão de expressão gênica envolvidos na biologia da célula de Schwann. | 85 |
| Figura 33 – Diagrama de Venn de genes da biologia da célula de Schwann diferencialmente mais expressos, relacionados a assinatura genética na Hanseníase. | 86 |
| Figura 34 – Análise do perfil inflamatório na infecção por Hanseníase NP. | 87 |
| Figura 35 – Padrão de expressão de citocinas e quimiocinas solúveis sintetizadas diferencialmente após infecção ou estímulo com <i>M. leprae</i> viável ou morto em células de Schwann humanas. | 90 |
| Figura 36 – Matriz de correlação entre a expressão gênica de pacientes com Hanseníase Neural Pura e suas alterações histopatológicas. | 92 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Mecanismos celulares e moleculares de interação do <i>M. leprae</i> viável e morto com nervo periférico..... | 55 |
| Tabela 2 – Sequências de pares de primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR..... | 64 |
| Tabela 3 – Dados clínicos de pacientes com NP incluídos neste estudo (n=8).66 | |
| Tabela 4 – Regressão linear entre PCR para <i>M. leprae</i> e BAAR em relação à expressão gênica global..... | 93 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APOB – Apolipoproteína B.

ATGL – Lipase de triacilglicerol de adipócito

ATP – Adenosina trifosfato

BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente

BB- Borderline-Borderline

BDNF – “Brain Derived Neurotrophic Factor” – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro.

BL- Borderline-lepromatoso

BT – Borderline-Tuberculóide

CCL2 – “Motif chemokine Ligand 2”

cDNA – fita de DNA complementar

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

cJUN – Proteína proto-oncogênica Ju-Nana

COVID-19 – “Coronavirus Disease 2019” - Doença por Coronavirus 2019

CS – Célula de Schwann

CSPM – Célula de Schwann Primária Mielinizante

DAPI – 4'6'-diamino-2-fenil-indol

DMEM F12 – Meio de cultura Eagle Dulbeco Modificado

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DW – Degeneração Walleriana

EGR1 – “Early Growth Response 1” – Proteína 1 de resposta de crescimento precoce.

ENH – eritema nodoso hansênico

ERBb2/3 – “Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/3” – Fator de crescimento da epiderme humana 2/3.

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GDNF- fator neurotrófico derivado da glia

GIF – Grau de Incapacidade Física

GJA1 – Proteína de Junção comunicante alfa 1

H&E – Hematoxilina e Eosina

HLA – Antígeno de Leucócito Humano.

HSL – “Hormone-sensitive lipase” – Lipase Hormônio Sensível

IFNB – Interferon Beta

IFN- γ – Inteferon gamma

IKBKA – “conserved Helix-loop-helix ubiquitous kinase”
IL10 – Interleucina 10
IL12- Interleucina 12
IL1A – interleucina 1 alfa
IL1B – Interleucina 1beta
IL2 – Interleucina 2
IL4 – Interleucina 4
IP10 – Proteína 10kDA induzida por Interferon Gamma
JNK – cinase N-terminal de cJun
JNKi – inibidor da cinase N-terminal de cJun
KCNJ10 – “Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 10” –
Subfamília J do Canal de Ratificação Interna de Potássio Membro 10.
KROX20/EGR2 – “Early Growth Response 2” – Proteína 2 de resposta de crescimento
precoce.
LAM – Lipoarabinomanana
LC3 – Cadeia leve 3 da proteína associada a microtúbulos
LL– Lepromatoso-lepromatoso
LM – Lipomanana
M. leprae – *Mycobacterium leprae*
MAPK3 – Proteína cinase 3 ativada por mitógeno.
MBP – Proteína Básica de Mielina
MCP1– Proteína quimioatraente de monócitos 1
MMPs – Metaloproteases
MOI – “Multiplicity of Infection” – Multiplicidade de Infecção
MPZ – Proteína Zero da Mielina
mTOR – Proteína alvo da Rapamicina
NF-kB – Fator Nuclear kappa B
NGF – “Nerve Growth Factor” – Fator de Crescimento neural
NGS – “Normal Goat Serum” – Soro de cabra normal
NIH – National Institute of Health
NP – Hanseníase Neural Pura
NP – Hanseníase Neural Pura
NRG-1 – Neuregulina-1
NT-4 – Netrina-4
NTN1– Netrina-1

OLIG1 – Fator de Transcrição 1 de oligodendrócitos
OMS – Organização Mundial da Saúde
p75NTR – Receptor de neurotrofina P75
PB- Paucibacilar
PBS - tampão fosfato-salina
PDIM – Ftiocerol dimicocerato
PEES - penicilina-estreptomicina
PFA - paraformaldeído
PGL-1 – glicolipídio-fenólico-1
PKH67 – Intercalante celular verde fluorescente
PLP – Proteína proteolipídica
PQT- poliquimioterapia
PrInt - Programa Institucional de Internalização
pSLC- célula de Schwann progenitora
RAF1 -RAF proteína proto-oncogene serina/threonina- kinase RAF 1
RAG - gene de ativação de recombinação 1
RIN - número equivalente a integridade do RNA
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
RNAr – ácido ribonucleico ribossomal
ROS - espécie reativa de oxigênio
RPL13- Proteína Ribossomal L13
RPMI- Meio Roswell Park Memorial Institute
RR- Reação Reversa
RTqPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SC – Célula de Schwann
SHH – Sonic HedgeHog
SNC – Sistema Nervoso Central
SNP- Sistema Nervoso Periférico
SOSTDC1 – “Sclerostin Domain Containing 1”
SOX10 – “SRY-box transcription factor 10” – Fator de Transcrição 10 relacionado ao SRY.
SOX2- “SRY-Box Transcription Factor 2” – Fator de Transcrição 2 para expressão do SRY.
SREBP- Proteínas de ligação do elemento regulador de esteróis.
TG -Tricrômico de Gomori

TGFB – Fator de Crescimento Transformador Beta

TH1- “T helper 1” – Linfócito T auxiliador 1

TH2- “T helper 2” – Linfócito T auxiliador 2

TNF -fator de necrose tumoral

TT- Tuberculóide-Tuberculóide

TYRP1– “Tyrosinase Related Protein 1” – Proteína relacionada a tirosinase 1.

ULK1 – “unc-51 like autophagy activating kinase 1” – cinase-1 ativadora de autofagia
tipo unc-51.

UNC5B– “Unc5 Netrin Receptor B” – Receptor de netrína Unc5.

WIPI2 – Proteína 2 de interação com fosfoinosítídeo do domínio de repetição WD.

WNK – proteína cinase 1 deficiente de lisina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

A Hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo patógeno intracelular obrigatório *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*) (DEPS e COLLINS, 2012; SINGH *et al.*, 2015). Ambos possuem tropismo pelos nervos periféricos e pele, devido à sua preferência por regiões do corpo com baixa temperatura (em torno de 28 a 30°C) e por outros mecanismos de predileção patógeno-hospedeiro ainda pouco esclarecidos (SCOLLARD *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2012; WHO, 2016). Após entrar no organismo, o bacilo apresenta uma longa janela de incubação, período no qual as manifestações clínicas da doença tendem a aparecer, sendo em torno de dois a dez anos, após a instalação da infecção primária (BRASIL, 2010).

O *M. leprae* se estabelece, principalmente, nas células que sintetizam a bainha de mielina no nervo periférico, isto é, as células de Schwann, comumente conhecidas como a glia do sistema nervoso periférico (SNP) (MIETTO *et al.*, 2016; VERKHRATSKY *et al.*, 2019; JESSEN e MIRSKY, 2019a). Estas células da glia estão envolvidas no suporte de inúmeras funções fisiológicas do SNP, incluindo na velocidade da propagação do potencial de ação neuronal e na manutenção da homeostase e integridade do axônio (VERKHRATSKY *et al.*, 2019; MIETTO *et al.*, 2021; SARDELLA-SILVA *et al.*, 2021). De modo curioso, a habilidade particular de preferencialmente invadir as células de Schwann, com certo grau de afinidade por outras células do microambiente neural (ex.: macrófagos), torna a Hanseníase uma doença complexa e multifatorial (SCOLLARD, TRUMAN, & EBENEZER, 2015; SERRANO-COLL *et al.*, 2018). Tal colonização perturba a função de diferentes células do nervo, ocasionando, dessa forma, grave degeneração do tecido nervoso, com uma grande importância clínica, especialmente pela incapacidade física gerada nos pacientes acometidos pela doença (ANTUNES *et al.*, 2012; JARDIM *et al.*, 2021). É sobre esse complexo mecanismo de interação patógeno-célula de Schwann, ainda tão pouco compreendido ao nível molecular e celular que leva a destruição do nervo periférico, que a presente tese é baseada.

1.2 Histórico, epidemiologia e transmissão

A Hanseníase é uma das doenças mais antigas que acometem a humanidade. Com registros históricos que datam de 6.000 anos a.C., a doença também é citada na bíblia hebraica, no livro de Levítico, como “tsaraáth”, que significa desonra, vergonha ou desgraça (EIDT, 2004). Devido à ausência de entendimento a respeito do modo de transmissão da doença, acreditava-se, naquela época, que a manifestação sintomatológica da doença era decorrente do “castigo devido ao pecado carnal”. Desta maneira, o indivíduo acometido carregava, além das debilidades oriundas da doença, um grande estigma social. A antiga “lepra” trazia o fardo da discriminação, onde o isolamento era a única forma de controlar a doença e banir o “portador da desonra” (BRASIL, 2010). Por ser uma doença predominantemente de países subdesenvolvidos e pelo fato de a Hanseníase atingir as camadas socioeconômicas mais desfavorecidas, especialmente no Brasil, o estigma e o preconceito sofrido pelos pacientes culminaram na necessidade de trocar o termo lepra, por outra terminologia. Esta mudança ocorreu em 1995, a partir da lei nº 9.010, que oficializou a mudança do nome da doença para Hanseníase, em homenagem ao pesquisador Gerhard Armauer Hansen, responsável pela identificar o agente etiológico *M. leprae* como causador da doença (FEMINA *et al.*, 2007).

Apesar do Ministério da Saúde ter aperfeiçoado e intensificado as medidas integrativas de educação social, a respeito da doença na rede básica de saúde e nas mídias sociais, o Brasil ainda considera a Hanseníase como um problema de saúde pública, contando com mais de 28 mil novos casos por ano (Figura 1) (WHO, 2021). Para que se seja considerada erradicada, o número de casos precisa estar abaixo de 10 casos por 100 mil habitantes, meta que ainda não foi cumprida (BRASIL, 2020). Ainda, a incapacidade física e as deformidades nos membros, decorrentes das lesões neurológicas carregam o fardo do preconceito social. O diagnóstico tardio é uma das principais razões que levam a incapacidade física, uma vez que o acesso aos cuidados de saúde básica pelas classes sociais economicamente desfavoráveis ainda é um grande entrave a ser melhorado em nossas políticas públicas (ANTUNES *et al.*, 2012; LASTÓRIA *et al.*, 2014).

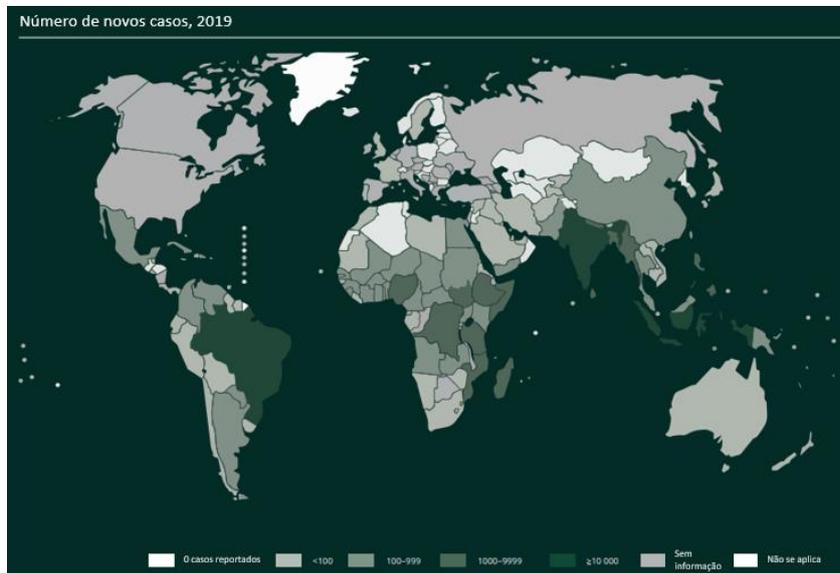


Figura 1 – Mapa de novos casos de Hanseníase no mundo em 2019.

Em 2019, 118 países apresentaram novos casos da doença, predominantemente países subdesenvolvidos, onde 79% do total global aconteceram no Brasil, na Índia e na Indonésia. Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021). Boletim estratégico para erradicação da Hanseníase. ISBN: 978-92-9022-850-9.

Segundo o boletim estratégico para erradicação da Hanseníase (2021-2030), elaborado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021), no ano de 2019 a Hanseníase foi prevalente em 161 países e, mais especificamente, 118 países detectaram casos novos da doença, num total de 202.256 novos casos em 2019 (Figura 2). Desses novos casos, 79% foram relatados na Índia, Brasil e Indonésia, regiões de alta prioridade no desenvolvimento da doença (WHO, 2021).

Detecção mundial por regiões, 2009-2019

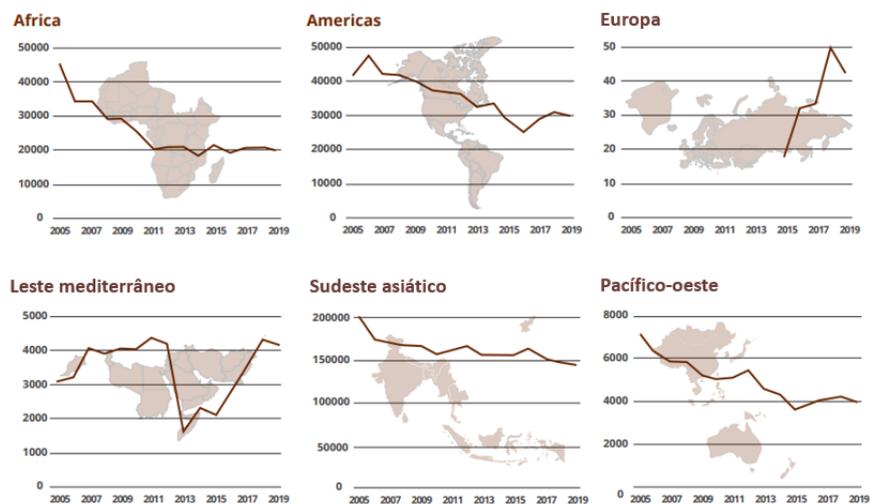


Figura 2 – Progressão de novos casos de Hanseníase no mundo por regiões, entre 2009 e 2019.

Fonte: Organização Mundial da Saúde (WHO, 2021). Boletim estratégico para erradicação da Hanseníase. ISBN: 978-92-9022-850-9.

Dentro da incidência de 2019, 10.816 casos apresentaram avançado comprometimento neurológico, culminando em incapacidade física no momento do diagnóstico, incluindo, dentre esses, 370 crianças. Este dado mostra que o diagnóstico ainda está ocorrendo de modo muito tardio e isso pode ser associado, por exemplo, à uma ausência da conscientização da população, associada também a pouca assistência de saúde para a população mais carente (Figura 3) (WHO, 2021). Dos novos casos, 38,9% eram do sexo feminino e 7,4% eram crianças. Sabendo-se do longo tempo de incubação necessária à manifestação sintomatológica, a detecção de casos infantil é considerada um indicador de transmissão recente na comunidade. Não obstante, a disparidade de gênero observada também se apresenta no Brasil, onde indivíduos do sexo masculino são mais acometidos e, de modo geral, pessoas que não completaram o ensino fundamental. Complementarmente, a população parda apresenta o maior número de casos acometidos (BRASIL, 2021).

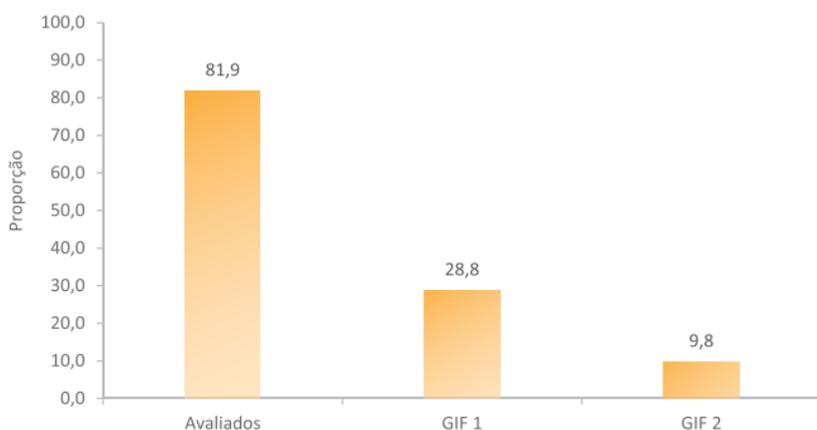


Figura 3 – Grau de incapacidade física (GIF) no Brasil.

Proporção de casos de Hanseníase avaliados quanto aos graus de incapacidade física 1 – no início do comprometimento neurológico, e 2 – em um estado mais avançado do comprometimento neurológico, no momento do diagnóstico no ano de 2020. Brasil, 2020.

Atualmente, já é sabido que o principal mecanismo de transmissão da doença se dá pelas vias aéreas, uma vez que foi demonstrada a presença do bacilo viável em secreções nasais, sendo, portanto, transmitido por gotículas de modo inalatório (FADLITHA *et al.*, 2019). Não se descarta, entretanto, a possibilidade da via de transmissão cutânea, uma vez que o bacilo viável pode ser encontrado em lesões de pele. Deve-se ressaltar, porém, que além do homem, o tatu de nove bandas – *Dasyurus novemcintus* – também é um hospedeiro natural do *M. leprae*, e, além do mais, pode ser infectado pela mesma cepa, sugerindo a possibilidade da transmissão cruzada entre as espécies (TRUMAN *et al.*, 2001). É comum, em algumas partes do Brasil, a alimentação pela caça de carne de tatu selvagem, sendo essa uma proposição de um possível mecanismo de propagação de cepas diferentes, especialmente na região centro-oeste do Brasil (SILVA *et al.*, 2018).

1.3 Agente etiológico

O *M. leprae* é um bacilo pertencente ao gênero *Mycobacterium*, com morfologia de bastonete com aproximadamente 1-8 µm um de comprimento e 0,3 µm de diâmetro (TRUMAN *et al.*, 2001). É uma bactéria Gram-positiva, apesar de não ser corada, de

modo efetivo, pela coloração de Gram, devido à alta quantidade de lipídios na sua superfície. O envoltório celular de *M. leprae* é constituído pela membrana plasmática, parede celular, folheto externo de pseudo-bicamada e uma cápsula (VISSA e BRENNAN, 2001). Esta impermeabilidade se deve à uma camada hidrofóbica rica em lipídios complexos, os quais são distintos de outras bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, que recobrem a superfície externa dessas micobactérias (VISSA e BRENNAN, 2001; BHAMIDI *et al.*, 2011). Esses lipídios são caracterizados como ácidos graxos ramificados, denominados de ácidos micólicos, unicamente encontrados neste gênero, além de glicolipídios, como o lipoarabinomanana e de seu precursor lipomanana (LM) (VISSA e BRENNAN, 2001; BHAMIDI *et al.*, 2011; ANTUNES *et al.*, 2012). O *M. leprae* possui um importante componente em seu folheto externo, o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1), molécula presente exclusivamente neste bacilo, que não apresenta reação cruzada com outras micobactérias, em especial ao *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), sendo, portanto, uma molécula alvo para sua identificação (LETURIONDO *et al.*, 2019). Além deste glicolipídio, encontram-se também como componentes da cápsula o ftiocerol dimicocerato e o fosfatidilinositol manosídeo, além de outros fosfolipídios (Figura 4) (VISSA e BENNAN, 2001; SCOLLARD *et al.*, 2006); BHAMIDI *et al.*, 2011).

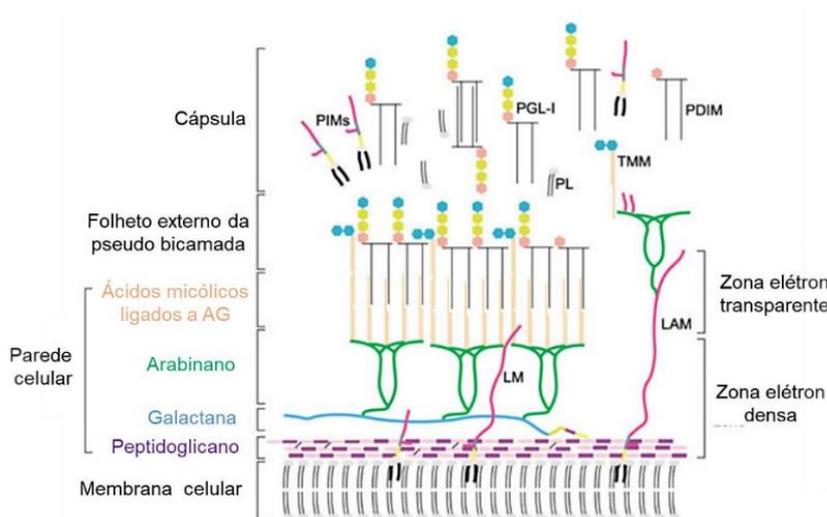


Figura 4 – Envoltório celular de *M. leprae*.

O envoltório celular de *M. leprae* composto por membrana plasmática, parede celular, folheto externo e cápsula. Adaptado de VISSA e BRENNAN, 2001.

No ano de 2001, o genoma do *M. leprae* foi completamente sequenciado (COLE *et al.*, 2001). Apesar da expectativa sobre a compreensão de quais genes estariam relacionados à fisiopatologia da doença, menos da metade do seu genoma (49,5%, ou seja, 1.605 genes) é capaz de codificar proteínas, ou seja, mais da metade do seu conteúdo genético é constituído por pseudogenes (COLE *et al.*, 2001). Traçando-se um paralelo com o *M. tuberculosis*, o *M. leprae* perdeu muitos genes relacionados ao crescimento bacteriano, além de outros relacionados as vias catabólicas e do metabolismo energético (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Comparando-se os dois genomas, o *M. leprae* possui apenas dois genes que expressam lipases, enquanto *M. tuberculosis* dispõe de mais de 20 genes responsáveis pela hidrólise lipídica (COLE *et al.*, 2001). O decaimento genético de genes relacionados à reprodução bacteriana poderia explicar, portanto, o seu longo tempo de multiplicação intracelular (VISSA e BRENNAN, 2001).

O *M. leprae* apresenta crescimento lento em comparação com outras micobactérias e, além disso, por ser um parasito intracelular obrigatório, a maquinaria da célula hospedeira é essencial para sua sobrevivência (Figura 5). O bacilo leva em torno de 14 dias para se replicar. Além disso, até hoje, nenhum grupo foi capaz de cultivar essa bactéria *in vitro* (MARTINEZ *et al.*, 2009). Seu cultivo, entretanto, para experimentação foi iniciado em 1965, por SHEPARD e colaboradores, que demonstraram o aparecimento de uma lesão focal, típica da doença, através da inoculação de 10^3 bacilos no coxim plantar de camundongos atímicos (SHEPARD *et al.*, 1965). Este animal ainda é o principal modelo experimental de cultivo *in vivo* da bactéria, que demanda cerca de seis meses, em média, para obtenção de um volume adequado para uso em experimentação científica (Figura 6) (MARTINEZ *et al.*, 2009). O tatu de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) também é capaz de manifestar a forma disseminada da Hanseníase, cerca de 18 a 24 meses após infecção (KIRCHHEIMER e STORRS, 1971; SILVA *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2021).

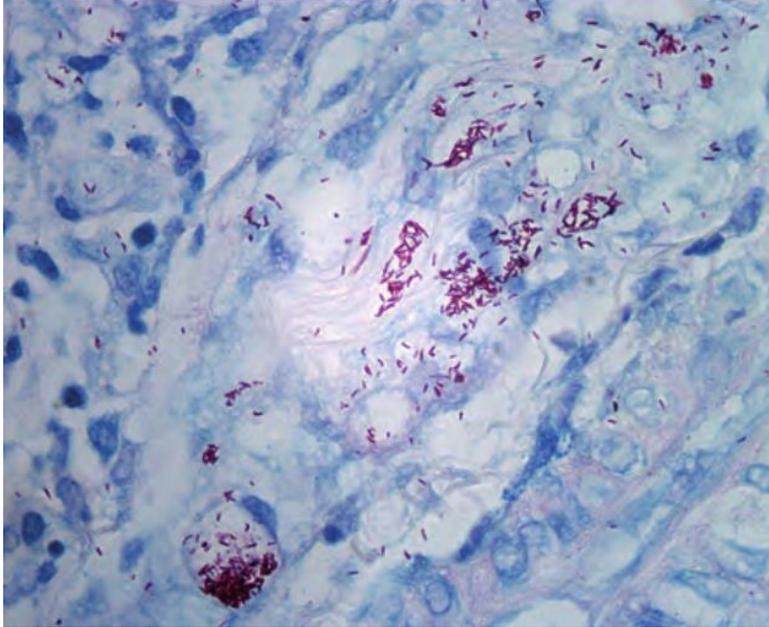


Figura 5 – Micrografia de biópsia de pele apresentando numerosos bacilos (*M. leprae*), evidenciados por coloração de Ziehl-Neelsen (400x).

Fonte: CHIARATTI *et al*, 2016.

A respeito do sítio de tropismo, o *M. leprae* possui especial preferência em infectar os nervos periféricos, persistindo principalmente no interior das células de Schwann (SCOLLARD *et al.*, 2012). Não obstante, é sabido que o *M. leprae* também é capaz de infectar outras células não neuronais que constituem o nervo, tais como macrófagos, células endoteliais, adipócitos e fibroblastos (MADIGAN *et al.*, 2017b; PINHEIRO *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2019; HOOJI e GELUK, 2021; ROSA *et al.*, 2021) Neste contexto, é importante compreender as características anatomofisiológicas do sistema nervoso periférico, a fim de se estabelecer uma relação entre tecido, células e a manutenção da infecção do *M. leprae* no nervo periférico.



Figura 6 – Modelo de cultivo de *M. leprae* em coxim plantar de camundongos nude.

Pata de camundongo nude seis meses após a inoculação, a pata atinge uma carga bacilar suficiente para ser utilizada experimentalmente. Este modelo é uma das únicas formas de cultivo do bacilo para uso experimental. Fonte: SCOLLARD *et al.*, 2006.

1.4 O Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso periférico (SNP) compreende uma complexa e extensa rede de prolongamentos nervosos, que possibilitam a integração e comunicação do sistema nervoso central com os demais tecidos do corpo (KANDEL *et al.*, 2012). Anatomicamente, o SNP se organiza em gânglios periféricos, nos prolongamentos dos nervos e nas terminações nervosas (PURVES *et al.*, 2010; MIETTO *et al.*, 2011). Os gânglios periféricos abrigam os corpos celulares dos neurônios somáticos sensitivos e dos neurônios autonômicos motores, enquanto os axônios dos neurônios, em associação com as células não-neuronais (ex.: células da glia, do sistema imunológico, vascular, entre outros) do SNP se organizam em forma de nervos. Os nervos do SNP podem ser classificados em nervos espinais – que se comunicam com os centros superiores a partir da medula espinal – ou em nervos cranianos – onde os corpos celulares desses neurônios têm origem no encéfalo (KANDEL *et al.*, 2012; SONNE e LOPES-OJEDA, 2021).

Apesar de existirem diferentes tipos de neurônios, todos obedecem a uma estrutura principal, composta por 3 elementos: O corpo celular, os dendritos e o axônio (Figura 7) (LENT *et al.*, 2010). O corpo celular é a região onde se localizam a maioria

das organelas do neurônio bem como o núcleo celular. Desta maneira, grande parte das proteínas e metabólitos são produzidos nesta região, tornando o corpo celular não somente o centro metabólico do neurônio, mas também a região mais eletrônica do mesmo (PURVES *et al.*, 2010). Os dendritos, por sua vez, são responsáveis pela detecção e recepção de informações eletroquímicas externas, advindas por meio das sinapses, que serão transduzidas, integradas e processadas no neurônio. Já o axônio é a porção mais extensa do neurônio, podendo chegar à 1 metro de comprimento, em humanos. Este prolongamento possui uma membrana altamente especializada, dotada de canais iônicos dependentes de voltagem, que permitem a geração de um potencial de ação elétrico, responsável pela transmissão de informações entre os neurônios e células-alvo (PURVES *et al.*, 2010; KANDEL *et al.*, 2012).

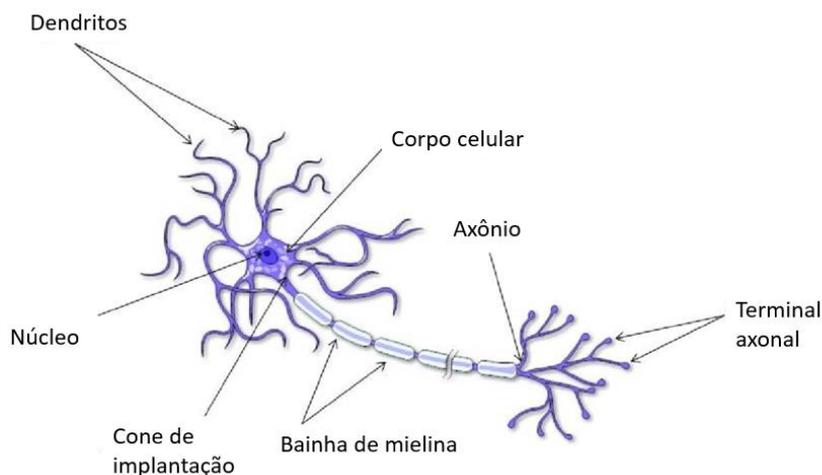


Figura 7 – Representação esquemática do neurônio.

O neurônio é célula fundamental responsável pela transmissão do impulso nervoso. As setas indicam suas divisões estruturais. Adaptado de NELLIKATTIL *et al.*, 2016.

1.4.1 Anatomia do nervo periférico

Um nervo periférico é formado pela associação de várias fibras nervosas: axônios, associados às células da glia (Figura 8). Cada fibra nervosa possui um envoltório de lâmina basal, circundada de tecido conjuntivo – denominado de endoneuro. O perineuro, por sua vez, é uma segunda camada de tecido conjuntivo e agrupa várias fibras nervosas (JESSEN e MIRSKY, 2005; MIETTO *et al.*, 2011). O

perineuro constitui parte da barreira hemato-nervosa, dificultando o acesso de diversas moléculas e agentes nocivos à intimidade das fibras nervosas (JESSEN e MIRSKY, 2005). Vários feixes nervosos, por sua vez, constituirão o nervo propriamente dito. A união entre os feixes se dá por uma camada envoltória de tecido conjuntivo denso, denominada epineuro. Os nervos mais calibrosos possuem múltiplos fascículos, enquanto os nervos mais delgados podem ser formados por fascículo único (LENT *et al.*, 2010). No SNP, caracterizam-se as fibras nervosas como mielinizadas e não mielinizadas. As fibras mielinizadas são formadas por um único axônio, associada à inúmeras células de Schwann, que se enovelam ao longo do eixo axonal, de modo paralelo, compondo, cada trecho, uma estrutura denominada de bainha de mielina (MIETTO *et al.*, 2011). As fibras não mielinizadas, no entanto, se caracterizam por serem circundadas por uma fina camada citoplasmática, onde uma única célula de Schwann é capaz envolver diversos axônios de pequeno calibre. Esta estrutura é denominada de feixes de Remak (NAVE e TRAPP, 2008).

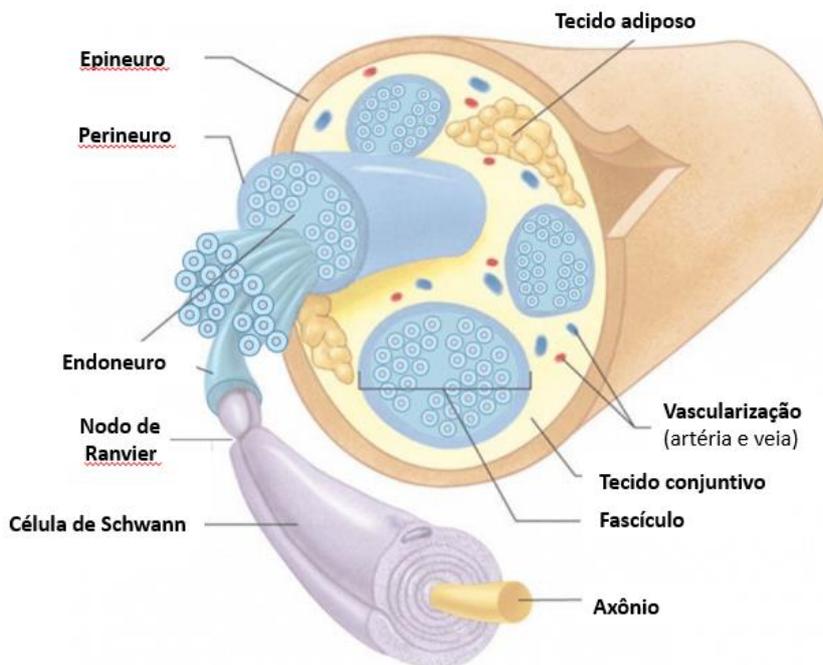


Figura 8 – Anatomia do nervo periférico.

A figura ilustra as características anatômicas do nervo periférico, que conta com uma organização estrutural de fibras nervosas, organizadas em feixes, delimitados por fascículos nervosos, que compreendem três camadas de isolamento: o epineuro, tecido conjuntivo que delimita o nervo *per se*, o perineuro, que delimita cada fascículo nervoso e o endoneuro, que delimita cada fibra nervosa. Cada fibra nervosa é composta pela associação entre um axônio e as células de Schwann que enovelam este axônio. Fonte: Adaptado de KULIASHA *et al.*, 2018.

De modo interessante, diferentes doenças são caracterizadas por perturbações nas fibras sensitivas e/ou motoras dos nervos periféricos, tendo como possível gatilho inúmeros fatores, incluindo causas infecciosas, genéticas e idiopáticas. A esse quadro, dá-se o nome de neuropatia (NINDS, 2014). Algumas neuropatias podem acometer as fibras nervosas periféricas de forma seletiva, como no caso do *Diabetes mellitus* (MATSUTOMO *et al.*, 2005; RICHERSON *et al.*, 2005), ou de forma mais gradativa, como a Síndrome do Túnel do Carpo (NISHIMURA *et al.*, 2004) e a própria Hanseníase (VILLAROEL *et al.*, 2007). Em todos esses contextos, uma característica em comum é a perturbação na função das células de Schwann. Tal condição modifica as atividades fisiológicas da glia periférica e, de certo modo, culminam na gradual degeneração do nervo acometido. Portanto, faz-se fundamental entender a fisiopatologia das células de Schwann, no contexto da saúde e doença do nervo periférico, a fim de avançar o conhecimento sobre as causas moleculares e celulares das neuropatias periféricas.

1.4.2 A biologia da célula de Schwann

As células de Schwann (CS) foram primeiramente descobertas em 1839 por Theodor Schwann e posteriormente identificadas como as principais células garantidoras da homeostase do SNP (SCHEIB e HOKE, 2013; SARDELLA-SILVA *et al.*, 2021). No que se refere seu contexto embrionário, as células de Schwann passam por diferentes períodos de diferenciação, como descrito a seguir: i) o estágio de célula de Schwann precursora, onde entram em contato com os axônios primitivos que estão sendo formados no embrião, ii) seguido pelo estágio de célula de Schwann imatura (JESSEN e MIRSKY, 2019a). Nesse momento do desenvolvimento embrionário, a célula de Schwann imatura pode se diferenciar na célula de Schwann adulta ou em fibroblastos residentes do nervo. Quando axônios e células de Schwann imaturas

chegam ao momento do envelhecimento, a célula de Schwann imatura envolve o axônio, alterando sua morfologia. A célula de Schwann imatura que, gradativamente se torna em uma célula adulta mielinizante, irá envolver o axônio, enquanto as células adultas do tipo Remak envolverão diversos axônios amielínicos. Portanto, na fase adulta, podemos diferenciar dois fenótipos da glia periférica: as células de Schwann mielinizantes e as células de Schwann não mielinizantes (JESSEN e MIRSKY, 2015; JESSEN e MIRSKY, 2019a). Morfologicamente, as células de Schwann mielinizantes produzem proteínas relacionadas à composição da bainha de mielina, como a proteína zero de mielina (MPZ) e a proteína básica de mielina (MBP), além de componentes da matriz extracelular que compõe a lâmina basal, como a Laminina-2, o colágeno tipo IV, o heparan-sulfato dentre outros polissacarídeos (CHERNOUSOV e CAREY, 2001).

1.4.2.1 As células de schwann mielinizantes

Por muitos anos, acreditou-se que o propósito da bainha de mielina seria, unicamente, impulsionar a função eletrofisiológica do nervo, além de proporcionar o princípio de condução saltatória, por meio do aumento da velocidade de condução do potencial de ação. Tal mecanismo é justificado pela composição bioquímica da mielina, onde 75% de sua massa total é constituída de ácidos graxos livres (JESSEN e MIRSKY, 2005). O fenótipo de célula de Schwann mielinizante resulta da ativação de uma cascata de sinalização de fatores de transcrição pró-mielinizantes, que são desencadeados inicialmente pelos fatores Sox2, NF-κB e Egr1 (Figura 9) (JESSEN e MIRSKY, 2022). À medida que as fibras nervosas amadurecem, os axônios se segregam e a fase pró-mielinização se inicia, levando a inibição de dois conjuntos de fatores – Pou3f1 e Pou3f2- que levam a regulação positiva de KROX20 (SVAREN e MEIJER, 2008; HE *et al.*, 2010; SALZER *et al.*, 2015), juntamente ao fator de transcrição SOX10 (KAO *et al.*, 2009). O KROX20 é considerado um fator regulador mestre da mielinização no SNP, pois apresenta o papel de conduzir a transcrição de proteínas estruturais da mielina bem como os demais componentes lipídicos da mielina (LE *et al.*, 2005b; SALZER, 2015). Concomitantemente a esses acontecimentos, ocorre uma massiva regulação de lipídios durante o processo de mielinização. As proteínas de ligação do elemento regulador de esteróis (SREBP) são reguladas positivamente, tendo papel fundamental na construção estrutural da mielina nas células de Schwann (CAMARGO *et al.*, 2009). A célula de Schwann apresenta

como característica marcante a capacidade de modulação genética para assumir um fenótipo transcricional de célula mielinizante ou célula Remak. A distinção no padrão de expressão gênica se dá pelo equilíbrio na repressão transcricional na qual SOX2 e cJUN inibem a expressão de KROX20 e vice-versa (SALZER, 2015). Dentre as vias de sinalização pró-mielinizantes, destaca-se a regulação da Neuregulina-1 (NRG1) para a ativação de vias canônicas intracelulares ativadas por ErbB2/3 (LEMMON e SCHLESSINGER, 2010), uma das principais vias responsáveis pela diferenciação da célula de Schwann.

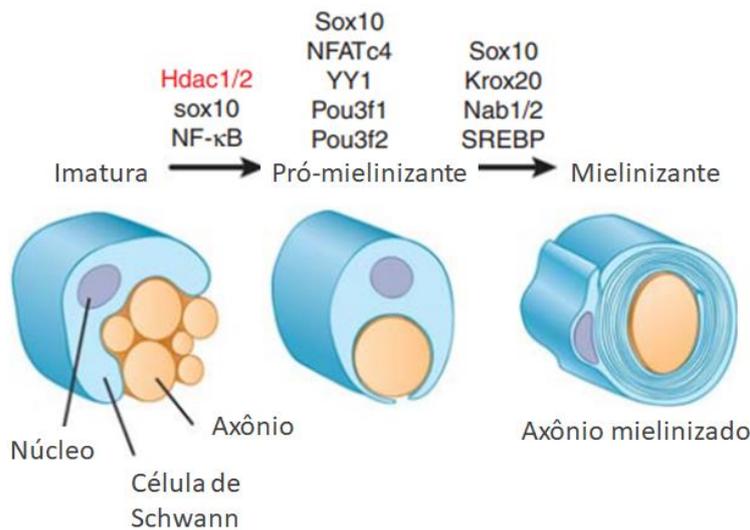


Figura 9 – Regulação transcricional da célula de Schwann mielinizante.

Célula de Schwann imatura se diferenciando, ativando uma cascata de sinalização que levará a biossíntese de esteróis e proteínas de mielina, sob ação principal da indução de KROX20 para a manutenção do fenótipo de célula de Schwann mielinizante madura. Fonte: Adaptado de SALZER *et al.*, 2015.

Dentro do nervo, a população celular majoritária são as células de Schwann, que formam aproximadamente 91% das células componentes de um nervo sadio (MUELLER *et al.*, 2003; CAMPANA *et al.*, 2007). Além dessas, outras populações celulares compõe a estrutura nervosa, tal qual macrófagos residentes e fibroblastos (SCHUBERT e FRIEDE, 1981). Todas essas populações celulares promovem a funcionalidade do nervo, entretanto, as células de Schwann apresentam papel fundamental e crítico em resposta a estímulos externos (SALZER *et al.*, 2015).

Funcionalmente, as células de Schwann cooperam na manutenção do metabolismo neuronal, na garantia da integridade do axônio e, de modo especial, pelo fornecimento de fatores tróficos aos neurônios (BRINKMANN *et al.*, 2008; MIETTO *et al.*, 2021). Dada a importância do papel fisiológico das células de Schwann para a função do nervo, é importante destacar aspectos extremamente particulares no que tange a sua morfofisiologia para o funcionamento do microambiente nervoso. Durante o período de desenvolvimento pós-natal, as células de Schwann mielinizantes apresentam a habilidade intrínseca de se alongar acompanhando o crescimento axonal, além de participar ativamente da construção das regiões intermodais e de bandas longitudinais conhecidas como bandas de Cajal, que são estruturais citoplasmáticas longitudinais presentes em células de Schwann, responsáveis por seu alongamento (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017; ARTHUR-FARRAJ e COLEMAN, 2021). COURT e colaboradores (2004) observaram que células de Schwann que não arquitetavam bandas de Cajal durante seu desenvolvimento pós-natal, apresentavam um crescimento axonal ruim, e como consequência, as distâncias intermodais eram mais curtas e a velocidade de condução do nervo, menor. Isso se deve ao fato de que, por essas bandas, metabólitos importantes são captados do espaço extracelular, contribuindo para a nutrição e metabolismo axonal (Figura 10).

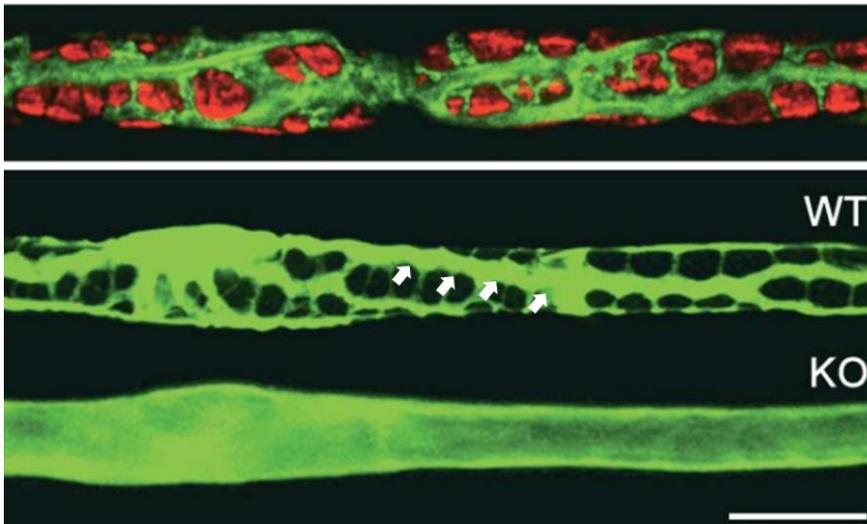


Figura 10 – Bandas de Cajal na célula de Schwann.

Micrografia de fluorescência mostrando bandas de Cajal em uma porção de uma fibra mielinizada de nervo isquiático de rato adulto. Observa-se que numa fibra sadia, a estrutura da célula de Schwann apresenta inúmeras bandas para o fluxo de metabólitos, enquanto no animal “knockout” – incapaz de arquitetar as bandas, o crescimento axonal será prejudicado. Fonte: Adaptado de COURT *et al.*, 2004.

Nas fibras mielinizadas, observa-se ainda a presença de fendas citoplasmáticas transversais cônicas, presentes no internodo, que percorrem toda a bainha de mielina – da face externa ao núcleo da célula de Schwann – denominadas incisuras de Schmidt-Lantermann (ISL) (TERADA *et al.*, 2019). Essas fendas escalonadas formam canais de comunicação entre as camadas envoltórias de mielina (TERADA *et al.*, 2019). MIETTO e colaboradores (2021) recentemente demonstraram as ISL como sítio de proteínas transportadoras de ferro para as mitocondriais axonais, necessárias para o reparo adequado do nervo (MIETTO *et al.*, 2021).

1.4.2.2 Aspectos patológicos: o que acontece com a célula de Schwann quando o nervo sofre uma injúria?

A glia periférica possui um papel fundamental não somente na manutenção da integridade do axônio, como também para o metabolismo neuronal (BRINKMANN *et al.*, 2008; VALENZUELA *et al.*, 2016; MIETTO *et al.*, 2021). A neuroplasticidade de reparo observada no SNP, diferentemente do central, ocorre devido à capacidade das células de Schwann adultas adquirirem um terceiro fenótipo funcional, denominado de fenótipo de reparo (JESSEN e MIRSKY, 2015; SALZER, 2015; WONG *et al.*, 2017). O mecanismo primordial que ocorre nesta etapa é a mudança do perfil genético da célula de Schwann, caracterizado pela repressão de genes de mielina com concomitante indução de genes de suporte (ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012; MASAKI *et al.*, 2013; SALZER, 2015; JESSEN e MIRSKY, 2019a). Essa mudança no perfil genético caracteriza uma nova capacidade funcional da célula de Schwann, que favorece a capacidade de restauração da função do nervo. Neste sentido, é importante, primeiramente, entender como ocorre o processo de degeneração da fibra nervosa pós lesão.

1.4.3 Degeneração Walleriana

Após a lesão, seja por corte, esmagamento ou processo adicional (ex.: químico, metabólico, infeccioso, dentro outros), a porção distal do axônio entra em um processo

degenerativo, coletivamente conhecido por degeneração Walleriana (DW) (CONFORTI *et al.*, 2014; MIETTO, 2015; SALZER, 2015). A DW é caracterizada por degeneração retrógrada, distal ao local da lesão (Figura 11) (PERRY *et al.*, 1990; CONFORTI *et al.*, 2014). O esqueleto axonal por sua vez, se desintegra e a membrana basal do axônio se rompe. Este processo apresenta características bioquímicas marcantes, como um abrupto e robusto influxo de Cálcio (Ca^{2+}) e o déficit energético (ATP) no sítio da lesão, gerando espécies reativas de oxigênio, que promovem o desmantelamento axonal (WANG *et al.*, 2012). O neurônio acometido, por sua vez, modifica sua expressão gênica, induzindo a transcrição de diversos fatores pró-regeneração (DORON-MANDEL *et al.*, 2015).

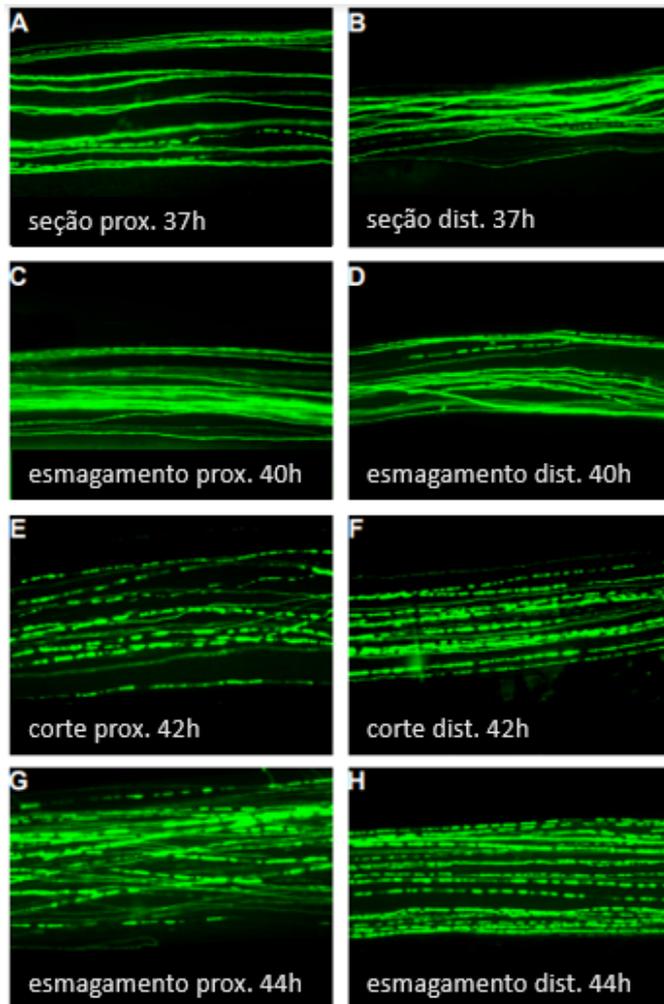


Figura 11 – Degeneração Walleriana.

Micrografias de fluorescência 37h (A e B), 40h (C e D), 42h (E e F) e 44h (G e H) após esmagamento e seção axonal mostrando a DW começando distalmente e envolvendo a fragmentação total dos axônios. Fonte: Adaptado de BEIROWSKI *et al.*, 2005.

Durante o curso da DW, nos momentos iniciais, a bainha de mielina sofre uma extensa fragmentação (MIETTO *et al.*, 2015; MARTINEZ e CANAVARRO, 2000), previamente a chegada de macrófagos hematogênicos, consolidando o papel crítico da própria célula de Schwann em induzir a destruição da sua própria bainha de mielina (MUELLER *et al.*, 2003). Dada a composição lipídica da mielina, formada aproximadamente por 70% de lipídeos compondo sua massa total, as lipases – como

a fosfolipase A2 (PLA2) – apresentam um importante destaque no contexto da DW, no processo da degradação estrutural, promovendo a hidrólise de fosfolípidios de membrana (MARTINI *et al.*, 2008). As Incisuras de Schmidt-Lantermann, por sua vez, também apresentam um papel crítico no curso da destruição mielínica. Quando ocorre o processo de injúria, os filamentos de actina presentes nas ISL irão promover uma constrição da fibra que resultará na fragmentação mielínica em formato de ovóides de mielina (JUNG *et al.*, 2011). Concomitantemente, as células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes distais ao sítio da lesão, modificam sua expressão gênica, silenciando os genes de envelhecimento, passando a transcrever genes relacionados ao suporte regenerativo, caracterizando, morfológicamente a célula de Schwann em modo de reparo (ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012). Esta habilidade é exclusiva do SNP, uma vez que os oligodendrócitos não apresentam o fenótipo de diferenciação de reparo, ficando a cargo dos astrócitos realizarem o processo cicatricial no encéfalo e medula, quando a lesão ocorre (KANDEL *et al.*, 2012).

1.4.4 As fases do reparo: O clearance de mielina

Existem dois acontecimentos principais desencadeados na célula de Schwann, envolvidos no mecanismo imediato pós lesão: a desdiferenciação e a ativação celular. No primeiro momento, as células de Schwann mielinizantes deixam de realizar a sua expressão gênica padrão, incluindo os genes relacionados ao seu fenótipo, caracterizando este processo como a desdiferenciação (NAMGUNG, 2014; JESSEN e MIRSKY, 2015; JESSEN e MIRSKY, 2019a; JESSEN e MIRSKY, 2022). Não obstante, simultaneamente, ocorre a indução da expressão de genes de reparo, caracterizando o mecanismo de ativação pró-nervo (JESSEN e MIRSKY, 2015). Desta maneira, a associação de tais mecanismos caracterizam a desdiferenciação celular (Figura 12) (JESSEN e MIRSKY, 2015).

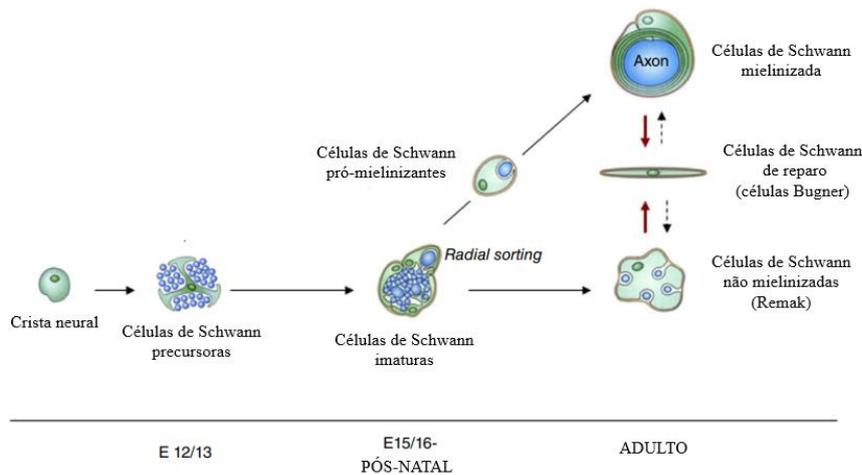


Figura 12 – A célula de Schwann de reparo.

O diagrama representa os principais estágios de desenvolvimento da célula de Schwann. Seta preta: Desenvolvimento normal; seta vermelha: resposta à lesão das células de Schwann. Seta tracejada: formação pós-reparo de células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes. Adaptado de JESSEN e MIRSKY (2015).

Ao se caracterizar os principais eventos que ocorrem durante a desdiferenciação, ressalta-se a redução da expressão de genes relacionados à indução da mielinização em células de Schwann em desenvolvimento, como o gene *KROX20*, que leva a transcrição do fator *Egr2* – fator chave para a produção da bainha de mielina e, enzimas relacionadas à síntese de colesterol; as proteínas estruturais *MPZ*, *MBP* e *p75NTR*. Desta maneira, a célula de Schwann de reparo pode ser vista como uma célula de Schwann de fenótipo imaturo, uma vez que ainda não expressa suas características de célula adulta (JESSEN e MIRSKY 2015; JESSEN e MIRSKY, 2019a). Outra característica marcante da desdiferenciação é o aumento da expressão gênica de neurotrofinas, fatores de crescimento vasculares e genes relacionados a resposta imune inata. O fator neurotrófico derivado da glia (*GDNF*) e o fator de crescimento neural (*NGF*) constituem as neurotrofinas mais diferencialmente expressas, enquanto o fator de necrose tumoral alfa (*TNF*), a interleucina 1 (*IL-1 α*), interleucina 1-B (*IL-1 β*) e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (*MCP-1*) estão consideravelmente em maior expressão gênica pelas células de Schwann distais (SUZUKI *et al.* 2015). De modo particular, esses fatores pró-inflamatórios induzidos, irão, por conseguinte induzir ao recrutamento de macrófagos no nervo, auxiliando no processo fagocítico tardio dos debris celulares e mielínicos (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*,

2015). É importante ressaltar que no contexto da Hanseníase, ao passo que a bactéria interage com a célula de Schwann, também desencadeia tais mecanismos de desdiferenciação, levando ao fenótipo imaturo e, por conseguinte, induzindo um processo facilitador da infecção do nervo, que serão descritas mais à frente (RAMBUKKANA *et al.*, 2002; PETITO *et al.*, 2013; MADIGAN *et al.*, 2017).

1.4.5 A destruição autofágica da mielina

O processo inicial de remoção dos debris de mielina, no entanto, ocorre por um mecanismo recentemente descrito: a mielinfagia. Durante os primeiros dias após a lesão, a célula de Schwann se encarrega de realizar a remoção de cerca de 50% da mielina, pelas vias da autofagia (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015). Sendo a mielina um componente citoplasmático das células de Schwann mielinizantes, ocorre, portanto, a organização dos debris de mielina em ovóides, que serão digeridos pelos lisossomos, por uma via autofágica seletiva, mediada pela proteína alvo da rapamicina (mTOR), porém diferente da via clássica dependente de mTOR (THUMM e SIMONS, 2015; GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015; GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017). Dessa maneira, os ovóides de mielina são envolvidos por um autofagossomo de dupla membrana, que segue para a degradação lisossomal (Figura 13). Após esta primeira etapa e, a partir da ativação de genes de resposta imune, os macrófagos concluem a remoção dos debris de mielina que estão localizados no microambiente neural (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015).

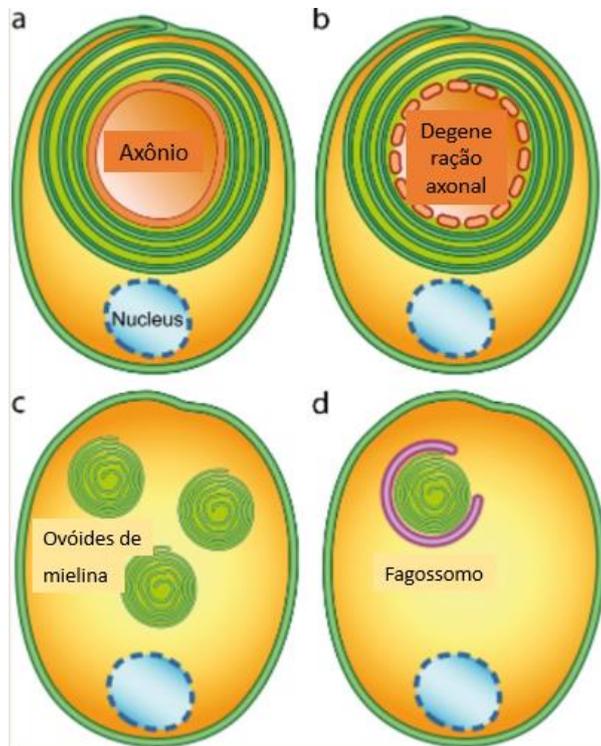


Figura 13 – Mielifagia na célula de Schwann mielinizante saudável. Fases da mielifagia. (A) Axônio íntegro. (B) Quando a degeneração Walleriana é iniciada, o axônio entra em degeneração. (C) A célula de Schwann então internaliza fragmentos de mielina. (D) Em seguida, os fragmentos de mielina resultantes são recolhidos em fagossomos. Adaptado de THUMM e SIMONS, 2015.

Na célula de Schwann imatura, um gene específico – *JUN* – dá origem à proteína cJUN, sendo essa altamente expressa na célula de reparo, apesar de sua baixíssima expressão nas células de Schwann precursoras (JESSEN e MIRSKY, 2015; JESSEN e MIRSKY, 2022). Observa-se o aumento deste fator de transcrição em nervos lesionados (SHY *et al.*, 1996). Entende-se, a partir de dados da literatura, que essa proteína é a responsável por induzir o processo de desdiferenciação, atuando de modo antagônico principalmente na supressão do gene de mielina *KROX20*, além de outros genes relacionados a produção de mielina (ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012). Uma das principais características da célula de Schwann de reparo é sua morfologia extensa – esta é associada a qualidade necessária de estiramento para promover uma ponte de reconexão para os axônios lesionados. Seu processo de alongamento celular é desencadeado após a perda de contato com o

axônio (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017). Células de Schwann Remak, por exemplo, ao modular sua morfologia para célula de reparo, podem chegar ao triplo de seu comprimento após quatro semanas de lesão. De modo similar, células de Schwann mielinizantes chegam ao dobro de seu tamanho quando adquirem o fenótipo de reparo. Na maioria das vezes, o fenótipo de reparo forma ramificações ao longo do eixo da célula. Este processo auxilia o crescimento axonal na orientação correta, com vistas a obter uma regeneração efetiva ao nervo lesionado (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017; JESSEN e MIRSKY, 2019a). Após a degeneração e a remoção da mielina e resíduos celulares ocasionados pela lesão, o microambiente nervoso está apto ao processo de regeneração. Neste sentido, a célula de Schwann de reparo é capaz de modular uma cascata de sinalização promovendo alterações na expressão gênica, onde a mesma é capaz de modular seu fenótipo para um fenótipo de célula de Schwann adulta mielinizante (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2017). Este dado consolida ainda a notável habilidade de remodelamento apresentada pela CS, que pode entrar num processo de encurtamento celular de até sete vezes; as CS em modo de reparo são bastante alongadas, e os axônios regenerados apresentam um padrão morfológico de nodos de Ranvier mais próximos, onde a mielina internodo é mais curta (Figura 14) (JESSEN e MIRSKY, 2015; ARTHUR-FARRAJ *et al.*, 2012). A morfologia das células de Schwann de reparo de origem mielinizante ou não mielinizante é bastante similar. A plasticidade e capacidade de adaptação ao estímulo ao qual o nervo é exposto é uma característica singular das células de Schwann, para a manutenção do sistema nervoso periférico como um todo.

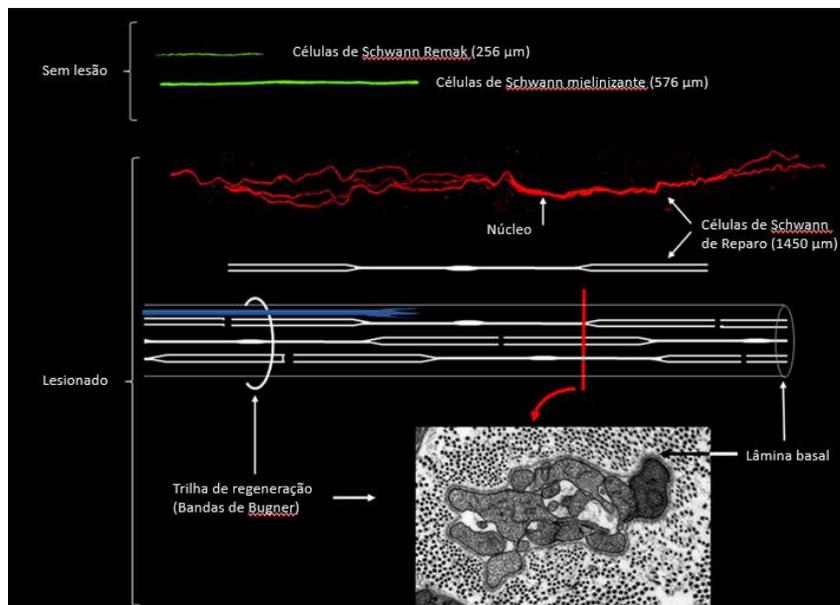


Figura 14 – Células de Schwann mielinizantes, não-mielinizantes (Remak) e em modo de reparo (Bugner) *in vivo*.

A imunofluorescência ilustra em verde, as células de Schwann mielinizantes e não-mielinizantes, em nervo não lesionado. Em vermelho, uma célula de Schwann de reparo após 4 semanas de lesão. Em azul, a organização da célula de reparo para formação de trilhas de regeneração (bandas de Bungner), cercada por lâmina basal. Fonte: Adaptado de GOMEZ-SANCHEZ (2017) e JESSEN e MIRSKY (2019a).

Em algumas circunstâncias crônicas, o processo de regeneração não é eficiente; nestes casos, ocorre a destruição do nervo, abalando o processo de desencadeamento do potencial de ação, levando a uma condição denominada neuropatia periférica.

1.5 A neuropatia da Hanseníase

Estima-se que a prevalência das neuropatias periféricas na população em geral seja de 2,4%, e em adultos com mais de 55 anos, possa atingir até 8% da população em geral (IASP, 2017). Doenças metabólicas como o *Diabetes mellitus* e doenças infecciosas como a Hanseníase são as principais causas dessa comorbidade, juntamente com distúrbios genéticos, doenças autoimunes e processos traumáticos (NINDS, 2014; IASP, 2017).

A Hanseníase é a principal doença infecciosa causadora de neuropatia periférica no mundo. O alto grau de morbidade e de incapacidade física se deve ao grave acometimento do nervo infectado, que resulta em uma irreversível perda da função motora e sensitiva periférica, acarretando sérios prejuízos à qualidade de vida do paciente (RAMBUKKANA *et al.*, 2002; JARDIM *et al.*, 2003; ANTUNES *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2018). A Hanseníase apresenta múltiplas e variáveis manifestação sintomatológica que, de certo modo, estão relacionadas com a resposta imune celular que cada indivíduo elabora contra *M. leprae*. Devido a essa gama diversificada de sinais e sintomas, existe um espectro de classificação das formas clínicas da Hanseníase. O correto diagnóstico da forma clínica é fundamental para o manejo adequado do tratamento ao paciente (WHO, 2016; BRASIL, 2010).

Em 1966, RIDLEY e JOPLING postularam uma classificação para a Hanseníase, baseada nos sinais e sintomas e nas características imunológicas e histopatológicas apresentadas pelos pacientes. Esta classificação apresenta dois extremos: o paciente com baixa carga bacilar – tuberculóide (TT) e o paciente com alta carga bacilar – lepromatoso (LL), além de classificações intermediárias: borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB) e borderline lepromatoso (BL) (RIDLEY e JOPLING, 1966). Os pacientes TT apresenta resposta imune celular (Th1) bastante efetiva, o que resulta num combate ao patógeno que leva à apenas uma lesão com baixa carga bacilar. No sítio da lesão, há uma considerável expressão de interleucina 12 (IL-12) e interferon-gamma (IFN- γ) Sua imunidade humoral, no entanto, é pouco pronunciada, e o indivíduo apresenta poucos anticorpos específicos para *M. leprae* (PARK *et al.*, 2016). Os pacientes do polo oposto, LL, apresentam a modulação da resposta imune celular (Th2) e humoral oposta ao TT. Neste paciente, a resposta imune humoral é bastante efetiva, com alta quantidade de anticorpos específicos (PARK *et al.*, 2016). É possível observar aumento de citocinas anti-inflamatórias no sítio da lesão, como Interleucina-4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10). No entanto, a imunidade celular é muito pouco elaborada, o que resulta num paciente com alta carga bacilar e múltiplas lesões de pele (WHO, 2010). Por esta dificuldade no controle da carga bacilar, esta forma clínica é a mais contagiosa (JOPLING e MC DOUGALL, 1988). Nas formas clínicas borderline – BB, BL ou BT a resposta imune celular será maior de acordo com a proximidade ao polo tuberculóide (PARK *et al.*, 2016).

Em 1982, a OMS desenvolveu um novo sistema de classificação da Hanseníase, baseado no número de lesões e na intensidade da carga bacilar (WHO,

2016). Neste sistema, classificam-se como paucibacilares (PB) os indivíduos com até cinco lesões de pele e índice baciloscópico nulo, enquanto classificam-se como multibacilares (MB) indivíduos com seis ou mais lesões de pele e baciloscopia positiva (BRASIL, 2010).

1.5.1 Episódios reacionais

A resposta imunológica do paciente contribui em muito no curso da doença, mesmo que durante ou após o tratamento. Neste sentido, é importante ressaltar alguns quadros inflamatórios, sistêmicos e agudos, resultantes de mudanças no balanço imunológico do hospedeiro em relação ao patógeno: os episódios reacionais (ANDRADE *et al.*, 2016). Tais episódios são divididos em duas categorias: A reação de tipo 1 é caracterizada por uma reação de hipersensibilidade tardia devido à uma alteração súbita na imunidade celular (BRITTON, 1993), em decorrência da presença de antígenos hansenianos. Esta reação também é conhecida como reação reversa (RR); isso se deve ao fato de que a resposta imune aparenta estar diminuindo, entretanto, em seguida, reverte o quadro e se torna muito mais intensa. Durante esse percurso observa-se um aumento do infiltrado de linfócitos T CD4+ nas lesões focais de nervo e o aumento da resposta celular, gerando a hipersensibilidade tardia, onde ocorre mudança no perfil da resposta Th2 para Th1, apresentando notório aumento da produção de IFN- γ (COOPER *et al.*, 1989). Esse quadro pode surgir na fase inicial da doença, durante o tratamento com a poliquimioterapia (PQT), ou até mesmo anos após o término do tratamento (ROSE, 1991). A fase inicial do tratamento com a PQT está correlacionada ao aparecimento da reação reversa; isso se deve ao fato, possivelmente, devido ao rápido extermínio do bacilo, que permite que o sistema imune se recupere. Desta forma, neste tipo de reação, desenvolve-se um forte quadro inflamatório, que afeta principalmente pele e nervos (Figura 15) (SCOLLARD *et al.*, 2012).



Figura 15 – Episódio reacional tipo 1 (Reação Reversa). Lesões com borda definida, caracterizadas por rubor e calor.

Fonte: Instituto Lauro Souza Lima. SVS, DVDT, Ministério da Saúde (2017).

Já a reação de tipo 2, denominada Eritema Nodoso Hansênico (ENH), ocorre predominantemente em pacientes multibacilares lepromatosos (Figura 16). Esta reação ocorre em cerca de 50% dos pacientes LL, que podem desenvolver lesões eritematosas, pápulas inflamatórias além de sintomatologia sistêmica em casos graves como febre alta, ulceração, edema e inflamação nos nervos sensitivos, caracterizando um processo denominado neurite. A neurite pode ter sérias consequências, incluindo a lesão irreversível do nervo, perda de função e incapacidade física. A histopatologia dos nódulos inflamatórios ressalta a presença de infiltrado de neutrófilos e células mononucleadas (HASLETT *et al.*, 2005).



Figura 16 – Episódio reacional tipo 2 (Eritema Nodoso Hansênico). Nódulos e pápulas dolorosas.

Fonte: Instituto Lauro Souza Lima. SVS, DVDT, Ministério da Saúde (2017).

A intensidade inflamatória dos episódios reacionais tem como consequência especialmente o comprometimento da função nervosa, que pode evoluir para uma disfunção permanente, desencadeando a neuropatia hanseniana (JARDIM *et al.*,

2003). Esses episódios agudos são a causa principal da disfunção neurológica que culmina na incapacidade física (JIH *et al.*, 2002). Observa-se frequentemente na literatura, um aumento da resposta de interleucinas IL-2, IL-12, TNF e IFN- γ , configurando um aumento da resposta celular no sítio da lesão, que pode desencadear o quadro de neurite hanseniana (JIH *et al.*, 2002). As reações comumente estão presentes no momento do diagnóstico, em torno de 20% dos novos casos no Brasil apresentam algum tipo de reação. O acompanhamento da avaliação da função neurológica é fundamental no contexto da RR. Isso se dá devido à possibilidade de neurite silenciosa (BRASIL, 2017). A neurite silenciosa pode levar a destruição do nervo sem sinais aparentes, como a ausência de dor, por exemplo. Muitos estudos têm sido realizados para identificar biomarcadores que predispõe a reação de tipo 1, entretanto, não há resultados concretos. A lesão neural pode ocorrer ao longo de todo espectro clínico; entretanto, existe ainda uma forma clínica da Hanseníase que não apresenta características cabíveis ao sistema Ridley e Jopling e tampouco ao sistema da OMS: a Hanseníase Neural Pura (NP) (Figura 17).

1.5.2 Classificação independente: Hanseníase neural pura

Nesta forma clínica, que posteriormente foi inserida na classificação de Madrid, ocorre o desenvolvimento exclusivamente de lesão de nervo, sem sinais de pele, que culminam em neuropatia periférica do ramo nervoso acometido, resultando em disfunção sensitiva, motora ou sensitivo-motora (JARDIM *et al.*, 2003). Dentre os principais sintomas da Hanseníase neural pura no que diz respeito ao comprometimento sensitivo, relata-se parestesia, hipoestesia ou anestesia tátil, térmica e dolorosa, dor neuropática no trajeto do nervo (JARDIM *et al.*, 2003). Dentre as formas de acometimento do bacilo, já se sabe que as células de Schwann não mielinizantes são o sítio de predileção da bactéria (EBENEZER e SCOLLARD, 2021). Tais células compõe especialmente as fibras aferentes sensitivas, uma vez que apresentam calibre mais fino. Este dado é corroborado pela sintomatologia inicial da neuropatia da Hanseníase, que é a perda da sensibilidade periférica; tal fenômeno em seguida evoluirá para o acometimento de fibras mielinizadas, podendo haver progressão também para as vias eferentes motoras (RAMBUKKANA *et al.*, 2004).

Uma vez que não há lesões cutâneas nesta forma clínica, o diagnóstico deve ser o mesmo para pacientes com neuropatia periférica, por avaliação morfofuncional

do ramo nervoso, por meio de testes quantitativos de sensibilidade, avaliação eletroneuromiográfica e biópsia de nervo (ANGST *et al.*, 2020). A seleção do nervo biopsiado será realizada a partir da avaliação eletroneurofisiológica, sob os critérios de alteração na amplitude do potencial de ação, diminuição da velocidade de condução ou ausência de resposta neural pós estímulo elétrico. Atualmente, o padrão ouro de identificação da Hanseníase neural pura é a realização da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) para identificação de material genético de *M. leprae* nos fragmentos de biópsia de nervo (BRASIL, 2020; JARDIM *et al.*, 2021). No entanto, esta é uma realidade dos centros de referência em Hanseníase, não fazendo parte da realidade da maior parte das unidades de saúde do Brasil (CASTRO, 2012).

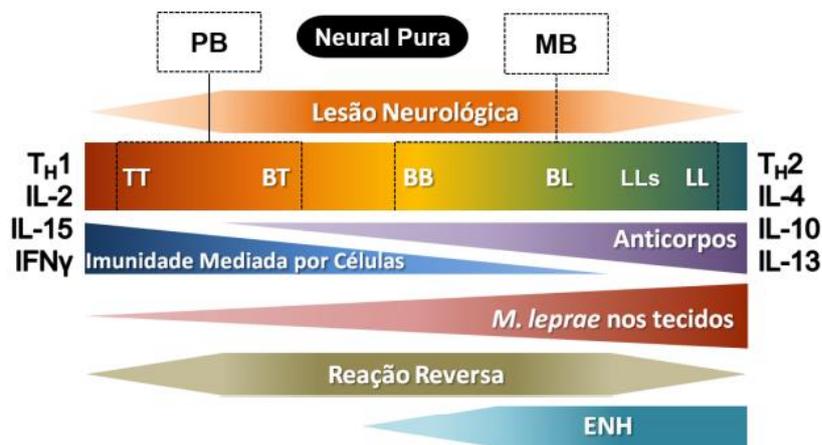


Figura 17 – Classificações vigentes para categorização das formas clínicas da Hanseníase.

O espectro da Hanseníase varia de acordo com a carga bacilar, resposta imune do hospedeiro, características histopatológicas e episódios reacionais. *TT: Tuberculoide-tuberculoide; *BT: Borderline-tuberculoide; *BB: Borderline-borderline; *BL: Borderline-lepromatoso; *LL: Lepromatoso-lepromatoso; *PB: Paucibacilar; *MB: Multibacilar; *ENH: Eritema Nodoso Hanseniano. Fonte: Adaptado de LOCKWOOD e SAUNDERSON, 2012.

1.6 O rearranjo metabólico

A desmielinização tem sido recorrentemente citada na literatura como o marco deflagratório do início da destruição das fibras periféricas, em células de Schwann mielinizantes infectadas com *M. leprae*, sendo anterior, inclusive, ao recrutamento inflamatório pela imunidade inata (SPIERINGS *et al.*, 2000; PINHEIRO *et al.*, 2018).

O impacto da desmielinização pode não resultar somente na indução do fenótipo de reparo, mas em mecanismos nutricionais para a célula hospedeira.

Nos últimos anos, o laboratório de Hanseníase, bem como diversos pesquisadores no mundo têm reportado diversas alterações desencadeadas em células de Schwann não mielinizantes infectadas; tais alterações favorecem a sobrevivência intracelular do bacilo, como por exemplo a indução do aumento de corpúsculos lipídicos (BARISCH e SOLDATI, 2017; ELAMIN, STEHR e SINGH, 2012; KAUR e KAUR, 2017; MATTOS *et al.*, 2011; MATTOS *et al.*, 2012), a modulação do metabolismo de glicose (MEDEIROS *et al.*, 2016), e a reprogramação celular (MASAKI *et al.*, 2013; PETITO *et al.*, 2013). De modo particular, o sucesso do estabelecimento da infecção por *M. leprae* se dá pela sua habilidade natural em induzir o fenômeno de desmielinização após entrar em contato com fibras nervosas mielinizadas (Figura 18) (RAMBUKKANA *et al.*, 2002; TAPINOS *et al.*, 2006).

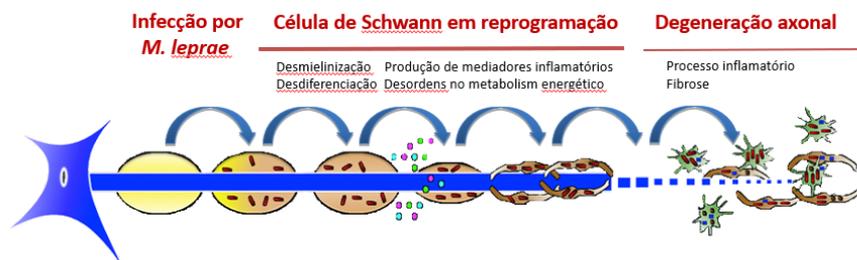


Figura 18 – O impacto de *M. leprae* na célula de Schwann.

A interação no *M. leprae* com seu sítio preferencial de infecção, a célula de Schwann, acarreta diversas modificações genéticas e funcionais, que por sua vez, culminam em um processo de perda da função do nervo e conseqüente fibrose do tecido. Adaptado de MIETTO *et al.*, 2015.

Entretanto, as alterações metabólicas decorrentes da quebra da mielina para a fisiologia da bactéria foram muito pouco exploradas. É importante dizer que, durante o processo da quebra de mielina, a maior parte dos lipídeos derivados da mielina formam os ovóides de mielina, que por seguinte são utilizados para a construção dos corpúsculos lipídicos, que serão reutilizados, posteriormente pelas células de Schwann, para a reconstrução da bainha de mielina. (BROSIUS-LUTZ *et al.*, 2017; GOODRUM *et al.*, 1994). Como conseqüência do decaimento massivo do número de

genes de *M. leprae* ao longo do curso dos anos, a estratégia de sobrevivência do bacilo envolve a capacidade de subversão do metabolismo da célula hospedeira para seu próprio benefício (ELAMIN *et al.*, 2012; KAUR e KAUR, 2017; MATTOS *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2016). A célula hospedeira infectada por *M. leprae*, apresenta uma característica morfológica que é a produção e acúmulo de corpúsculos lipídicos; tal evento tem sido associado à sobrevivência da mesma (Figura 19). O acúmulo de corpúsculos lipídicos já vem sendo descrita como uma característica patológica que ocorre em diversas outras infecções por bactérias intracelulares obrigatórias (BARISCH e SOLDATI, 2017).

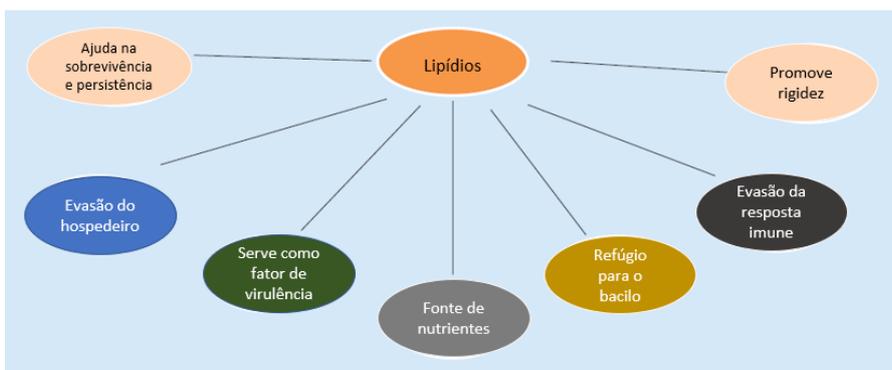


Figura 19 – Múltiplos papéis dos lipídeos na sobrevivência micobacteriana. Representação esquemática mostrando as diversas de atuação dos lipídeos desde fonte de nutrição, rigidez, evasão da resposta imune do hospedeiro, bem como servir como fatores de virulência. Adaptado de KAUR e KAUR, 2017.

1.6.1 O comportamento inflamatório da CS frente ao bacilo viável e morto

No curso da infecção pelo *M. leprae*, estudos anteriores do presente grupo ressaltaram alterações significativas de certas citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TELES *et al.*, 2007; PETITO *et al.*, 2013; MARQUES *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2016; de OLIVEIRA *et al.*, 2022). Dentre tais moléculas, o fator de necrose tumoral (TNF) é uma das citocinas produzidas pela célula de Schwann frente a infecção. Dos estudos mais recentes, demonstra-se que é papel da bactéria morta levar a este perfil de atividade inflamatória, onde ocorre uma forte indução de infiltrado macrófágico, resultando num processo inflamatório focal que gerará o dano no nervo (LIEFNER *et al.*, 2000). TELES e colaboradores (2007) observaram que, além da expressão aumentada de TNF, ocorre também o aumento da síntese dos receptores TNFR1 e TNFR2 em amostras de fragmentos de nervo de pacientes com a

Hanseníase NP. Tais dados foram posteriormente corroborados por outro estudo do presente grupo, onde ANDRADE e colaboradores (2016) demonstraram experimentalmente *in vitro* o aumento não somente na expressão gênica, mas da expressão proteica de TNF de membrana em células de Schwann; não somente, o grupo demonstrou que, na presença de TNF exógeno, as células de Schwann induziram o aumento da secreção solúvel das interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), já discriminadas anteriormente na literatura pelo seu papel na lesão axonal (ANDRADE *et al.*, 2016). O recrutamento de macrófagos para o sítio da lesão, bem como o aumento da resposta inflamatória também é intensificado pelo aumento da expressão de metaloproteases (MMPs), já descritas no envolvimento das células de Schwann infectadas, em especial no envolvimento secundário da resposta imune adaptativa, que contribui para a aceleração da destruição da bainha de mielina e da perda da integridade axonal (TELES *et al.*, 2007; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007). A Tabela 1 dispõe o histórico da literatura pertinente ao comportamento da célula de Schwann frente ao bacilo viável e morto, e seus efeitos na célula hospedeira (Tabela 1).

Tabela 1 – Mecanismos celulares e moleculares de interação do *M. leprae* viável e morto com nervo periférico.

| Modelo experimental | Viabilidade | Resultados | Referência |
|---|--|---|---------------------------------|
| Cocultura de CS e Gânglio da raiz dorsal de camundongos. | <i>M. leprae</i> morto | <i>M. leprae</i> induz rápida desmielinização por um mecanismo dependente de contato, na ausência de células imunes, num modelo de cultura de nervo <i>in vitro</i> de camundongos com depleção para <i>RAG1</i> . CS mielinizantes foram resistentes a invasão do <i>M. leprae</i> , mas entraram em desmielinização ao contato com a bactéria, enquanto CS não-mielinizantes apresentaram grande número de <i>M. leprae</i> intracelular. | Rambukkana <i>et al.</i> , 2002 |
| CS primária de rato | <i>M. leprae</i> viável | As CS mantiveram 56% de viabilidade a 33°C por 3 semanas. Apresentaram alterações morfológicas e expressaram moléculas de adesão, mas foram capazes de manter a interação celular. Coculturas de neurônio-CS, infectadas após mielinização, não apresentaram alterações morfológicas na arquitetura da mielina a 33°C por 30 dias, mantendo 53% de viabilidade do <i>M. leprae</i> . | Hagge <i>et al.</i> , 2002 |
| Linhagem de CS humanas ST88-14 e CS primária humana | Lipopetídeo 19-kDa do <i>M. leprae</i> | TLR2 foi expresso em níveis moderados em comparação ao MHC-I, mas em maiores níveis para o MHC-II. A lipoproteína 10-kDa do <i>M. leprae</i> inicia apoptose e induz inflamação. A presença de células apoptóticas aumenta na presença de TLR2 e da lipoproteína 19-kDa do <i>M. leprae</i> . | Oliveira <i>et al.</i> , 2003 |
| Linhagem de CS humana ST8814 | <i>M. leprae</i> morto | Presença de receptores de TNF e TGF na membrana nas CS. A combinação de TNF α /TGF- β 1 bem como a infecção por <i>M. leprae</i> desencadeou o aumento na taxa de apoptose nas culturas de CS. Além disso, RT-qPCR mostrou que o <i>M. leprae</i> aumentou a expressão dessas citocinas e seus receptores nas CS. | Oliveira <i>et al.</i> , 2005 |
| CS primárias e cocultura de SC mielinizante-neurônio. | <i>M. leprae</i> morto | O <i>M. leprae</i> se liga e ativa diretamente a proteína de ancoragem ErbB2, induz a cascata de sinalização Erk1/2 e em seguida induz a desmielinização. | Tapinos <i>et al.</i> , 2006 |
| Linhagem de CS humana ST8814 e biópsias de nervo (<i>ex vivo</i>) | <i>M. leprae</i> morto | <i>M. leprae</i> e TNF induzem o aumento de MMP-2 e MMP-9 além de aumentar a secreção dessas enzimas em culturas de ST88-14. Os efeitos do TNF e do <i>M. leprae</i> foram sinérgicos. Nervos com | Oliveira <i>et al.</i> , 2010 |

| | | | |
|-------------------------------|---|---|-------------------------------|
| | | infiltrado inflamatório e fibrose apresentaram maior síntese de RNAm para TNF, MMP-2 e MMP-9 em comparação ao controle. Biópsias de pacientes sem alterações inflamatórias também demonstraram aumento de MMP-2 e MMP-9. Biópsias com infiltrado endoneural e granulomas epitelioides apresentaram maior expressão gênica para MMP-2 e MMP-9. | |
| Linhagem de CS humana ST88-14 | <i>M. leprae</i> morto | CS se transdiferenciam em miofibroblastos produtores de matriz extracelular sob estímulo de TGFβ-1, por mecanismo desencadeado pelo <i>M. leprae</i> . | Petito <i>et al.</i> , 2013 |
| CS primárias de camundongo | <i>M. leprae</i> viável e <i>M. leprae</i> morto | O <i>M. leprae</i> sequestra a capacidade de reprogramação de CS adultas para o estágio de células tronco progenitoras pela diminuição da expressão de genes de diferenciação de CS e pelo aumento da expressão de genes do desenvolvimento embrionário. A reprogramação leva ao aumento do potencial migratório e imunomodulatório das células infectadas. | Masaki <i>et al.</i> , 2013 |
| CS primárias de camundongo | <i>M. leprae</i> viável | A indução da reprogramação de CS adultas em células pSLC induzem muitos genes relacionados a resposta imune, em especial de imunidade inata e genes associados a quimiocinas, desde os primeiros momentos da infecção na CS, atingindo seu máximo quando a célula se desdiferencia totalmente. | Masaki <i>et al.</i> , 2014 |
| Biópsia de nervo humana | <i>M. leprae</i> morto | <i>M. leprae</i> é capaz de contribuir para uma resposta mediada por TNF induzindo a produção de TNF de membrana e aumentando os receptores TNFR1, tornando as CS mais sensíveis aos níveis de TNF exógenos do nervo, que advém de macrófagos residentes nos estágios iniciais da lesão e num segundo momento, de células inflamatórias. | Andrade <i>et al.</i> , 2016 |
| Linhagem de CS humana ST88-14 | <i>M. leprae</i> viável | A infecção por <i>M. leprae</i> foi capaz de modular o metabolismo de glicose da CS, gerando um aumento marcante na captação de glicose. Adicionalmente, a infecção por <i>M. leprae</i> reduziu o potencial de membrana mitocondrial e a liberação de lactato pelas CS, resultando no controle de radicais livres. | Medeiros <i>et al.</i> , 2016 |
| Modelo de peixe-zebra | <i>M. leprae</i> viável e <i>M. marinum</i> expressando PGL-1 | A aproximação de macrófagos infectados ao axônio induz a desmielinização. O PGL-1 é o responsável pela resposta neurotóxica pela indução de ROS e RNS, causando dano mitocondrial que leva a desmielinização. | Madigan <i>et al.</i> , 2017b |

| | | | |
|------------------------------------|-------------------------|--|----------------------------------|
| CS primária humana e de camundongo | <i>M. leprae</i> morto | Diminuição da expressão de neurotrofinas como NT-4, NGF e BDNF em CS humanas estimuladas com <i>M. leprae</i> , enquanto observou-se aumento da expressão de NT-3 em camundongos estimulados com <i>M. leprae</i> . Essas alterações podem levar a lesão neural. | Nogueira <i>et al.</i> , 2018 |
| Linhagem de CS humana ST88-14 | <i>M. leprae</i> viável | PGL-1 induziu a expressão de MR/CD206 e PPAR- γ em CS infectadas. Tais moléculas podem auxiliar no reconhecimento, invasão e sobrevivência do bacilo. Essa sinalização também induz o acúmulo de corpúsculos lipídicos nas CS. | Dias Acosta <i>et al.</i> , 2018 |
| Linhagem de CS humana ST88-14 | <i>M. leprae</i> viável | <i>M. leprae</i> utiliza o metabolismo de glicose do hospedeiro como fonte de carbono para biossintetizar a maioria de seus aminoácidos. A enzima fenolpiruvato carboxilase é necessária para a dieta intracelular do <i>M. leprae</i> . | Borah <i>et al.</i> , 2019 |
| CS primária de camundongo | <i>M. leprae</i> viável | <i>M. leprae</i> infecta a S e acelera a destruição da mielina pelo mecanismo de mielinfagia, que leva ao aumento de corpúsculos lipídicos, principais organelas de persistência da infecção nas CS | Mietto <i>et al.</i> , 2020 |

Fonte: Adaptado de DE OLIVEIRA *et al.*, 2022.

1.7 O Estado da arte

As células de Schwann – as principais células gliais do sistema nervoso periférico – são o hospedeiro preferencial para a entrada, persistência e replicação do *M. leprae* dentro do nervo (SCOLLARD *et al.*, 2015; MIETTO *et al.*, 2016; SERRANO-COLL *et al.*, 2018; DIAZ ACOSTA *et al.*, 2018; de OLIVEIRA *et al.*, 2022). Portanto, muita atenção tem sido dada às alterações moleculares e celulares causadas pelo *M. leprae* nessas células, a fim de identificar as razões subjacentes que culminam na neuropatia grave observada nos pacientes. A resposta imune elicitada no microambiente nervoso contra os bacilos é um componente chave que pode levar às distintas manifestações clínicas (PINHEIRO *et al.*, 2018). As células de Schwann infectadas produzem um amplo painel de quimiocinas e citocinas inflamatórias, que, acompanhadas de resposta imune celular, têm sido associadas à manifestação de dor neuropática e a neurite hanseniana em pacientes (SPIERINGS *et al.*, 2000a e 2000b; ANDRADE *et al.*, 2016; ANGST *et al.*, 2020). Este perfil de imunomodulação observado em células de Schwann infectadas é de grande importância, e observou-se na literatura que tal fenômeno ocorre antes da reprogramação das células de Schwann para o fenótipo de célula de Schwann imatura, destacando o papel crucial

da rede de sinalização imune no contexto dos estágios iniciais da infecção por *M. leprae* (MASAKI *et al.*, 2014; HOOKI e GELUK, 2021). Além disso, a infecção por *M. leprae* nas células de Schwann tem sido associada a alterações na via metabólica de glicose/lactato (MEDEIROS *et al.*, 2016; BORAH *et al.*, 2019), acúmulo de lipídios/colesterol (MATTOS *et al.*, 2011; ROSA *et al.*, 2021), disfunção mitocondrial (OLIVEIRA *et al.*, 2021) e a destruição da bainha de mielina (MIETTO *et al.*, 2016; MADIGAN *et al.*, 2017; MIETTO *et al.*, 2020).

Algumas dessas alterações também foram confirmadas em pacientes com Hanseníase e são sugeridas como causadoras da neuropatia em curso e da fibrose tecidual observada, além da perda da função neurológica periférica comumente apresentada por esses pacientes (PETITO *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2016). No entanto, embora esses eventos possam surgir de modificações da função de suporte do nervo da CS, as alterações que acompanham o perfil de expressão gênica nessa célula hospedeira são amplamente desconhecidas. Estudos mostraram que o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), um dos principais componentes patogênicos da parede celular de *M. leprae*, é essencial para a internalização de *M. leprae* nas células de Schwann e tem sido amplamente atribuído à indução do processo patológico *in vitro* e em modelos infecciosos experimentais (NG *et al.*, 2000; MADIGAN *et al.*, 2017, DIAS ACOSTA *et al.*, 2018). A compreensão dos mecanismos imunopatogênicos relacionados à lesão nervosa em pacientes com Hanseníase é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle da neuropatia hanseniana. O tratamento de danos nos nervos com esteroides é eficaz, mas pelo menos 40% dos pacientes recaem e requerem um novo ciclo de esteroides (WALKER *et al.*, 2011; LOCKWOOD *et al.*, 2017).

Como a neuropatia da Hanseníase é uma doença complexa e ainda intrincada, na qual tanto *M. leprae* viável quanto o morto podem ter um papel prejudicial na progressão da doença, é necessário compreender e decifrar a contribuição de bactérias viáveis e mortas na alteração da biologia da célula de Schwann. Na literatura, sugere-se que bacilos mortos, ao contrário de *M. leprae* viáveis, tornam as células de Schwann suscetíveis ao ataque de células “natural killers” (STEINHOFF *et al.*, 1991). Além disso, bactérias mortas e seus componentes estruturais, como a LAM, também foram relatados como causadores de dano neural via modulação do fluxo autofágico (SILVA *et al.*, 2017) e do ataque de proteínas do sistema de complemento

no nervo (BAHIA EL IDRISSEI *et al.*, 2015). Apesar da imensurável importância das células de Schwann para a compreensão de diversos mecanismos relevantes a respeito da manutenção e do reparo do sistema nervoso periférico, ainda se encontram muitas dificuldades para o estabelecimento e obtenção de culturas primárias, que, por limitações amostrais e éticas, impõe a necessidade da utilização de outros métodos de estudo. Uma das metodologias mais utilizadas para o avanço na compreensão do metabolismo e fisiologia das células de Schwann é o estudo em linhagens celulares, especialmente da linhagem de células ST88-14, isolada de um tumor maligno de paciente portador de neurofibromatose I (YAN *et al.*, 1995). Tal linhagem é capaz de expressar proteínas endógenas clássicas como o marcador S-100 e é capaz de ser invadido por microrganismos como o *M. leprae*. Não obstante, vê-se como fundamental a busca de novas estratégias de infecção, como a utilização de modelo *in vivo*, tal qual demonstrado por MADIGAN (2017) em peixe-zebra, com vistas a compreender o impacto nos sistemas biológicos bem como a possibilidade de investigação dos efeitos da infecção em longo prazo.

1.8 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. 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. Uma grande limitação para os estudos na área deve-se ao fato da Hanseníase ser uma doença desmielinizante, no entanto, as linhagens celulares estudadas e, mesmo a célula primária humana não são mielinizantes, o que limita em muito os estudos. Assim, o uso de células murinas pode auxiliar na maior compreensão dos processos especificamente associados com a desmielinização. 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, prevenindo as incapacidades permanentes. Atualmente, os pacientes com neuropatia hanseniana 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, usando tanto células humanas não mielinizantes quanto células mielínicas murinas, podem auxiliar em futuras intervenções mais específicas e efetivas.

1.9 Hipótese

A hipótese da presente tese baseia-se na conjectura que o *M. leprae* modula a biologia da célula de Schwann, de modo a favorecer sua sobrevivência e instalação no nervo periférico. Estas alterações favoreceriam a atividade intracelular do patógeno, ao passo que levariam ao dano neural observado na neuropatia da Hanseníase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a capacidade do *M. leprae* em modular a expressão de genes associados à biologia da célula de Schwann em células da linhagem ST88-14, em células primárias de camundongo e em biópsias de nervo, bem como determinar os mecanismos imunopatogênicos associados com a desmielinização na Hanseníase.

2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Analisar o perfil de expressão de transcritos envolvidos na neuropatia periférica, na plasticidade de células gliais, no mecanismo de reparo neural e no perfil inflamatório em biópsias de nervos de pacientes com e sem Hanseníase e em células de Schwann da linhagem humana ST88-14 infectadas ou estimuladas com *M. leprae*;
- ❖ Analisar o perfil de expressão de mediadores inflamatórios secretados por células de Schwann infectadas ou estimuladas com *M. leprae*;
- ❖ Correlacionar os dados de expressão gênica aos achados histopatológicos de biópsias de NP e controle;
- ❖ Investigar o envolvimento de genes de autofagia na infecção de células de Schwann primárias mielinizantes de camundongo (CSPM);
- ❖ Investigar a correlação entre a indução de corpúsculos lipídicos pela infecção por *M. leprae* e a viabilidade bacteriana.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Parte 1: Modelo murino

O presente estudo foi realizado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/ FIOCRUZ) e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número de aprovação L-033-2015. Para a obtenção de células de Schwann primárias com mielina, foram utilizados camundongos BALB/c machos, com 21 dias de idade, conforme modelo adaptado de GOMES-SANCHEZ (2015). Inicialmente, os camundongos foram eutanasiados por CO₂. Após, os nervos isquiáticos (direito e esquerdo) foram dissecados e mantidos em meio L15 gelado. Em seguida, o epineuro foi cuidadosamente removido em ambiente estéril, com auxílio de uma lupa, e os nervos foram mantidos *in vitro*, por 48h, à 37°C/5%CO₂, para que ocorresse o processo de degeneração natural, em meio de cultura Eagle Dulbecco Modificado (DMEM F12), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos penicilina- estreptomicina (PEES) a 100 U/mL. Após esse período, os segmentos de nervo foram submetidos ao processo de degeneração enzimática utilizando 0,005% de Colagenase A (#C0130, Sigma-Aldrich®, Estados Unidos) e 1,2 U/mL de Dispase (#17105041, Gibco®, Estados Unidos) em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com antibióticos penicilina-estreptomicina (PEES) a 100 U/mL por 18h. No dia seguinte, foi realizada a dissociação mecânica, utilizando agulha de 26 G, e os fragmentos de nervo e células foram centrifugados a 500 g por 5 minutos. O pellet celular foi ressuscitado em meio completo (descrito anteriormente) e as células foram plaqueadas, em placas de cultura de 24 poços, previamente tratadas com 5 µg/mL de laminina (#23017015, Natural Laminin, ThermoFisher Scientific®, Estados Unidos) por 5 horas a 37°C/5% CO₂. Após, o sobrenadante foi descartado, deixando aderidas as células de Schwann primárias mielinizantes (CSPM), as quais foram lavadas 3x com tampão fosfato-salina (PBS) para remoção de debris celulares e um novo meio suplementado foi inserido. Em determinado grupo experimental, as CSPM foram tratadas com inibidor JNK (#SP600125, Enzo Life Sciences®, Estados Unidos) diluído em meio de cultura, numa concentração final de 40µM.

3.1.1 Purificação e infecção por *M. leprae*

A cepa Thai-53 de *M. leprae*, gentilmente doada pelo Instituto Lauro Souza Lima (São Paulo, Brasil), foi selecionada para o estudo, pois é a cepa mais prevalente em circulação no mundo. Apesar de não ser a cepa mais prevalente no Brasil, ela apresenta similaridade genética de 99,9% com as cepas 4N e 3I, predominantes no Brasil (MONOT *et al.*, 2009). Foi purificada do coxim plantar de patas de camundongos *nude* infectados, conforme descrito por MEDEIROS e colaboradores (2016). Para os experimentos de infecção *in vitro*, as CSPM foram incubadas com *M. leprae* em uma proporção de multiplicidade de infecção de 100 bactérias por célula (MOI 1:100). O experimento foi incubado de acordo com os parâmetros 33°C/5%/CO₂, para manutenção da atividade bacteriana. Após os pontos de 24h e 72h de infecção, as CSPM foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% e processadas para as técnicas de imunocitoquímica e reação em cadeia da polimerase em transcrição reversa quantitativa (RT-qPCR). Para a imunomarcação, foi realizada o experimento de infecção com *M. leprae* corado com a sonda fluorescente PKH67 "Green Fluorescent Cell Linker Kit" (Sigma #MKCF0773), de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.2 Imunofluorescência e Microscópio de fluorescência

Para a realização da imunomarcação, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS 0,1M por 15 minutos. Em seguida, as CSPM foram lavadas por 3 vezes em PBS e permeabilizadas numa solução de bloqueio contendo 0,03% de Triton 100X + *Normal Goat Serum* (NGS) a 5% + Albumina de Soro Bovino (BSA) em PBS por 1 hora. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio: anticorpo monoclonal de rato anti-MBP (1:300 Millipore, MAB386) e anticorpo policlonal de coelho anti- LC3 (1:100 Novus Biological, NB100-2220). As células foram lavadas por 3 vezes em PBS e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, em solução de bloqueio contendo o marcador fluorescente intercalante de DNA 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI) (1:500, Invitrogen®, Molecular Probes, Estados Unidos) juntamente aos anticorpos secundários cabra anti-rato 488 e cabra anti-coelho 594, ambos a proporção de diluição de 1:500 (Invitrogen®, Molecular Probes). As CSPM foram em seguida lavadas 2 vezes em PBS e 1 vez em água destilada. As laminulas foram montadas em seguida com o meio de montagem

Fluoromount (#00-4958-02, Sigma-Aldrich®). Os corpúsculos lipídicos foram corados com *Oil Red O* e observados em microscopia de fluorescência, enquanto os ovóides de mielina foram observados em campo claro. Ambas as quantificações foram feitas no software ImageJ® (NIH, Estados Unidos).

Todas as imagens foram realizadas no microscópio invertido Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss®, Alemanha), utilizando o sistema de iluminação estruturada *Apotome*, nas lentes de 40X e 60X com imersão em óleo. A fonte de luz HXP-120 foi utilizada para excitação das células imunomarcadas e as imagens foram adquiridas utilizando a câmera Zeiss HMRC, controlada pelo “software” AxionVision versão 4.8 (Carl Zeiss®, Alemanha).

3.1.3 RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase em transcrição reversa quantitativa

Após a infecção no tempo estabelecido, o RNA total das células das CSPM foi extraído e isolado utilizando o reagente Trizol® (ThermoFisher Scientific, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. A fita de DNA complementar (cDNA) foi transcrita a partir do RNA, por meio do kit SuperScript III First-Strand Synthesis (Invitrogen, #18080-400). O cDNA foi, portanto, amplificado utilizando a sonda SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Estados Unidos). Para as análises de RT-qPCR, foram utilizadas as sequências de pares de *primers* conforme a Tabela 2:

Tabela 2 – Sequências de pares de primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

| Gene | Sigla | Forward | Reverse |
|---|-------------|----------------------------|-----------------------------|
| Proteína Básica de Mielina | <i>MBP</i> | AATCGGCTCACAA GGGATTCA | TCCTCCCAGCTTAA AGATTTTGG |
| Proteína Zero de Mielina | <i>MPZ</i> | CGGACAGGGAAA TCTATGGTGC | TGGTAGCGCCAGG TAAAAGAG |
| Proteína 2 de resposta de crescimento precoce | <i>EGR2</i> | AGGCCCTTTGAC CAGATGA | AAGATGCCCGCAC TCACAAT |
| Beclina-1 | <i>BCN1</i> | GCCTGGGCTGTG GTAAGTAA | CCAGCCTCTGAAA CTGGACA |

| | | | |
|--|---------------|----------------------------|---------------------------|
| Proteína 2 de interação com fosfoinosítídeo do domínio de repetição WD | <i>Wipi-2</i> | GCTGTTGGTAGTA AGTCCGGG | GCTTTGAGGCTGA CAATGGC |
| Cinase-1 ativadora de autofagia tipo unc-51 | <i>ULK-1</i> | TGCGCATAGTGTG CAGGTAG | AACATCGTGGCGC TGTATGA |
| Lipase Hormônio Sensível | <i>HSL</i> | TCGGGGAGCACT ACAAACG | CACGCAACTCTGG GTCTATGG |
| Lipase de triacilglicerol de adipócito | <i>ATGL</i> | GGTGCCAACATTA TTGAGGTG | AAACACGAGTCAG GGAGATGC |
| Perilipina | <i>PLIN</i> | GTCCCTATCCGAT GCCCTGAAG | GCGTCCGCCTCTG CTGAAG |
| Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase | <i>GAPDH</i> | TGCACCACCAACT GCTTAG | GGATGCAGGGATG ATGTTC |

Além das CSPM, biópsias de nervo humanas também foram processadas para extração do RNA total e obtenção da fita de cDNA, para elaboração e análise do RT-qPCR. Foi utilizado o kit de PCR *array Human Autophagy* (Genone, #HATPL-I) e o kit de PCR *array Human Schwann Cell Biology* (ScienCell Research Laboratories®, #GK096). Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados em triplicata e corridos no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems®, Estados Unidos). Os resultados foram analisados pelo método $\Delta\Delta CT$ após normalização com o gene endógeno GAPDH.

A expressão gênica de *M. leprae* também foi avaliada por expressão gênica, por meio do protocolo previamente descrito por MARTINEZ (2009). As CSPM infectadas por *M. leprae*, tratadas ou não com JNKi, foram submetidas à extração de DNA e RNA bacteriano a partir do protocolo de extração utilizando Trizol®. O RNA total foi reversamente transcrito utilizando primers randômicos e o kit GoScript (Promega®, #A2801), de acordo com as instruções do fabricante. Níveis quantitativos de RNA ribossomal 16S foram determinados a partir da razão com o DNA ribossomal 16S, quantificado por meio do PCR em tempo real utilizando a sonda TaqMan.

3.1.4 Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado o “software” Prism (GraphPad®, Estados Unidos) versão 7.0, onde os gráficos foram gerados. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para os resultados do RT-qPCR, os dados foram avaliados estatisticamente pelo teste Mann-Whitney, enquanto para as análises de imunomarcação, foram avaliadas por meio do teste T. Para este trabalho, o nível de significância foi considerado 5%.

3.2 Parte 2

3.2.1 Avaliação da expressão gênica em fragmentos de nervo

Biópsias de nervo de oito pacientes com diagnóstico de Hanseníase neural pura (NP) foram obtidas de voluntários recrutados no Ambulatório Souza Araújo (Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz) (Tabela 3). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (número de parecer: 2.227.887). Fragmentos de biópsia de nervo dos pacientes foram utilizados para coloração histopatológica e análise de RT-qPCR. Para o presente estudo, foram selecionados pacientes com NP que não apresentavam qualquer sinal histopatológico de fibrose endoneural, para garantir que os espécimes nervosos selecionados estivessem nos estágios iniciais da progressão da neuropatia da Hanseníase. A seleção das amostras foi realizada após análise da coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e tricrômico de Gomori (TG) ao microscópio de campo claro, seguindo protocolo previamente publicado (ANTUNES *et al.* 2012). Os critérios de exclusão foram pacientes com coinfeção, comorbidades metabólicas como diabetes e sinais de fibrose endoneural, gestantes e pacientes menores de 18 anos. Para o grupo controle, espécimes de biópsia de nervo de três indivíduos submetidos à cirurgia do plexo braquial foram gentilmente doados pelo Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ).

Tabela 3 – Dados clínicos de pacientes com NP incluídos neste estudo (n=8).

*NP= Hanseníase Neural Pura; *RR= Reação Reversa

| Idade (anos) | Gênero | Forma Clínica da Hanseníase | Reação | PQT | Grau de Incapacidade física |
|--------------|----------|-----------------------------|--------------|-----|-----------------------------|
| 67 | feminino | NP | RR + Neurite | Não | 0 |

| | | | | | |
|----|-----------|----|-----------------|-----|---|
| 26 | masculino | NP | RR + Neurite | Não | 0 |
| 34 | feminino | NP | Não | Não | 0 |
| 48 | masculino | NP | RR + Neurite | Não | 0 |
| 47 | feminino | NP | RR | Não | 2 |
| 22 | masculino | NP | RR | Não | 2 |
| 22 | feminino | NP | Não | Não | 0 |
| 48 | feminino | NP | Não | Não | 0 |

3.2.2 Cultura de células de Schwann

A linhagem celular de Schwann humana, ST88-14, foi utilizada no presente estudo para os ensaios *in vitro*. Antes dos ensaios, as células foram cultivadas em meio RPMI (Gibco®, EUA) suplementado com 1% de penicilina, 1% de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em ambiente controlado a 37°C/5%CO₂. Para os ensaios, células ST88-14 foram suspensas em meio de cultura sem penicilina-estreptomicina e cultivadas a uma densidade de 5x10⁵ células/poço em placas de cultura de 6 poços. A cultura de células foi infectada com *M. leprae* viável, gentilmente doado pelo Instituto Lauro de Souza Lima (São Paulo, Brasil) ou estimulado com *M. leprae* morto (irradiado com raios gama), obtido através do BEI Resources® (#NR-19326), com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 50 bacilos/célula (50:1). Após 24h de incubação, os sobrenadantes foram colhidos e mantidos congelados a -20°C até a quantificação das quimiocinas e citocinas inflamatórias. Além disso, as culturas de células de Schwann foram submetidas a procedimentos de extração de RNA total.

3.2.3 Extração de RNA e matriz RT-qPCR

Culturas de células de Schwann e fragmentos de biópsia de nervo foram triturados mecanicamente e ressuspensos em 1 mL de TRIzol® (Gibco, Estados Unidos) e o RNA foi obtido seguindo as orientações do fabricante e armazenado a -70°C até o uso. Após, 10 ng de RNA total foram transcritos reversamente para cDNAs usando o kit Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e então amplificados usando o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®, EUA) ou *TaqMan probes* (ThermoScientific®, Estados Unidos). O kit GeneQuery™ *Human Schwann cell PCR Primer library array* (Realtime Primers®, EUA #GK096) foi usado para perfilar a expressão gênica total em células de Schwann e biópsias de nervos humanos. A lista completa de genes está disponível em <https://www.sciencellonline.com/genequerytm-human-Schwann-cell-biology-qpcr-array-kit.html> (acessado em 27 de janeiro de 2022). As sondas *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* e *Human TaqMan MGB-Probe* (ThermoScientific®), foram usados para determinar a expressão de RNAs de *TNF* (HS-99999043_m1), *IL23A* (HS-0037334324_m1), *CCL2* (HS-00234140_m1) e *CXCL10* (HS-0017042_m1). O *array* de RT-qPCR foi realizado em triplicata e as amplificações foram realizadas no sistema ViiA7 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). O método $\Delta\Delta CT$ (Livak e Schmittgen, 2001) foi usado para analisar os dados obtidos após normalização usando o controle endógeno do gene endógeno *RPL13*, para análise *SYBR Green*, ou normalizado usando o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*; HS -02758991_g1), para ensaios *TaqMan*.

3.2.4 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Para avaliação da secreção de citocinas/quimiocinas solúveis, os sobrenadantes de culturas ST88-14 de controles e culturas ST88-14 infectadas com *M. leprae* (viável ou morto) foram colhidos após 24h e armazenados a -20°C até o uso. Os seguintes mediadores inflamatórios (*TNF*, *TGF-β*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-12*, *IL-10*, *MCP-1/CCL2* e *IP-10/CXCL10*) foram quantificados pela técnica de ELISA seguindo as orientações do fabricante (R&D Systems®, EUA).

3.2.5 Análise estatística

As análises dos experimentos foram realizadas por Teste t não pareado, teste de Kruskal-Wallis ou ANOVA *one-way*. Para todas as análises estatísticas, o valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas com o software Prism versão 7.0 (GraphPad® Software, EUA). Alternativamente, um correlograma foi gerado para avaliar a correlação entre as características histopatológicas em biópsias de nervo e o seu padrão de expressão gênica. A correlação de Pearson foi aplicada a cada par de variáveis presentes nos dados. O valor da correlação varia entre -1 e 1, com valores negativos implicando a existência de correlação negativa e valores positivos implicando correlação positiva. A força da correlação é medida pela proximidade do valor a 1 ou -1, com valores mais próximos a estes sugerindo uma correlação mais forte. Cada regressão foi realizada usando a expressão gênica como variável de resposta e inicialmente tanto o PCR quanto os bacilos ácido-resistentes (BAAR) como covariáveis. Cada coeficiente teve sua significância estatística testada pelo teste t para coeficientes de regressão. Nos casos em que uma das variáveis não foi estatisticamente significativa, o modelo foi ajustado novamente utilizando apenas a covariável estatisticamente significativa. Por fim, a qualidade de ajuste do modelo foi avaliada usando R^2 , uma medida estatística que avalia o quanto da variação na variável de resposta é explicada pelas covariáveis.

4 RESULTADOS

4.1 Parte 1

4.1.1 A infecção por *M. leprae* acelera a quebra de mielina

Com o objetivo de investigar as consequências da quebra e degradação da mielina durante o curso da infecção por *M. leprae*, utilizou-se CSPM de nervo isquiático de camundongo como modelo experimental. Inicialmente, observamos uma taxa de 98% de infecção das CSPM pela bactéria após 3 dias de incubação *in vitro* (div) (Figura 20).

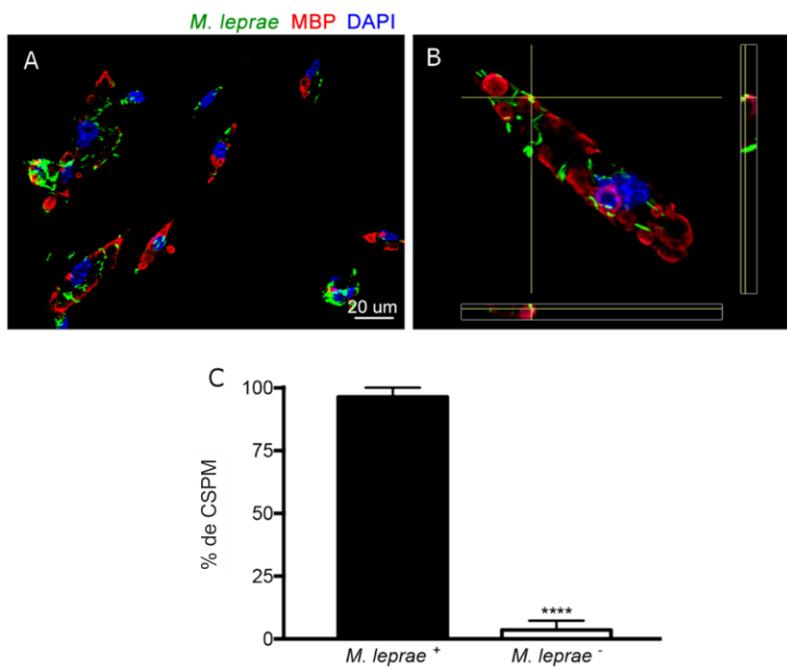


Figura 20 – Aumento da degradação da mielina em resposta à entrada do *M. leprae* nas células de Schwann primárias mielinizantes de camundongo.

CSPM de nervo isquiático de camundongo foram infectadas com *M. leprae* corado em verde por PKH (MOI 100:1, 3 div). (A, B) O bacilo invade com sucesso as CSPM e reside em estreita associação com a degradação de ovóides de mielina, conforme indicado nas seções ortogonais. Os ovóides podem ser observados devido à imunomarcagem com anticorpo anti Proteína Básica de Mielina (MBP), em vermelho, enquanto o núcleo das células de Schwann está marcado em azul, por DAPI. na Taxa de infecção expressa como média \pm Desvio Padrão de quatro experimentos independentes com pelo menos 80 células contadas por experimento. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$ **** $p < 0,0001$.

Além disso, foi constatado que as bactérias estavam localizadas em áreas citoplasmáticas ricas em ovóides de mielina (Figura 21A), resultando em uma colocalização de aproximadamente 80% (Figura 21B).

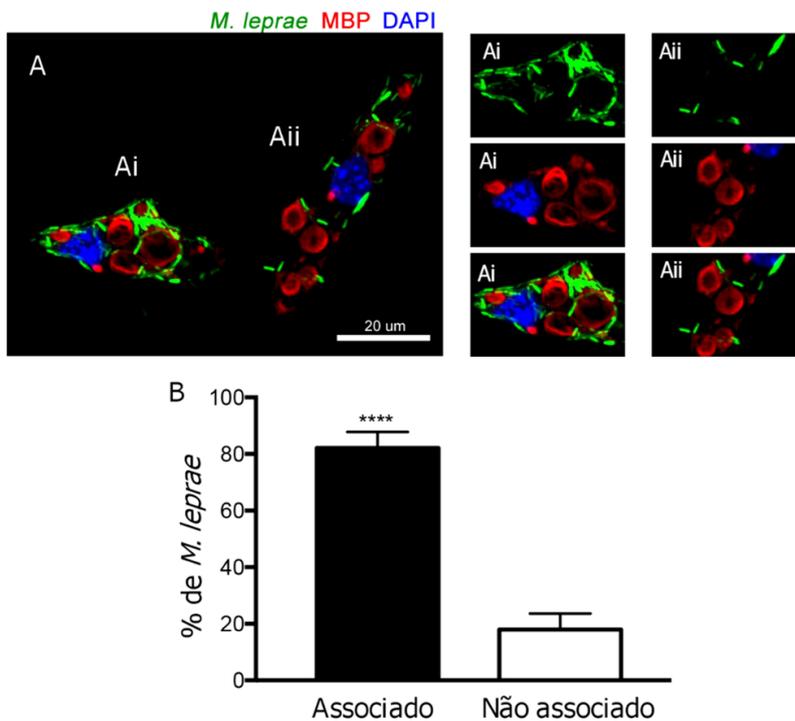


Figura 21 – Interação do *M. leprae* com ovóides de mielina em CSPM de camundongo infectadas representando a interação *M. leprae*-mielina.

CSPM de nervo isquiático de camundongo infectadas com *M. leprae* corado em verde por PKH (MOI 100:1, 3 div) interagindo com ovóides de mielina, marcado com anticorpo anti Proteína Básica de Mielina (MBP), em vermelho e núcleo das células de Schwann marcado por DAPI (em azul). Elucidação de duas células distintas (Ai e Aii), ilustrando o posicionamento da bactéria junto aos ovóides de mielina. (B) Porcentagem de bacilos associados aos ovóides por célula de Schwann. A taxa de interação foi expressa como média \pm Desvio Padrão de quatro experimentos independentes com 80 a 200 ovóides de mielina contados por cada experimento. A quantificação foi realizada utilizando o software ImageJ. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$.

Após observar a interação das bactérias em regiões de maior abundância de mielina, buscou-se compreender se a infecção por *M. leprae* poderia impactar o processo de destruição da mielina em CSPM. Para responder esse questionamento, a área de mielina foi mensurada e comparada entre CSPM infectadas e sem infecção (controle), num período de 0h, 1 dia *in vitro* (div) e 3 div (Figuras 22A, 22B e 22C). O resultado foi estratificado de acordo com a porcentagem de CSPM contendo pequenos ovóides (0-350 μm^2), médios ovóides (350-700 μm^2) e grandes ovóides ($> 700 \mu\text{m}^2$) em degeneração.

Observou-se que nas culturas de CSPM controle, no período de 1 div e 3 div, apresentou-se uma gradual redução de seu conteúdo de mielina de pequenos ovóides, médios ovóides e grandes ovóides, do seguinte modo, respectivamente: 36,2%, 40,9% e 22,3% (1 div) (Figura 22D) e 43,4%, 30,7% e 16,8% (3 div) (Figura 22E). Este dado reflete o processo natural de degeneração progressiva da mielina dentro das CSPM.

De modo interessante, após 1 div de infecção, as CSPM tiveram uma redução significativa da área de mielina dos grandes ovóides em 2,3 vezes, que refletiu em um aumento de 1,6 vezes na porcentagem de pequenos ovóides (Figura 22D). Além disso, no período de 3div de incubação, foi observada uma redução ainda maior de grandes ovóides, resultando num aumento de 6 vezes na porcentagem de células contendo ovóides médios, que culminou numa redução da área de mielina em 79% das CSPM (Figura 22E).

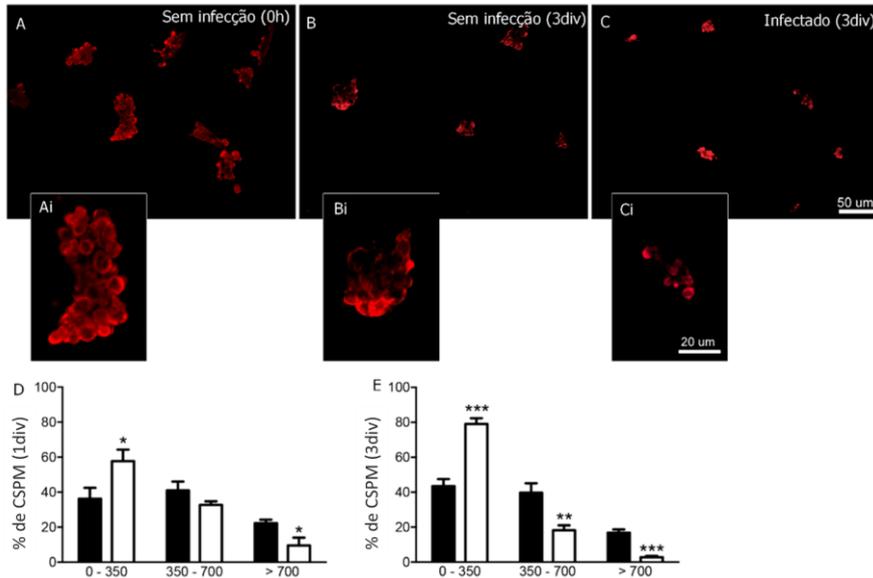


Figura 22 – Aumento da quebra de mielina em resposta a entrada do *M. leprae* nas CPM de camundongo.

Imunofluorescência da mielina nas culturas de CPM de camundongo mostrando o curso progressivo da degradação de mielina em células (A) –h – sem infecção; (B) 3 div sem infecção e (C) 3 div infectado e o conteúdo dos ovóides de mielina por célula em diferentes condições (Ai-Ci). (D) Quantificação da área dos ovóides de mielina por célula 1 div e (E) 3 div, estratificadas em pequenos ovóides (0-350 um), médios ovóides (350-700 um) e grandes ovóides (> 700um). As barras em preto representam as culturas não infectadas e as barras em branco, as culturas infectadas por *M. leprae* (MOI 100:1). Os gráficos foram representados por média \pm desvio padrão. A quantificação foi realizada por meio do software ImageJ. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Para confirmar o fenótipo de degradação da mielina observado por microscopia, analisou-se também o efeito da infecção ao nível transcricional. Para isto, foram avaliados os níveis de RNAm para dois genes que codificam duas proteínas de mielinização: MBP e MPZ. Também foi analisado o gene que codifica o fator transcricional KROX-20, que regula a mielinização na célula de Schwann. O resultado mostra que, concomitante com o aumento da degradação da mielina, também foi observada uma redução estatística nos níveis de RNAm para MBP, MPZ e KROX20 no grupo infectado por *M. leprae* em comparação com as CPM não infectadas (Figura 23), que é consistente com o efeito do *M. leprae* em induzir, desde

os estágios iniciais, a reprogramação de CSPM para um fenótipo não produtor de mielina.

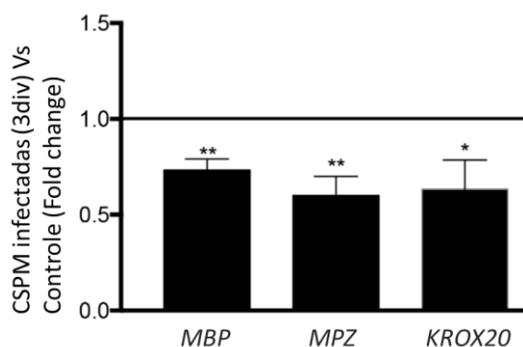


Figura 23 – *M. leprae* modula negativamente genes pró-mielinizantes em CSPM de camundongo.

Diminuição significativa na expressão de transcritos de mielina – *MBP*, *MPZ* e *KROX20* – *in vitro*, a partir da infecção por *M. leprae* (MOI 100:1, 3 div) de células de Schwann primárias de camundongo, avaliado por RT-qPCR. A linha horizontal representa os níveis de expressão gênica em células não infectadas (controles). Os resultados estão expressos em média ± Desvio Padrão. Experimento realizado em triplicata. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Para analisar ainda mais as alterações nos transcritos de mielina durante a infecção da Hanseníase, os mesmos genes foram investigados em fragmentos de nervo de pacientes com Hanseníase. Foi observado que, nessas amostras, houve uma regulação negativa de transcritos de RNAm de *MBP* e *MPZ*, quando comparados com pacientes controle (sadios (Figura 31). Coletivamente, esses dados mostram que *M. leprae* é capaz de entrar em CSPM e se agrupar em torno de ovóides de mielina e que, essa interação patógeno-hospedeiro resulta na aceleração da degradação da mielina que acompanhada pela regulação negativa em um conjunto de genes chave envolvidos na produção de mielina.

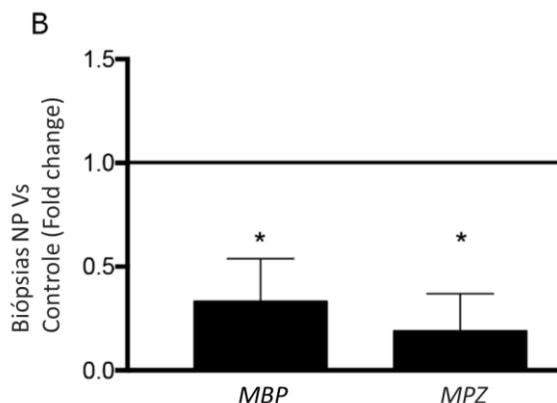


Figura 24 – *M. leprae* modula negativamente genes pró-mielinizantes em biópsias de nervo.

Diminuição significativa na expressão de transcritos de mielina – *MBP* e *MPZ* – *ex vivo*, a partir de fragmentos de biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase Neural Pura (NP) (n=8), avaliado por RT-qPCR. A linha horizontal representa os níveis de expressão gênica em biópsias controle (n=3). Os resultados estão expressos em média \pm Desvio Padrão. Experimento realizado em triplicata. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$.

4.1.2 *M. leprae* induz a degradação da mielina por autofagia e aumenta o número de corpúsculos lipídicos

Dados da literatura mostram que em CSPM, os ovóides de mielina são progressivamente degradados por um mecanismo de macroautofagia denominado mielinfagia (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015; JANG *et al.*, 2016). Portanto, nosso próximo passo foi estudar se a destruição avançada da mielina, observada nas CSPM infectadas, estaria relacionada com possíveis alterações na via de destruição autofágica. Para tanto, CSPM foram infectadas ou não com *M. leprae* e a relação entre a formação de ovóides de mielina e a autofagia foi avaliada através da análise do número de ovóides de mielina positivos para o marcador de autofagossomo LC3. Embora as CSPM não infectadas apresentem cerca de 26% de ovóides de LC3⁺ puncta-mielina, em células infectadas com *M. leprae*, observou-se um aumento significativo de até 82% (Figura 25).

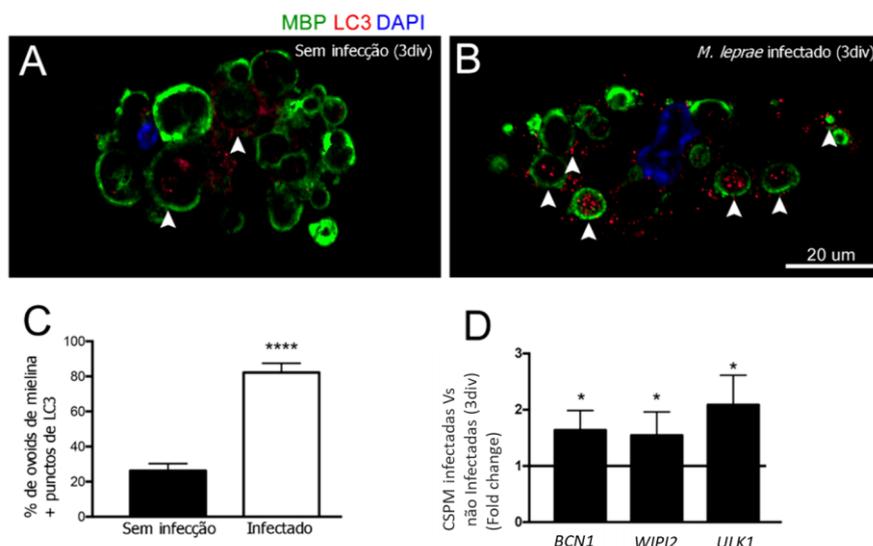


Figura 25 – *M. leprae* induz a destruição da mielina pelo mecanismo de mielinofagia.

Micrografias obtidas por microscopia de fluorescência, ilustrando o acúmulo de pontos de LC3, elucidado pela marcação com anticorpo anti-LC3 (em vermelho) em ovóides de mielina em degeneração, elucidado pela marcação com anticorpo anti-MBP (em verde, setas apontam para o MBP) em (A) CSPM não infectadas e (B) infectadas por *M. leprae* (MOI 100:1, 3 div). (C) gráfico mostrando o efeito da infecção na porcentagem de ovóides de mielina com pontos de LC3 expressos por média \pm Desvio Padrão de três experimentos independentes, com pelo menos 130 ovóides de mielina analisados por experimento. (D) Análise da expressão gênica em CSPM infectadas por *M. leprae*, avaliadas por RT-qPCR. A linha horizontal representa a expressão gênica em células não infectadas (controles) do efeito da infecção na expressão dos genes relacionados a formação do autofagossomo (*BCN1*, *WIPI2* e *ULK1*). O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$.

A análise expressão de genes envolvidos nos estágios iniciais da formação do autofagossomo *BCN1*, *WIPI2*, *ULK1* e *ATG7* mostra um aumento estatisticamente significativo em CSPM infectadas com *M. leprae* quando comparado a condição não infectada (Figura 25D). Resultados semelhantes foram observados em fragmentos de nervo de pacientes com Hanseníase em comparação com nervo de indivíduos saudáveis (Figura 26).

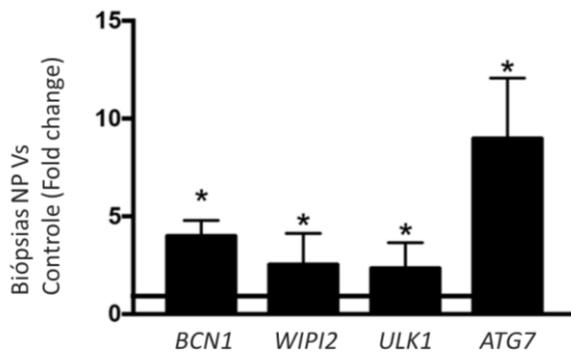


Figura 26 – Aumento da indução de autofagia em biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase

Aumento significativo na expressão de transcritos relacionados a formação do autofagossomo – *BCN1*, *WIPI2*, *ULK1* e *ATG7* – *ex vivo*, a partir de fragmentos de biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase NP (n=8), avaliados por RT-qPCR. A linha de base representa os níveis de expressão gênica em biópsias controle (n=3). Os resultados estão expressos em média \pm Desvio Padrão. Experimento realizado em triplicata. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$.

Sabe-se que a quebra da mielina pode resultar na formação corpúsculos lipídicos (BROSIUS-LUTZ *et al.*, 2017; GOODRUM *et al.*, 1994), e conhecendo a importância dos lipídios para as bactérias intracelulares (BARISCH & SOLDATI, 2017; ELAMIN *et al.*, 2012) e de modo especial, para o estabelecimento da infecção pelo *M. leprae* (MATTOS *et al.*, 2011a; MATTOS *et al.*, 2011b; MATTOS *et al.*, 2012; KAUR e KAUR, 2017; ROSA *et al.*, 2022), avaliou-se se a formação destas organelas lipídicas teria alguma relação com o tamanho dos ovóides de mielina em CSPM não infectadas e infectadas com *M. leprae* após 3 div, para isso, os corpúsculos lipídicos foram corados por *Oil Red O*, que marca lipídeos neutros, e tamanho dos ovóides de mielina foi avaliado lipídios neutros bem como o tamanho dos ovóides de mielina em CSPM não infectadas e infectadas com *M. leprae* após 3 div (Figura 27).

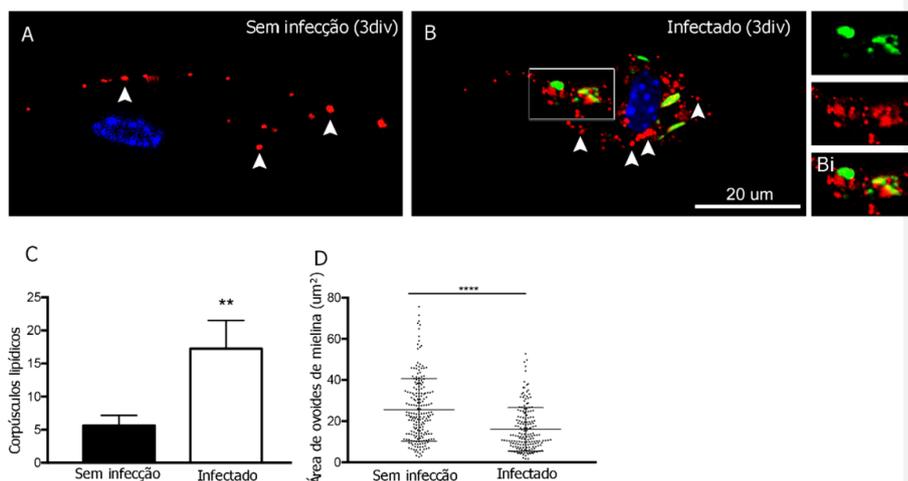


Figura 27 – *M. leprae* induz o aumento de corpúsculos lipídicos a partir da quebra de mielina em CSPM.

Coloração em *Oil Red O* (em vermelho) para marcação de corpúsculos lipídicos (setas brancas) em (A) CSPM não infectadas e (B) CSPM infectadas por *M. leprae* viável. Pode-se observar a associação do bacilo aos corpúsculos lipídicos (Bi). Esses dados estão corroborados através da quantificação dos corpúsculos lipídicos em ambas as condições (C). Os resultados estão expressos em média \pm Desvio Padrão de três experimentos independentes, com pelo menos 40 células por experimento. Foi também quantificada a área dos ovóides de mielina das CSPM infectadas e não infectadas, ilustrando a redução do tamanho dos ovóides (D). Tal resultado está expresso em média \pm Desvio Padrão de três experimentos independentes, com no mínimo 100 ovóides contabilizados por experimento. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Os resultados do experimento revelaram que, embora as CSPM não infectadas exibissem uma média de cerca de 5,6 corpúsculos lipídicos por célula, esse número aumentou estatisticamente três vezes mais no grupo infectado por *M. leprae*, atingindo uma média de cerca de 17 corpúsculos lipídicos por CSPM, observados por coloração *Oil Red O* (Figura 27C). Também foi observada uma redução estatística de cerca de 40% no tamanho dos ovóides de mielina em CSPM infectadas com *M. leprae* (Figura 27D), o que se correlaciona muito bem com a quebra avançada de mielina e corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção por *M. leprae*. De modo consistente, observou-se em CSPM infectadas, uma indução de 8,7 vezes na expressão de RNAm de perilipina – um gene (*PLIN*) que codifica uma proteína associada a corpúsculos lipídicos – observou-se também uma regulação negativa estatisticamente significativa

de 40% e 55% nos genes que codificam lipase de triglicerídeos adiposos (*ATGL*) e nos transcritos de lipase hormônio-sensível (*HSL*) (ambos relacionados à lipólise), respectivamente, quando comparados com os valores observados em células não infectadas (Figura 28).

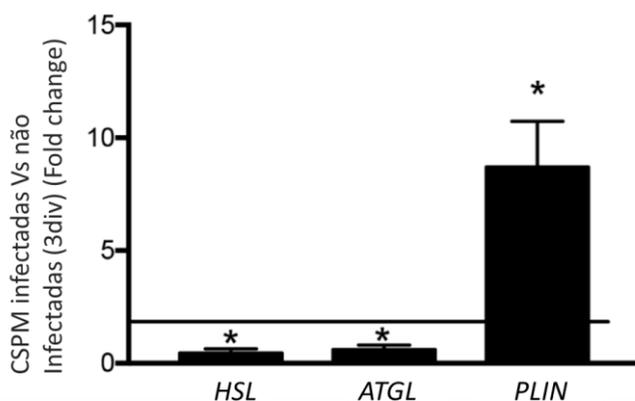


Figura 28 – *M. leprae* induz a expressão de transcritos para formação de corpúsculos lipídicos e para regulação negativa de lipases.

Diminuição significativa na expressão de transcritos relacionados a quebra de lipídios – *HSL* e *ATGL* – e aumento significativo do gene da perilipina – *PLIN* – responsável pela construção de corpúsculos lipídicos, em CSPM de camundongo infectadas (MOI 100:1, 3 div), avaliadas por RT-qPCR. A linha horizontal representa os níveis de expressão gênica em células não infectadas (controle). Os resultados estão expressos em média \pm Desvio Padrão. Experimento realizado em triplicata. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$.

Assim, esses resultados indicam um aumento na mielínofagia observada por uma regulação positiva de transcritos envolvidos na formação de autofagossomos levando ao aumento da formação de corpúsculos lipídicos como resposta à infecção por *M. leprae* em CSPM.

4.1.3 A degradação da mielina favorece a viabilidade de *M. leprae* dentro das células de Schwann

Levando em consideração que a degradação da mielina é um provável mecanismo benéfico para a persistência do *M. leprae* dentro da célula hospedeira, nosso próximo passo foi verificar se a prevenção da degradação da mielina reduziria a viabilidade da bactéria. Assim, a degeneração da mielina foi farmacologicamente

inibida, por meio do tratamento das culturas de CSPM com o inibidor JNK SP600125 (JNKi). Estudos *in vitro* já mostraram que este composto bloqueia a degradação da mielina em células de Schwann (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015). Como esperado, o tratamento com JNKi impediu a degradação de ovóides de mielina em células não infectadas e infectadas por *M. leprae* cultivadas por 3 div, mantendo seus valores de mielina semelhantes aos observados em CSPM não infectadas recém-plaqueadas em 0h (Figura 29).

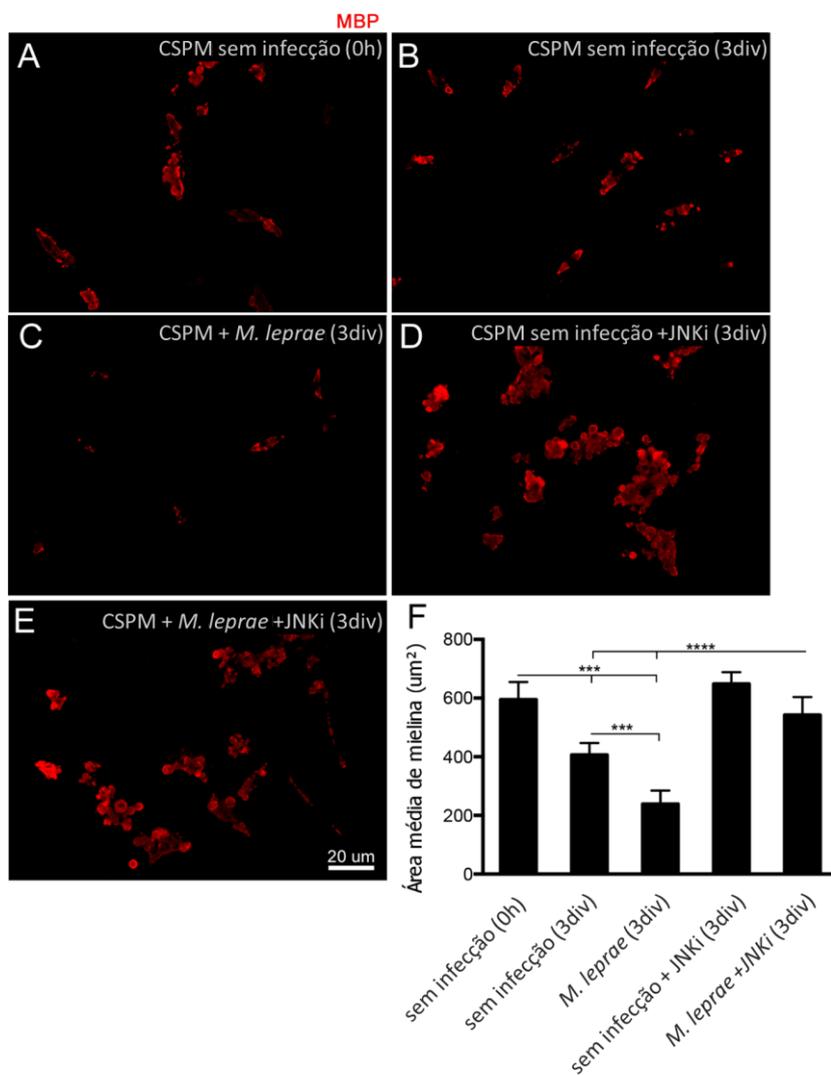


Figura 29 – A inibição farmacológica da degradação de mielina altera a fisiologia do *M. leprae*.

Imunomarcção de mielina a partir de anticorpo anti MBP (em vermelho) em CSPM de camundongo (A) sem infecção (0h de experimento); (B) sem infecção (3 div); (C) infectadas (3 div); (D) sem infecção, incubada com inibidor de JNK (3 div); (E) infectadas e incubadas com inibidor de JNK (3 div). (F) Quantificação da área média dos ovóides de mielina nos diferentes grupos de células estudados (eixo x). O *software* utilizado para quantificação foi o ImageJ. Os resultados estão expressos como média desvio padrão com pelo menos 200 células analisadas por experimento. Experimento realizado em triplicata. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $P < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Notavelmente, a inibição da quebra da mielina resultou na significativa redução de cerca de 3,3 vezes na quantidade de *M. leprae* intracelular, se comparado as células infectadas sem o inibidor (Figura 30).

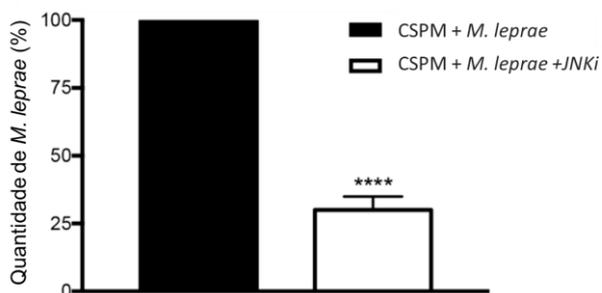


Figura 30 – A viabilidade bacteriana é afetada pela inibição farmacológica de JNK.

Quantificação da porcentagem de bactérias viáveis, em CSPM de camundongo (barra em preto) e nas células que foram incubadas com inibidor de JNK (JNKi) (barra em branco). O gráfico mostra que o bloqueio da degradação de mielina pela inibição da via JNK leva a diminuição da viabilidade bacteriana. A quantificação foi realizada pelo software ImageJ. Os resultados estão expressos em média \pm Desvio Padrão, de quatro experimentos diferentes. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

Esses resultados forneceram, pela primeira vez, evidências de que a degradação da mielina é um dos principais contribuintes para a persistência de *M. leprae* nas CSPM, sugerindo o papel central da degradação da mielina favorecendo a sobrevivência intracelular do patógeno da Hanseníase no nervo periférico de pacientes infectados.

4.2 Parte 2: modelo humano

4.2.1 Análise de expressão gênica em fragmentos de nervo de pacientes com neuropatia hanseniana

Com o objetivo de estudar a assinatura genética dos nervos de pacientes com neuropatia hanseniana, a presente tese investigou a expressão de diferentes genes envolvidos em múltiplos aspectos da neuropatia periférica, como a seguir: i) plasticidade e reprogramação das células de Schwann; ii) suporte neuronal e iii) neuropatia. Em relação aos genes relacionados à neuropatia, alguns alvos foram significativamente elevados em nervos de pacientes com NP, como *HLA-DRB1*, *APOB* e *WNK*, enquanto outros foram regulados negativamente, incluindo *HLA-DQB1* e *PLP1* (Figura 31). Curiosamente, *HLA-DRB1*, previamente descrito por influenciar a suscetibilidade à Hanseníase (da SILVA *et al.*, 2009), foi regulado positivamente 60 vezes mais em nervos hansenianos quando comparados a nervos não hansenianos. *APOB* e *WNK* também foram aumentados nos nervos de pacientes com NP 10 e 4 vezes mais, respectivamente (Figura 31).

Ao examinar o perfil de RNAm envolvido na desdiferenciação das células de Schwann, observamos que *JUN*, *GDNF* e *MAPK14* apresentaram aumento significativo, enquanto *ERBB2*, *GJA1*, *BDNF* e *MAPK3* foram significativamente diminuídos em nervos de pacientes com NP (Figura 31). Embora as neurotrofinas, como o BDNF, sejam necessárias para a regeneração do axônio, no presente estudo,

identificou-se que o *BDNF* foi regulado negativamente em pacientes com NP, o que está de acordo com um relato anterior que investigou a expressão desta neurotrofina na infecção por *M. leprae* (NOGUEIRA *et al.*, 2020).

Em resumo, a presente análise das assinaturas genéticas mostrou notavelmente que a maioria dos genes envolvidos na regeneração do nervo estava aumentada nas biópsias do nervo da Hanseníase, possivelmente sugerindo um equilíbrio contínuo da degeneração do nervo e uma tentativa de regredir o dano durante o curso da infecção *in vivo*.

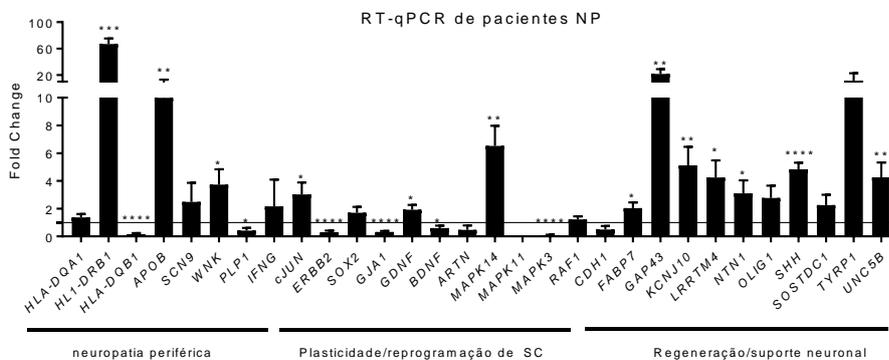


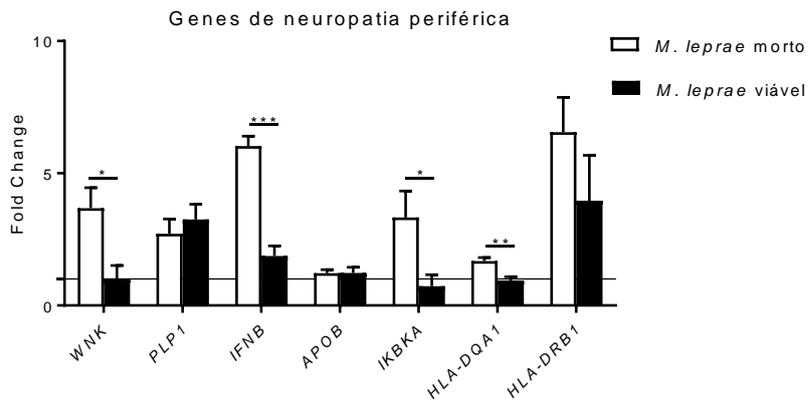
Figura 31 – Alteração na expressão gênica da biologia da célula de Schwann em pacientes com Hanseníase NP.

Análise do perfil de expressão gênica de transcritos de RNAm diferencialmente expressos, de vias de sinalização envolvidas com neuropatia periférica, regeneração, suporte neuronal, plasticidade e desdiferenciação da célula de Schwann. A análise foi realizada em biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase NP (n=8) (A- barras pretas) e em biópsias controle (n=3) (A- linha horizontal). Os resultados estão representados como média \pm Desvio padrão. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.2.2 Os genes funcionais das células de Schwann são modulados diferencialmente de acordo com a viabilidade do bacilo

O dano neural na Hanseníase tem sido associado ao papel desempenhado por bactérias viáveis e mortas após o contato com células de Schwann (MASAKI *et al.*,

2013; DIAZ ACOSTA *et al.*, 2018). Entretanto, pouco foi explorado como a viabilidade da bactéria, viável ou morta, poderia interferir no perfil genético da célula hospedeira infectada. Portanto, a próxima etapa deste estudo foi investigar possíveis diferenças na assinatura genética das células de Schwann humanas, após precoce exposição ao *M. leprae* viável e morto. Para tanto, células de Schwann da linhagem ST88-14 foram infectadas com *M. leprae* viável e estimuladas com *M. leprae* morto (MOI 50:1) e, após 1 div, o RNAm foi extraído para o procedimento de PCR *array*, também utilizado no experimento anterior. Conforme observado na Fig. 32B-D, o *M. leprae* morto aumentou a expressão de *WNK*, *IFNB*, *IKBKA* e *HLA-DQA1* (genes relacionados à neuropatia periférica), além de *GJA1* e *RAF1* (para reprogramação de células de Schwann) e *KCNJ10*, *OLIG1*, *SHH* e *SOSTDC1* (para regeneração neural). Curiosamente, *M. leprae* viável pareceu modular genes relacionados à plasticidade e desdiferenciação das células de Schwann como *BDNF*, *JUN*, *SOX10*, *ERBB2* e *MAPK11* (Figura 32D).



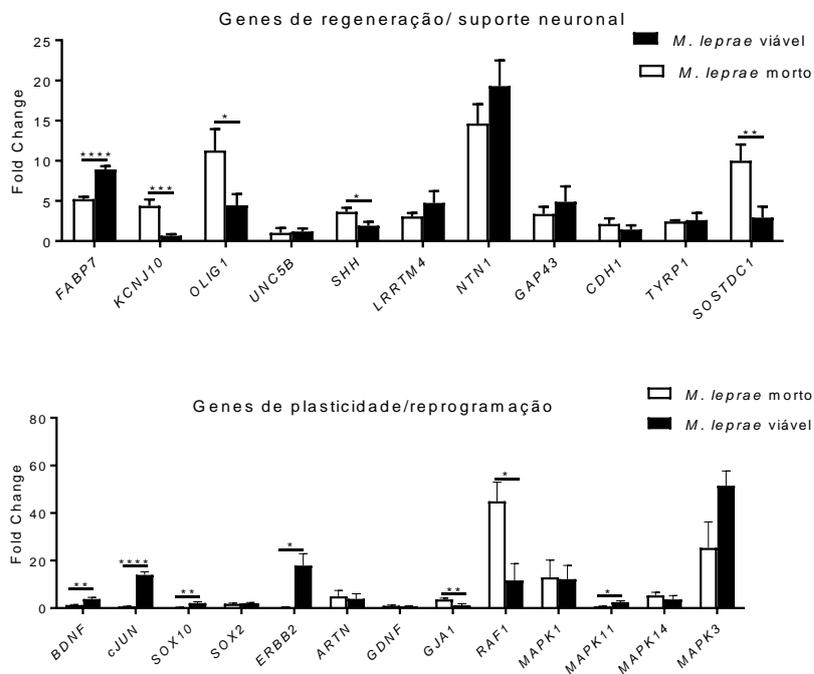


Figura 32 – Padrão de expressão gênica envolvidos na biologia da célula de Schwann.

Análise do perfil de expressão gênica de transcritos de RNAm diferencialmente expressos, de vias de sinalização envolvidas com neuropatia periférica, regeneração, suporte neuronal, plasticidade e dediferenciação da célula de Schwann. Também, em células de Schwann humanas ST88-14 infectadas com *M. leprae* morto (n=10) (barras brancas) ou com *M. leprae* viável (n=10) (barras pretas). Os resultados estão representados como média \pm Desvio padrão. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Em resumo, este primeiro conjunto de análises aponta para a ideia de que *M. leprae* morto induz maior expressão de genes relacionados à neuropatia periférica e genes de suporte à regeneração neural enquanto *M. leprae* viável atua modulando genes relacionados à plasticidade e dediferenciação das células de Schwann. Essa interseção de genes foi sintetizada em um diagrama de Venn (Figura 33).

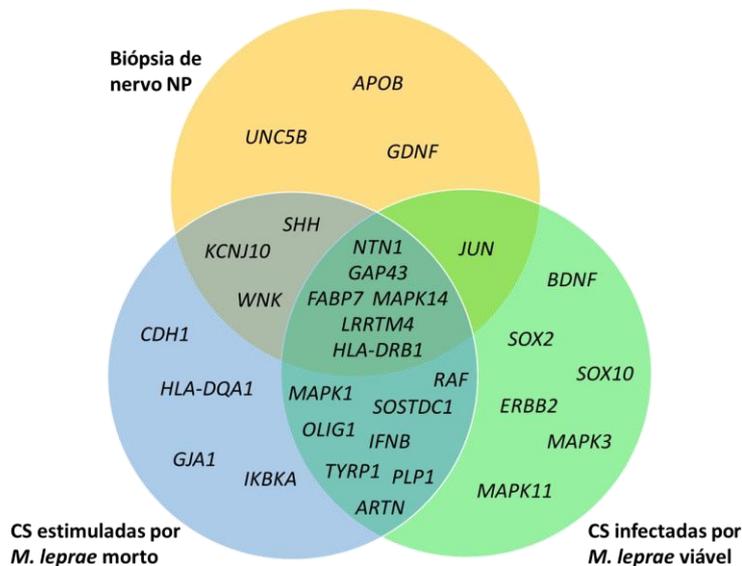


Figura 33 – Diagrama de Venn de genes da biologia da célula de Schwann diferencialmente mais expressos, relacionados a assinatura genética na Hanseníase.

O diagrama de Venn foi utilizado para identificar clusters de transcritos de RNAm sobrepostos e não sobrepostos, com aumento de expressão gênica nas biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase e em células de Schwann infectadas ou estimuladas com *M. leprae* viável e não viável (MOI 50:1, 1 div).

4.2.3 Análise de perfil inflamatório sugere que *M. leprae* morto e viável aumentam a expressão de CCL2

O objetivo seguinte foi analisar o perfil do microambiente inflamatório em biópsias de nervos de pacientes diagnosticados com Hanseníase e sadios (controles), bem como corroborar esta análise com dados *in vitro*, oriundos das células de Schwann desafiadas com bactérias viáveis e mortas. A análise das biópsias de nervo humano indicou que *IL23*, *TNF*, *CXCL10* e *CCL2* estavam aumentados em pacientes com NP quando comparados com biópsias de controle (Fig. 34a). Além disso, ao se analisar as alterações nas células de Schwann *in vitro*, foi observado que *M. leprae* morto induziu uma maior expressão de *TNF*, *CXCL10* e *IL6* nas células de Schwann quando comparadas com aquelas infectadas com bacilos viáveis (Fig. 34B). Ainda,

células infectadas com *M. leprae* viável aumentaram a expressão de *IL23* e *CCL2* quando comparadas com culturas não estimuladas.

Esses resultados reforçam a hipótese de que o bacilo morto provavelmente está envolvido na indução de um perfil pró-inflamatório, sugerindo que tais mediadores pró-inflamatórios sejam induzidos por bactérias mortas presentes no local da infecção.

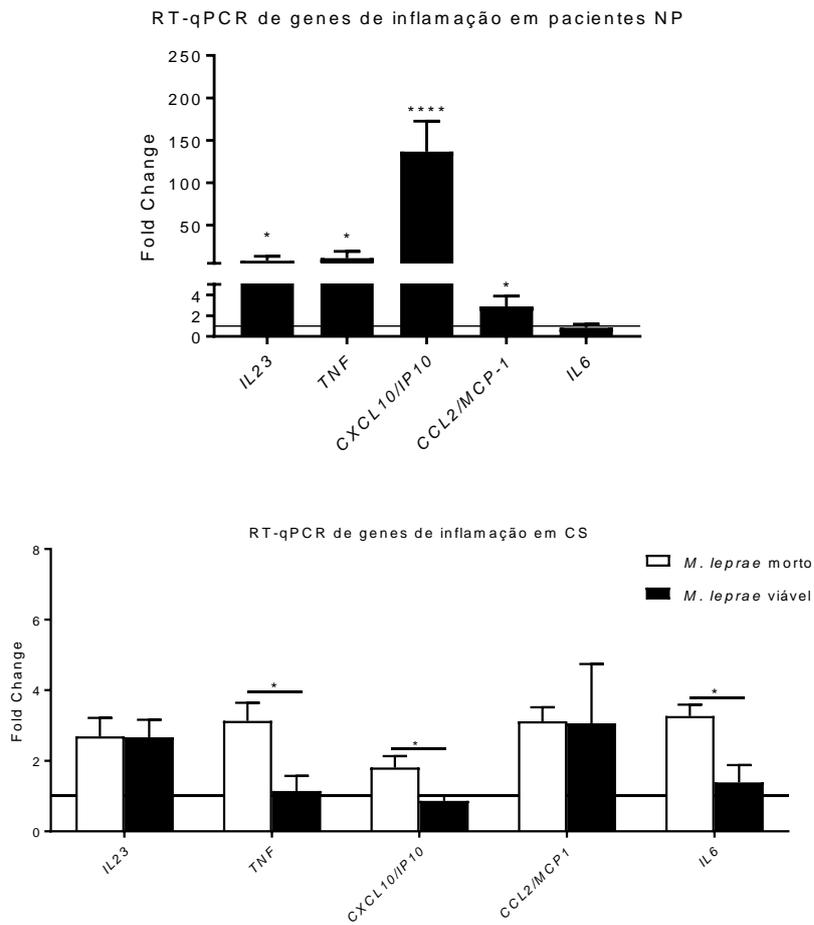


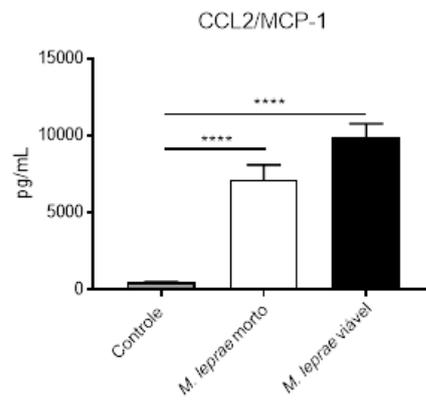
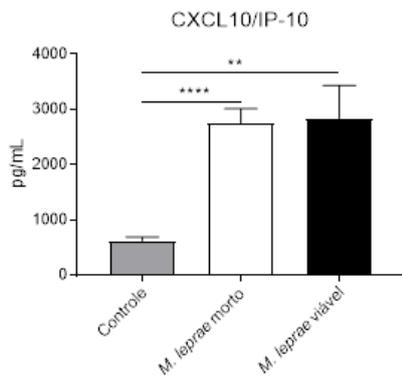
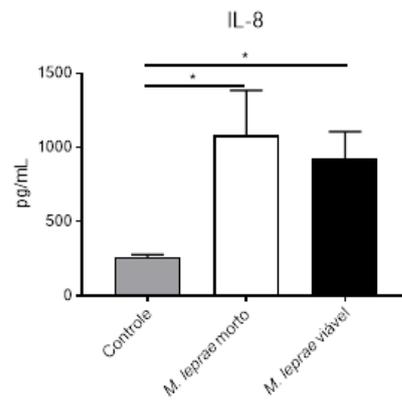
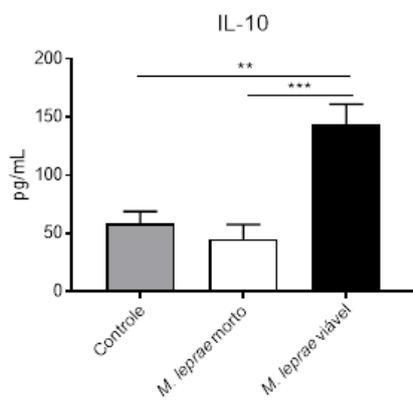
Figura 34 – Análise do perfil inflamatório na infecção por Hanseníase NP.

Análise por dos transcritos de RNAm de citocinas/quimiocinas por RT-qPCR em (A) biópsias de nervo de pacientes com Hanseníase NP (n=8) (barras pretas) em comparação a biópsias de nervo controle (n=3) (linha horizontal – Fold Change) e (B) em células de Schwann humanas ST88-14 estimuladas com *M. leprae* morto (n=10) (barras brancas) e infectadas com *M. leprae* viável (n=10) (barras pretas) (MOI 50:1 por 24h), em comparação a células ST88-14 não infectadas (n=10). Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão representados em média \pm Desvio padrão. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.2.4 *M. leprae* viáveis e mortos promovem uma resposta inflamatória distinta em células de Schwann

Para consolidar os achados relacionados à expressão gênica anteriormente apresentada, foram avaliadas a produção de citocinas em células de Schwann desafiadas com bacilos viáveis e mortos. Para isso, realizou-se a análise dos níveis de citocinas em sobrenadantes de 1 div, e identificou-se que *M. leprae* morto causou um aumento nos níveis de TNF, IL-8, MCP-1/CCL-2 e CXCL-10 em comparação com culturas de controle (não estimuladas) (Figura 35). Por outro lado, a infecção por *M. leprae* viável levou ao aumento de TGF- β , IL-8, IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2 e CXCL-10 em comparação com controles não estimulados. Também se observou uma redução estatística nos níveis de TNF após infecção por *M. leprae* quando comparados a culturas estimuladas com o bacilo morto e com o grupo controle (Figura 35).

Juntos, esses resultados ressaltam mais uma vez que *M. leprae* morto induz mediadores pró-inflamatórios em células de Schwann humanas, enquanto *M. leprae* viável promove preferencialmente citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e produção reduzida de TNF (Figura 35).



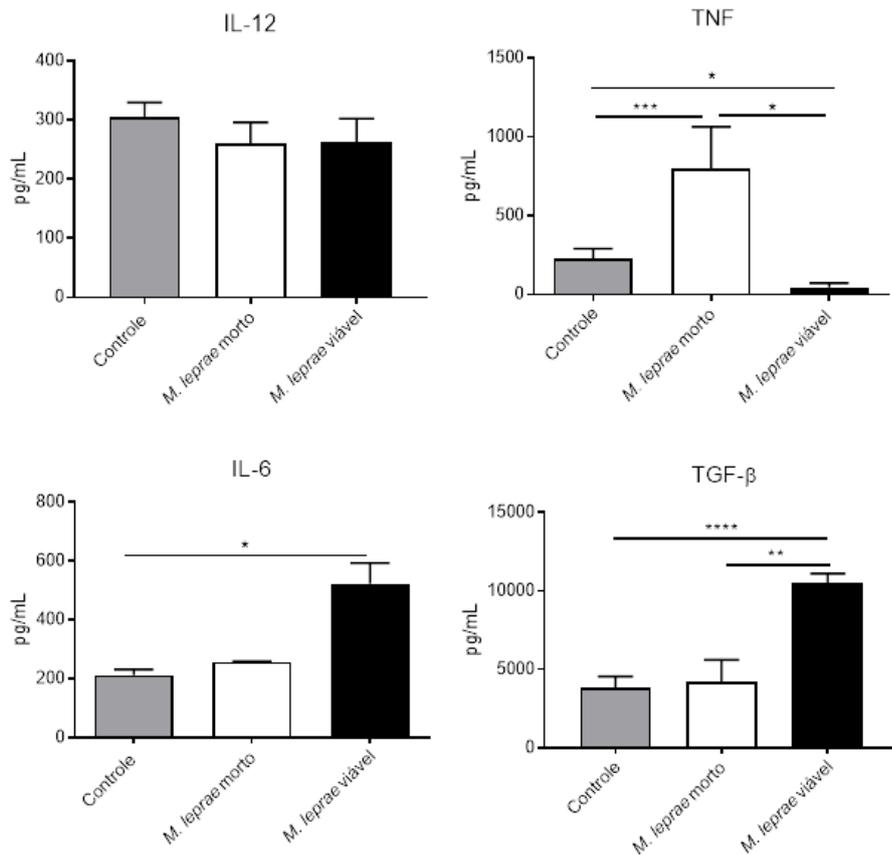


Figura 35 – Padrão de expressão de citocinas e quimiocinas solúveis sintetizadas diferencialmente após infecção ou estímulo com *M. leprae* viável ou morto em células de Schwann humanas.

Ensaio imunoenzimático (ELISA) demonstrando o padrão de secreção de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias em células de Schwann humanas não infectadas (controle – barra cinza), estimuladas com *M. leprae* morto (barra branca) e infectada com *M. leprae* viável (barra preta), após 24h de estímulo *in vitro* (MOI 50:1) (n=10). Os resultados foram realizados em triplicata e estão dispostos pela média \pm desvio padrão. O nível de significância foi considerado quando $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

4.2.5 CCL2 correlaciona-se com diminuição de fibras nervosas na histopatologia, BAAR e PCR

Em seguida, realizou-se uma matriz de correlação para analisar uma possível relação entre alterações histopatológicas e modulações no perfil genético das células de Schwann, a fim de avaliar os principais candidatos à assinatura molecular durante os estágios iniciais do dano neural em pacientes com Hanseníase. Os achados histopatológicos de nervo estão listados no eixo y da Figura 36. Por meio da matriz de correlação, observou-se que, axônios em bulbo de cebola, regeneração axonal, desmielinização e proliferação de células de Schwann foram positivamente correlacionados com *SHH*, *TYRP1*, *ERBB2* e *MAPK14* genes (Figura 36). A remielinização foi positivamente correlacionada com os genes *NTN1*, *OLIG1* e *UNC5B*. Macrófagos espumosos foram correlacionados com *IL6* e granulomas foram positivamente correlacionados com *GDNF*, *GJA1* e *SHH* (Figura 36). *CCL2* foi negativamente correlacionado com infiltrado linfocitário, infiltrado perineural e infiltrado epineural; além disso, foi positivamente correlacionado com diminuição de fibras e proliferação de células de células de Schwann (Figura 36).

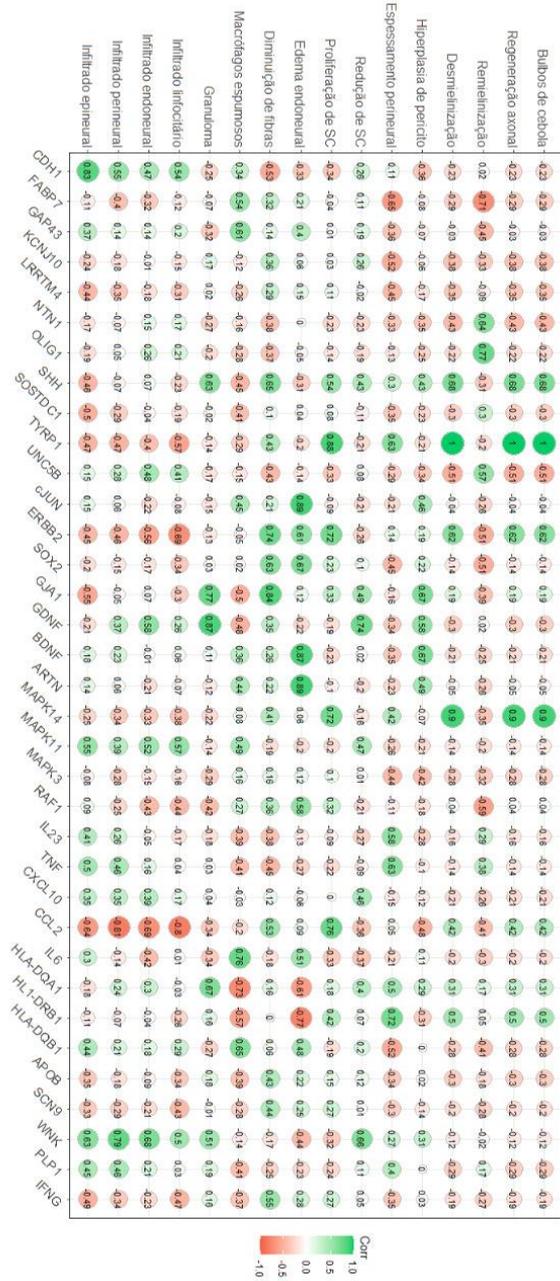


Figura 36 – Matriz de correlação entre a expressão gênica de pacientes com Hanseníase Neural Pura e suas alterações histopatológicas.

O eixo y indica as principais alterações histopatológicas focais observadas em pacientes com Hanseníase NP; o eixo x mostra os genes da biologia da célula de Schwann avaliados nestes pacientes. A cor verde representa forte correlação (valor próximo de 1) enquanto a cor vermelha representa correlação fraca (valor próximo a -1) entre o gene expresso e a alteração histopatológica especificada.

A coloração de bacilos ácido-álcool resistentes (BAAR) em lesões neurais e o PCR positivo são duas ferramentas comumente usadas para diagnosticar a Hanseníase NP na clínica. Assim, foi investigada, em seguida, uma associação potencial entre a presença do bacilo no nervo e alterações na expressão gênica. Uma correlação positiva entre a expressão de *CCL2* e *CDH1* com BAAR foi observada, enquanto uma correlação negativa foi observada entre a expressão de *CCL2* e *GDNF* com PCR (Tabela 3).

Tabela 4 – Regressão linear entre PCR para *M. leprae* e BAAR em relação à expressão gênica global.

Dentre todos os genes avaliados, *CCL2*, *CDH1* e *GDNF* apresentaram diferença significativa para BAAR e/ou PCR.

| Variável | Estimativa | Desvio padrão | Valor p |
|----------------|------------|---------------|-------------|
| CCL2 | | | |
| Intercepto | 0.622 | 1.112 | 0,5998 |
| BAAR | 5.247 | 1.435 | 0.0147* |
| PCR | -4.445 | 1.284 | 0.0180* |
| R ² | 0.778 | | |
| CDH1 | | | |
| Intercepto | 0.108 | 0.253 | 0,6818 |
| BAAR | 1.014 | 0.412 | 0.0493* |
| R ² | 0.502 | | |
| GDNF | | | |
| Intercepto | 3.119 | 0.503 | 0.000815*** |
| PCR | -1.596 | 0.581 | 0.033469* |
| R ² | 0.557 | | |

5 DISCUSSÃO

A neuropatia da Hanseníase é considerada como a doença neurodegenerativa periférica de origem infecciosa mais comum (SCOLLARD *et al.*, 2015; SERRANO-COLL *et al.*, 2018). Estudos recentes da literatura argumentam que existem mecanismos potenciais impulsionados pelo *M. leprae* no desencadeamento da desmielinização após o contato com fibras mielinizadas (RAMBUKKANA *et al.*, 2002; TAPINOS *et al.*, 2006; SCOLLARD *et al.*, 2015; MIETTO *et al.*, 2016; MADIGAN *et al.*, 2017; SERRANO-COLL *et al.*, 2018; MIETTO *et al.*, 2020). No entanto, a relação entre a degradação da mielina e seus possíveis efeitos sobre o *M. leprae* foi muito pouco explorado. Existe pouca literatura a respeito dos subprodutos da degeneração da mielina. Neste trabalho, foi proposto que tais moléculas ofereceriam condições para promover a viabilidade de *M. leprae* dentro da célula hospedeira, a partir da hipótese de que a quebra de mielina forneceria abundantes elementos lipídicos, sendo, portanto, uma estratégia vantajosa induzida pelo *M. leprae* para sobreviver na célula hospedeira.

Inicialmente, confirmou-se que *M. leprae* era capaz de entrar em células de Schwann primárias mielinizantes, uma capacidade que foi estudada inicialmente por RAMBUKANNA e colaboradores (2002), entretanto pouco aprofundamento foi dado a este assunto. Além disso, utilizando o modelo de CSPM, observou-se uma interessante afinidade do patógeno por ovoides de mielina em degeneração. Curiosamente, os macrófagos, após serem infectados com *M. leprae*, promovem desmielinização neural seguida de fagocitose de debris de mielina (MADIGAN *et al.*, 2017), que, de fato, podem fornecer fragmentos de mielina para as bactérias intracelulares. Coletivamente, foi proposto uma nova e inesperada predileção de *M. leprae* por detritos de mielina em degeneração, que são, sem dúvida, os principais abrigos protetores enriquecidos com lipídios dentro da célula hospedeira. Futuros estudos serão necessários para elucidar essa parceria metabólica, com vistas a reconhecer se *M. leprae* é capaz de metabolizar elementos derivados da mielina.

A consequência da infecção por *M. leprae* para a degeneração da mielina intracelular foi amplamente subestimada. O presente estudo, por outro lado, abordou essa questão mostrando que a infecção por *M. leprae* acelerou significativamente a taxa de degradação da mielina de forma dependente do tempo. Além disso, esse

aprimoramento na digestão da mielina foi seguido por uma evidente supressão dos principais genes promotores da mielina, como os transcritos de *MBP*, *MPZ* e *KROX20*. Os achados também foram validados em biópsias de nervos humanos de pacientes com Hanseníase NP e são consistentes com relatórios anteriores que documentaram o desligamento de vários genes de mielina, incluindo o indutor de mielina *KROX20*, em células de Schwann infectadas por *M. leprae* (MASAKI *et al.*, 2013; CASALENOVO *et al.*, 2019).

A fim de entender os mecanismos subjacentes ligados à degradação avançada da mielina observada em CSPM infectadas, a atenção foi novamente voltada para a via de destruição autofágica da mielina, ou seja, a mielinfagia. Os presentes dados evidenciam o aumento da mielinfagia, em cerca de três vezes mais em CSPM infectadas por *M. leprae* em comparação com as não infectadas. Isso também foi confirmado *in vitro* e *in vivo* pela regulação positiva de transcritos-chave envolvidos na formação inicial do autofagossomo (*BCN1*, *WIPI2*, *ULK1* e *ATG7*). Esse complexo fenômeno regulatório que destrói a mielina dentro da célula de Schwann é comumente observado durante a resposta à lesão de nervo, como trauma (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015) e distúrbio inflamatório (JANG *et al.*, 2016). Na presente tese, nós fornecemos evidências adicionais sobre o envolvimento dessa via em um distúrbio infeccioso do nervo periférico.

Devido à importância dos corpúsculos lipídicos para a fisiologia de *M. leprae* (BARISCH & SOLDATI, 2017; MATTOS *et al.*, 2011, 2012), o presente estudo buscou verificar a formação dessas organelas na modelagem *in vitro* da infecção por CSPM. De fato, foi quantificado um aumento significativo no número desses corpúsculos, que também foram correlacionadas com uma redução significativa de 1,6 vezes no tamanho geral dos ovóides de mielina em CSPM infectadas com *M. leprae*, em comparação com as não infectadas. Tal fato se correlaciona muito bem com a aceleração da degradação da mielina e aumento do aparecimento de corpúsculos lipídicos induzidos pelo *M. leprae*. Esse achado foi corroborado por análise quantitativa de PCR que confirmou uma regulação positiva de 8,7 vezes mais no RNAm da perilipina (*PLIN*), juntamente com uma regulação negativa estatística de cerca de duas vezes em *HSL* e *ATGL* em CSPM infectadas por *M. leprae*. Curiosamente, lesões cutâneas de pacientes com Hanseníase e macrófagos infectados por *M. leprae* aumentaram a expressão de perilipina tanto em nível de

RNAm quanto de proteína (TANIGAWA *et al.*, 2008). É importante ressaltar que a perilipina atua como uma proteína de suporte promovendo a síntese e o crescimento dos corpúsculos lipídicos (IKURA & CALDWELL, 2015; SUN *et al.*, 2014) e prevenindo a lipólise (STRAUB *et al.*, 2008).

Coletivamente, o presente trabalho acredita que a elevada mielinofagia induzida por *M. leprae* beneficiará o patógeno pelo menos por dois mecanismos: i) a ativação da mielinofagia, um importante mecanismo central que promove a reprogramação das células de Schwann (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2015), ii) digestão aumentada da mielina que contribui para o aumento dos níveis de corpúsculos lipídicos, como demonstrado aqui, e em artigos anteriores (BROSIUS-LUTZ *et al.*, 2017; GOODRUM *et al.*, 1994). Como a quebra da mielina leva à formação de corpúsculos lipídicos, é concebível que o *M. leprae* induza a degeneração da mielina para garantir a disponibilidade de lipídios e, portanto, seu funcionamento intracelular adequado. Dessa forma, ao se inibir farmacologicamente a degradação da mielina, observou-se por RT-qPCR uma redução significativa de 3,3 vezes na viabilidade do *M. leprae*.

O presente trabalho investigou o contexto da infecção da célula de Schwann e seu comportamento para a manutenção da infecção. Além da investigação do papel da mielina, discutida acima, outra vertente de grande importância no contexto da infecção deste hospedeiro foi abordada: O padrão genético de resposta da célula de Schwann frente ao patógeno – *M. leprae* –viável ou morto. A compreensão da relação entre a célula de Schwann e o *M. leprae* é fundamental para entender a progressão da doença tanto em modelos experimentais, bem como em pacientes com Hanseníase NP. Além disso, é de suma importância entender como as bactérias viáveis e mortas afetam a biologia da célula de Schwann, uma vez que esse contexto é amplamente desconhecido e pouco explorada no campo. No presente trabalho, foi também utilizado o modelo de interação patógeno-hospedeiro *in vitro* para determinar como bactérias viáveis e mortas modificam o perfil de expressão gênica global assim que a bactéria entra em contato com as células de Schwann. Além disso, essas alterações precoces foram associadas ao perfil genético das células de Schwann em resposta à infecção, bem como na análise de biópsias de nervo de pacientes NP, estabelecendo uma conexão com o padrão de resposta precoce durante a progressão da doença em indivíduos com Hanseníase.

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória de expressão gênica das células de Schwann desafiadas com bactérias viáveis ou mortas, juntamente com dados obtidos de biópsias de nervos. As seguintes famílias de genes foram investigadas: neuropatia periférica, rede inflamatória, plasticidade/desdiferenciação das células de Schwann e suporte à regeneração nervosa. Entre a expressão gênica global, *HLA-DRB1*, *MAPK14*, *GAP43*, *FABP7*, *NTN1* e *LRRTM4* foram regulados positivamente em biópsias nervosas de pacientes com NP e em células de Schwann infectadas com *M. leprae* viável e morto, em comparação com os respectivos grupos controle. Tem sido descrito que os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA) afetam a resposta imune do hospedeiro contra o *M. leprae* (de SOUZA-SANTANA *et al.*, 2015; DALLMANN-SAUER *et al.*, 2020). O *HLA-DRB1* é um dos genes mais regulados na esclerose múltipla, tendo um papel especial na indução da desmielinização (SIMON *et al.*, 2020). Além disso, este transcrito está consistentemente relacionado à forma clínica da Hanseníase tuberculóide (T-Lep), enquanto o *HLA-DQB1* tem forte relação com a forma clínica L-Lep (MARCOS *et al.*, 2000). No presente estudo, *HLA-DQB1* foi regulado negativamente em pacientes com NP, em comparação com as amostras nervosas não infectadas. Além disso, os receptores para a molécula de orientação axônica, netrin-1 (NTN1), são expressos pelas células de Schwann e desempenham um papel na regeneração periférica e induzem o fenótipo de regeneração (DUN *et al.*, 2017).

Ao avaliar o conjunto de genes relacionados à plasticidade e desdiferenciação das células de Schwann, algumas serina/treonina quinases, como a proteína quinase 14 ativada por mitógeno (MAPK14), amplamente conhecida por seu papel nas vias do inflamassoma na neuroglia (SHE *et al.*, 2018), foi regulada positivamente em pacientes com NP. No entanto, há uma carência de informações sobre a *MAPK14* na Hanseníase. *GAP43*, a principal proteína do cone de crescimento do axônio que desempenha um papel no crescimento do axônio (KAWASAKI *et al.*, 2018) e na regeneração, também foi regulada positivamente, o que sugere um papel provisório para o crescimento axonal no nervo infectado. *SHH*, *WNK* e *KCNJ10* foram regulados positivamente em biópsias de nervos de Hanseníase e em células de Schwann infectadas com *M. leprae* morto. O gene Sonic Hedgehog (*SHH*), que já foi relatado anteriormente em danos nos nervos (BENITO *et al.*, 2017; WAGSTAFF *et al.*, 2021), também pode desencadear a regeneração e induzir a proliferação de células de

Schwann, na tentativa de neutralizar o dano causado pelos bacilos (WAGSTAFF *et al.*, 2021). *KCNJ10* codifica o canal de potássio retificador para dentro (canal Kir4.1). A alteração da expressão do gene *KCNJ10* está relacionada a neuropatias, como a síndrome East/SeSAME da doença de Huntington, caracterizada por epilepsia, ataxia e retardo mental, que eleva os níveis de $K^{(+)}$ extracelular, o que consequentemente leva a uma excitabilidade neuronal anormal (TONG *et al.*, 2014; MORIN *et al.*, 2020). Foi demonstrado em camundongos que a inflamação pode silenciar os canais Kir4.1, levando a hiperalgesia e dor trigeminal (TAKEDA *et al.*, 2011). Apesar da ausência de estudos relacionando o gene *KCNJ10* e a infecção pelo *M. leprae*, parece que a modulação deste gene pode ser uma via potencial a ser explorada para a neurite hansênica no futuro. *JUN* foi o único gene estatisticamente regulado positivamente em biópsias de NP e células de Schwann infectadas com *M. leprae* viáveis em comparação com os respectivos controles. (*JUN* é um regulador mestre de células de Schwann envolvido na transição de um fenótipo diferenciado para um estágio semelhante a células-tronco/progenitoras (JESSEN e MIRSKY, 2005) e foi relatado anteriormente como regulado positivamente, entre outros genes de desenvolvimento e da crista neural, durante Infecção por *M. leprae* em células de Schwann de camundongo (MASAKI *et al.*, 2013). *PLP1*, *SOSTDC1*, *RAF1*, *ARTN*, *OLIG1*, *MAPK1*, *IFNB* e *TYRP1* foram regulados positivamente em células de Schwann infectadas com *M. leprae* viável e morto, mas não nas biópsias de NP. A proteína 1 relacionada à tirosinase (*TYRP1*) desempenha um papel na via biossintética da melanina, sendo expressa principalmente pelos melanócitos (DENNIS *et al.*, 2015). Tem sido documentado que pacientes com Hanseníase podem apresentar lesões hiper ou despigmentação devido a uma transferência defeituosa de melanina (GASQUE e JAFFAR-BANDJEE, 2015). Os melanócitos têm sido recentemente associados à resposta imune inata, produzindo citocinas inflamatórias, como a IL-1 β (GASQUE e JAFFAR-BANDJEE, 2015). Mas o papel da via *TYRP1* no nervo periférico requer mais investigação. Foi documentado que o interferon beta (IFN- β) é aumentado durante condições de estresse celular, mas a falta dessa proteína leva à neuroinflamação (EJLERSKOV *et al.*, 2015; INÁCIO *et al.*, 2015). O IFNB é essencial para iniciar a via de destino celular impulsionada pelo NUPR1, uma assinatura gênica que contribui para uma infecção progressiva em células humanas (ANDRADE *et al.*, 2019). O fator de transcrição de oligodendrócitos 1 (*OLIG1*) é uma importante proteína do fenótipo de remielinização, geralmente suprarregulada após um distúrbio no microambiente celular (SCHMID *et al.*, 2014). Está bem descrito que durante a neuropatia diabética,

a falta de insulina leva ao fenótipo de desmielinização devido a uma regulação negativa de OLIG1 (SCHMID *et al.*, 2014). Por outro lado, neste estudo, alguns genes como *MAPK3 (ERK1)*, uma importante quinase regulada por sinal extracelular e molécula de migração e proliferação de células de Schwann (MANTUANO *et al.*, 2015) foram regulados negativamente em pacientes com NP. Da mesma forma, *ERbB2*, um conhecido indutor de desmielinização e Connexin43 – *GJA1* – também foram significativamente reduzidos em pacientes com NP. Apesar da falta de informações sobre *GJA1* na Hanseníase, isso tem sido descrito em comprometimento neural, como na patogênese da doença de Alzheimer, onde a regulação negativa de *GJA1* leva a níveis reduzidos de ApoE (KAJIWARA *et al.*, 2018; MENTIS *et al.*, 2021).

Embora se saiba que a polaridade da Hanseníase pode resultar do perfil de resposta inflamatória do hospedeiro, também podem ocorrer múltiplas características de envolvimento neurológico. Por exemplo, polimorfismos em certos genes como *IL10*, *ninjurina 1* e *TNF* têm sido associados à suscetibilidade à Hanseníase (CARDOSO *et al.*, 2007; TARIQUE *et al.*, 2015; TARIQUE *et al.*, 2020). No presente trabalho, foi possível correlacionar o padrão de alterações histopatológicas com alteração no perfil de expressão gênica induzida pela infecção pelo *M. leprae*. A análise do correlograma demonstrou, pela primeira vez, uma correlação estatisticamente significativa entre a assinatura gênica dos estágios iniciais – antes da fibrose – e as alterações histopatológicas do dano nervoso na neuropatia hanseniana. Em relação às características histopatológicas, a expressão de *TYRP1*, *SHH* e *MAPK14* foi fortemente correlacionada com axônios de bulbo de cebola, regeneração de axônios, desmielinização e proliferação de células de Schwann, enquanto *MCP1/CCL2* foi fortemente correlacionada negativamente com infiltrado inflamatório no nervo: epineural, endoneural, perineural e infiltrados linfocitários. É importante perceber que a fraca correlação com fibrose endoneural, perineural e epineural deveu-se aos critérios de inclusão deste estudo, que selecionou pacientes sem sinais de fibrose.

A correlação bisserial demonstrou que o gene que expressa a proteína quimioatraente de monócitos 1 (*MCP1/CCL2*) foi positivamente correlacionado com BAAR e negativamente correlacionada com PCR, o que indica fortemente a correlação do aumento da expressão deste gene por bactérias viáveis. Esse achado corrobora um estudo anterior do nosso grupo, que mostrou ativação do sistema

micobacteriano ESX-1 pelo *M. leprae* viável, levando à ativação do gene *OASL* e à indução da proteína *CCL2*, prejudicando a resposta bactericida do hospedeiro, que não foi observado com estímulos de *M. leprae* mortos em células THP-1 (de TOLEDO-PINTO *et al.*, 2016). Mais do que isso, independentemente, as células de Schwann são responsáveis pelo desencadeamento da resposta ao dano nervoso através do início da depuração dos detritos pela mielínofagia, seguida do recrutamento de macrófagos, que é especialmente regulado pelo *CCL2* (MEDEIROS *et al.*, 2015). Nesse sentido, vê-se a relevância da ativação do gene *CCL2* não apenas como mecanismo protetor na manutenção da viabilidade micobacteriana, mas também como marcador biológico indicativo de BAAR positivo. O *CCL2* foi descrito como um dos genes da imunidade inata ativados imediatamente no contexto da infecção *in vitro* (MASAKI *et al.*, 2013). Assim, apesar dos achados relevantes, ainda há um caminho a percorrer em termos de compreensão do papel dessa quimiocina na infecção e no dano nervoso durante a Hanseníase.

Para fortalecer os dados obtidos a partir da assinatura gênica da infecção por *M. leprae*, foi avaliado o perfil imunomodulador secretado por células de Schwann sem infecção e desafiadas com *M. leprae* viável e morto. Observamos um perfil pró-inflamatório elicitado pelos bacilos mortos, enquanto um microambiente anti-inflamatório parece ser promovido pela infecção com as bactérias viáveis. Estudos têm demonstrado que a infecção de macrófagos por *M. leprae* viável leva a uma resposta de células T reguladoras em vez de uma resposta de células T citotóxicas, o que contribui para a persistência da infecção no hospedeiro (MONTROYA *et al.*, 2009; MODLIN, 2010). Essa característica já é bem demonstrada em pacientes com L-lep, o que leva a uma alta carga bacilar.

No presente trabalho, demonstrou-se que as células de Schwann também induzem o fenótipo anti ou pró inflamatório de acordo com a viabilidade do bacilo. Como nos episódios reacionais há uma mistura de bacilos viáveis e mortos, é interessante destacar o papel das células de Schwann, e não apenas dos macrófagos, como moduladores do processo de reação no nervo, podendo levar até mesmo à neurite hanseniana (ANDRADE *et al.*, 2016).

6 PERSPECTIVAS

A presente tese se conclui no contexto da pandemia de COVID-19. Muitos dados ainda seriam executados, entretanto, foi-se necessário retornar do doutorado sanduíche devido ao surto pandêmico. Do mesmo modo, a continuidade dos estudos em camundongos no presente trabalho foi interrompida devido as ações de trabalho apenas emergenciais no campus, uma vez que a FIOCRUZ é o centro de referência brasileiro no controle de doenças. Muitas perspectivas surgem deste trabalho, como descrito abaixo, que poderão avançar e trazer luz ao conhecimento da fisiopatologia da neuropatia da Hanseníase:

- 1- O desenvolvimento de alvos moleculares a partir da assinatura genética da histopatologia do nervo infectado apresentada;
- 2- A possibilidade de averiguação dos subprodutos específicos de mielina como alvos farmacológicos para a inibição da viabilidade da bactéria e da progressão da doença.

7 CONCLUSÕES

Na presente tese, o estudo no modelo de CSPM de camundongo propõe um novo papel sobre a degradação da mielina favorecendo a sobrevivência *M. leprae* nas células de Schwann. Propõe-se ainda, que a quebra de mielina é uma estratégia evolutiva vantajosa perpetrada pelo *M. leprae* para garantir a disponibilidade de lipídios e sobreviver por mais tempo no nervo periférico. Paralelamente, foi identificado o impacto precoce de bactérias viáveis e mortas, independentemente, na modificação do perfil de expressão gênica de células humanas de Schwann *in vitro*. Também foi descrito uma assinatura molecular associada a dano neural em estágios iniciais de Hanseníase neural pura de pacientes. A Hanseníase é uma doença complexa e intrincada e a identificação desse perfil genético pode contribuir para o completo entendimento da patogênese da neuropatia hanseniana e identificar essas vias como alvos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes. Reconhece-se o número relativamente limitado de amostras de nervos humanos, pois no presente desenho experimental reduziu-se a análise a biópsias de nervos de pacientes com Hanseníase sem sinais de fibrose neural e nos estágios iniciais de dano neural. Portanto, trabalhos futuros com amostras adicionais de nervos de indivíduos com Hanseníase, em estágios clínicos distintos, são importantes para avançar essas interações hospedeiro-patógeno e análise genética associada em coortes maiores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, P. R., JARDIM, M. R., DA SILVA, A. C. C., *et al.* "Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis", **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 75, n. 3, p. 272–283, 2016. DOI: 10.1093/jnen/nlv027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jnen/nlv027>.

ANDRADE, P. R., MEHTA, M., LU, J., *et al.* "The cell fate regulator NUPR1 is induced by *Mycobacterium leprae* via type I interferon in human leprosy", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007589, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007589. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0007589>.

ANGST, D. B. M., PINHEIRO, R. O., VIEIRA, J. S. da S., *et al.* "Cytokine Levels in Neural Pain in Leprosy", **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00023>.

ANTUNES, S. L. G., CHIMELLI, L., JARDIM, M. R., *et al.* "Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 246–253, 2012. DOI: 10.1590/s0074-02762012000200015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000200015>.

ARJUN, B. N. **Filling of gaps in sea surface temperature using artificial neural network.** [S.I.], Unpublished. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.33600.64004>, 2016

ARTHUR-FARRAJ, P. J., LATOUCHE, M., WILTON, D. K., *et al.* "C-jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration", **Neuron**, v. 75, n. 4, p. 633–647, 2012. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.06.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.021>.

ARTHUR-FARRAJ, P., COLEMAN, M. P. "Lessons from injury: How nerve injury studies reveal basic biological mechanisms and therapeutic opportunities for

peripheral nerve diseases", **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 18, n. 4, p. 2200–2221, 2021. DOI: 10.1007/s13311-021-01125-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-021-01125-3>.

BAHIA EL IDRISSEI, N., DAS, P. K., FLUITER, K., *et al.* "*M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator", **Acta neuropathologica**, v. 129, n. 5, p. 653–667, 2015. DOI: 10.1007/s00401-015-1404-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1404-5>.

BARISCH, C., SOLDATI, T. "Breaking fat! How mycobacteria and other intracellular pathogens manipulate host lipid droplets", **Biochimie**, v. 141, p. 54–61, 2017. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.06.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.001>.

BEIROWSKI, B., ADALBERT, R., WAGNER, D., *et al.* "The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves", **BMC neuroscience**, v. 6, p. 6, 2005. DOI: 10.1186/1471-2202-6-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-6-6>.

BENITO, C., DAVIS, C. M., GOMEZ-SANCHEZ, J. A., *et al.* "STAT3 controls the long-term survival and phenotype of repair Schwann cells during nerve regeneration", **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 37, n. 16, p. 4255–4269, 2017. DOI: 10.1523/jneurosci.3481-16.2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3481-16.2017>.

BHAMIDI, S., SCHERMAN, M. S., JONES, V., *et al.* "Detailed structural and quantitative analysis reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*", **The journal of biological chemistry**, v. 286, n. 26, p. 23168–23177, 2011. DOI: 10.1074/jbc.m110.210534. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m110.210534>.

BORAH, K., GIRARDI, K. do C. de V., MENDUM, T. A., *et al.* "Intracellular *Mycobacterium leprae* utilizes host glucose as a carbon source in Schwann cells", **mBio**, v. 10, n. 6, 2019. DOI: 10.1128/mbio.02351-19. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02351-19>.

BRASIL. "Boletim Epidemiológico da Hanseníase". **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Ministério da Saúde, 2021.

BRASIL. "Boletim Epidemiológico da Hanseníase". **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Ministério da Saúde, Num especial, 2020.

BRASIL. "Guia de procedimentos técnicos em baciloscopia em Hanseníase". **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília, 2010. ISBN 978-85-334-1678-9.

BRASIL. "Guia Prático sobre Hanseníase". **Secretaria de Vigilância em Saúde**. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis. Brasília, 2017. ISBN 978-85-334-2542-2.

BRINKMANN, B. G., AGARWAL, A., SEREDA, M. W., *et al.* "Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system", **Neuron**, v. 59, n. 4, p. 581–595, 2008. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.06.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.028>.

BRITTON, W. J. "3. Immunology of leprosy", **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 5, p. 508–514, 1993. DOI: 10.1016/0035-9203(93)90066-y. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90066-y](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(93)90066-y).

BROSIUS LUTZ, A., CHUNG, W.-S., SLOAN, S. A., *et al.* "Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 38, p. E8072–E8080, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1710566114. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1710566114>.

CAMARGO, N., SMIT, A. B., VERHEIJEN, M. H. G. "SREBPs: SREBP function in glia-neuron interactions: SREBP function in glia-neuron interactions", **The FEBS journal**, v. 276, n. 3, p. 628–636, 2009. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06808.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06808.x>.

CAMPANA, W. M. "Schwann cells: Activated peripheral glia and their role in neuropathic pain", **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 5, p. 522–527, 2007.

DOI: 10.1016/j.bbi.2006.12.008. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2006.12.008>.

CARDOSO, C. C., MARTINEZ, A. N., GUIMARÃES, P. E. M., *et al.* "Ninjurin 1 asp110ala single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage", **Journal of neuroimmunology**, v. 190, n. 1–2, p. 131–138, 2007.

DOI: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.015. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.07.015>.

CASALENOVO, M. B., ROSA, P. S., BERTOLUCI, D. F., *et al.* "Myelination key factor krox-20 is downregulated in Schwann cells and murine sciatic nerves infected by *Mycobacterium leprae*", **International journal of experimental pathology**, v. 100, n. 2, p. 83–93, 2019. DOI: 10.1111/iep.12309. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1111/iep.12309>.

CASTRO, F. R. S. "Alterações neurológicas na forma neural pura de Hanseníase: aplicação do grau de incapacidade física e da classificação internacional de funcionalidade, incapacidade e saúde", **Rio de Janeiro**, 2012. .

CHATTOPADHYAY, S., MYERS, R. R., JANES, J., *et al.* "Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: Implications for pathological processes and pain in injured nerve", **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 5, p. 561–568, 2007. DOI:

10.1016/j.bbi.2006.10.015. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.015>.

CHERNOUSOV, M. A., STAHL, R. C., CAREY, D. J. "Schwann cell type V collagen inhibits axonal outgrowth and promotes Schwann cell migration via distinct adhesive activities of the collagen and noncollagen domains", **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6125–6135, 2001. DOI: 10.1523/jneurosci.21-16-06125.2001. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.21-16-06125.2001>.

CHIARATTI, F. C., DAXBACHER, E. L. R., NEUMANN, A. B. F., *et al.* "Type 2 leprosy reaction with Sweet's syndrome-like presentation", **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 91, n. 3, p. 345–349, 2016. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164111. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164111>.

- COLE, S. T., EIGLMEIER, K., PARKHILL, J., *et al.* "Massive gene decay in the leprosy bacillus", **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–1011, 2001. DOI: 10.1038/35059006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/35059006>.
- CONFORTI, L., GILLEY, J., COLEMAN, M. P. "Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease", **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 394–409, 2014. DOI: 10.1038/nrn3680. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3680>.
- COOPER, C. L., MUELLER, C., SINCHAI SRI, T. A., *et al.* "Analysis of naturally occurring delayed-type hypersensitivity reactions in leprosy by in situ hybridization", **The journal of experimental medicine**, v. 169, n. 5, p. 1565–1581, 1989. DOI: 10.1084/jem.169.5.1565. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.169.5.1565>.
- COSMA, C. L., SWAIM, L. E., VOLKMAN, H., *et al.* "Zebrafish and frog models of *Mycobacterium marinum* infection", **Current protocols in microbiology**, v. 3, n. 1, 2006. DOI: 10.1002/0471729256.mc10b02s3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/0471729256.mc10b02s3>.
- COURT, F. A., SHERMAN, D. L., PRATT, T., *et al.* "Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves", **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 191–195, 2004. DOI: 10.1038/nature02841. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature02841>.
- DA SILVA, M. B., PORTELA, J. M., LI, W., *et al.* "Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006532, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006532. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006532>.
- DA SILVA, S. A., MAZINI, P. S., REIS, P. G., *et al.* "HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance", **BMC infectious diseases**, v. 9, n. 1, 2009. DOI: 10.1186/1471-2334-9-134. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-9-134>.
- DALLMANN-SAUER, M., FAVA, V. M., GZARA, C., *et al.* "The complex pattern of genetic associations of leprosy with HLA class I and class II alleles can be reduced

- to four amino acid positions", **PLoS pathogens**, v. 16, n. 8, p. e1008818, 2020. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008818. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008818>.
- DE MATTOS, K. A., SARNO, E. N., PESSOLANI, M. C. V., *et al.* "Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 156–166, 2012. DOI: 10.1590/s0074-02762012000900023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000900023>.
- DE SOUZA, M. E. V. C., URA, F. C., OPRMOLLA, S. "Study of the association of HLA antigens and ulcerated type 1 leprotic reaction", **An Bras Dermatol**, v. 75, p. 282–290, 2000. .
- DE SOUZA-SANTANA, F. C., MARCOS, E. V. C., NOGUEIRA, M. E. S., *et al.* "Human leukocyte antigen class I and class II alleles are associated with susceptibility and resistance in borderline leprosy patients from Southeast Brazil", **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 22, 2015. DOI: 10.1186/s12879-015-0751-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-015-0751-0>.
- DE TOLEDO-PINTO, T. G., FERREIRA, A. B. R., RIBEIRO-ALVES, M., *et al.* "STING-dependent 2'-5' oligoadenylate synthetase-like production is required for intracellular *Mycobacterium lepraesurvival*", **The journal of infectious diseases**, v. 214, n. 2, p. 311–320, 2016. DOI: 10.1093/infdis/jiw144. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw144>.
- DENNIS, M. K., MANTEGAZZA, A. R., SNIR, O. L., *et al.* "BLOC-2 targets recycling endosomal tubules to melanosomes for cargo delivery", **The journal of cell biology**, v. 209, n. 4, p. 563–577, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201410026. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201410026>.
- DEPS, P., COLLIN, S. M. "Mycobacterium lepromatosis as a Second Agent of Hansen's Disease", **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.698588. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.698588>.
- DÍAZ ACOSTA, C. C., DIAS, A. A., ROSA, T. L. S. A., *et al.* "PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to

- successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves", **PLoS pathogens**, v. 14, n. 7, p. e1007151, 2018. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007151. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007151>.
- DORON-MANDEL, E., FAIZILBER, M., TEREZIO, M. "Growth control mechanisms in neuronal regeneration", **FEBS letters**, v. 589, n. 14, p. 1669–1677, 2015. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.04.046. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.046>.
- DUGGAN, G. M., MOSTOWY, S. "Use of zebrafish to study *Shigella* infection", **Disease models & mechanisms**, v. 11, n. 2, 2018. DOI: 10.1242/dmm.032151. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.032151>.
- DUN, X.-P., PARKINSON, D. "Role of netrin-1 signaling in nerve regeneration", **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 491, 2017. DOI: 10.3390/ijms18030491. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18030491>.
- EBENEZER, G. J., SCOLLARD, D. M. "Treatment and evaluation advances in leprosy neuropathy", **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 18, n. 4, p. 2337–2350, 2021. DOI: 10.1007/s13311-021-01153-z. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-021-01153-z>.
- EJLERSKOV, P. *et al.* Lack of neuronal IFN- β -IFNAR causes Lewy body- and Parkinson's disease-like dementia. **Cell**, v. 163, n. 2, p. 324–339, 2015.
- EJLERSKOV, P., HULTBERG, J. G., WANG, J., *et al.* "Lack of neuronal IFN- β -IFNAR causes Lewy body- and Parkinson's disease-like dementia", **Cell**, v. 163, n. 2, p. 324–339, 2015. DOI: 10.1016/j.cell.2015.08.069. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.069>.
- ELAMIN, A. A., STEHR, M., SINGH, M. "Lipid droplets and *Mycobacterium leprae* infection", **Journal of pathogens**, v. 2012, p. 361374, 2012. DOI: 10.1155/2012/361374. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/361374>.
- FADLITHA, V. B., YAMAMOTO, F., IDRIS, I., *et al.* "The unique tropism of *Mycobacterium leprae* to the nasal epithelial cells can be explained by the

- mammalian cell entry protein 1A", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. e0006704, 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006704. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006704>.
- FEMINA, L. L., SOLER, A. C. P., NARDI, S. M. T., *et al.* "Lepra para a Hanseníase: a visão do portador sobre a mudança de terminologia", **Hansen. Int**, v. 32, n. 1, p. 37–48, 2007. .
- GASQUE, P., JAFFAR-BANDJEE, M. C. "The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases", **The Journal of infection**, v. 71, n. 4, p. 413–421, 2015. DOI: 10.1016/j.jinf.2015.06.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.006>.
- GOMEZ-SANCHEZ, J. A., CARTY, L., IRUARRIZAGA-LEJARRETA, M., *et al.* "Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves", **The journal of cell biology**, v. 210, n. 1, p. 153–168, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201503019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201503019>.
- GOMEZ-SANCHEZ, J. A., PILCH, K. S., VAN DER LANS, M., *et al.* "After nerve injury, lineage tracing shows that myelin and remak Schwann cells elongate extensively and branch to form repair Schwann cells, which shorten radically on remyelination", **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 37, n. 37, p. 9086–9099, 2017. DOI: 10.1523/jneurosci.1453-17.2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1453-17.2017>.
- GOODRUM, J. F., EARNHARDT, T., GOINES, N., *et al.* "Fate of myelin lipids during degeneration and regeneration of peripheral nerve: an autoradiographic study", **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 357–367, 1994. DOI: 10.1523/jneurosci.14-01-00357.1994. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.14-01-00357.1994>.
- HAGGE, D. A., OBY ROBINSON, S., SCOLLARD, D., *et al.* "A new model for studying the effects of *Mycobacterium leprae* on Schwann cell and neuron interactions", **The journal of infectious diseases**, v. 186, n. 9, p. 1283–1296, 2002. DOI: 10.1086/344313. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/344313>.
- HASLETT, P. A. J., ROCHE, P., BUTLIN, C. R., *et al.* "Effective treatment of erythema nodosum leprosum with thalidomide is associated with immune stimulation", **The**

- journal of infectious diseases**, v. 192, n. 12, p. 2045–2053, 2005. DOI: 10.1086/498216. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1086/498216>.
- HOOIJ, A., GELUK, A. "In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*", **Immunol Rev**, v. 301, n. 1, p. 175–192, 2021. DOI: 10.1111/imr.12966. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12966>.
- HOWE, K., CLARK, M. D., TORROJA, C. F., *et al.* "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome", **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013. DOI: 10.1038/nature12111. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12111>.
- IASP. INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. "IASP Taxonomy. Pain terms. Neuropathic pain". 2017. Disponível em: www.iasp-pain.org/Taxonomy#Neuropathicpain.
- IKURA, Y., CALDWELL, S. H. "Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: a potential linkage with hepatocellular damage", **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 8, p. 8699–8708, 2015. .
- INÁCIO, A. R., LIU, Y., CLAUSEN, B. H., *et al.* "Endogenous IFN- β signaling exerts anti-inflammatory actions in experimentally induced focal cerebral ischemia", **Journal of neuroinflammation**, v. 12, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s12974-015-0427-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-015-0427-0>.
- JANG, S. Y., SHIN, Y. K., PARK, S. Y., *et al.* "Autophagic myelin destruction by schwann cells during wallerian degeneration and segmental demyelination: Autophagy in Demyelination", **Glia**, v. 64, n. 5, p. 730–742, 2016. DOI: 10.1002/glia.22957. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.22957>.
- JARDIM, M. R., ANTUNES, S. L. G., SANTOS, A. R., *et al.* "Criteria for diagnosis of pure neural leprosy", **Journal of neurology**, v. 250, n. 7, p. 806–809, 2003. DOI: 10.1007/s00415-003-1081-5. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-003-1081-5>.
- JARDIM, M., VITAL, R. T., ILLARRAMENDI, X., *et al.* "The red flags of ulnar neuropathy in leprosy", **PloS one**, v. 16, n. 11, p. e0259804, 2021. DOI:

10.1371/journal.pone.0259804. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0259804>.

JESSEN, K. R., MIRSKY, R. "The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves: Repair Schwann cell and its function in regenerating nerves", **The journal of physiology**, v. 594, n. 13, p. 3521–3531, 2016. DOI: 10.1113/jp270874. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1113/jp270874>.

JESSEN, Kristjan R., MIRSKY, R. "The origin and development of glial cells in peripheral nerves", **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 9, p. 671–682, 2005. DOI: 10.1038/nrn1746. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1746>.

JESSEN, Kristjan R., MIRSKY, R. "The role of c-Jun and autocrine signaling loops in the control of repair Schwann cells and regeneration", **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 15, p. 820216, 2021. DOI: 10.3389/fncel.2021.820216. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2021.820216>.

JESSEN, Kristjan R., MIRSKY, R. "The success and failure of the Schwann cell response to nerve injury", **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, 2019. DOI: 10.3389/fncel.2019.00033. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2019.00033>.

JESSEN, Kristján R., MIRSKY, R., LLOYD, A. C. "Schwann cells: Development and role in nerve repair", **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 7, p. a020487, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a020487. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>.

JIH, M. H., KIMYAI-ASADI, A., LEVIS, W. R. "Reversal reaction to Hansen's disease", **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 1, n. 1, p. 70–71, 2002. .

JONES, J. M., GELLERT, M. "The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system", **Immunological reviews**, v. 200, n. 1, p. 233–248, 2004. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00168.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00168.x>.

JOPLING, W.H., MCDUGALL, A.C. "Handbook of leprosy". **Michigan University**, 2. Ed, 1988.

JUNG, J., CAI, W., LEE, H. K., *et al.* "Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration", **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 6, p. 2009–2015, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4537-10.2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4537-10.2011>.

KAJIWARA, Y., WANG, E., WANG, M., *et al.* "GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis", **Acta neuropathologica communications**, v. 6, n. 1, p. 144, 2018. DOI: 10.1186/s40478-018-0642-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40478-018-0642-x>.

KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M., *et al.* **Principles of neural science, fifth edition**. 5. ed. [S.l.], McGraw-Hill Education/Medical, 2012.

KAO, S.-C., WU, H., XIE, J., *et al.* "Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation", **Science (New York, N.Y.)**, v. 323, n. 5914, p. 651–654, 2009. DOI: 10.1126/science.1166562. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1166562>.

KAUR, G., KAUR, J. "Multifaceted role of lipids in Mycobacterium leprae", **Future microbiology**, v. 12, p. 315–335, 2017. DOI: 10.2217/fmb-2016-0173. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2016-0173>.

KAWASAKI, A., OKADA, M., TAMADA, A., *et al.* "Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration", **iScience**, v. 4, p. 190–203, 2018. DOI: 10.1016/j.isci.2018.05.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2018.05.019>.

KIRCHHEIMER, W. F., STORRS, E. E. "Attempts to establish the armadillo (*Dasypos novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo", **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association**, v. 39, n. 3, p. 693–702, 1971. .

KULIASHA, C. A., SPEARMAN, B., ATKINSON, E. W., *et al.* "Robust and scalable tissue-engineered electronic nerve interfaces (teeni)". 2018. **Anais [...]** San Diego, Transducer Research Foundation, 2018.

- LASTÓRIA, J. C., ABREU, M. A. M. M. de. "Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1", **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20142450. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>.
- LEMMON, M. A., SCHLESSINGER, J. "Cell signaling by receptor tyrosine kinases", **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos fundamentais de neurociência**. Rio de Janeiro, Atheneu, 2004.
- LETURIONDO, A. L., NORONHA, A. B., DO NASCIMENTO, M. O. O., *et al.* "Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil", **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, 2019. DOI: 10.1186/s12879-018-3653-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-018-3653-0>.
- LIEFNER, M., SIEBERT, H., SACHSE, T., *et al.* "The role of TNF- α during Wallerian degeneration", **Journal of neuroimmunology**, v. 108, n. 1–2, p. 147–152, 2000. DOI: 10.1016/s0165-5728(00)00262-9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0165-5728\(00\)00262-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0165-5728(00)00262-9).
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method", **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- LOCKWOOD, D. N. J., DARLONG, J., GOVINDHARAJ, P., *et al.* "AZALEP a randomized controlled trial of azathioprine to treat leprosy nerve damage and Type 1 reactions in India: Main findings", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005348, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005348. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0005348>.
- MADIGAN, C. A., CAMBIER, C. J., KELLY-SCUMPIA, K. M., *et al.* "A macrophage response to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy", **Cell**, v. 170, n. 5, p. 973–985.e10, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.030. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.030>.

- MADIGAN, C. A., CAMERON, J., RAMAKRISHNAN, L. "A Zebrafish Model of Mycobacterium leprae Granulomatous Infection", **The journal of infectious diseases**, v. 216, n. 6, p. 776–779, 2017. DOI: 10.1093/infdis/jix329. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix329>.
- MANTUANO, E., LAM, M. S., SHIBAYAMA, M., *et al.* "The NMDA receptor functions independently and as an LRP1 co-receptor to promote Schwann cell survival and migration", **Journal of cell science**, v. 128, n. 18, p. 3478–3488, 2015. DOI: 10.1242/jcs.173765. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.173765>.
- MARQUES, M. A. M., BERRÊDO-PINHO, M., ROSA, T. L. S. A., *et al.* "The essential role of cholesterol metabolism in the intracellular survival of Mycobacterium leprae is not coupled to central carbon metabolism and energy production", **Journal of bacteriology**, v. 197, n. 23, p. 3698–3707, 2015. DOI: 10.1128/jb.00625-15. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00625-15>.
- MARTINEZ, A. M. B., CANAVARRO, S. "Early myelin breakdown following sural nerve crush: a freeze-fracture study", **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 12, p. 1477–1482, 2000. DOI: 10.1590/s0100-879x2000001200012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-879x2000001200012>.
- MARTINEZ, A. N., LAHIRI, R., PITTMAN, T. L., *et al.* "Molecular determination of Mycobacterium leprae viability by use of real-time PCR", **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2124–2130, 2009. DOI: 10.1128/jcm.00512-09. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.00512-09>.
- MASAKI, T., MCGLINCHEY, A., CHOLEWA-WACLAW, J., *et al.* "Innate immune response precedes Mycobacterium leprae-induced reprogramming of adult Schwann cells", **Cellular reprogramming**, v. 16, n. 1, p. 9–17, 2014. DOI: 10.1089/cell.2013.0064. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1089/cell.2013.0064>.
- MASAKI, T., QU, J., CHOLEWA-WACLAW, J., *et al.* "Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection", **Cell**, v. 152, n. 1–2, p. 51–67, 2013. DOI: 10.1016/j.cell.2012.12.014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.014>.

MATTOS, K. A., LARA, F. A., OLIVEIRA, V. G. C., *et al.* "Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes: *M. leprae*-driven lipid droplets in Schwann cells", **Cellular microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x>.

MATTOS, K. A., OLIVEIRA, V. G. C., D'AVILA, H., *et al.* "TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence", **The journal of immunology**, v. 187, n. 5, p. 2548–2558, 2011. DOI: 10.4049/jimmunol.1101344. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1101344>.

MEDEIROS, M. F., RODRIGUES, M. M. J., VITAL, R. T., *et al.* "CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy", **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 23, n. 3, p. 220–229, 2015. DOI: 10.1097/pai.0000000000000074. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000074>.

MEDEIROS, R. C. A., GIRARDI, K. do C. de V., CARDOSO, F. K. L., *et al.* "Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by Mycobacterium leprae", **The journal of biological chemistry**, v. 291, n. 41, p. 21375–21387, 2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.725283. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.725283>.

MENTIS, A.-F. A., DARDIOTIS, E., CHROUSOS, G. P. "Apolipoprotein E4 and meningeal lymphatics in Alzheimer disease: a conceptual framework", **Molecular psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 1075–1097, 2021. DOI: 10.1038/s41380-020-0731-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-020-0731-7>.

MIETTO, B. S., ANDRADE, P. R., JARDIM, M. R., *et al.* "Demyelination in peripheral nerves: Much to know from leprosy neuropathy", **J Mult Scler (Foster City)**, v. 3, n. 2, 2016. .

MIETTO, BRUNO DE SIQUEIRA. "Estudo comparativo dos processos de degeneração Walleriana e regeneração do nervo isquiático de camundongos selvagens e galectina". Dissertação de mestrado apresentado ao programa de

- ciências morfológicas. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
- MIETTO, BRUNO DE SIQUEIRA. "Mecanismos inflamatórios desencadeados durante a degeneração e regeneração dos nervos no sistema nervoso periférico". Tese de doutorado em ciências morfológicas. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, Brasil, 2015.
- MIETTO, Bruno Siqueira, JHELMUM, P., SCHULZ, K., *et al.* "Schwann cells provide iron to axonal mitochondria and its role in nerve regeneration", **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 41, n. 34, p. 7300–7313, 2021. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0900-21.2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0900-21.2021>.
- MIETTO, Bruno Siqueira, SOUZA, B. J., ROSA, P. S., *et al.* "Myelin breakdown favours *Mycobacterium leprae* survival in Schwann cells", **Cellular microbiology**, v. 22, n. 1, 2020. DOI: 10.1111/cmi.13128. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/cmi.13128>.
- MODLIN, R. L. "The innate immune response in leprosy", **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 48–54, 2010. DOI: 10.1016/j.coi.2009.12.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.001>.
- MONOT, M., HONORÉ, N., GARNIER, T., *et al.* "Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*", **Nature genetics**, v. 41, n. 12, p. 1282–1289, 2009. DOI: 10.1038/ng.477. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.477>.
- MONTOYA, D., CRUZ, D., TELES, R. M. B., *et al.* "Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy", **Cell host & microbe**, v. 6, n. 4, p. 343–353, 2009. DOI: 10.1016/j.chom.2009.09.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2009.09.002>.
- MORIN, M., FORST, A.-L., PÉREZ-TORRE, P., *et al.* "Novel mutations in the KCNJ10 gene associated to a distinctive ataxia, sensorineural hearing loss and spasticity clinical phenotype", **Neurogenetics**, v. 21, n. 2, p. 135–143, 2020. DOI: 10.1007/s10048-020-00605-6. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10048-020-00605-6>.

MUELLER, O. M., LIGHTFOOT, S., SCHROEDER, A. **RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RNA Quality Control Application**. [S.l: s.n.], 2004.

NAMGUNG, U. "The role of Schwann cell-axon interaction in peripheral nerve regeneration", **Cells, tissues, organs**, v. 200, n. 1, p. 6–12, 2014. DOI: 10.1159/000370324. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1159/000370324>.

NAVE, K.-A., TRAPP, B. D. "Axon-glial signaling and the glial support of axon function", **Annual review of neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 535–561, 2008. DOI: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309>.

NG, V., ZANAZZI, G., TIMPL, R., *et al.* "Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*", **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511–524, 2000. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)00142-2. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00142-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00142-2).

NINDS. NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL DISORDERS AND STROKE. "Peripheral Neuropathy Fact Sheet". **NIH**, n. 18-NS-4853, 2014.

NOGUEIRA, M. R. S., AMÔR, N. G., MICHELLIN, L. B., *et al.* "Effect of *Mycobacterium leprae* on neurotrophins expression in human Schwann cells and mouse sciatic nerves", **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200075, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760200075. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760200075>.

OLIVEIRA, A. L., GOMES ANTUNES, S. L., TELES, R. M., *et al.* "Schwann cells producing matrix metalloproteinases under *Mycobacterium lepra* stimulation may play a role in the outcome of leprosy neuropathy", **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 69, n. 1, p. 27–39, 2010. DOI: 10.1097/nen.0b013e3181c6515c. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e3181c6515c>.

OLIVEIRA, J. A. da P. de, ATHAIDE, M. M. de, RAHMAN, A. U., *et al.* "Kynurenines in the Pathogenesis of Peripheral Neuropathy During Leprosy and COVID-19", **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.815738. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2022.815738>.

OLIVEIRA, M. F., MEDEIROS, R. C. A., MIETTO, B. S., *et al.* "Reduction of host cell mitochondrial activity as *Mycobacterium leprae*'s strategy to evade host innate immunity", **Immunological reviews**, v. 301, n. 1, p. 193–208, 2021. DOI: 10.1111/imr.12962. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12962>.

OLIVEIRA, R. B., OCHOA, M. T., SIELING, P. A., *et al.* "Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: A mechanism of nerve damage in leprosy", **Infection and immunity**, v. 71, n. 3, p. 1427–1433, 2003. DOI: 10.1128/iai.71.3.1427-1433.2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.71.3.1427-1433.2003>.

OLIVEIRA, R. B., SAMPAIO, E. P., AARESTRUP, F., *et al.* "Cytokines and *Mycobacterium leprae* Induce Apoptosis in Human Schwann Cells", **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 64, n. 10, p. 882–890, 2005. DOI: 10.1097/01.jnen.0000182982.09978.66. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/01.jnen.0000182982.09978.66>.

PARK, A. J., RENDINI, T., MARTINIUK, F., *et al.* "Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy", **Journal of leukocyte biology**, v. 100, n. 1, p. 47–54, 2016. DOI: 10.1189/jlb.5ru1215-537rr. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.5ru1215-537rr>.

PERRY, V. H., LUNN, E. R., BROWN, M. C., *et al.* "Evidence that the Rate of Wallerian Degeneration is Controlled by a Single Autosomal Dominant Gene", **The European journal of neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 408–413, 1990. DOI: 10.1111/j.1460-9568.1990.tb00433.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.1990.tb00433.x>.

PETITO, R. B., AMADEU, T. P., PASCARELLI, B. M. O., *et al.* "Transforming growth factor- β may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy", **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 72, n. 4, p. 351–365, 2013. DOI: 10.1097/nen.0b013e31828bfc60. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e31828bfc60>.

PINHEIRO, R. O., SCHMITZ, V., SILVA, B. J. de A., *et al.* "Innate immune responses in leprosy", **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00518. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00518>.

PURVES, D., AUGUSTINE, G., FITZPATRICK, D., *et al.* (Eds.). **Neuroscience**. 6. ed. New York, NY, Oxford University Press, 2018.

RAMBUKKANA, A. "Mycobacterium leprae-induced demyelination: a model for early nerve degeneration", **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 4, p. 511–518, 2004. DOI: 10.1016/j.coi.2004.05.021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.021>.

RAMBUKKANA, A., ZANAZZI, G., TAPINOS, N., *et al.* "Contact-dependent demyelination by Mycobacterium leprae in the absence of immune cells", **Science (New York, N.Y.)**, v. 296, n. 5569, p. 927–931, 2002. DOI: 10.1126/science.1067631. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1067631>.

RICHERSON, S. J., ROBINSON, C. J., SHUM, J. "A comparative study of reaction times between type II diabetics and non-diabetics", **Biomedical engineering online**, v. 4, n. 1, p. 12, 2005. DOI: 10.1186/1475-925x-4-12. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-925x-4-12>.

RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. "Classification of leprosy according to immunity: a five-group system". **Int J Lepr.** V. 34, 1966.

ROSA, T. L. S. A., MARQUES, M. A. M., DEBOARD, Z., *et al.* "Reductive power generated by Mycobacterium leprae through cholesterol oxidation contributes to lipid and ATP synthesis", **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 709972, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.709972. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2021.709972>.

SALZER, J. L. "Schwann cell myelination", **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 8, p. a020529, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a020529. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a020529>.

SARDELLA-SILVA, G., MIETTO, B. S., RIBEIRO-RESENDE, V. T. "Four Seasons for Schwann cell biology, revisiting key periods: Development, homeostasis, repair, and aging", **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1887, 2021. DOI: 10.3390/biom11121887. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11121887>.

- SCHEIB, J., HÖKE, A. "Advances in peripheral nerve regeneration", **Nature reviews. Neurology**, v. 9, n. 12, p. 668–676, 2013. DOI: 10.1038/nrneurol.2013.227. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2013.227>.
- SCHMID, D., ZEIS, T., SCHAEREN-WIEMERS, N. "Transcriptional regulation induced by cAMP elevation in mouse Schwann cells", **ASN neuro**, v. 6, n. 3, p. AN20130031, 2014. DOI: 10.1042/an20130031. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1042/an20130031>.
- SCHUBERT, T., FRIEDE, R. L. "The role of endoneurial fibroblasts in myelin degradation", **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 40, n. 2, p. 134–154, 1981. DOI: 10.1097/00005072-198103000-00006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-198103000-00006>.
- SCOLLARD, D. M., ADAMS, L. B., GILLIS, T. P., *et al.* "The continuing challenges of leprosy", **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 2, p. 338–381, 2006. DOI: 10.1128/cmr.19.2.338-381.2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.19.2.338-381.2006>.
- SCOLLARD, D. M., TRUMAN, R.W., EBENEZER, G.J. "Mechanisms of nerve injury in leprosy". **Clinics in Dermatology**, v. 33(1), pags 46–54, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.008>
- SCOLLARD, David M. "Chemotherapy of leprosy has changed (almost) everything", **Leprosy review**, v. 83, n. 3, p. 245–246, 2012. DOI: 10.47276/lr.83.3.245. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.47276/lr.83.3.245>.
- SERRANO-COLL, H., SALAZAR-PELAEZ, L., ACEVEDO-SAENZ, L. *et al.* "Mycobacterium leprae induced nerve damage: Direct and indirect mechanisms". **Pathog Dis.** v. 76(6), 2018. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty06>
- SHE, H., HE, Y., ZHAO, Y., *et al.* "Release the autophagy brake on inflammation: The MAPK14/p38α-ULK1 pedal", **Autophagy**, v. 14, n. 6, p. 1097–1098, 2018. DOI: 10.1080/15548627.2018.1446626. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2018.1446626>.
- SHEPARD, C. C., MCRAE, D. H. "Mycobacterium leprae in mice: Minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity, and effect of

- cortisone", **Journal of bacteriology**, v. 89, n. 2, p. 365–372, 1965. DOI: 10.1128/jb.89.2.365-372.1965. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.89.2.365-372.1965>.
- SHY, M. E., SHI, Y., WRABETZ, L., *et al.* "Axon-Schwann cell interactions regulate the expression of c-jun in Schwann cells", **Journal of neuroscience research**, v. 43, n. 5, p. 511–525, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<511::AID-JNR1>3.0.CO;2-L. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960301\)43:5<511::AID-JNR1>3.0.CO;2-L](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<511::AID-JNR1>3.0.CO;2-L).
- SILVA, B. J. de A., BARBOSA, M. G. de M., ANDRADE, P. R., *et al.* "Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization", **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006103, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006103. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006103>.
- SINGH, P., BENJAK, A., SCHUENEMANN, V. J., *et al.* "Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*", **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 14, p. 4459–4464, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1421504112. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1421504112>.
- SONNE, J., LOPEZ-OJEDA, W. "Neuroanatomy, Cranial Nerve". **StatPearls**, 2022. PMID: 29261885.
- SPIERINGS, E., DE BOER, T., ZULIANELLO, L. *et al.* "The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy". **Lepr Rev.** v. 71 Suppl:S121-9, 2000. PMID: 11201869.
- SPIERINGS, E., DE BOER, T., ZULIANELLO, L., *et al.* "Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*", **Immunology and cell biology**, v. 78, n. 4, p. 349–355, 2000. DOI: 10.1046/j.1440-1711.2000.00939.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00939.x>.
- STEINHOFF, U., WAND-WÜRTTENBERGER, A., BREMERICH, A., *et al.* "*Mycobacterium leprae* renders Schwann cells and mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells", **Infection and immunity**, v. 59, n. 2, p. 684–

688, 1991. DOI: 10.1128/iai.59.2.684-688.1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.59.2.684-688.1991>.

STRAUB, B. K., STOEFFEL, P., HEID, H., *et al.* "Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis", **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 47, n. 6, p. 1936–1946, 2008. DOI: 10.1002/hep.22268. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22268>.

SUN, Z., GONG, J., WU, H., *et al.* "Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes", **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1594, 2013. DOI: 10.1038/ncomms2581. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2581>.

TAKEDA, M., TAKAHASHI, M., NASU, M., *et al.* "Peripheral inflammation suppresses inward rectifying potassium currents of satellite glial cells in the trigeminal ganglia", **Pain**, v. 152, n. 9, p. 2147–2156, 2011. DOI: 10.1016/j.pain.2011.05.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2011.05.023>.

TANIGAWA, K., SUZUKI, K., NAKAMURA, K., *et al.* "Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*", **FEMS microbiology letters**, v. 289, n. 1, p. 72–79, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01369.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01369.x>.

TAPINOS, N., OHNISHI, M., RAMBUKKANA, A. "ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli", **Nature medicine**, v. 12, n. 8, p. 961–966, 2006. DOI: 10.1038/nm1433. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm1433>.

TARIQUE, M., NAQVI, R. A., SANTOSH, K. V., *et al.*, "(CC) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population". **Association of TNF- α -308(GG)**, [S.I.], TT, 2015. v. 73. p. 61–65.

TARIQUE, Mohammad, NAZ, H., SAINI, C., *et al.* "Association of IL-10 gene polymorphism with IL-10 secretion by CD4 and T regulatory cells in human leprosy", **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1974, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01974. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.01974>.

- TELES, R. M. B., ANTUNES, S. L. G., JARDIM, M. R., *et al.* "Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF- α in the nerves of leprosy patients", **Journal of the peripheral nervous system: JPNS**, v. 12, n. 3, p. 195–204, 2007. DOI: 10.1111/j.1529-8027.2007.00139.x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8027.2007.00139.x>.
- TERADA, N., SAITOH, Y., KAMIJO, A., *et al.* "Structures and molecular composition of Schmidt-Lanterman incisures", **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1190, p. 181–198, 2019. DOI: 10.1007/978-981-32-9636-7_12. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-32-9636-7_12.
- THUMM, M., SIMONS, M. "Myelinophagy: Schwann cells dine in", **The journal of cell biology**, v. 210, n. 1, p. 9–10, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201506039. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201506039>.
- TONG, X., AO, Y., FAAS, G. C., *et al.* "Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice", **Nature neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 694–703, 2014. DOI: 10.1038/nn.3691. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3691>.
- TRUMAN, R. W., KRAHENBUHL, J. L. "Viable *M. leprae* as a research reagent", **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association**, v. 69, n. 1, p. 1–12, 2001. .
- VALENZUELA, V., OÑATE, M., HETZ, C., *et al.* "Injury to the nervous system: A look into the ER", **Brain research**, v. 1648, p. 617–625, 2016. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.04.053. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.053>.
- VERKHRATSKY, A., HO, M. S., PARPURA, V. "Evolution of neuroglia", **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1175, p. 15–44, 2019. DOI: 10.1007/978-981-13-9913-8_2. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_2.
- VISSA, V. D. & BRENNAN, P. J. "The genome of *Mycobacterium leprae*: A minimal mycobacterial gene set". **Genome Biology**, v. 2(8), pages 1–8, 2001. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-reviews1023>

WAGSTAFF, L. J., GOMEZ-SANCHEZ, J. A., FAZAL, S. V., *et al.* "Failures of nerve regeneration caused by aging or chronic denervation are rescued by restoring Schwann cell c-Jun", **eLife**, v. 10, 2021. DOI: 10.7554/eLife.62232. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.62232>.

WALKER, S. L., NICHOLLS, P. G., DHAKAL, S., *et al.* "A phase two randomised controlled double blind trial of high dose intravenous methylprednisolone and oral prednisolone versus intravenous normal saline and oral prednisolone in individuals with leprosy type 1 reactions and/or nerve function impairment", **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, p. e1041, 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001041. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001041>.

WANG, J. T., MEDRESS, Z. A., BARRES, B. A. "Axon degeneration: molecular mechanisms of a self-destruction pathway", **The Journal of Cell Biology**, v. 196, n. 1, p. 7–18, 2012. DOI: 10.1083/jcb.201108111.PMC3255986. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201108111.PMC3255986>.

WHO, "World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes". **Technical Report Series. Geneva**, v. 675, 1982. .

WHO, World Health Organization. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *Wkly Epidemiol Rec.* 2016 Sep 2;91(35):405–20.

WHO,. WORLD HEALTH ORGANIZATION. "Towards zero leprosy". **Global Leprosy (Hansen's Disease) Strategy (2021-2030)**, 2021. ISBN: 978-92-9022-850-9.

WONG, K. M., BABETTO, E., BEIROWSKI, B. "Axon degeneration: make the Schwann cell great again", **Neural regeneration research**, v. 12, n. 4, p. 518–524, 2017. DOI: 10.4103/1673-5374.205000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.205000>.

YAN, N., RICCA, C., FLETCHER, J., *et al.* "Farnesyltransferase inhibitors block the neurofibromatosis type I (NF1) malignant phenotype", **Cancer research**, v. 55, n. 16, p. 3569–3575, 1995. .

ZHOU, Z., PENA, M., VAN HOOJI, A. *et al.* "Detection and Monitoring of *Mycobacterium leprae* Infection in Nine Banded Armadillos (*Dasypus*

novemcinctus) using a Quantitative Rapid Test". **Front Microbiol.** V. 12:763289, 2021. doi:10.3389/fmicb.2021.763289

9 APÊNDICE A – DOUTORADO SANDUÍCHE

9.1 Introdução

Em complementaridade a presente tese, parte do doutoramento desta autora foi realizado no exterior, a partir da contemplação no Programa Institucional de Internalização (PrInt) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), por meio da aprovação no edital do ano de 2019 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Ministério da Educação (MEC) na modalidade Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE). Esse período foi realizado na Universidade da Califórnia em San Diego, nos Estados Unidos (UCSD/USA), sob supervisão da Dra. Cressida Ariana Madigan, no Laboratório Cressida Madigan (Cressida Madigan Lab).

O presente laboratório é um dos pioneiros no mundo na execução de infecções bacterianas no modelo *in vivo* de peixe-zebra (*Danio rerio*), sendo, portanto, uma importante fonte de investigação para a elaboração de um modelo *in vivo* de estudo, inédito para a infecção em longo prazo por *M. leprae*. O peixe-zebra apresenta características bastante favoráveis para utilização enquanto animal de laboratório. A espécie se popularizou nos estudos da biologia do desenvolvimento, uma vez que são hospedeiros geneticamente manipuláveis, por apresentar alta fecundidade, colocando em torno de 300 ovos pós cópula e pelo curto intervalo entre a fase larval e adulta (Figura A1) (MADIGAN *et al.*, 2017a).



Figura A1 – Diferentes estágios de vida do peixe-zebra.

Na esquerda, o peixe em estágio larval (72h pós oclusão do ovo). No meio, a transição de larva para a morfologia adulta (aproximadamente 21 dias pós oclusão). Na direita, o peixe adulto (aproximadamente 90 dias de idade). Fonte: *The Zebrafish Information Network*.

Não obstante as vantagens genéticas do peixe-zebra, outro grande favorecimento é a transparência óptica do embrião e do estágio larval. Observa-se na Figura A2 os embriões 72h após a desova. É possível se manipular o mutante desejado, uma vez que o genoma deste animal já foi completamente sequenciado

(HOWE *et al.*, 2013). O modelo de infecção de embriões no estágio larval - aproximadamente 50-72h de idade – tem sido utilizado na literatura para caracterizar os primeiros eventos após infecção (MADIGAN *et al.*, 2017b; DUGGAN e MOSTOWY, 2018 *et al.*). Nesta etapa do desenvolvimento, o embrião ainda não desenvolveu imunidade adaptativa; portanto, é possível se estudar os fatores de virulência determinados a partir da interação unicamente com a imunidade inata do embrião (MADIGAN *et al.*, 2017a).

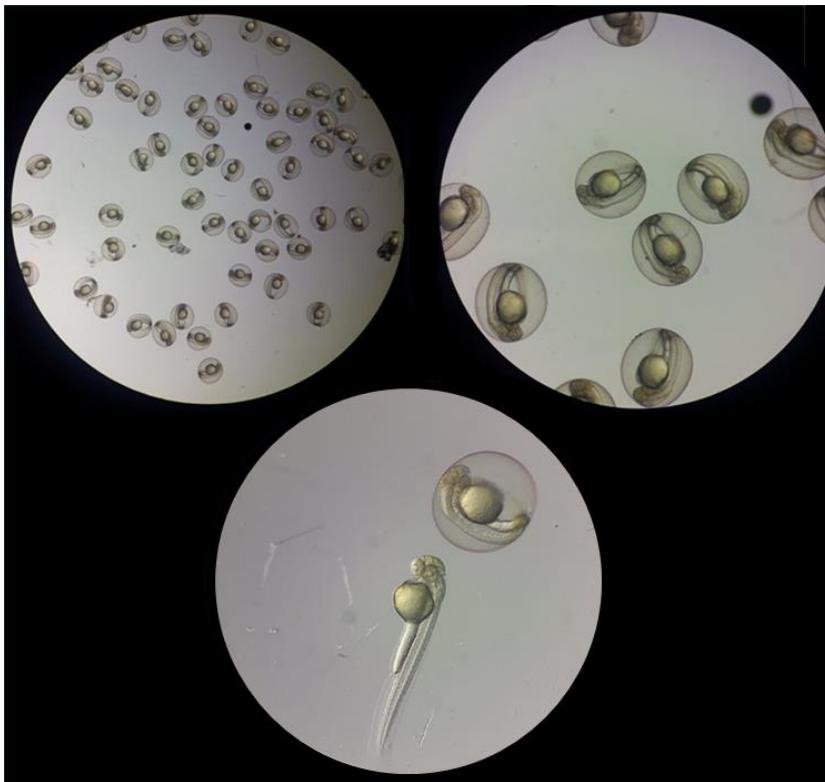


Figura A2 – Ovos fecundados de peixe-zebra, 72h após a desova pela fêmea. A transparência óptica do peixe-zebra e de seu ovo, permitem a observação das características morfológicas em seu interior. Observa-se o embrião e o saco vitelínico no interior do ovo. Cada fecundação resulta em aproximadamente 300 ovos que serão postos 6h após a fertilização. Fonte: Autora.

9.2 Justificativa

Uma das principais características que tornam a Hanseníase uma doença tão antiga e ainda sem uma compreensão profunda sobre o dano neural é a ausência de modelos experimentais para o estudo da mesma. O peixe-zebra apresenta uma característica específica que é a sua temperatura de sobrevivência: em torno de 30°C. Nos estudos com hanseníase, uma das principais dificuldades apresentadas pelos modelos animais é a temperatura interna mais elevada, em torno de 37°C, que inviabiliza a replicação bacteriana. Desta forma, além de todas as características favoráveis a manipulação genética e ambiental, este se torna um modelo promissor para o estudo da infecção neural pelo *M. leprae*, podendo-se, pela primeira vez, se ter um modelo experimental *in vivo* para a Hanseníase.

9.3 Objetivos

Identificar o padrão de transcrição gênica do hospedeiro – peixe-zebra – e do patógeno – *M. leprae* – no contexto da infecção, para identificar os padrões de resposta global do patógeno sobre o hospedeiro e do hospedeiro sobre o patógeno.

9.3.1 Objetivos específicos

- Realizar a análise da expressão gênica global do eucarioto e do procarioto por meio da técnica dual RNAseq;
- Elaborar e identificar o melhor protocolo de extração de RNA para aproveitamento máximo de RNA íntegro do eucarioto e do procarioto, utilizando a plataforma “tapestation”;
- Identificar o impacto da imunidade adaptativa no contexto da lesão de nervo, a partir de peixe-zebra knockout para *RAG1*.

9.4 Materiais e métodos

A criação dos peixes-zebra foi inicialmente realizada na Universidade de Washington, de acordo com o comitê de ética em pesquisa Animal da Universidade e com as diretrizes no Instituto Nacional de Saúde Americano, do inglês “National Institute of Health – NIH”. Conforme publicado anteriormente por COSMA e

colaboradores (2006), os peixes-zebra foram criados em sistemas de aquários próprios para laboratório (Aquatic Habitats, Florida) e transferidos para um sistema de fluxo, para o experimento de infecção. Foram mantidos entre 10 a 12 peixes por tanque de 9 litros. Os tanques foram mantidos nas condições determinadas pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais: Temperatura da água de 28 - 30°C, pH de aproximadamente 7,4 e condutividade de aproximadamente 1.500 Siemens (μS).

Para a anestesia, os animais adultos (aproximadamente 3 meses de idade) foram transferidos para placa de petri e em seguida foram anestesiados com 0,1% de ácido 3-aminobenzóico etil ester (Tricaína) diluído na água. Em seguida, os peixes foram infectados por injeção intraperitoneal com 5×10^5 *M. leprae* viável, isolados de patas de camundongos “nude”, previamente descritos nesta tese. A viabilidade bacteriana foi avaliada por radiorespirometria.

Para mimetizar a infecção de longo prazo, os grupos foram definidos, primeiramente, em relação ao seu genótipo. Por meio da técnica CRISPR/Cas9, foi realizada a depleção do gene de ativação de recombinação 1 (*RAG1*). Este gene é fundamental para maturação dos linfócitos B e T, componentes fundamentais da imunidade adaptativa (JONES *et al.*, 2004). Neste modelo, portanto, seria viável se estudar as influências exclusivas da imunidade inata no contexto do curso da infecção pelo *M. leprae*, comparando-as com as manifestações apresentadas no contexto da infecção nos peixes imunocompetentes (selvagens).

Foram utilizadas duas linhagens de peixe nesse estudo: o peixe-zebra selvagem^{+/+} (do inglês “wildtype”), e o homocigoto *RAG1*^{-/-}. Os animais foram observados duas vezes ao dia, e eutanasiados por overdose de tricaína em cada “timepoint” experimental. Caso os animais apresentassem características físicas moribundas, também seriam eutanasiados. Para averiguar a viabilidade bacteriana ao longo do curso da infecção, foi realizado o ensaio de viabilidade baseado na razão 16S/23S conforme proposto por MARTINEZ e colaboradores (2009). Os peixes mutantes para depleção do gene *RAG1*^{-/-} não são capazes de produzirem linfócitos T e B maduros, similarmente ao que ocorre nos camundongos nude, capazes de crescerem o *M. leprae* no coxim plantar (SHEPARD, 1965; MARTINEZ *et al.*, 2009). A ausência de resposta adaptativa nos peixes-zebra poderia, portanto, elucidar o papel da resposta imune inata no curso do processo infeccioso da Hanseníase.

Para cada grupo selvagem e mutante, foram definidos sete (7) sub-grupos experimentais, com diferentes tempos de infecção. Todos os peixes foram infectados

por 5×10^5 unidades de *M. leprae* viável (Figura A3). O Grupo B foi infectado e imediatamente eutanasiado, para se avaliar se as possíveis alterações observadas seriam em decorrência da infecção crônica ou do processo imediato da injeção intracaudal. O Grupo C foi infectado por sete (7) dias; o grupo D por 30 dias (1 mês); O Grupo E por 120 dias (4 meses); o grupo F por 180 dias (6 meses); o grupo G por 240 dias (8 meses) e o grupo H por 360 dias (12 meses).

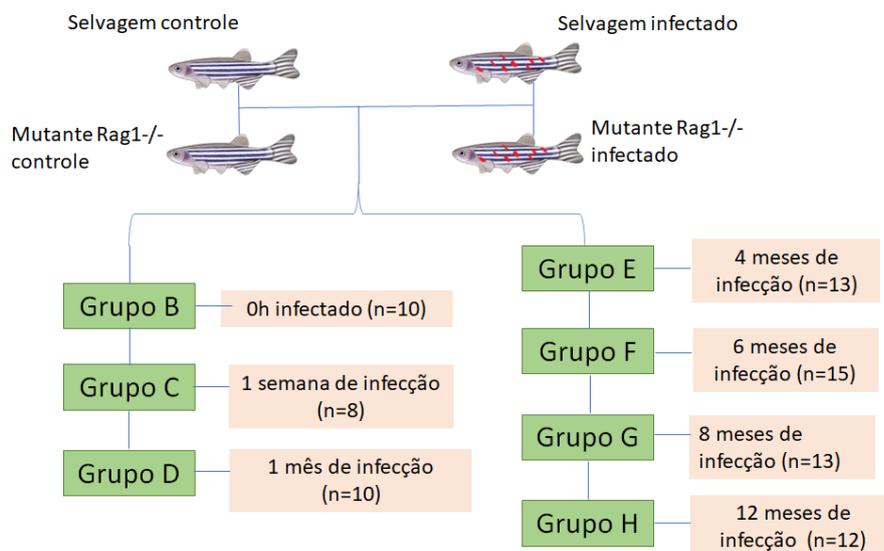


Figura A3 – Desenho experimental do modelo de infecção em peixe-zebra.

Os grupos experimentais foram definidos de acordo seu genótipo (selvagem ou mutante *RAG1^{-/-}*) e com o tempo de infecção. Grupo B – 0h; Grupo C – 7 dias; Grupo D – 30 dias; Grupo E – 4 meses; Grupo F – 6 meses; Grupo G – 8 meses; Grupo H – 12 meses. Todos os grupos foram infectados com 5×10^5 de *M. leprae* viável.

9.4.1 Processamento para RT-qPCR e RNAseq

O RNAseq é uma técnica que vislumbra a identificação da expressão gênica total de um organismo num dado momento. Haja vista que o peixe-zebra é o único modelo animal total para a infecção por *M. leprae*, e que é muito recentemente utilizado na literatura, dispondo-se poucos dados informativos, o objetivo desta etapa do estudo foi realizar um dual RNAseq, que avaliaria a expressão gênica total tanto do hospedeiro – peixe-zebra– como do patógeno – *M. leprae*. Esta técnica é de grande interesse, uma vez que poder-se-ia acessar informações inéditas a respeito de como ocorre o impacto da bactéria do contexto da infecção crônica em um organismo total,

bem como o impacto da resposta imune do hospedeiro frente a biologia molecular do patógeno. Mais que isso, este procedimento permite se avaliar a expressão gênica no animal selvagem e mutante para *RAG1*^{-/-}. Primeiramente, para obtenção do RNA total do peixe-zebra e do *M. leprae*, foram testados dois protocolos de extração de RNA, uma vez que não há dados robustos na literatura para este tipo de experimento, considerando ambos os organismos vivos. Outrossim, também é importante considerar que o peixe-zebra é um peixe escamoso, e para acessar o material nuclear das células, muitas barreiras necessitam ser lisadas (Figura A4).



Figura A4 – Maceração dos peixes-zebra em N₂ líquido seguido de TRIzol®. Os animais foram triturados em nitrogênio líquido. Após a evaporação de N₂, o material biológico seguiu para processamento em TRIzol para extração de RNA. Fonte: Autora.

Para a extração de RNA total, foram elaborados dois protocolos, assessorados pela Illumina®, com o objetivo de alcançar uma maior quantidade de RNA total na melhor integridade possível. Desta maneira, os peixes infectados foram submetidos a dois métodos: a homogeneização ultrassônica direta por “beads” magnéticas o método de lise diferencial (Figura A5). No método de homogeneização ultrassônica

por beads, foram utilizadas beads magnéticas de zircônia, de calibre 0.1mm em 1 mL de TRIzol® + amostra biológica. A homogeneização é realizada por 60 segundos. Em seguida, a amostra é dissociada das beads e segue para precipitação em clorofórmio. No processo de lise diferencial, onde a amostra em TRIzol® é centrifugada em alta velocidade 20.000 rpm por 20 minutos. Em seguida, o precipitado é lisado por meio do homogeneizador ultrassônico com o auxílio de beads magnéticas de zircônia, do tamanho 0,1mm. Após essa lise, a amostra é precipitada em clorofórmio para posterior extração de RNA total.

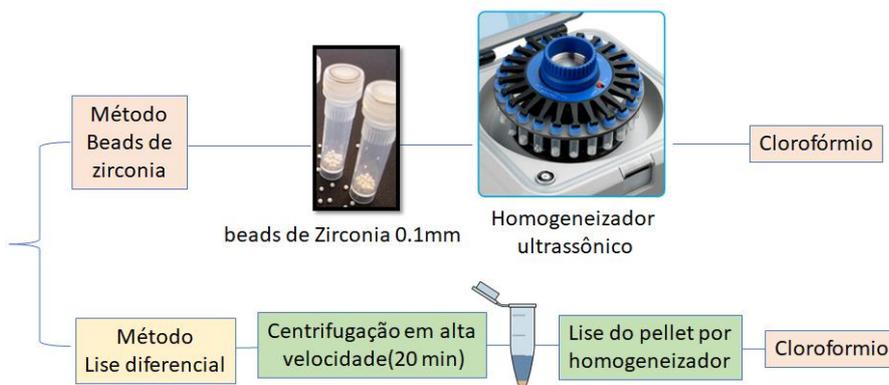


Figura A5 – Protocolos teste para extração de RNA total do hospedeiro eucarioto e do patógeno procaríoto.

Dois métodos foram utilizados para melhor aproveitamento da extração de RNA total do hospedeiro e do patógeno: O método de homogeneização ultrassônica por beads e o método de lise diferencial. Fonte: Autora.

9.4.2 Avaliação da integridade do RNA

Devido ao fato de ambos os protocolos de extração de RNA total do hospedeiro e do patógeno terem sido desenhados para esse experimento, é fundamental que se avalie se as técnicas preservaram a integridade do RNA de ambos os organismos. Para avaliação da integridade do RNA, foram utilizados dois procedimentos: o sistema Agilent TapeStation® para identificar a integridade do RNA do eucarioto (peixe-zebra) e o RT-qPCR para ver a expressão gênica dos genes endógenos do *M. leprae* e do peixe-zebra (Figura A6).

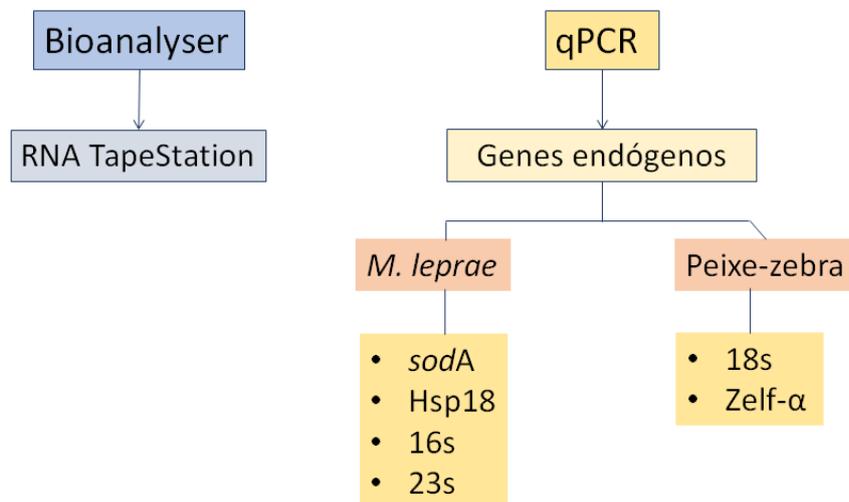


Figura A6 – Avaliação de integridade do RNA total do hospedeiro (peixe-zebra) e do patógeno (*M. leprae*).

Diagrama ilustrando os processos envolvidos para análise de integridade do RNA do patógeno – procaríoto – e do hospedeiro – eucarioto. A integridade RNA do peixe zebra foi avaliada pela plataforma Agilent 2100 Bioanalyser System – RNA Tape Station. O RNA do *M. leprae* foi avaliado pela amplificação dos genes endógenos da bactéria, pela técnica de RT-qPCR. Genes endógenos do peixe-zebra também foram avaliados para controle de qualidade. Fonte: Autora.

O sistema Agilent TapeStation é um sistema de eletroforese automatizado em “chip” para o controle de qualidade de amostras de DNA e RNA. O sistema integra um instrumento, “software” de processamento de dados, reagentes e dispositivos “ScreenTape” específicos para DNA e RNA. Por meio desta plataforma também foi possível avaliar, além da quantidade e integridade, o grau de degradação de RNA de cada amostra. O Número Equivalente a Integridade do RNA (RIN[®]) resulta no grau de qualidade de cada amostra, onde superior a 7 (>7) excelente qualidade; entre 4 e 6 média qualidade; inferior a 3 (<3) alto grau de degradação (Figura A7).

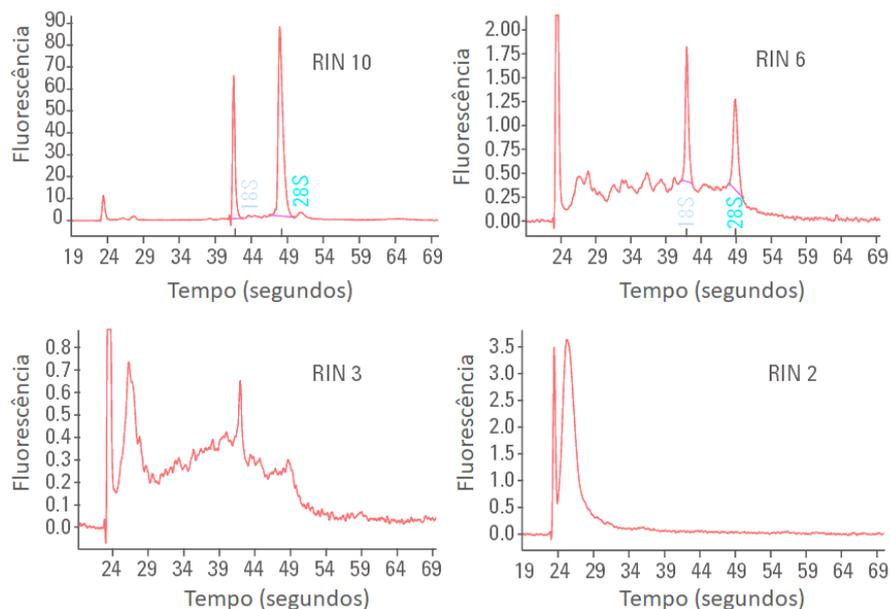


Figura A7 – Análise da integridade e degradação do RNA na plataforma Agilent TapeStation

Os picos presentes no gráfico sinalizam o gene endógeno de mRNA eucarioto (18S) e o gene endógeno de rRNA (28S). No primeiro gráfico, observa-se apenas a presença do RNA íntegro (RIN=10). No segundo gráfico, observa-se no início do curso temporal a presença de RNA degradado, e ao mesmo tempo, a presença de RNA íntegro (RIN=5). No último gráfico, não é possível observar os picos de RNA de genes endógenos, resultando em um RNA degradado e impróprio para o uso (RIN = 3).
 Fonte: MUELLER *et al.*, 2004.

9.4.3 RNAseq

Para o padrão ouro, foram desenvolvidas, especialmente para o presente trabalho, novas sondas para depleção de RNA ribossomal (rRNA) de *M. leprae* e peixe-zebra. A preparação da biblioteca será realizada com o Illumina Truseq Stranded RNAm kit® seguido de sequenciamento com o Novaseq library prep sequencing SP100 kit®. As bibliotecas serão sequenciadas no sistema Novaseq6000 (Illumina®) em leituras de 50 bp de extremidade única.

9.5 Resultados

No estudo com modelo de peixe-zebra infectado, foram extraídos o RNA total de peixes-zebra selvagem e mutantes *RAG1*^{-/-}, no curso temporal de 0 a 12 meses de infecção. Para a análise da integridade do RNA, a eletroforese automatizada “Tapestation” foi utilizada para o controle de qualidade das amostras. Como o RNA mensageiro (RNAm) compreende em torno de 1-3% do total de RNA celular, ele não é facilmente detectável. O RNA ribossomal (RNAr), por sua vez, corresponde a aproximadamente 80% do total de RNA, sendo a maioria composta pelas espécies 18S e 28S em eucariotos (CLARK *et al.*, 2013). A qualidade do RNAm é avaliada a partir da quantidade de qualidade do RNAr, onde os picos de 18S e 28S sugerem RNAm intacto. Foram analisadas aproximadamente 280 amostras, onde (n=35) peixes-zebra selvagens controle; (n=35) peixes-zebra *RAG1*^{-/-} controle; (n=35) peixes-zebra selvagens infectados com *M. leprae* viável; (n=35) peixes-zebra *RAG1*^{-/-} infectados com *M. leprae* vivo. Todas as amostras foram analisadas após extração de RNA pelo método de lise diferencial e pelo método das *beads* de zircônia, descritas na sessão de materiais e métodos.

Foram considerados RNA com alto grau de integridade, os que apresentaram RIN igual ou superior a 7,0 (Figura A8). A intensidade de fluorescência emitida pela amostra com RIN superior a 7,0 se concentra nos picos de integridade de RNAr 18S e 28S, elucidando sua integridade. Por outro lado, amostras que emitiram fluorescência ao longo do tempo da corrida da eletroforese caracterizam banda de arraste, ou seja, RNA com grau de degradação, que não deve ser, portanto, considerado para avaliação da expressão gênica do hospedeiro (Figura A8).

No estudo com modelo de peixe-zebra infectado, foram extraídos o RNA total de peixes-zebra selvagem e mutantes *RAG1*^{-/-}, no curso temporal de 0 a 12 meses de infecção. Para a análise da integridade do RNA, a eletroforese automatizada “Tapestation” foi utilizada para o controle de qualidade das amostras. Como o RNA mensageiro (RNAm) compreende em torno de 1-3% do total de RNA celular, ele não é facilmente detectável. O RNA ribossomal (RNAr), por sua vez, corresponde a aproximadamente 80% do total de RNA, sendo a maioria composta pelas espécies 18S e 28S em eucariotos (CLARK *et al.*, 2013). A qualidade do RNAm é avaliada a partir da quantidade de qualidade do RNAr, onde os picos de 18S e 28S sugerem

RNA intacto. Foram analisadas aproximadamente 280 amostras, onde (n=35) peixes-zebra selvagens controle; (n=35) peixes-zebra *RAG1*^{-/-} controle; (n=35) peixes-zebra selvagens infectados com *M. leprae* viável; (n=35) peixes-zebra *RAG1*^{-/-} infectados com *M. leprae* viável. Todas as amostras foram analisadas após extração de RNA pelo método de lise diferencial e pelo método das *beads* de zircônia, descritas na sessão de materiais e métodos.

Foram considerados RNA com alto grau de integridade, os que apresentaram RIN igual ou superior a 7,0 (Figura A8). A intensidade de fluorescência emitida pela amostra com RIN superior a 7,0 se concentra nos picos de integridade de RNAr 18S e 28S, elucidando sua integridade. Por outro lado, amostras que emitiram fluorescência ao longo do tempo da corrida da eletroforese caracterizam banda de arraste, ou seja, RNA com grau de degradação, que não deve ser, portanto, considerado para avaliação da expressão gênica do hospedeiro (Figura A8).

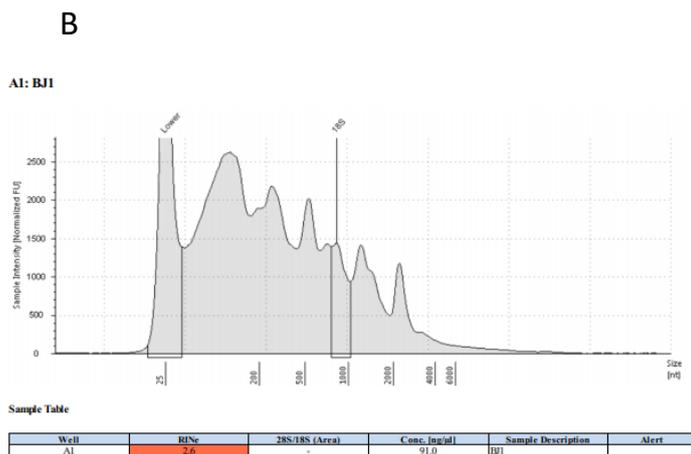
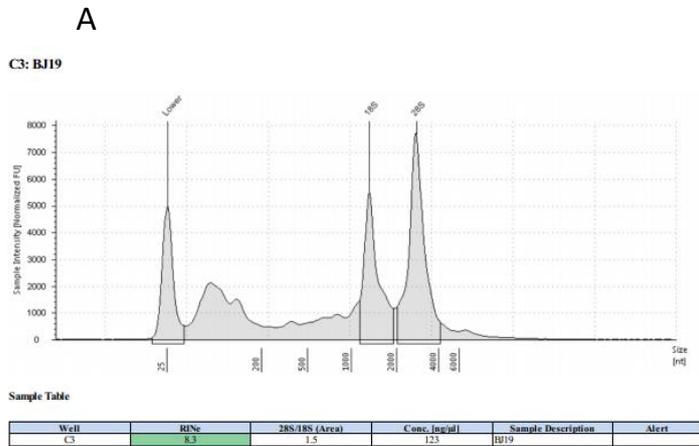


Figura A8 – Análise do controle de qualidade do RNA total extraído de peixe-zebra infectado eutanasiado e do peixe-zebra infectado encontrado morto.

Avaliação da integridade do RNA eucariótico utilizando a plataforma Bioanalyser TapeStation. (A) Análise de mostra de peixe-zebra eutanasiado para análise, com bom grau de estabilidade para os picos 18S e 28S de RNAr. (B) Análise de amostra de peixe-zebra *post-mortem*, com alto grau de degradação de RNA e picos 18S e 28S difusos. Foram utilizados 10 ng de RNA para performance na microeletroforese.

Os picos 18S e 28S só analisam, no entanto, a integridade do RNA do eucarioto – o hospedeiro. Entretanto, no presente sistema biológico avaliado, o interesse é identificar a integridade do RNA também do patógeno – *M. leprae*. Para isso, genes endógenos da biologia do *M. leprae* foram analisados, de modo a identificar se o sistema de extração de RNA total proposto no presente trabalho poderia estar

degradando o RNA do bacilo. É importante ressaltar, no entanto, que o acesso do RNA bacteriano tende a ser mais dificultado devido à parede celular presente no *M. leprae*.

Para identificar a presença de RNA íntegro, a expressão gênica dos genes endógenos do *M. leprae* - 23S, 16S, *hsp18* e *sodA* foi avaliada e comparada aos resultados obtidos na integridade do hospedeiro. Foi possível observar a amplificação dos genes endógenos do *M. leprae* (Figura A9) nas amostras submetidas a extração por lise diferencial. Todas as amostras estudadas, de peixes-zebra controle e infectado, selvagem e mutante (*RAG1*^{-/-}) foram submetidas a análise de integridade.

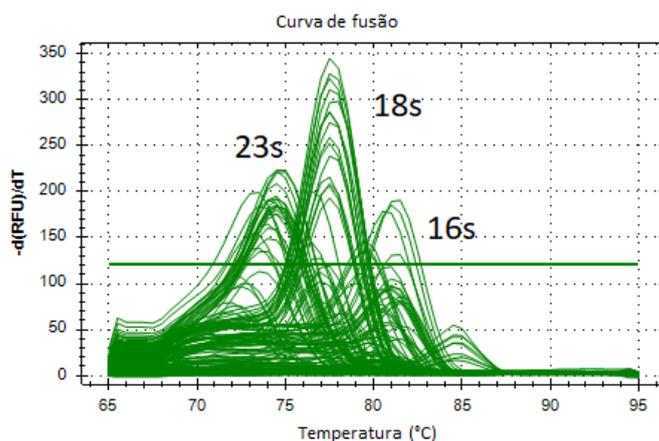


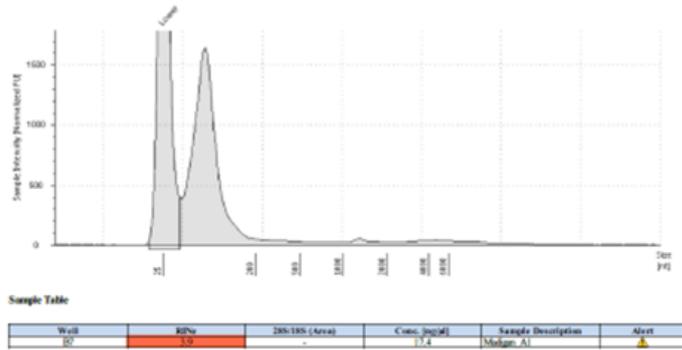
Figura A9 – Curve de “melting” para três genes endógenos no sistema patógeno-hospedeiro peixe-zebra-*M.leprae*.

O gráfico representa as reações de PCR quantitativo plotadas como a primeira derivada negativa da temperatura versus a fluorescência (-dRFU/dT). A análise da curva de fusão é uma avaliação das características de dissociação do DNA de dupla fita, elucidando a presença da transcrição desses genes endógenos, indicando a preservação do RNA do patógeno – para os genes 23S e 16S – e do RNA do hospedeiro – 18S.

9.5.1 O método de extração de RNA interfere na qualidade da integridade

A partir dos dados obtidos, avaliou-se, portanto, se os métodos de extração de RNA total interferem o padrão de integridade da amostra, tanto para o RNA eucariótico como para o RNA procariótico. Observou-se que o método de lise diferencial preservou a integridade do RNA do hospedeiro, como exemplificado pela Figura A10.

Peixe #4 - Beads



Peixe #4 – Lise diferencial

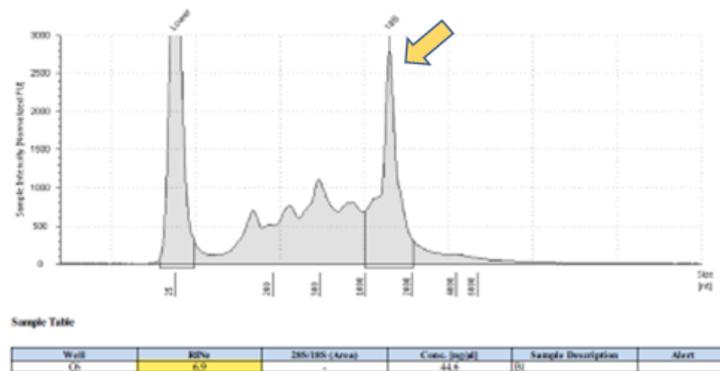


Figura A10 – Método de extração de RNA por lise diferencial mantém a conservação da integridade do RNA do hospedeiro (peixe-zebra) em comparação com o método de lise por *beads* de zircônia.

Análise da integridade e estabilidade do RNA eucariótico avaliado pela plataforma Bioanalyser Tape Station utilizando (A) o protocolo de lise por *beads* magnéticas de zircônia e (B) o protocolo de lise diferencial da amostra biológica – peixe zebra. Neste, observa-se o pico de RNAr 28S preservado.

Os resultados foram sumarizados na Tabela 4. Os peixes foram plotados de acordo com o tipo de extração de RNA, onde o sufixo “nb” indica que o processo de lise não passou por *beads* magnéticas, configurando a o protocolo de lise diferencial. Observa-se que, de modo geral, as amostras processadas por lise diferencial apresentaram maior grau de integridade do RNA extraído (acima de 7,0), onde foi

obtida concentração significativa de RNA total. Do mesmo modo, observou-se que, para ambas as técnicas, o RNA do *M. leprae* foi preservado, conforme demonstra a amplificação dos genes endógenos 23S, 16S, *hsp18* e *sodA*, configurando, portanto, a lise diferencial como método mais adequado para a obtenção de maior preservação do RNA no sistema biológico patógeno hospedeiro, para futuro prosseguimento na avaliação transcriptômica do dual RNAseq.

Tabela A1: Avaliação da integridade do RNA extraído pelos protocolos de lise diferencial e lise por beads de zircônia.

Coluna 1: nomenclatura dos peixes-zebra selvagens; coluna 2: infecção; coluna 3: tempo pós-infecção (em dias). Coluna 4: Número de Integridade do RNA, adequado para análise transcriptômica (em verde); parcialmente degradado (em amarelo) e não apto para avaliação (em vermelho). Observa-se também a avaliação do RNA eucariótico, analisado pelos genes endógenos do *M. leprae* 23S, 16S, *hsp18* e *SodA*.

| Peixe (WT) | Infectado | dias pós-infec. | Tape Station | | qPCR | | | |
|------------|-----------|-----------------|--------------|-------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| | | | RIN | [RNA] | M. leprae 23S Ct | M. leprae 16S Ct | M. leprae HSP18 Ct | M. leprae SodA Ct |
| B1 | Sim | 0 | 8,3 | 128.0 | 31.7 | 26.8 | 38.8 | 38.6 |
| B1nb | Sim | 0 | 8,1 | 107.3 | 31.3 | 25.3 | 37.5 | 39.3 |
| B1 | Não | 0 | 8,8 | 94.4 | | | | |
| B1nb | Não | 0 | 8,5 | 100.2 | | | | |
| C1 | Sim | 7 | 6,3 | 68.4 | 32.3 | 27.4 | 36.5 | |
| C1nb | Sim | 7 | 7,5 | 75.9 | 32.5 | 27.2 | 38.9 | 38.7 |
| C1 | Não | 7 | 3,4 | 20.4 | | | | |
| C1nb | Não | 7 | 6,4 | 69.8 | | | | |
| D1 | Sim | 30 | 5,1 | 31.2 | 30.1 | 26.1 | x | |
| D1nb | Sim | 30 | 7,3 | 92.3 | 29.3 | 28.5 | 39.5 | 39.3 |
| E1 | Sim | 120 | 6,6 | 40.1 | 31.2 | 27.3 | 38.4 | 38.7 |
| E1nb | Sim | 120 | 8,1 | 86.5 | 30.9 | 26.3 | 38.6 | 38.9 |
| D1 | Não | 30 | 3,4 | 19.3 | | | | |
| D1nb | Não | 30 | 7,7 | 67.8 | | | | |
| E1 | Não | 120 | 5,8 | 44.6 | | | | |
| E1nb | Não | 120 | 7,1 | 71.7 | | | | |

9.6 Discussão

Como parte do doutorado-sanduiche, a presente tese desenvolveu estudos com o modelo *in vivo* de peixe-zebra, para estabelecimento da infecção crônica por modelo experimental. Tal modelo tem um grande potencial para se investigar diversas questões que ainda não podem ser respondidas por modelo *ex vivo* ou *in vitro*. Foi possível estabelecer um método de extração e preservação do RNA total do sistema patógeno-hospedeiro, viabilizando a investigação das alterações transcriptômicas promovidos pelo *M. leprae* e pelo peixe-zebra, observando o impacto de cada organismo no contexto da infecção. Tais dados viabilizarão a realização do dual RNA-seq, que contribuirá para o campo da Hanseníase em vários níveis: i) a possibilidade

de avaliar diferentes aspectos da infecção pelo *M. leprae* em um sistema de cultura - com um organismo inteiro - para um patógeno não cultivável, possibilita a compreensão da expressão gênica de variáveis induzidas pelo patógeno em diferentes locais de infecção; ii) a possibilidade de realizar diferentes tempos de experimento trará maior precisão na progressão da doença; iii) como todo o *M. leprae* disponível para pesquisa é cultivado em camundongos “nude” ou em tatus infectados, provar que a replicação bacteriana *in vivo* pode trazer grande vantagem, pois o peixe-zebra é mais barato e mais fácil de abrigar e cada ciclo reprodutivo é muito mais curto e gera um grande descendência; iv) a manipulação do peixe-zebra também pode ser colocada sob a seleção de antibióticos, o que não é possível com camundongos e tatus, abrindo um leque de possibilidades para o entendimento da resistência do *M. leprae* e tantos outros patógenos não cultiváveis.

9.7 Perspectivas

O presente estudo tem imenso potencial exploratório para aprimorar os estudos de patógenos não cultiváveis. Com a abordagem dual RNA-seq, espera-se compreender molecularmente as características crônicas da Hanseníase pela primeira vez em um modelo animal completo, em um período de infecção inédito, o que é fundamental por se tratar de uma doença crônica que pode levar pelo menos 3 anos para se manifestar.

10 APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Artigo 1: Artigo de primeira autoria com parte dos resultados da tese de doutorado.

Título: Gene Expression Profile of Mycobacterium leprae Contribution in the Pathology of Leprosy Neuropathy.

Autores: Beatriz Junqueira de Souza, Mayara Abud Mendes, Gilberto Marcelo Sperandio da Silva, Patrícia Sammarco-Rosa, Milton Ozorio de Moraes, Marcia Rodrigues Jardim, Euzenir Nunes Sarno, **Roberta Olmo Pinheiro e Bruno Siqueira Mietto.**

Revista: FRONTIERS IN MEDICINE, v. 9, p. 1, 2022.

doi: 10.3389/fmed.2022.861586



Gene Expression Profile of *Mycobacterium leprae* Contribution in the Pathology of Leprosy Neuropathy

Beatriz Junqueira de Souza¹, Mayara Abud Mendes¹, Gilberto Marcelo Sperandio da Silva², Patricia Sammarco-Rosa³, Milton Ozorio de Moraes¹, Marcia Rodrigues Jardim¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Roberto Olmo Pinheiro^{1†} and Bruno Siqueira Mietto^{4*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Jessica L. Jones,
United States Food and Drug
Administration, United States

Reviewed by:

Héctor Serrano,
CES University, Colombia
Juliana De Moura,
Federal University of Paraná, Brazil
Huma Naz,
University of Missouri, United States
Tarun Narang,
Postgraduate Institute of Medical
Education and Research, India

*Correspondence:

Bruno Siqueira Mietto
bruno.mietto@ufjf.edu.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases – Surveillance,
Prevention and Treatment,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 24 January 2022

Accepted: 14 March 2022

Published: 15 April 2022

Citation:

Souza BJd, Mendes MA, Sperandio
da Silva GM, Sammarco-Rosa P,
Moraes MOd, Jardim MR, Sarno EN,
Pinheiro RO and Mietto BS (2022)
Gene Expression Profile of
Mycobacterium leprae Contribution in
the Pathology of Leprosy Neuropathy.
Front. Med. 9:861586.
doi: 10.3389/fmed.2022.861586

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ²Clinical Research Laboratory in Chagas Disease, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ³Laboratory Animal House, Lauro de Souza Lima Institute, Sao-Paulo, Brazil, ⁴Laboratory of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

Peripheral neuropathy is the main cause of physical disability in leprosy patients. Importantly, the extension and pattern of peripheral damage has been linked to how the host cell will respond against *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) infection, in particular, how the pathogen will establish infection in Schwann cells. Interestingly, viable and dead *M. leprae* have been linked to neuropathology of leprosy by distinct mechanisms. While viable *M. leprae* promotes transcriptional modifications that allow the bacteria to survive through the use of the host cell's internal machinery and the subvert of host metabolites, components of the dead bacteria are associated with the generation of a harmful nerve microenvironment. Therefore, understanding the pathognomonic characteristics mediated by viable and dead *M. leprae* are essential for elucidating leprosy disease and its associated reactional episodes. Moreover, the impact of the viable and dead bacteria in Schwann cells is largely unknown and their gene signature profiling has, as yet, been poorly explored. In this study, we analyzed the early differences in the expression profile of genes involved in peripheral neuropathy, dedifferentiation and plasticity, neural regeneration, and inflammation in human Schwann cells challenged with viable and dead *M. leprae*. We substantiated our findings by analyzing this genetic profiling in human nerve biopsies of leprosy and non-leprosy patients, with accompanied histopathological analysis. We observed that viable and dead bacteria distinctly modulate Schwann cell genes, with emphasis to viable bacilli upregulating transcripts related to glial cell plasticity, dedifferentiation and anti-inflammatory profile, while dead bacteria affected genes involved in neuropathy and pro-inflammatory response. In addition, dead bacteria also upregulated genes associated with nerve support, which expression profile was similar to those obtained from leprosy nerve biopsies. These findings suggest that early exposure to viable and dead bacteria may provoke Schwann cells to behave differentially, with far-reaching implications for the ongoing neuropathy seen in leprosy patients, where a mixture of active and non-active bacteria are found in the nerve microenvironment.

Keywords: leprosy, *Mycobacterium leprae*, peripheral nervous system, Schwann cell, host-pathogen interaction

INTRODUCTION

Leprosy neuropathy is a chronic neurological condition, caused by the infection of the nerve by its etiologic agents, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* (1–5). *M. leprae* infection provokes early pathological changes in the host cell that are, to some extent, associated with the late degenerative appearance of the infected nerves (6, 7). Schwann cells, the glial cells of the peripheral nervous system, are the preferable host for *M. leprae* entry, persistence, and replication within the nerve (8–11). Therefore, much attention has been given to the molecular and cellular alterations driven by leprosy bacilli once inside Schwann cells in order to identify the underlying reasons that culminate in the severe neuropathy seen in patients.

The immune response elicited in the nerve microenvironment against the bacilli is a key component that may lead to the distinct clinical manifestations (4). Infected Schwann cells produce a broad panel of inflammatory chemokines and cytokines, that accompanied with cell-mediated immune response, have been linked to the manifestation of neural pain and leprosy neuritis in patients (12–15). Of importance, this immunomodulation profile seen in infected Schwann cells was reported to occur before the reprogramming of the Schwann cells to the immature phenotype, highlighting the crucial role of the immune signaling network in the context of the early stages of *M. leprae* infection (16, 17). Additionally, *M. leprae* infection of Schwann cells has been associated with alterations in the glucose/lactate metabolic pathway (18, 19), lipid/cholesterol accumulation (20, 21), mitochondrial dysfunction (11), and myelin dismantling (22–24). Some of these changes were also confirmed in leprosy patients, and are suggested to cause the ongoing neuropathy and the observed tissue fibrosis and loss of nerve function experienced by leprosy individuals (14, 25). However, while these events may arise from modifications of the host Schwann cell's supportive function of the nerve, the accompanying changes in gene expression profile are largely unknown.

Studies have shown that the phenolic glycolipid 1 (PGL-1), a major *M. leprae* cell wall pathogenic component, is essential for *M. leprae* internalization into Schwann cells and has also been extensively attributed to induce pathology *in vitro* and in experimental infectious models (10, 23, 26). The understanding of the immunopathogenic mechanisms related to nerve damage in leprosy patients is pivotal for the development of new therapeutic strategies to control leprosy neuropathy. The treatment of nerve damage with steroids is effective but at least 40% of patients relapse and require a further course of steroids (27, 28).

Because leprosy neuropathy is an intricate complex disease, in which both viable and dead *M. leprae* may have a detrimental role for disease progression, it is necessary to fully understand and decipher the contribution of viable and dead bacteria in altering Schwann cell biology. For example, it was suggested that dead bacilli, unlike viable *M. leprae*, make Schwann cells susceptible to attack by killer cells (29). Moreover, dead bacteria and its components, such as lipoarabinomannan (LAM), were also reported to cause neural damage via modulation of the autophagic flux (30) and the complement attack of the nerve (31).

Despite these observations, the early effects of viable and dead *M. leprae* on the global Schwann cell gene expression profile that may be linked to primary neural leprosy are still largely unknown. Therefore, in the present study, we analyzed the expression profile of transcripts involved in neuropathy, glial cell plasticity, nerve repair, and the inflammatory network in leprosy and non-leprosy nerve biopsies and after challenging Schwann cells with viable and dead *M. leprae* independently. Our utmost goal was to provide novel evidence of how viable and dead bacteria modulate Schwann cell gene expression responses along with a detailed statistical correspondence to several histopathological findings commonly observed in nerve biopsies from leprosy and non-leprosy patients.

MATERIALS AND METHODS

Human Nerve Biopsy

Nerve biopsy specimens from eight patients diagnosed with pure neural leprosy (PNL) were obtained from volunteers recruited at the Souza Araujo Outpatient Unit (Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation) (Table 1). Nerve biopsy fragments, as well their nerve sections, were available for histopathological staining and PCR analysis. For the present study, patients with PNL were selected who did not present any sign of nerve endoneurial fibrosis to ensure the chosen nerve specimens were in the early stages of leprosy neuropathy progression. This selection was made after analyzing the nerve section stained with the hematoxylin and eosin and Gomori trichrome stains under a light microscope following previously published protocol (6). Exclusion criteria were patients with coinfection, metabolic comorbidities such as diabetes, and signs of endoneurial fibrosis, pregnant women and patients under 18 years. For the control group, nerve biopsy specimens from three individuals who underwent brachial plexus surgery were kindly donated by the University Hospital Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRRJ). This study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (number of purports: 2.227.887).

Schwann Cell Culture

The human Schwann cell line, ST88-14, was used in the present study for the *in vitro* assays. Prior to the assays, cells were cultured in RPMI media (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% penicillin, 1% streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 10% fetal bovine serum. The cells were maintained in a controlled environment at 37°C and 5% CO₂. For the assays, ST88-14 cells were suspended in culture medium without penicillin-streptomycin and cultured at a density of 5×10^5 cells/well on six-well culture plates. The cell culture was infected with viable *M. leprae*, gently donated by Lauro de Souza Lima Institute (Sao-Paulo, Brazil) or stimulated with dead (gamma-irradiated) *M. leprae*, obtained through BEI Resources (#NR-19326), at a multiplicity of infection (MOI) of 50 bacilli/cell (50:1). After 24 h of incubation, supernatants were harvested and kept frozen at -20°C until quantification of inflammatory chemokines and cytokines. Additionally, Schwann cell cultures were subjected to total RNA extraction procedures.

TABLE 1 | Clinical data from PNL patients included in the present study ($n = 8$).

| Age (years) | Gender | Leprosy clinical form | Leprosy reaction | Multidrug therapy | Physical disability level |
|-------------|--------|-----------------------|------------------|-------------------|---------------------------|
| 67 | female | PNL | RR + Neuritis | No | 0 |
| 26 | male | PNL | RR + Neuritis | No | 0 |
| 34 | female | PNL | No | No | 0 |
| 48 | male | PNL | RR + Neuritis | No | 0 |
| 47 | female | PNL | RR | No | 2 |
| 22 | male | PNL | RR | No | 2 |
| 22 | female | PNL | No | No | 0 |
| 48 | female | PNL | No | No | 0 |

PNL, Pure Neural Leprosy; RR, Reverse Reaction.

RNA Extraction and RT-qPCR Array

Schwann cell cultures and nerve biopsy fragments were mechanically grinded and resuspended in 1 mL TRIzol (Gibco BRL) and RNA was obtained following the manufacturer's orientations and stored at -70°C until use. After, 10 ng of total RNA was reverse-transcribed to cDNAs using the Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and then amplified using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) or TaqMan assays (ThermoScientific). The GeneQueryTM Human Schwann cell PCR Primer library array kit (Realtime Primers, Elkins Park, PA, USA #GK096) was used to profile total gene expression in Schwann cells and human nerve biopsies. The full list of genes is available on <https://www.sciencelonline.com/genequerytm-human-schwann-cell-biology-qpcr-array-kit.html> (accessed on 27th Jan 2022). The TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and Human TaqMan MGB-Probe assays (ThermoScientific), were used to determine mRNA expression of TNF (HS-9999043_m1), IL-23A (HS-0037334324_m1), CCL2 (HS-00234140_m1) and CXCL10 (HS-0017042_m1). The RT-qPCR array was performed in triplicate, and the amplifications were carried out in the ViiA7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The $\Delta\Delta\text{CT}$ method (32) was used to analyze the obtained data after normalization using the endogenous control of the housekeeping gene *RPL13*, for SYBR Green analysis, or normalized using the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; HS-02758991_g1), for TaqMan assays.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

For cytokine/chemokine release evaluation, the supernatants from control ST88-14 cultures and *M. leprae* (viable or dead) infected ST88-14 cultures were harvested after 24 h and stored at -20°C until use. The following inflammatory mediators (TNF, TGF- β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-10, MCP-1/CCL2, and IP-10/CXCL10) were quantified by ELISA technique following the manufacturer's orientations (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Statistical Analysis

Analyses of the experiments were performed by unpaired *t*-test, Kruskal-Wallis test or one-way ANOVA. For all statistical

analyses the value of $p \leq 0.05$ was considered significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Alternatively, a correlogram graph was generated to evaluate the correlation between histopathological characteristics in nerve fragments and the pattern of gene expression. A Pearson's correlation was applied to each pair of variables present in the data. The correlation value varies between -1 and 1 , with negative values implying the existence of negative correlation and positive values implying positive correlation. The strength of the correlation is measured by the proximity of the value to 1 or -1 , with values closer to these suggesting stronger correlation. Each regression was performed using the gene expression as the response variable and initially both PCR and Acid Fast Bacilli (AFB) as covariates. Each coefficient had its statistical significance tested by the *t*-test for regression coefficients. In the cases where one of the variables was not statistically significant, the model was fitted again using only the statistically significant covariate. Finally, the model's goodness of fit was evaluated using R^2 , a statistical measure that evaluates how much of the variation on the response variable is explained by the covariates.

RESULTS

Gene Profiling Analysis of Leprosy and Non-leprosy Nerve Biopsies

In order to identify the molecular pathways related to primary neural leprosy (PNL), a Schwann cell biology PCR array was performed comparing gene expression in nerve fragments from PNL patients and non-leprosy controls. As illustrated in **Figure 1A**, differentially expressed patterns of genes related to peripheral neuropathy, Schwann cell plasticity/reprogramming, and nerve support could be observed. Regarding neuropathy-related genes, some targets were statistically elevated in nerves from PNL patients, such as *HLA-DRB1*, *APOB*, and *WNK*, while others were downregulated, including *HLA-DQB1* and *PLP1*. Interestingly, *HLA-DRB1*, previously reported to influence leprosy susceptibility (33), was upregulated 60-times more in leprosy nerves when compared to non-leprosy nerves. *APOB* and *WNK* were also augmented in leprosy nerves, by 10- and 4-times more, respectively.

By examining the mRNA profile involved in Schwann cell dedifferentiation, we observed that *cJUN*, *GDNF*, and *MAPK14* were statistically upregulated, while *ERBB2*, *GJA1*, *BDNF*, and *MAPK3* were significantly decreased in nerves from PNL patients. Although neurotrophins, such as BDNF, are required for axon regeneration, here we found that *BDNF* was downregulated in PNL patients, which is in agreement with a previous report that investigated neurotrophin expression in leprosy infection (34).

In summary, our PCR array analysis remarkably showed that most genes involved in nerve regeneration were significantly increased in leprosy nerve biopsies, possibly suggesting a continuous balance of nerve degeneration and an attempt to regrow during the course of infection *in vivo*.

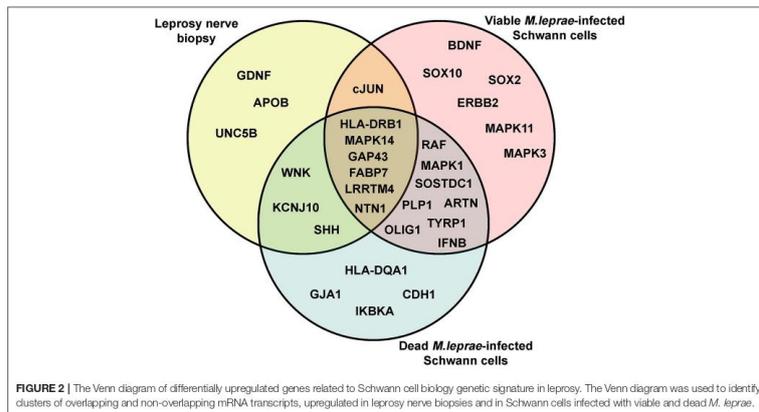
Viable and Dead *M. leprae* Distinctly Modulate Schwann Cell Functional Genes

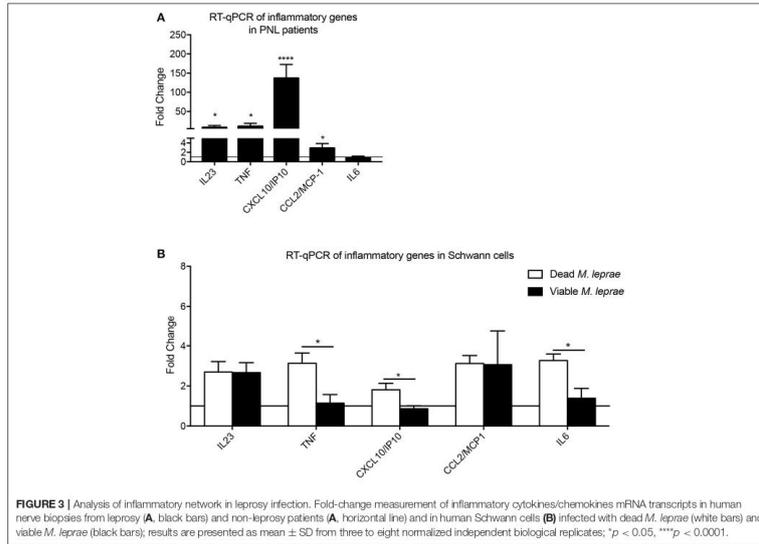
Neural damage in leprosy has been associated with the role played by viable and dead bacteria after being in contact with Schwann cells (10, 35). Therefore, we were interested in exploring the early effect of *M. leprae* infection on Schwann cell biology genes. For that, we infected human Schwann cells with viable and dead *M. leprae* and screened changes in the mRNA levels after 24 h of infection using the Schwann cell biology PCR array. As observed in **Figures 1B–D**, dead *M. leprae* increased the expression of *WNK*, *IFNB*, *IKBKA*, and *HLA-DQA1* (genes related to neuropathy), in addition to *GJA1* and *RAF1* (for Schwann cell reprogramming) and *KCNJ10*, *OLIG1*, *SHH*, and *SOSTDC1* (for neural regeneration). Interestingly, viable *M. leprae* appeared to modulate genes related to Schwann cell

plasticity and dedifferentiation, such as *BDNF*, *cJUN*, *SOX10*, *ERBB2*, and *MAPK11*. In summary, this first set of analysis points to the notion that dead *M. leprae* induces greater expression of peripheral neuropathy and nerve regeneration support genes whereas viable *M. leprae* acts by modulating genes related to Schwann cell plasticity and dedifferentiation. We have summarized this gene intersection in a Venn diagram (**Figure 2**).

Inflammatory Network Analysis Suggests That Dead and Viable *M. leprae* Increase CCL2 Expression

We next aimed to analyze the inflammatory network profile in leprosy and non-leprosy nerve biopsies, as well as *in vitro*, using Schwann cells challenged with viable and dead bacteria. The human nerve analysis indicated that *IL23*, *TNF*, *CXCL10*, and *CCL2* were increased in PNL patients when compared with control biopsies (**Figure 3A**). In addition, when we analyzed changes in Schwann cells *in vitro*, we observed that dead *M. leprae* induced a higher expression of *TNF*, *CXCL10*, and *IL6* in Schwann cells when compared with those infected with viable bacilli (**Figure 3B**). Furthermore, cells infected with viable *M. leprae* increased *IL23* and *CCL2* expression when compared to non-stimulated cultures. These results support the notion that dead bacteria are likely involved in the induction of a pro-inflammatory profile, suggesting that such pro-inflammatory mediators, in the context of neural involvement shown by the biopsies, are induced by dead bacteria present at the site of infection.



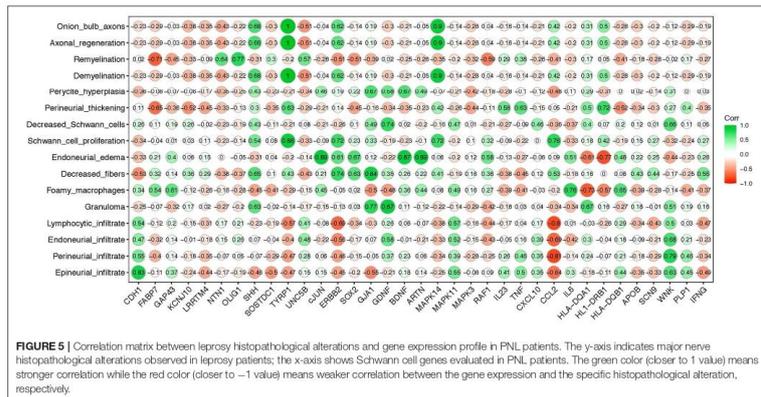
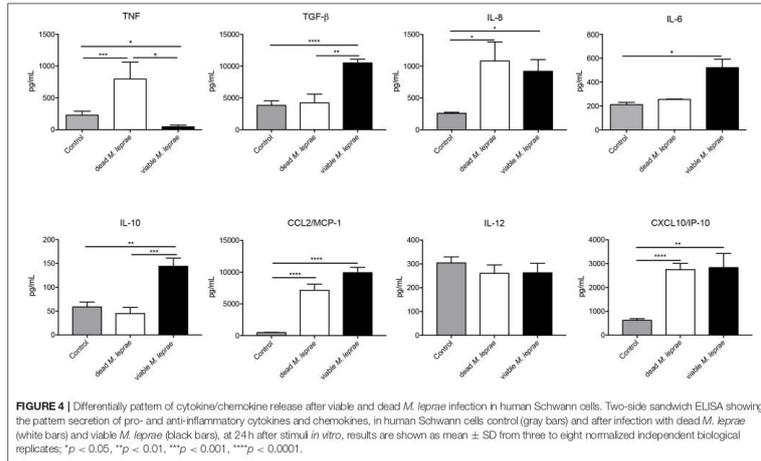


Viable and Dead *M. leprae* Promote a Distinct Inflammatory Response in Schwann Cells

We substantiated our transcriptional analysis by evaluating the cytokine network production in Schwann cells challenged with viable and dead bacilli. For that, we performed analysis of cytokine levels in 24-h supernatants, and found that dead *M. leprae* caused an increase in the TNF, IL-8, MCP-1/CCL-2, and CXCL-10 levels in comparison to non-stimulated control cultures (Figure 4). Conversely, viable *M. leprae* infection led to increased TGF- β , IL-8, IL-6, IL-10, MCP-1/CCL2, and CXCL-10 in comparison to non-stimulated controls. We also observed a statistical reduction in TNF levels after viable *M. leprae* infection when compared to dead stimulated cultures and controls. Together, these results suggest that dead *M. leprae* induces pro-inflammatory mediators in human Schwann cells, whereas viable *M. leprae* preferably promote anti-inflammatory cytokines like IL-10 and TGF- β and reduced TNF production (Figure 4).

CCL2 Correlates With Decreased Fiber in Histopathology, AFB and PCR From Nerve Fragments

We next applied a correlation matrix to analyze a potential relationship of histopathological findings and changes in gene profiling of Schwann cells in order to evaluate top molecular signature candidates during the early stages of nerve damage in leprosy patients. The overall nerve pathological findings are listed on the y-axis of Figure 5. Using this correlogram, we observed that, onion bulb axons, axonal regeneration, demyelination, and Schwann cell proliferation were positively correlated with *SHH*, *TYRP1*, *ERBB2*, and *MAPK14* genes. With regards to remyelination appearance, this was positively correlated with *NTN1*, *OLIG1*, and *UNC5B* genes. Foamy macrophages correlated with *IL6* and granulomas were positively correlated with *GDNF*, *GJA1*, and *SHH* (Figure 5). *CCL2* was negatively correlated with lymphocytic, perineurial, and epineurial infiltrate and positively correlated with decreased fibers and Schwann cell proliferation (Figure 5).



Acid Fast Bacilli (AFB) staining in nerve lesions and positive PCR are two commonly used tools for diagnosing PNL at clinics. Thus, we next searched for a potential association between the presence of the bacilli in nerve and changes

in gene expression. It was statistically relevant that the expression of *CCL2* and *CDH1* positively correlated with AFB, while, *CCL2* and *GDNF* expression negatively correlated with PCR (Table 2).

TABLE 2 | Linear regression between *M. leprae* PCR and AFB values against the global gene expression.

| Variable | Estimative | Standard deviation | P-value |
|----------------|------------|--------------------|-------------|
| CCL2 | | | |
| Intercept | 0.622 | 1.112 | 0.5998 |
| FAB | 5.247 | 1.435 | 0.0147* |
| PCR | -4.445 | 1.284 | 0.0180* |
| R ² | 0.778 | | |
| CDH1 | | | |
| Intercept | 0.108 | 0.253 | 0.6818 |
| BFAB | 1.014 | 0.412 | 0.0493* |
| R ² | 0.502 | | |
| GDNF | | | |
| Intercept | 3.119 | 0.503 | 0.000915*** |
| PCR | -1.596 | 0.581 | 0.033469* |
| R ² | 0.557 | | |

Among all the genes evaluated, CCL2, CDH1, and GDNF presented a statistical significance with AFB and/or PCR. **p* < 0.05, ****p* < 0.001.

DISCUSSION

The comprehension of Schwann cell-*M. leprae* pathological interactions is vital to fully understand disease progression in experimental models as well as in leprosy patients. Moreover, how viable and dead bacteria affect Schwann cell biology is largely unknown and poorly explored in the field. Therefore, in the present work, we used the *in vitro* host-pathogen interaction model to determine how viable and dead bacteria modify the global gene expression profile as soon as the bacteria comes in contact with the Schwann cells. Furthermore, we extended these early changes in the Schwann cell gene profile in response to infection to the analysis of patient nerve biopsies, establishing a potential link to the early response pattern during the disease progression in leprosy individuals.

We initially performed an exploratory, broad gene expression analysis of Schwann cells challenged with viable or dead bacteria, along with data obtained from nerve biopsies. The following families of genes involved in the nerve response to injury were investigated: (i) peripheral neuropathy, (ii) inflammatory network, (iii) Schwann cell plasticity/dedifferentiation, and (iv) nerve regeneration support.

Among the global gene expression, *HLA-DRB1*, *MAPK14*, *GAP43*, *FABP7*, *NTN1*, and *LRRTM4* were upregulated in nerve biopsies from PNL patients and in viable and dead *M. leprae*-infected Schwann cells, in comparison with the respective control groups (Figure 2). It has been described that human leukocyte antigen (*HLA*) alleles affect the host immune response against *M. leprae* (36, 37). *HLA-DRB1* is one of the most upregulated genes in multiple sclerosis, having a special role in inducing demyelination (38). Moreover, this transcript is consistently related to the tuberculoid leprosy (T-Lep) clinical form, while *HLA-DQB1* has a strong relation with the L-Lep clinical form (39). In the present study, *HLA-DQB1* was downregulated in PNL patients, in comparison with the uninfected nerve specimens

(Figure 1A). Additionally, receptors for the axon guidance molecule, netrin-1 (*NTN1*), are expressed by Schwann cells and play a role in peripheral regeneration and induce the regeneration phenotype (40).

When evaluating the set of genes related to Schwann cell plasticity and dedifferentiation, some serine/threonine kinases, such as mitogen-activated protein kinase 14 (*MAPK14*), widely known for its role at the inflammasome pathways in the neuroglia (41), were found to be upregulated in PNL patients. However, there is a lack of information regarding *MAPK14* in leprosy. *GAP43*, the major protein of the axon growth-cone that plays a role in axon growth (42) and regeneration was also upregulated, which suggests a tentative role for axonal regrowth in the injured infected nerve. *SHH*, *WNK*, and *KCNJ10* were upregulated in leprosy nerve biopsies and in dead *M. leprae*-infected Schwann cells (Figure 2). The sonic hedgehog gene (*SHH*), which has been previously reported in nerve damage (43, 44), may also trigger regeneration and induce Schwann cell proliferation, as an attempt to counteract the harm caused by the bacilli (44). *KCNJ10* encodes the inward-rectifying potassium channel (Kir4.1). Alteration of *KCNJ10* gene expression is related to neuropathies, such as Huntington's disease East/SeSAME syndrome, by elevating the extracellular K⁽⁺⁾, which consequently leads to abnormal neuron excitability (45, 46). It was demonstrated in mice that inflammation can silence (Kir4.1) channels, leading to hyperalgesia and trigeminal pain (47). Despite the absence of studies relating the *KCNJ10* gene and *M. leprae* infection, it seems this may be a potential pathway to be explored for leprosy neuritis in the future. *cJUN* was the only gene statistically upregulated in PNL biopsies and viable *M. leprae*-infected Schwann cells in comparison to the respective controls (Figure 2). *cJUN* is a master Schwann cell regulator involved in the transition of a differentiated phenotype toward a progenitor/stem-cell like stage (48) and has also previously been reported to be upregulated, among other developmental and neural crest genes, during *M. leprae* infection in mouse Schwann cells (35).

PLP1, *SOSTDC1*, *RAF1*, *ARTN*, *OLIG1*, *MAPK1*, *IFNB*, and *TYRPI* were upregulated in viable and dead *M. leprae*-infected Schwann cells, but not in the PNL biopsies. The tyrosinase-related protein 1 (*TYRPI*) plays a role in the melanin biosynthetic pathway, being mostly expressed by melanocytes (49). It has been documented that leprosy patients may present hyper or de-pigmented lesions due to a defective transfer of melanin (50). The melanocytes have been recently associated with the innate immune response, by producing inflammatory cytokines, such as IL-1 β (50). But the role of the *TYRPI* pathway in the peripheral nerve requires further investigation. It was documented that interferon beta (*IFNB*) is increased during cell stress conditions, but the lack of this protein leads to neuroinflammation (51, 52). *IFNB* is essential to start the cell fate pathway driven by *NUPR1*, a gene signature that contributes to a progressive infection in human cells (53). Oligodendrocyte transcription factor 1 (*OLIG1*) is an important protein of the remyelination phenotype, usually upregulated after a disturbance in the cell microenvironment (54). It is well described that during diabetic neuropathy, the lack of insulin

leads to the demyelination phenotype due to a downregulation of *OLIG1* (54). On the other hand, in this study, some genes like *MAPK3* (*ERK1*), an important extracellular signal-regulated kinase and Schwann cell migration and proliferation molecule (55) was downregulated in PNL patients. Likewise, *ErbB2*, a well-known demyelination inducer and *Connexin43—GJA1—* were also significantly reduced in PNL patients. Despite the lack of information about *GJA1* in leprosy, this has been described in neural impairment, like in the pathogenesis of Alzheimer's disease, where *GJA1* downregulation leads to reduced levels of ApoE (56, 57).

While we know that the polarity of leprosy can result from the host's inflammatory response profile, multiple features of neurological involvement may also occur. For example, polymorphisms in certain genes such as *IL10*, *ninjurin 1* and *TNF* have been associated with leprosy susceptibility (58–60).

In the present work, we were able to correlate the pattern of histopathological impairments with alteration in the gene expression profile induced by *M. leprae* infection. The correlogram analysis demonstrated, for the first time, a statistically significant correlation between the gene signature from the early stages—before fibrosis—and the histopathological alterations of the nerve damage in leprosy neuropathy. Regarding the histopathological features, *TYRP1*, *SHH*, and *MAPK14* expression were strongly correlated to onion bulb axons, axon regeneration, demyelination, and Schwann cell proliferation, while *MCPI/CCL2* was strongly negatively correlated with nerve inflammatory infiltrates: epineurial, endoneurial, perineurial, and lymphocytic infiltrates. It is important to realize that the weak correlation with endoneurial, perineurial, and epineurial fibrosis was due to the inclusion criteria for this study, which selected patients with no signs of fibrosis.

The biserical correlation demonstrated that the monocyte chemoattractant protein 1 (*MCPI/CCL2*) was positively correlated with AFB and negatively correlated with PCR, which strongly indicates the correlation of increased expression of this gene by viable bacteria. This finding corroborates a previous study by our group, which showed activation of the ESX-1 mycobacterial system by the viable *M. leprae*, leading to the activation of the *OASL* gene and the induction of *CCL2*, impairing the host bactericidal response, which was not observed with dead *M. leprae* stimuli in THP-1 cells (61). More than that, independently, Schwann cells are responsible for the triggering response of nerve damage through initiating the clearance of the debris by myelinophagy, followed by macrophage recruitment, which is especially regulated by *CCL2* (62). In this sense, we see the relevance of *CCL2* gene activation not only as a protective mechanism in the maintenance of mycobacterial viability, but also as a biological marker indicative of positive AFB. *CCL2* has been described as one of the innate immunity genes immediately activated in the context of infection *in vitro* (35). Thus, despite the relevant findings, there is still a way to go in terms of understanding the role of this chemokine in infection and nerve damage during leprosy.

To strengthen the data obtained from the gene signature of *M. leprae* infection, we evaluated the immunomodulatory profile

secreted by Schwann cells without infection and challenged with viable and dead *M. leprae*. We observed a pro-inflammatory profile elicited by the dead bacilli, while an anti-inflammatory microenvironment appeared to be promoted by infection with the viable bacteria. Studies have shown that macrophage infection by viable *M. leprae* leads to a regulatory T cell response rather than a cytotoxic T cell response, which contributes to the persistence of the infection in the host (63, 64). This characteristic is already well demonstrated in patients with L-lep, which leads to a high bacillary load. In the present work, we demonstrated that Schwann cells also behave in a way to induce the anti- or pro-inflammatory phenotype according to the bacilli viability. Since in reactional episodes there is a mixture of viable and dead bacilli, it is interesting to point out the role of the Schwann cells, and not only the macrophages, as modulators of the reaction process in the nerve, which can even lead to leprosy neuritis (14).

CONCLUSION

In the present study, we identified the early impact of viable and dead bacteria, independently, on modifying the gene expression profile of human Schwann cells *in vitro*. We also described a molecular signature associated with neural damage in early stages of pure neural leprosy from patients (i.e., *HLA-DRB1*, *MAPK14*, *GAP43*, *FABP7*, *NTN1*, and *LRRTM4*). Leprosy is a complex intricate disease and the identification of this genetic profiling may contribute for the fully understanding of leprosy neuropathy pathogenesis with the long-term goal of identifying these pathways as targets for the development of effective therapeutic strategies. We acknowledge the relatively limited number of human nerve samples, as in our experimental design we narrowed our analysis to nerve biopsies of leprosy patients with no signs of neural fibrosis and at the initial stages of neural damage. Therefore, future work with additional nerve samples from leprosy individuals, at distinct clinical stages, are important to advance this host-pathogen interactions and associated genetic analysis in larger cohorts. In summary, these results open new perspectives for the understanding of the genetic signature of neural commitment in leprosy disease.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Oswaldo Cruz Foundation Ethics Committee (number of purports: 2.227.887). The Ethics Committee waived the requirement of written informed consent for participation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BS, RP, and BM designed and carried out experiments, collected and interpreted data, and prepared illustrations. BS, GS, RP, and BM analyzed the data. BS, MM, GS, PS-R, MOM, MJ, ES, RP, and BM reviewed and edited the manuscript. ES, RP, and BM conceptualized and designed experiments, supervised the study, interpreted data, and obtained funding. BS, RP, and BM wrote the manuscript. PS-R provided viable *M. leprae*. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Dead *M. leprae* was obtained through BEI Resources, NIAID, NIH: *Mycobacterium leprae*, Strain NHDP, Gamma-Irradiated Whole Cells (lyophilized), NR-19326.

REFERENCES

- Save MP, Shetty VP, Shetty KT, Antia NH. Alterations in neurofilament protein(s) in human leprosy nerves: morphology, immunohistochemistry and Western immunoblot correlative study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* (2004) 30:635–50. doi: 10.1111/j.1365-2990.2004.00578.x
- World Health Organization. *Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities (Plan Period: 2006-2010)*. Geneva: WHO (2005).
- Save MP, Shetty VP, Shetty KT. Hypophosphorylation of NF-H and NF-M subunits of neurofilaments and the associated decrease in KSPXX kinase activity in the sciatic nerves of swiss white mice inoculated in the foot pad with *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev.* (2009) 80:388–401. doi: 10.47276/lr.80.4.388
- Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate immune responses in leprosy. *Front Immunol.* (2018) 9:518. doi: 10.3389/fimmu.2018.00518
- Depp B, Collin SM. *Mycobacterium lepromatosis* as a second agent of Hansen's disease. *Front Microbiol.* (2021) 12:698588. doi: 10.3389/fmicb.2021.698588
- Antunes SL, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery IA, Corte-Real S, et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* (2012) 107:246–53. doi: 10.1590/S0074-02762012000200015
- Jardim M, Vital RT, Ilaramendi X, Hacker M, Junqueira B, Pitta IJR, et al. The red flags of ulnar neuropathy in leprosy. *PLoS One.* (2021) 16:e0258904. doi: 10.1371/journal.pone.0258904
- Scollard DM, Dasco MM, Abad-Venida ML. Tuberculosis and leprosy: classical granulomatous diseases in the twenty-first century. *Dermatol Clin.* (2015) 33:541–62. doi: 10.1016/j.det.2015.03.016
- Serrano-Coll H, Salazar-Peláez L, Acevedo-Saenz L, Cardona-Castro N. *Mycobacterium leprae*-induced nerve damage: direct and indirect mechanisms. *Pathog Dis.* (2018) 76:fy062. doi: 10.1093/femsdp/fty062
- Diaz-Acosta CC, Dias AA, Rosa TISA, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLoS Pathog.* (2018) 14:e1007151. doi: 10.1371/journal.ppat.1007151
- Oliveira ME, Medeiros RCA, Mietto BS, Calvo TL, Mendonça APM, et al. Reduction of host cell mitochondrial activity as *Mycobacterium leprae*'s strategy to evade host innate immunity. *Immunol Rev.* (2021) 301:193–208. doi: 10.1111/imr.12962
- Spierings E, De Boer T, Zuilianello L, Ottenhoff TH. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol.* (2000) 78:349–55. doi: 10.1046/j.1440-7711.2000.00939.x
- Spierings E, De Boer T, Zuilianello L, Ottenhoff TH. The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae* in the immunopathogenesis of nerve damage in leprosy. *Lepr Rev.* (2000) 71(Suppl):S121–9. doi: 10.5935/0305-7518.20000083
- Andrade PR, Jardim MR, da Silva AC, Manhaes PS, Antunes SL, Vital R, et al. Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2016) 75:272–83. doi: 10.1093/jnen/nlv027
- Angat DBM, Pinheiro RO, Vieira JDS, Cobas RA, Hacker MAV, Pitta IJR, et al. Cytokine levels in neural pain in leprosy. *Front Immunol.* (2020) 11:23. doi: 10.3389/fimmu.2020.00023
- Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Wadaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambuska A. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cell Reprogram.* (2014) 16:9–17. doi: 10.1089/cell.2013.0064
- van Hooij A, Gdul A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Immunol Rev.* (2021) 301:175–92. doi: 10.1111/imr.12966
- Medeiros RCA, Girardi KD, Cardoso FK, Mietto BS, Pinto TG, et al. Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem.* (2016) 291:21375–87. doi: 10.1074/jbc.M116.725283
- Borah K, Girardi KDCV, Mendum TA, Lery LMS, Beste DJV, Lara FA, et al. Intracellular *Mycobacterium leprae* utilizes host glucose as a carbon source in schwann cells. *mBio.* (2019) 10:e02351–19. doi: 10.1128/mBio.02351-19
- Mattos KA, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol.* (2011) 187:2548–58. doi: 10.4049/jimmunol.1101344
- Rosa TISA, Marques MAM, DeBoard Z, Hutchins K, Silva CAA, Montague CR, et al. Reductive power generated by *Mycobacterium leprae* through cholesterol oxidation contributes to lipid and ATP synthesis. *Front Cell Infect Microbiol.* (2021) 11:709972. doi: 10.3389/fcimb.2021.709972
- Mietto BS, Andrade PR, Jardim MR, Antunes SL, Sarno EN. Demyelination in peripheral nerves: much to know from leprosy neuropathy. *J Mult Scler.* (2016) 3:2. doi: 10.4172/2376-0389.1000174
- Madigan CA, Gambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng TY, Zailaa J, et al. A macrophage response to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy. *Cell.* (2017) 170:973–85.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.030
- Mietto BS, de Souza BJ, Rosa PS, Pessolani MCV, Lara FA, Sarno EN. Myelin breakdown favours *Mycobacterium leprae* survival in Schwann cells. *Cell Microbiol.* (2020) 22:e13128. doi: 10.1111/cmi.13128
- Petito RB, Amadeu TP, Pascarelli BM, Jardim MR, Vital RT, Antunes SL, et al. Transforming growth factor- β 1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol.* (2013) 72:351–66. doi: 10.1097/NEN.0b013e31828b6c60
- Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talis JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* (2000) 103:511–24. doi: 10.1016/S0092-8674(00)00142-2
- Walker SL, Nicholls PG, Dhakal S, Hawksworth RA, Macdonald M, Mahat K, et al. A phase two randomised controlled double blind trial of high dose intravenous Methylprednisolone and oral prednisolone versus intravenous normal saline and oral prednisolone in individuals with leprosy type 1 reactions and/or nerve function impairment. *PLoS Negl Trop Dis.* (2011) 5:e1041. doi: 10.1371/journal.pntd.0001041

28. Lockwood DN, Darlong J, Govindharaj P, Kurian R, Sundarrao P, John AS, AZALEP a randomized controlled trial of azathioprine to treat leprosy nerve damage and Type 1 reactions in India: main findings. *PLoS Negl Trop Dis*. (2017) 11:e0005348. doi: 10.1371/journal.pntd.0005348
29. Steinhoff U, Wand-Würtenberger A, Bremerich A, Kaufmann SH. *Mycobacterium leprae* renders Schwann cells and mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells. *Infect Immun*. (1991) 59:684-8. doi: 10.1128/iai.59.2.684-688.1991
30. Silva BJ, Barbosa MG, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA, Córte-Real S, et al. Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization. *PLoS Pathog*. (2017) 13:e1006103. doi: 10.1371/journal.ppat.1006103
31. Bahia El Idriasi N, Das PK, Hutter K, Rosa PS, Vreijling J, Troost D, et al. *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of liparabinomannan as the dominant complement activator. *Acta Neuropathol*. (2015) 129:653-67. doi: 10.1007/s00401-015-1404-5
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta-Delta C(T)) method. *Methods*. (2001) 25:402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
33. da Silva SA, Mazini PS, Reis PG, Sell AM, Tsuneto IT, Peixoto PR, et al. HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and resistance. *BMC Infect Dis*. (2009) 9:134. doi: 10.1186/1471-2334-9-134
34. Nogueira MRS, Amor NG, Michellin LB, Filho NC, Rosa PS, Latini ACP, et al. Effect of *Mycobacterium leprae* on neurotrophins expression in human Schwann cells and mouse sciatic nerves. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. (2020) 115:e200075. doi: 10.1590/0074-02760200075
35. Masaki T, Qu J, Choleva-Waclaw J, Burr K, Raauu R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell Vol*. (2013) 152:51-67. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.014
36. de Souza-Santana FC, Marcos EV, Nogueira ME, Ura S, Tomimori J. Human leukocyte antigen class I and class II alleles are associated with susceptibility and resistance in borderline leprosy patients from Southeast Brazil. *BMC Infect Dis*. (2015) 15:22. doi: 10.1186/s12879-015-0751-0
37. Dallmann-Sauer M, Fava VM, Gzara C, Orlova M, Van Thuc N, Thai VH, et al. The complex pattern of genetic associations of leprosy with HLA class I and class II alleles can be reduced to four amino acid positions. *PLoS Pathog*. (2020) 16:e1008818. doi: 10.1371/journal.ppat.1008818
38. Simon Enz L, Zeis T, Schmid D, Geier E, van der Meer F, Steiner G, et al. Increased HLA-DR expression and cortical demyelination in MS links with HLA-DR15. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. (2019) 7:e656. doi: 10.1212/NXI.0000000000000656
39. Marcos EVG, de Souza FC, Ura S, Opromolla DVA. Study of the association of HLA antigens and ulcerated type 1 leprotic reaction. *An Bras Dermatol*. (2000) 75:282-90. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12879-015-0751-0>
40. Dun XP, Parkinson DB. Role of Netrin-1 signaling in nerve regeneration. *Int J Mol Sci*. (2017) 8:491. doi: 10.3390/ijms18030491
41. She H, He Y, Zhao Y, Mao Z. Release the autophagy brake on inflammation: the MAFK14/p38α-ULK1 pedal. *Autophagy*. (2018) 14:1097-8. doi: 10.1080/1548627.2018.1446626
42. Kawasaki A, Okada M, Tamada A, Okada S, Nonami M, Ito Y, et al. Growth cone phosphoproteomics reveals that GAP-43 phosphorylated by JNK is a marker of axon growth and regeneration. *iScience*. (2018) 4:190-203. doi: 10.1016/j.isci.2018.05.019
43. Benito C, Davis CM, Gomez-Sanchez JA, Turmaine M, Meijer D, Poli V, et al. STAT3 controls the long-term survival and phenotype of repair schwann cells during nerve regeneration. *J Neurosci*. (2017) 37:4255-69. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3481-16.2017
44. Wagstaff LJ, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Otto GW, Kilpatrick AM, Michael K, et al. Failures of nerve regeneration caused by aging or chronic denervation are rescued by restoring Schwann cell c-Jun. *Elife*. (2021) 10:e62232. doi: 10.7554/eLife.62232
45. Tong X, Ao Y, Faas GC, Nwaobi SE, Xu J, Hausteim MD. Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci*. (2014) 17:694-703. doi: 10.1038/nn3691
46. Morin M, Forst AL, Pérez-Torre P, Jiménez-Escrig A, Barca-Tierno V, García-Galloway E, et al. Novel mutations in the KCN110 gene associated to a distinctive ataxia, sensorineural hearing loss and spasticity clinical phenotype. *Neurogenetics*. (2020) 21:135-43. doi: 10.1007/s10048-020-00605-6
47. Takeda M, Takahashi M, Nasu M, Matsumoto S. Peripheral inflammation suppresses inward rectifying potassium currents of satellite glial cells in the trigeminal ganglia. *Pain*. (2011) 152:2147-56. doi: 10.1016/j.pain.2011.05.023
48. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. (2005) 6:671-82. doi: 10.1038/nrn1746
49. Dennis MK, Mantegazza AR, Snir OI, Tenza D, Acosta-Ruiz A, Delevoye C, et al. BLOC-2 targets recycling endosomal tubules to melanosomes for cargo delivery. *J Cell Biol*. (2015) 209:563-77. doi: 10.1083/jcb.201410026
50. Gasque P, Jaffar-Bandjee MC. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *J Infect*. (2015) 71:413-21. doi: 10.1016/j.jinf.2015.06.006
51. Ejlertsen P, Hultberg JG, Wang J, Carlsson R, Ambjorn M, Kuss M, et al. Lack of neuronal IPN-β-IPNAR causes Lewy body- and Parkinson's disease-like dementia. *Cell*. (2015) 163:324-39. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.069
52. Inácio AR, Liu Y, Clausen BH, Svensson M, Kucharz K, Yang Y, et al. Endogenous IPN-β signaling exerts anti-inflammatory actions in experimentally induced focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation*. (2015) 12:211. doi: 10.1186/s12974-015-0427-0
53. Andrade PR, Mehta M, Lu J, Teles RMB, Montoya D, Scumpia PO, et al. The cell fate regulator NUPR1 is induced by *Mycobacterium leprae* via type I interferon in human leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. (2019) 13:e0007589. doi: 10.1371/journal.pntd.0007589
54. Schmid D, Zeis T, Schaefer-Wiemers N. Transcriptional regulation induced by cAMP elevation in mouse Schwann cells. *ASN Neuro*. (2014) 6:137-57. doi: 10.1042/AN20130031
55. Mantuano E, Lam MS, Shibayama M, Campana WM, Gonias SL. The NMDA receptor functions independently and as an LRP1 co-receptor to promote Schwann cell survival and migration. *J Cell Sci*. (2015) 128:3478-88. doi: 10.1242/jcs.173765
56. Kajiwara Y, Wang E, Wang M, Sin WC, Brennan K, Schadt E, et al. GJA1 (connexin43) is a key regulator of Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun*. (2018) 6:144. doi: 10.1186/s40478-018-0642-x
57. Mentis AA, Dardiotis E, Chrousos GP. Apolipoprotein E4 and meningeal lymphatics in Alzheimer disease: a conceptual framework. *Mol Psychiatry*. (2021) 26:1075-97. doi: 10.1038/s41380-020-0731-7
58. Cardoso CC, Martinez AN, Guimarães PEM, Mendes CT, Pacheco AG, et al. NINJIN1 1 aspl10da single nucleotide polymorphism is associated with protection in leprosy nerve damage. *J Neuroimmunol*. (2007) 190:131-8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.07.015
59. Tarique M, Naqvi RA, Santosh KV, Kamal VK, Khanna N, Rao DN. Association of TNF-α-308: IL-10-819: IL-10-1082(GG) and IL-1R1+1970(CC) genotypes with the susceptibility and progression of leprosy in North Indian population. *Cytokine*. (2015) 73:61-5. doi: 10.1016/j.cyt.2015.01.014
60. Tarique M, Naz H, Saini C, Suhail M, Shankar H, Khanna N, et al. Association of IL-10 gene polymorphism with IL-10 secretion by CD4 and T regulatory cells in human leprosy. *Front Immunol*. (2020) 11:1974. doi: 10.3389/fimmu.2020.01974
61. de Toledo-Pinto TG, Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ, et al. STING-dependent 2'-5' oligoadenylate synthetase-like production is required for intracellular *Mycobacterium leprae* survival. *J Infect Dis*. (2016) 214:311-20. doi: 10.1093/infdis/jiv444
62. Medeiros MF, Rodrigues MM, Vital RT, da Costa Nery JA, Sales AM, de Andrea Hacker M, et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. (2015) 23:220-9. doi: 10.1097/PAL.0000000000000074

63. Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. (2009) 6:343-53. doi: 10.1016/j.chom.2009.09.002
64. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. (2010) 22:48-54. doi: 10.1016/j.coi.2009.12.001

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Souza, Mendes, Sperandio da Silva, Sammarco-Rosa, Moraes, Jardim, Sarno, Pinheiro and Mietts. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Artigo 2: Artigo como segunda autora, com parte dos resultados da tese de doutorado.

Título: Myelin breakdown favors Mycobacterium leprae survival in Schwann cells.

Autores: Bruno de Siqueira Mietto, Beatriz Junqueira de Souza, Maria Cristina Vidal Pessolani, **Flavio Alves Lara e Euzenir Nunes Sarno**.

Revista: CELLULAR MICROBIOLOGY, v. e13128, p. 1-21, 2019.

doi: 10.1111/cmi.13128.

Myelin breakdown favours *Mycobacterium leprae* survival in Schwann cells

Bruno Siqueira Mietto^{1,2}  | Beatriz Junqueira de Souza² | Patricia Sammarco Rosa³ | Maria Cristina Vidal Pessolani² | Flavio Alves Lara² | Euzenir Nunes Sarno²

¹Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

²Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

³Lauro de Souza Lima Institute, São Paulo, Brazil

Correspondence

Bruno Siqueira Mietto, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil.
Email: bruno.mietto@ufjf.edu.br

Funding information

FAPERJ; Fiocruz; CAPES; CNPq

Abstract

Leprosy neuropathy is a chronic degenerative infectious disorder of the peripheral nerve caused by the intracellular obligate pathogen *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Among all nonneuronal cells that constitute the nerve, Schwann cells are remarkable in supporting *M. leprae* persistence intracellularly. Notably, the success of leprosy infection has been attributed to its ability in inducing the demyelination phenotype after contacting myelinated fibres. However, the exact role *M. leprae* plays during the ongoing process of myelin breakdown is entirely unknown. Here, we provided evidence showing an unexpected predilection of leprosy pathogen for degenerating myelin ovoids inside Schwann cells. In addition, *M. leprae* infection accelerated the rate of myelin breakdown and clearance leading to increased formation of lipid droplets, by modulating a set of regulatory genes involved in myelin maintenance, autophagy, and lipid storage. Remarkably, the blockage of myelin breakdown significantly reduced *M. leprae* content, demonstrating a new unpredictable role of myelin dismantling favouring *M. leprae* physiology. Collectively, our study provides novel evidence that may explain the demyelination phenotype as an evolutionarily conserved mechanism used by leprosy pathogen to persist longer in the peripheral nerve.

KEYWORDS

disease processes, diseases, infection, metabolism, microbial–cell interaction, mycobacteria

1 | INTRODUCTION

Leprosy neuropathy is a chronic degenerative disorder caused by infection of peripheral nerves by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), an obligate intracellular pathogen with particular ability to invade and persist in Schwann cells (Scollard, Truman, & Ebenezer, 2015; Serrano-Coll, Salazar-Peláez, Acevedo-Saenz, & Cardona-Castro, 2018). Over the past few years, we and others have reported several changes in infected nonmyelinating Schwann cells that favour *M. leprae* survival intracellularly, such as lipid droplets dynamics (Barisch & Soldati, 2017; Elamin, Stehr, & Singh, 2012; Kaur & Kaur, 2017;

Mattos et al., 2010, 2011; Mattos, Sarno, Pessolani, & Bozza, 2012), central glucose metabolism modulation (Medeiros et al., 2016), and cellular reprogramming (Masaki et al., 2013; Petito et al., 2013). Particularly, the success of *M. leprae* infection also includes its natural ability in inducing demyelination after contacting myelinated fibres (Rambukkana, Zanazzi, Tapinos, & Salzer, 2002; Tapinos, Ohnishi, & Rambukkana, 2006). However, the metabolic implication of myelin breakdown for *M. leprae* physiology was entirely ignored.

Myelin is a lipid-rich membrane produced and constantly maintained by Schwann cells in the peripheral nerve (Chrast, Saher, Nave, & Verheijen, 2011). Importantly, during the process of myelin breakdown, the majority of myelin-derived lipids are drawn from the degrading myelin ovoids, then stored in lipid droplets to be later

Dr. Lara and Dr. Sarno should be considered joint senior author.

Cellular Microbiology. 2020;22:e13128.
<https://doi.org/10.1111/cmi.13128>

wileyonlinelibrary.com/journal/cmi

© 2019 John Wiley & Sons Ltd | 1 of 8

reused by Schwann cells for de novo synthesis of myelin membranes (Brosius-Lutz et al., 2017; Goodrum, Earnhardt, Goines, & Bouldin, 1994). Due to a massive gene decay that leads to the loss of almost half of the functional genes (Cole et al., 2001), *M. leprae* acquires a unique capacity to subvert the host cell metabolism for its own needs (Elamin et al., 2012; Kaur & Kaur, 2017; Mattos et al., 2012; Medeiros et al., 2016). Typically, effective *M. leprae* survival has been associated with lipid droplets accumulation, a key pathological characteristic also induced by a wide range of intracellular bacterial pathogens (Barisch & Soldati, 2017).

In the light of these evidence, we hypothesised that *M. leprae* would benefit from inducing demyelination, as a way to have access to lipid droplets derived from the process of myelin breakdown.

2 | RESULTS

2.1 | *M. leprae* infects Schwann cells and accelerates myelin breakdown

Although nonmyelinating Schwann cells have widely been used in *M. leprae* research (Casaleno et al., 2019; Masaki et al., 2013; Petito et al., 2013), we took advantage of freshly dissociated myelin degrading Schwann cells (hereafter named as mSCs) from mouse peripheral nerves to understand the consequences of *M. leprae* infection for myelin breakdown and clearance in vitro. We first examined the infection rate in our model and noted that the majority of mSCs were positively infected by *M. leprae* (~98%) at day three after incubation (Figure 1a-c). Interestingly, inside mSCs, *M. leprae* was often located in areas enriched in myelin ovoids (Figure 1d), resulting in a significant myelin-*M. leprae* interaction of about 80% in the host cell (Figure 1e).

We next questioned whether *M. leprae* infection would impact the process of myelin breakdown inside mSCs. To answer this, we measured and compared the myelin area in uninfected and *M. leprae*-infected mSCs over a period of time (0, 1, and 3 days) and plotted the results as the per cent of mSCs containing low (0–350 μm^2), medium (350–700 μm^2), or high (>700 μm^2) degenerating myelin content. In the uninfected group at 0 hr (starting time point), we observed a distribution of about 27.4%, 40.7%, and 31.8% of mSCs cells in the low, medium, and high myelin ranges, respectively (data not shown). In addition, after 1 and 3 days in vitro, uninfected mSCs presented a gradual reduction of their myelin content as follows: 36.2%, 40.9%, and 22.3% (1 div) and 43.4%, 39.7%, and 16.8% (3 div), respectively, which reflects the natural progressive process of myelin degeneration inside the cell (Figure 1f,g,i,j). Interestingly, *M. leprae*-infected mSCs, at day 1, showed a significant 2.3-fold reduction in the myelin area at high range that reflected in a 1.6-fold increase in the per cent of cells at the low range (Figure 1i). Moreover, at day 3, we observed a marked sixfold (medium range) and twofold (high range) reduction in myelin area that resulted in a substantial increase up to 79% of mSCs containing reduced myelin ovoids (Figure 1h,j). Concurrent with the enhancement on myelin degradation, we also found a statistical reduction in the mRNA levels for myelin basic protein (MBP), myelin protein zero

(MPZ), and KROX-20 in the *M. leprae*-infected group compared with uninfected mSCs (Figure 1k), which is consistent with the ability of *M. leprae* in inducing, since the very early stages, the reprogramming of mSCs to a nonmyelin-producing phenotype. To further analyse changes in myelin transcripts during leprosy infection in vivo, we measured and observed that nerves from leprosy patients have a statistical downregulation of MBP and MPZ mRNA when compared with nonleprosy patients (Figure 1l). Collectively, these data indicate that *M. leprae* is capable of entering mSCs and be clustered around myelin ovoids. Furthermore, this host-pathogen interaction resulted in the acceleration of myelin breakdown that was accompanied by downregulation in a set of key regulatory genes involved in myelin production in vitro and in vivo.

2.2 | *M. leprae* enhances the autophagic myelin destruction leading to increased lipid droplets levels

Inside mSCs, myelin ovoids are progressively degraded by macroautophagy mechanisms named as myelinophagy (Gomez-Sanchez et al., 2015; Jang et al., 2016). We therefore focused to understanding whether advanced myelin clearance observed in *M. leprae*-infected cells would be related to changes in this autophagic myelin destruction pathway. To assess this, we first quantified the number of myelin ovoids positive for the autophagosome marker LC3. Although uninfected mSCs presented about 26% of LC3⁺ puncta-myelin ovoids, in *M. leprae*-infected cells, we observed a significant increase of up to 82% (threefold more; Figure 2a-c). Accordingly, the mRNA levels of Beclin-1, Wipi2, ULK1, and ATG7 (transcripts involved in the early stages of autophagosome formation) were significantly increased in *M. leprae*-infected mSCs (Figure 2d) as well as in nerve biopsies from leprosy patients (Figure 2e). Because myelin breakdown results in lipid droplets formation (Brosius-Lutz et al., 2017; Goodrum et al., 1994), and knowing the importance of lipids to the intracellular bacteria (Barisch & Soldati, 2017; Elamin et al., 2012; Kaur & Kaur, 2017), we next measured the number of these myelin-derived neutral lipids by oil red O staining (Figure 2f-h) as well as the myelin ovoids size in uninfected and *M. leprae*-infected mSCs at day 3 (Figure 2i). The results of the experiment revealed that although uninfected mSCs exhibited an average of about 5.6 lipid droplets per cell, that number statistically increased three times more in the *M. leprae*-infected group, reaching an average of about 17 oil red O lipid bodies per mSCs (Figure 2h). We also observed a statistical reduction of about 40% in myelin ovoids size in *M. leprae*-infected mSCs (Figure 2i), which correlates very well with the advanced myelin breakdown and lipid droplets arising induced by leprosy infection. Consistent with this, we observed in *M. leprae*-infected mSCs, a marked 8.7-fold induction in perilipin (a lipid droplet-associated protein) mRNA expression as well as a statistical 40% and 55% downregulation in adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL) transcripts (both related to lipolysis), respectively, if compared with values seen in uninfected cells (Figure 2j). Thus, these results indicate an enhancement on myelinophagy leading to increased lipid

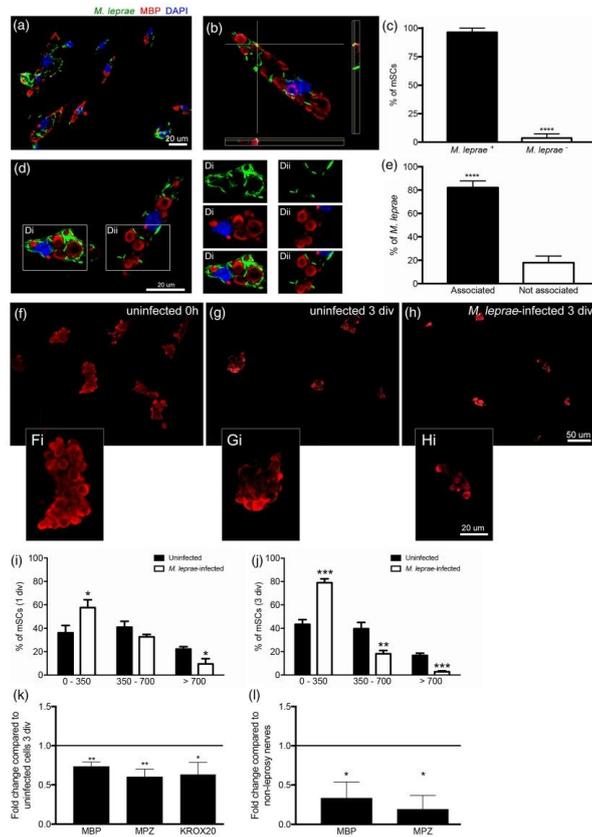


FIGURE 1 Enhancement of myelin breakdown in response to *M. leprae* entry in Schwann cells. (a, b) Leprosy pathogen successfully invade mSCs and resides in close association with degrading myelin ovoids as indicated at orthogonal sections. (c) The infection rate is expressed as mean \pm SD from four independent experiments with at least 80 cells counted per experiment. (d) Apotome image of an infected mSCs culture depicting *M. leprae*-myelin interaction at insets. (e) The interaction rate is expressed as mean \pm SD from four independent experiments with 80 to 200 myelin ovoids counted per each experiment. (f-h) Immunostaining for MBP in mSCs cultures, showing the progressive course of myelin breakdown and clearance in uninfected cells, from day 0 to 3, and the striking reduction induced by leprosy infection. (f-i) Inset represents example of myelin ovoids content in mSCs over time and at different conditions. (i, j) The graphs show the distribution of mSCs in three distinct myelin area ranges at days 1 and 3, respectively. (k, l) Fold-change analysis showing significantly downregulation of myelin transcripts *in vitro* (k) and in nerve biopsies from leprosy conditions (l); the horizontal bar represents levels in uninfected conditions; results are expressed as mean \pm SD from three to four normalised independent biological replicates; * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, **** $p < .0001$

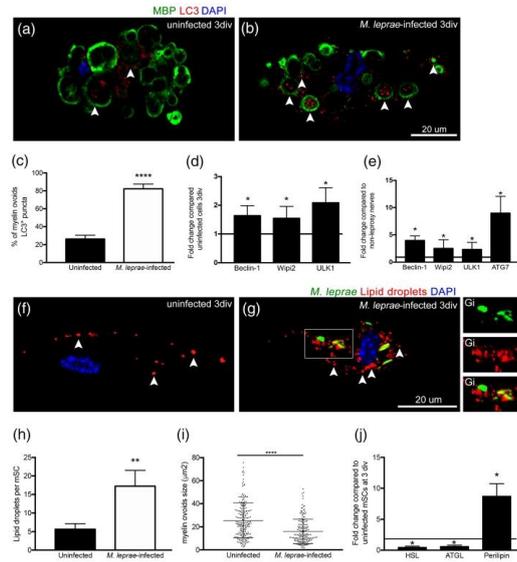


FIGURE 2 Elevated myelinophagy leads to increased lipid droplets accumulation. (a, b) Representative apotome images showing the accumulation of LC3 puncta in degenerating myelin ovoids (MBP; arrowheads) in uninfected (a) and *M. leprae*-infected (b) mSCs at day 3 in vitro. (c) The graph shows the percentage of LC3-decorated myelin ovoids; results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments with at least 130 myelin ovoids analysed per experiment. (d, e) Fold-change analysis showing significantly upregulated levels for the autophagosome transcripts in vitro (d) and in nerve biopsies from leprosy conditions (e); the horizontal bar represents levels in uninfected conditions; results are expressed as mean \pm SD from three to four normalised independent biological replicates; (f, g) Oil red O staining showing lipid droplets (arrowheads) in uninfected (f) and *M. leprae*-infected mSCs (g). (G) insets show lipid droplets–*M. leprae* association. (h) Quantification of lipid droplets numbers per mSCs; results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments with at least 40 mSCs analysed per experiment. (i) quantification of myelin ovoids size in uninfected and *M. leprae*-infected mSCs; results are expressed as mean \pm SD from three independent experiments with at least 100 myelin ovoids counted per each experiment. (j) qRT-PCR showing changes in the mRNA levels for HSL, ATGL, and perilipin in *M. leprae*-infected mSCs compared with uninfected mSCs (horizontal bar) at day 3; results are expressed as mean \pm SD from three normalised independent biological replicates. $p < .5$, $^*p < .01$, $^{****}p < .0001$

droplets formation as a response of *M. leprae* infection in mSCs, which was also followed by upregulation of transcripts involved in autophagosome formation and lipid droplets accumulation.

2.3 | Myelin breakdown favours *M. leprae* viability inside Schwann cells

If myelin breakdown benefits leprosy pathogen, preventing myelin from degradation should reduce its viability. We therefore pharmacologically inhibited myelin degeneration by treating mSCs cultures with JNK inhibitor SP600125 (JNKI), a compound previously reported to

block myelin dismantling in Schwann cells in vitro (Gomez-Sanchez et al., 2015). Accordingly, treatment with JNKI strikingly prevented the degradation of myelin ovoids in uninfected and *M. leprae*-infected cells cultured for 3 days, keeping their myelin values similar to those observed in freshly plated uninfected mSCs at 0 hr (Figure 3a–f). After confirming that, we next measured leprosy pathogen content by quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis of *M. leprae* DNA and RNA in infected mSCs treated or not with JNKI (Figure 3g). Remarkably, we found a notable reduction of about 3.3-fold in *M. leprae* content when we prevented myelin degradation inside mSCs. These results provided, for the first time, evidence that myelin breakdown is a major contributor for *M. leprae* persistence in Schwann cells,

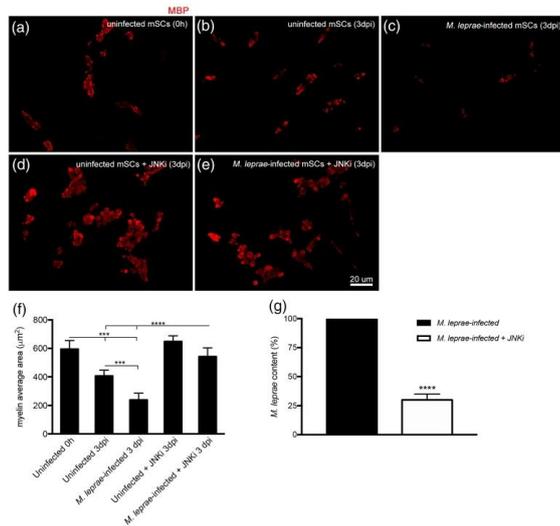


FIGURE 3 Pharmacological inhibition of myelin breakdown impairs *M. leprae* physiology. (a–e) Immunostaining for MBP in uninfected and *M. leprae*-infected mSCs at different time points and conditions. (f) The graphs show the overall quantification of myelin ovoids in mSCs; results are expressed as mean \pm SD from three to six independent experiments with at least 200 cells analysed per experiment. (g) The graph shows reduced *M. leprae* content when myelin breakdown was interrupted after JNKi treatment; results are expressed as mean \pm SD from four independent normalised experiments. ** $p < .01$, *** $p < .001$, **** $p < .0001$

suggesting the pivotal role of myelin dismantling favouring the intracellular survival of leprosy pathogen in the peripheral nerve of infected patients.

3 | DISCUSSION

Leprosy neuropathy is considered as the most common peripheral degenerative disorder of infectious origin (Scollard et al., 2015; Serrano-Coll et al., 2018). Increasing number of reports have argued potential mechanisms driven by *M. leprae* in triggering demyelination after contacting myelinated fibres (Madigan et al., 2017; Rambukkana et al., 2002; Scollard et al., 2015; Serrano-Coll et al., 2018; Tapinos et al., 2006). However, the interplay between myelin breakdown and *M. leprae* physiology was entirely ignored. For example, do degenerating myelin byproducts support *M. leprae* viability inside the host cell? In this study, we delineate the hypothesis that myelin breakdown is an advantage strategy induced by *M. leprae* to survive longer intracellularly.

We initially confirmed that *M. leprae* was capable of entering mSCs, a capacity that has not been studied in much detail (Rambukkana et al., 2002). Furthermore, by using our modelling of mSCs-*M. leprae* interaction, we observed a marked affinity of leprosy pathogen for degenerating myelin ovoids. Interestingly, macrophages, after being infected with *M. leprae*, promote nerve demyelination followed by myelin debris phagocytosis (Madigan et al., 2017), which, indeed, provide myelin fragments to the intracellular bacteria. Collectively, we propose a novel unexpected predilection of *M. leprae* for degenerating myelin debris, which are, undoubtedly, major protective lipid-enriched shelters inside the host cell. Future biochemical studies will also help elucidate this metabolic partnership, as it appears plausible that *M. leprae* would be able to metabolise myelin-derived elements.

The consequence of *M. leprae* infection for the degeneration of intracellular myelin was largely underappreciated. We, therefore, addressed this question and surprisingly found that leprosy infection significantly accelerated the rate of myelin breakdown in a time-dependent fashion. Moreover, this enhancement on myelin digestion was followed by a marked suppression of key myelin-promoting genes, such as MBP, MPZ, and Krox-20 transcripts. Our findings were also

validated in human nerve biopsies from leprosy patients and are consistent with previous reports that documented the shutdown of several myelin genes, including the myelin inducer Krox-20, in *M. leprae*-infected Schwann cells (Casaleno et al., 2019; Masaki et al., 2013).

In order to understand the underlying mechanisms linked to the advanced myelin breakdown observed in infected mSCs, we turned our attention to the autophagic myelin destruction pathway, namely, myelinophagy. Our data clearly show elevated myelinophagy, at an average of about threefold higher in *M. leprae*-infected mSCs as compared with uninfected ones. This was also confirmed in vitro and in vivo by the marked upregulation of key transcripts involved in early autophagosome formation. This intricate regulatory phenomenon that digests myelin inside Schwann cell is commonly observed during the nerve injury response, such as trauma (Gomez-Sanchez et al., 2015) and inflammatory disorder (Jang et al., 2016). Here, we provided additional evidence about the involvement of this pathway in an infectious disorder of the peripheral nerve.

Because of the critical importance of lipid droplets for *M. leprae* physiology (Barisch & Soldati, 2017; Mattos et al., 2010, 2012), we therefore wanted to check the formation of these organelles in the in vitro modelling of mSCs infection. Indeed, we quantified statistically significant increase in the number of these lipid droplets that were also correlated with a significant 1.6-fold reduction in the overall myelin ovoids size in *M. leprae*-infected mSCs, as compared with uninfected ones, which correlates very well with the acceleration of myelin breakdown and augmented appearance of lipid droplets induced by leprosy bacilli. We corroborated this finding by quantitative PCR analysis that confirmed a marked 8.7-fold upregulation in perilipin mRNA along with a statistical downregulation of about twofold in both HSL and ATGL in *M. leprae*-infected mSCs. Interestingly, skin lesions of leprosy patients and *M. leprae*-infected macrophages have increased perilipin expression at both mRNA and protein levels (Tanigawa et al., 2008). Importantly, perilipin acts as a scaffold protein promoting lipid droplets synthesis and enlargement (Ikura & Caldwell, 2015; Sun et al., 2014) and preventing lipolysis (Straub, Stoeffel, Heid, Zimbelmann, & Schirmacher, 2008). Collectively, this *M. leprae*-induced elevated myelinophagy is very likely to benefit leprosy pathogen in, at least, two ways. First, activation of myelinophagy is an important core mechanism that promotes Schwann cell reprogramming (Gomez-Sanchez et al., 2015). Second, augmented myelin digestion results in accompanied increased levels of lipid droplets as demonstrated here and in previous reports (Brosius-Lutz et al., 2017; Goodrum et al., 1994).

Because myelin breakdown leads to lipids droplets formation, it is conceivable that *M. leprae* would induce myelin dismantling to ensure lipids availability and, hence, their proper intracellular functioning. Thus, we pharmacologically inhibited myelin degradation and, remarkably, observed a significant 3.3-fold reduction in *M. leprae* content. This novel finding suggests a new unpredictable role of myelin breakdown favouring *M. leprae* in Schwann cells.

In conclusion, we propose that myelin breakdown is an evolutionary advantage strategy perpetrated by *M. leprae* to survive longer in the peripheral nerve. Basic research into a better mechanistic

understanding of this unexpected myelin-*M. leprae* coupling could be used for future host-target therapy strategies to treat patients with leprosy neuropathy.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Myelin degrading Schwann cells culture

All animal procedures were approved by the Oswaldo Cruz Foundation Animal Care Committee (License LA-003/2017) and followed the guidelines of the Brazilian Council on Animal Care. We obtained mSCs from mouse sciatic nerves, as described previously, with minor modifications (Gomez-Sanchez et al., 2015). Briefly, adult male wild type BALB/c mice (1 month old) were euthanised with CO₂, and both sciatic nerves were dissected and placed in L15 medium on ice. The epineurium was carefully removed, and nerve segments were allowed to degenerate in vitro for 2 days at 37°C/5% CO₂ in culture medium containing Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum + penicillin-streptomycin (100 U ml⁻¹). Then, nerve segments were enzymatically digested for 18 hr in 0.005% collagenase A (Sigma) + 1.2 U ml⁻¹ dispase (Gibco) in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 medium at 37°C/5% CO₂ followed by mechanical dissociation with 26G gauge syringe. After centrifugation at 300 g for 5 min, the cells were resuspended in culture medium and plated on laminin-coated coverslips (5 µg ml⁻¹, ThermoFisher, #23017015) for 5 hr at 37°C/5% CO₂. Then, plated mSCs were washed 3× in PBS and the culture medium was replaced. When indicated, mSCs cultures were treated with JNK inhibitor SP600125 at final concentration of 40 µM (Enzolfsciences, #SP600125) diluted in culture medium.

4.2 | *M. leprae* purification, labelling, and infection in vitro

Suspension of viable Thai-53 strain of *M. leprae* obtained from nude mouse-derived footpad was gently provided by Dr. Rosa Laboratory from Lauro de Souza Lima Institute, São Paulo, Brazil, and was purified as described (Medeiros et al., 2016). For experimental infection, mSCs were incubated with *M. leprae* at MOI ≤1:100 cell per bacilli in the cell incubator set up for 33°C/5% CO₂. After the desired time points, mSCs were washed, fixed, and processed for either immunolabelling or PCR procedures. When indicated, *M. leprae* labelling was performed using the PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma, #MKCF0773) according to the manufacturer's instructions.

4.3 | Immunolabelling, oil red O lipid droplets staining, and apotome microscope

For mSCs immunostaining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1-M PBS for 15 min, washed 3× in PBS, and then permeabilised in blocking solution containing 0.03% Triton X-100 + 5% normal goat serum + 2% bovine serum albumin in PBS for 1 hr. Then, cells were

incubated 30 min (room temperature) with primary antibodies diluted in blocking solution; rat anti-MBP monoclonal (1:300 Millipore, MAB386) and rabbit anti-LC3 polyclonal (1:100 Novus Biological, NB100-2220). Then, cells were washed 3× in PBS and incubated for another 30 min (room temperature) in blocking solution containing DAPI (1:500, Invitrogen, Molecular Probes) and secondary antibodies, goat anti-rat 488 and goat anti-rabbit 594 (both at 1:500, Invitrogen, Molecular Probes). Then, mSCs were washed 2× in PBS and 1× in distilled water, and slides were mounted in Fluoromount medium (Sigma). Oil red O droplets staining and quantification were performed as described by Rolfe, Bosco, Broussard, and Ren (2017), and myelin ovoids size was measured in bright field images at ImageJ.

All images were examined under a Zeiss AxioObserver Z1 inverted microscope (Carl Zeiss, Heidenheim, Germany) with an apotome structured illumination system, using a Zeiss Plan-Apochromat 40×-oil and/or 63×-oil objectives. Excitation was achieved using HXP-120 light source, and images were acquired using a Zeiss HMRC charge-coupled device camera controlled by AxioVision version 4.8 software.

4.4 | Quantitative reverse transcription-PCR and *M. leprae* content

Total RNA was isolated from mSCs cultures and human nerve biopsies using Trizol reagent following the manufacturer's instruction. The cDNA was reverse transcribed with SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen, #18080-400) and amplified using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). For mouse mSCs quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis, we used the following specific primers pairs as follows: MBP (forward AATCGGCTCACAAAGGATTCA and reverse TCCTCCAGCTTAAAGATTTTGG); MPZ (forward CGGACAGGAAATCTATGGTGC and reverse TGGTAGCCAGCTAAAGAG); Krox20 (forward AGCCCTTTGACCAGATGA and reverse AAGATGCCCGCACTACAAT); Bedin-1 (forward GCCTGGCTGTGGTAAGTAA and reverse CCAAGCTCTGAAACTGGACA); Wpl2 (forward GCTGTGGTAGTAAGTCCGGG and reverse GCTTTGAGCTGACAATGGC); ULK1 (forward TGCGCATA GTGTGCAGTAG and reverse AACATCGTGGCGCTGTATGA); HSL (forward TCGGGGAGCACTACAACG and reverse CACGCAACTTGGGTCTATGG); ATGL (forward GGTGCCAATTATTGAGGTG and reverse AAACACGAGTCAGGAGATGC); and perilipin (forward GTCCCTATCCGATGCCCTGAAG and reverse GCGTCCGCTCTGCTGAAG). For human nerves qRT-PCR analysis, we used the Human Autophagy PCR Array Kit (Genome, #HATPL-I) and Human Schwann Cell Biology PCR Array Kit (ScienCell Research Laboratories, #GK096). All qRT-PCRs were done in triplicate and performed in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, MA, USA), and the results were analysed by the $\Delta\Delta CT$ method after normalisation with the housekeeping gene GADPH (forward TGACCACCAACTGCTTAG and reverse GGATGCAGGGATGATGTTTC).

M. leprae content was determined using the protocol previously described (Medeiros et al., 2016). Briefly, *M. leprae*-infected mSCs treated or not with JNKi were submitted to DNA and RNA extraction

using Trizol method following the manufacturer's instruction. Total RNA was reverse transcribed using random primers and GoScript Kit (Promega, #A2801) following the manufacturer's instructions. Levels of 16S rRNA were determined and compared against 16S rDNA by TaqMan real-time PCR assay and read on an ABI Step One Plus Sequence Detection System (Applied Biosystems). *M. leprae* content was arbitrarily assumed 100% for the infected mSCs group for comparison against values obtained in the JNK treated *M. leprae*-infected mSCs condition.

4.5 | Statistical analysis

Graphics were generated using Prism version 6.0 software (GraphPad software). Results are presented as the mean \pm SD and statistically evaluated by Mann-Whitney *U* test (for qPCR analysis) or *t* test (for immunostaining analysis). Differences were considered significant at *p*-value of <.05.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq, CAPES, Fiocruz, and FAPERJ. We thank Dr. Rosa for gently providing the nude mouse-derived *M. leprae*. The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

ORCID

Bruno Siqueira Mietto  <https://orcid.org/0000-0002-4172-2670>

REFERENCES

- Barisch, C., & Soldati, T. (2017). Breaking fat! How mycobacteria and other intracellular pathogens manipulate host lipid droplets. *Biochimie*, 141, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.06.001>
- Brosius-Lutz, A., Chung, W. S., Sloan, S. A., Carson, G. A., Zhou, L., Lovellett, E., ... Barres, B. A. (2017). Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(38), E8072–E8080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710566114>
- Casalenovo, M. B., Rosa, P. S., de Faria Bertoluci, D. F., Barbosa, A. S. A., Nascimento, D. C. D., de Souza, V. N. B., & Nogueira, M. R. S. (2019). Myelination key factor krox-20 is downregulated in Schwann cells and murine sciatic nerves infected by *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Experimental Pathology*, 100, 1–11. <https://doi.org/10.1111/iep.12309>
- Chrast, R., Saher, G., Nave, K. A., & Verheijen, M. H. G. (2011). Lipid metabolism in myelinating glial cells: Lessons from human inherited disorders and mouse models. *Journal of Lipid Research*, 52(3), 419–434. <https://doi.org/10.1194/jlr.R009761>
- Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., ... Barrell, B. G. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823), 1007–1011. <https://doi.org/10.1038/35059006>
- Elamin, A. A., Stehr, M., & Singh, M. (2012). Lipid droplets and *Mycobacterium leprae* infection. *J Pathog*, 361374. <https://doi.org/10.1155/2012/361374>, 1, 10.

- Gomez-Sanchez J. A., Carly, L., Inuarizaga-Lejarreta, M., Palomo-Irigoyen, M., Varela-Rey, M., Griffith, M., ... Jessen, K. R. (2015). Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. *The Journal of Cell Biology*, 210(1), 153–168. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503019>
- Goodrum, J., Eamhardt, T., Goines, N., & Bouldin, T. W. (1994). Fate of myelin lipids during degeneration and regeneration of peripheral nerve: An autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*, 14(1), 357–367. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-01-00357.1994>
- Ikura, Y., & Caldwell, S. H. (2015). Lipid droplet-associated proteins in alcoholic liver disease: A potential linkage with hepatocellular damage. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(8), 8699–8708.
- Jang, S.Y., Shin, Y.K., Park, S.Y., Park, J.Y., Lee, H.J., Yoo, Y.H., Kim J.K., Park, H.T. (2016). Autophagic myelin destruction by Schwann cells during Wallerian degeneration and segmental demyelination. *Glia*, May;64(5):730–42. <https://doi.org/10.1002/glia.22957>.
- Kaur, G., & Kaur, J. (2017). Multifaceted role of lipids in *Mycobacterium leprae*. *Future Microbiology*, 12, 315–335. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0173>
- Madigan, C. A., Cambier, C. J., Kelly-Scumpia, J. M., Scumpia, P. O., Cheng, T. V., Zallaa, J., ... Ramakrishnan, L. (2017). A macrophage response to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy. *Cell*, 170(5), 973–985. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.030>
- Masaki, T., Qu, K., Cholewa-Waclaw, J., Burr, K., Raam, R., & Rambukkana, A. (2013). Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell*, 152(1–2), 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.014>
- Mattos, K. A., Lara, F. A., Oliveira, V. G., Rodrigues, L. S., D'Avila, H., Melo, R. C., ... Pessolani, M. C. (2010). Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cellular Microbiology*, 13(2), 259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x>
- Mattos, K. A., Oliveira, V. G., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Pinheiro, R. O., Sarno, E. N., ... Bozza, P. T. (2011). TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: Immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *Journal of Immunology*, 187(5), 2548–2558. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101344>
- Mattos, K. A., Sarno, E. N., Pessolani, M. C. V., & Bozza, P. T. (2012). Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(Suppl 1), 156–166. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900023>
- Medeiros, R. C., Girardi, K. D., Cardoso, F. K., Mietto, B. S., Pinto, T. G., Gomez, L. S., ... Lara, F. A. (2016). Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(41), 21375–21387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725283>
- Petito, R. B., Amadeu, T. P., Pascarelli, B. M., Jardim, M. R., Vital, R. T., Antunes, S. L., & Sarno, E. N. (2013). Transforming growth factor-β1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 72(4), 351–365. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31828bfc60>
- Rambukkana, A., Zanzaki, G., Tapinos, N., & Salzer, J. L. (2002). Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*, 296(5569), 927–931. <https://doi.org/10.1126/science.1067631>
- Rolfe, A. J., Bosco, D. B., Broussard, E. N., & Ren, Y. (2017). In vitro phagocytosis of myelin debris by bone marrow-derived macrophages. *J Vis Exo*, 30(130). <https://doi.org/10.3791/56322>
- Scollard, D. M., Truman, R. W., & Ebenezer, G. J. (2015). Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clinics in Dermatology*, 33(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.008>
- Serrano-Coll, H., Salazar-Peláez, L., Acevedo-Saenz, L., & Cardona-Castro, N. (2018). *Mycobacterium leprae* induced nerve damage: Direct and indirect mechanisms. *Pathog Dis*, 76(6). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty06>
- Straub, B. K., Stoeffel, P., Heid, H., Zimbelmann, R., & Schimacher, P. H. (2008). Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and de novo perilipin expression in hepatocyte steatogenesis. *Hepatology*, 47(6), 1936–1946. <https://doi.org/10.1002/hep.22268>
- Sun, Z., Gong, J., Wu, H., Xu, W., Wu, L., Xu, D., ... Li, P. (2014). Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes. *Nature Communications*, 4, 1594. <https://doi.org/10.1038/ncomms2581>
- Tanigawa, K., Suzuki, K., Nakamura, K., Akama, T., Kawashima, A., Wu, H., ... Ishii, N. (2008). Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiology Letters*, 289(1), 72–79. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01369.x>
- Tapinos, N., Ohnishi, M., & Rambukkana, A. (2006). ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nature Medicine*, 12(8), 961–966. <https://doi.org/10.1038/nm1433>

How to cite this article: Mietto BS, de Souza BJ, Pessolani MCV, Lara FA, Sarno EN. Myelin breakdown favours *Mycobacterium leprae* survival in Schwann cells. *Cellular Microbiology*. 2020;22:e13128. <https://doi.org/10.1111/cmi.13128>

Artigo 3: Relacionado ao tema da tese.

Título: The red flags of ulnar neuropathy in leprosy.

Autores: Marcia Maria Rodrigues Jardim; Robson Vital; Ximena Illarramendi; Mariana Hacker; **Beatriz Junqueira de Souza**; Isabela Pitta; Roberta Olmo Pinheiro; **Euzenir Nunes Sarno**.

Revista: PLoS One. v. 16, p. 1-11, 2021.

doi: 10.1371/journal.pone.0259804.

RESEARCH ARTICLE

The red flags of ulnar neuropathy in leprosy

Márcia Jardim^{1,2,3*}, Robson T. Vital², Ximena Illarramendi¹, Mariana Hacker¹, Beatriz Junqueira¹, Izabela J. R. Pitta^{1,2,3}, Roberta O. Pinheiro¹, Euzenir N. Sarno¹**1** Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Department of Neurology, Pedro Ernesto University Hospital/Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* These authors contributed equally to this work.

* Jardim.mm@gmail.com



Abstract

The diagnosis of pure neural leprosy is more challenging because patients share characteristics with other common pathologies, such as ulnar compression, which should be taken into consideration for differential diagnosis. In this study, we identify ulnar nerve conduction characteristics to aid in the differential diagnosis of ulnar neuropathy (UN) in leprosy and that of non-leprosy etiology. In addition, we include putative markers to better understand the inflammatory process that may occur in the nerve. Data were extracted from a database of people affected by leprosy (leprosy group) diagnosed with UN at leprosy diagnosis. A non-leprosy group of patients diagnosed with mechanical neuropathy (compressive, traumatic) was also included. Both groups were submitted to clinical, neurological, neurophysiological and immunological studies. Nerve enlargement and sensory impairment were significantly higher in leprosy patients than in patients with compressive UN. Bilateral impairment was significantly higher in the leprosy group than in the non-leprosy group. Leprosy reactions were associated to focal demyelinating lesions at the elbow and to temporal dispersion (TD). Clinical signs such as sensory impairment, nerve enlargement and bilateral ulnar nerve injury associated with eletrodiagnostic criteria such as demyelinating finds, specifically temporal dispersion, could be tools to help us decided on the best conduct in patients with elbow ulnar neuropathy and specifically decide if we should perform a nerve biopsy for diagnosis of pure neural leprosy.

OPEN ACCESS

Citation: Jardim M, Vital RT, Illarramendi X, Hacker M, Junqueira B, Pitta IJR, et al. (2021) The red flags of ulnar neuropathy in leprosy. PLOS ONE 16(11): e0259804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804>

Editor: Leila Harhaus, BG Trauma Center Ludwigshafen, GERMANY

Received: May 11, 2021

Accepted: October 26, 2021

Published: November 19, 2021

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804>

Copyright: © 2021 Jardim et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Introduction

Every person affected by leprosy suffers, to some degree or another, from peripheral nerve involvement as a result of the disease. This may range from the alteration of intradermal nerves in a patch of skin to a major lesion on a nerve trunk. Fortunately, neuropathy, a feared and challenging complication of leprosy, is treatable if timely diagnosed. In patients with pure neural leprosy, in which there are no associated skin lesions, diagnosis is even more challenging because of other common pathologies considered in the differential diagnosis, especially if it exclusively affects the ulnar nerve [1]. Involvement of the ulnar elbow segment is one of most common causes of focal neuropathy of the upper limbs, second only to the median nerve

Competing interests: No authors have competing interests.

compression of the wrist segment in carpal tunnel syndrome [2]. Ulnar neuropathy (UN) at the elbow is one of the most prevalent in leprosy at any stage or clinical presentation of the disease [3].

Altered patterns of nerve conduction together with clinical criteria are useful for identifying the cause of UN [4]. Several authors specifically and deeply assess the function of this nerve [5] but rarely include leprosy [6, 7]. Aside from neurophysiological signs of leprosy neuropathy, additional markers such as the inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF) and interleukin 6 (IL-6), that are produced by residual and infiltrating macrophages, mast cells, lymphocytes, Schwann cells, fibroblasts, and sensory neurons, could also be useful in establishing the cause of UN [8]. High levels of TNF in neurological disorders have been associated with demyelination, axonal degeneration, increased nerve blood barrier permeability and immune recruitment to the site of injury [9]. On the other hand, IL-6 production has been associated with proinflammatory signaling in Schwann cells. Leprosy reactions are a common complication of the disease and may occur before, during, or after release from treatment. During these reactions, a high level of inflammatory mediators are produced by the reactivation of the cellular immune response and may lead to substantial nerve damage [10–12]. TNF, in particular, is known to induce IL-6 and IL-8 production by Schwann cells [10]. Leprosy neuropathy is mainly a multiple mononeuropathy with axonal loss, but it is rarely recognized as a cause of demyelination or conduction block. In this study, we identify ulnar nerve conduction characteristics to aid the differential diagnosis of UN from non-leprosy etiology. In addition, we include putative markers to better understand the inflammatory process that may occur in the nerve.

Methods

A cross-sectional observational study was performed with patients diagnosed at the Souza Araújo Outpatient Clinic (ASA), Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, a national public health system reference center for leprosy, between April 2009 and April 2013. Data were extracted from the nerve conduction studies (NCS) database from people affected by leprosy (leprosy group) diagnosed with UN at leprosy diagnosis, during and/or after multidrug therapy (MDT). A non-Leprosy group of patients diagnosed with mechanical neuropathy (compressive, traumatic) after suspicion of having the pure neural form of leprosy were also included. Patients received fixed-dose paucibacillary (PB) or multibacillary (MB) MDT according to the results of their slit-skin smears or skin/nerve biopsies. The research was carried out in compliance with the International Norms on Ethics in Human Research, having been previously approved by the Ethics Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (Approval number: 21625313.9.0000.5248). All patients voluntarily provided their written informed consent.

The events of leprosy reactions were recorded and classified as follows: (1) reversal reactions (RR) involve inflammation of preexisting lesions with tender, new lesions and/or acroedema; (2) *erythema nodosum leprosum* (ENL) is the sudden appearance of inflamed papules, nodules, and plaques, with or without systemic signs and symptoms (fever, malaise, arthralgia, lymphadenopathy, etc), and (3) neuritis when one or more enlarged nerves is painful or presents loss of function. Neuritis may be isolated or arise together with cutaneous and systemic signs and symptoms.

Neurological examination

We performed a detailed neurological examination to record the number and distribution of affected peripheral nerves. The assessment included evaluation of sensory impairment (tactile sensation using the monofilament test, mechanical nociception, and cold

thermosensation), and motor function by the voluntary muscle test as described in detailed by Vital *et al.* (2012) [13].

Nerve conduction study

Electrophysiological testing was performed using the Neuropack 2 system (Nihon Kohden Corp., Tokyo, Japan). Room temperature was maintained between 29–32°C. Patients were placed in a supine position. Skin temperature at the wrists was kept above 33°C with the use of ultrared light, when necessary. Nerve conduction data was collected using a band pass filter setting of 2 Hz–10 KHz.

Sensory NCS (sNCS): The ulnar sensory nerve action potentials (SNAPs) were orthodromically recorded at a fixed recording and stimulation distance of 12 cm.

Motor NCS (mNCS): The ulnar nerve was stimulated at the wrist, below and above the sulcus (on the flexed elbow), and at the arm and was recorded at the abductor *digiti minimi muscle* [14]. The amplitudes of proximal and distal Compound Muscle Action Potentials (CMAPs) were compared across the different stimulation sites: from below the elbow to the wrist (forearm), from above to below the elbow (elbow), and above the elbow (arm). Normal cut-off values were defined according to Fuglsang-Frederiksen, 2010 (Box 1) [15].

Box 1. Normal cut-off values for ulnar nerve conduction study

| Ulnar nerve function | Parameter | | |
|----------------------|-----------|----------|---------|
| | amplitude | velocity | latency |
| Sensory | 8 μ V | 43m/s | 2.7 ms |
| Motor | 4mV | 55m/s | 3.3 ms |

Temporal dispersion (TD) was defined as a reduction in proximal CMAP amplitude compared with distal CMAP amplitude when the proximal CMAP duration increases by > 30% and/or a > 15% in area [16]. Conduction block (CB) was defined by a reduction of proximal CMAP area/amplitude by > 50% compared with distal CMAP area/amplitude. The duration of the proximal CMAP should not increase by > 30%.

The UN was classified according to CMAPs and SNAPs parameter values: a) no neuropathy, if normal values were registered (box); b) axonal involvement, defined by a CMAP and/or SNAP reduction, amplitude reduction of < 30% of reference values and the sensory and/or MVC above 70% of the reference value; c) demyelinating impairment defined by prolonged latency of CMAP and/or SNAP compared to the reference value, together with a reduction of sensory and/or motor velocities to < 85% of the reference value; d) mixed, if there were axonal and demyelinating lesions. If SNAPs and CMAPs could not be obtained by the above mentioned method, the nerve was classified as “no conduction” and excluded from the analysis to describe the pathophysiological process.

Serum levels of inflammatory mediators

Sixteen serum samples from patients affected by leprosy UN were selected, as described in the flowchart. The selection criteria was the presence of CB. The influence of reactional episodes or neuritis was also analyzed within groups with or without CB. Blood samples from leprosy patients were previously collected and processed under sterile conditions. Sera were extracted

and stored at -20°C until use, according to biosafety and good laboratory practices. Concentrations of proinflammatory mediators TNF and IL-6 were measured in the sera by commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer instructions (eBioscience- San Diego, CA, USA). Cytokine levels were measured in picograms per mL (pg/mL) and each value represents the mean of duplicate samples.

Statistical analysis

Descriptive statistics (frequencies, proportions and mean) were performed for both groups. Groups were compared using the chi-square test (χ^2). The level of significance established was 5% and two-sided p-value considered. Cytokine levels were compared using an unpaired t test in GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software).

Results

Mean age of patients affected by leprosy (48.5 years) was similar to that of non-leprosy patients (49.3 years of age), although in the leprosy group there was a higher percentage of patients from 50 to 65 years of age (Table 1).

Clinical findings

Forty seven percent of patients in the leprosy group did not present any disability at the beginning of MDT and clinical classifications were evenly distributed according to treatment. Twenty five percent of patients presented neuritis (either isolated or associated with reversal reaction) at the beginning of treatment.

Ulnar nerve alterations. Nerve enlargement and sensory impairment were significantly higher in leprosy patients (0,001 and 0,003, respectively) than in patients with compressive UN (Table 2).

Neurophysiological findings

Sensory conduction study. When evaluating sensory nerve conduction classification, more cases presented no conduction in the leprosy group than in the non-leprosy group ($p = 0.001$). On the other hand, patients in the non-leprosy group presented a higher proportion of axonal lesions than those in the leprosy group. During reactional episodes we observed

Table 1. Socio-demographic characteristics and clinical ulnar alterations observed in leprosy patients and people with compressive ulnar neuropathy.

| | | Leprosy (n = 93) (12–90) | Non leprosy (n = 36) (13–83) | $\chi^2(p)$ |
|--|--------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------|
| Age (years) | Age range | | | |
| | 12–34 | 26 (28%) | 8 (22%) | |
| | 35–49 | 18 (19%) | 12 (33%) | |
| | 50–65 | 34 (37%) | 11 (31%) | |
| | >65 | 15 (16%) | 5 (14%) | |
| Gender | Female | 28 (30%) | 18 (50%) | |
| | Male | 65 (70%) | 18 (50%) | |
| Ulnar nerve alterations (signs and symptoms) | Paresthesia | 67 (72%) | 26 (72%) | χ^2 (0,184) |
| | Neural pain | 34 (37%) | 8 (22%) | χ^2 (0,059) |
| | Nerve enlargement | 54 (58%) | 10 (28%) | χ^2 (0,001) |
| | Sensory impairment | 81 (87%) | 23 (64%) | χ^2 (0,003) |
| | Motor impairment | 50 (54%) | 22 (61%) | χ^2 (0,451) |

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t001>

Table 2. Clinical characteristics of 93 persons affected by leprosy with ulnar neuropathy.

| | | |
|---|-------------------|----------|
| Disability grade (according to the World Health Organization) | 0 (no disability) | 25 (47%) |
| | 1 | 15 (28%) |
| | 2 | 13 (25%) |
| | Not available | 40 |
| Clinical forms | LL | 18 (19%) |
| | BL | 11 (12%) |
| | BB | 8 (9%) |
| | BT | 21 (23%) |
| | TT | 1 (1%) |
| | I | 9 (10%) |
| | PN | 19(20%) |
| | ND | 6 (6%) |
| Treatment | PB | 50 (54%) |
| | MB | 43(46%) |
| Reaction at diagnosis | No reaction | 54 (58%) |
| | RR | 11 (12%) |
| | ENL | 5 (5%) |
| | Neuritis | 13 (14%) |
| | RR+Neuritis | 10 (11%) |

PB = Paucibacillary; MB = Multibacillary; LL = Lepromatous; BL = Borderline lepromatous; BB = Borderline borderline; BT = Borderline tuberculoid; TT = Tuberculoid; I = Indeterminate; PN = Pure Neural; RR = Reversal Reaction; ENL/EM = , erythema nodosum leprosum/erythema multiform.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t002>

a small increase in nerve damage, however, there was no difference in grade of damage (p = 0.636) (Table 3).

Motor conduction study. Motor function was normal for most of the nerves in both groups of patients, 107 (58%) and 46 (62%) in the leprosy and non-leprosy groups, respectively. Bilateral impairment was significantly higher in the leprosy group than in the non-leprosy group (Table 4). There was no difference in the distribution of altered nerves regarding the classification of the type of lesion (ie, pathophysiological) by the motor NCS between the groups, even after exclusion of non-classified and no conduction nerves. Both groups show demyelinating predominance. The frequency of TD in the Leprosy group was significantly

Table 3. Sensory nerve conduction study findings (classification of sensory ulnar nerves according pathophysiological pattern).

| Classification: Nerve Conduction study n (%) | Sensory | Leprosy (n = 186) | | | | | Total (n = 186) | Non Leprosy (n = 72) |
|--|----------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|--------------|-----------------|----------------------|
| | | No reaction (n = 108) | Reaction (n = 78) | | | | | |
| | | | RR (n = 22) | RR+ Neuritis (n = 20) | Neuritis (n = 26) | ENL (n = 10) | | |
| Normal | 44 (40%) | 5 (22%) | 3 (15%) | 10 (38%) | 3 (30%) | 21 (27%) | 65 (49%) | |
| Axonal Lesion | 8 (7%) | 3 (14%) | 5 (25%) | 2 (8%) | 2 (20%) | 12 (15%) | 20 (13%) | |
| No conduction | 45 (41%) | 10 (45%) | 7 (35%) | 12 (46%) | 4 (40%) | 33 (42%) | 78 (17%) | |
| No classification | 11 (10%) | 4 (18%) | 5 (25%) | 2 (8%) | 1 (10%) | 12 (15%) | 23 (22%) | |

n = number of sensory ulnar nerves; RR = Reversal Reaction; ENL = , erythema nodosum leprosum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t003>

Table 4. Motor nerve conduction study findings.

| mNCS | | Leprosy group | Non leprosy group | p-value |
|-------------------------------|-----------------------|---------------|-------------------|------------------|
| mNCS | Unilateral alteration | 27 (14%) | 26 (35%) | 0.00001 |
| | Bilateral alteration | 52 (28%) | 2 (3%) | |
| Total | | 79 (100%) | 24 (100%) | |
| Pattern of ulnar nerve lesion | Dem | 34 (43%) | 10 (36%) | 0.7982 |
| | Axonal | 14 (18%) | 8 (29%) | |
| | Mixed | 14 (18%) | 5 (18%) | |
| | NC | 8 (10%) | 2 (7%) | |
| | No Classification | 9 (11%) | 3 (10%) | |
| Total of altered mNCS | | 79 (100%) | 28(100%) | |
| CB* | No | 170 (96%) | 66(92%) | P = 0.1162 |
| | Yes | 8 (4%) | 6 (8%) | $\chi^2 = 1.429$ |
| TD* | No | 148 (83%) | 66(92%) | P = 0.041 |
| | Yes | 30 (17%) | 6 (8%) | $\chi^2 = 3.019$ |
| CB* ulnar nerve segment | Forearm | 2 (25%) | 1 (17%) | P = 0.6154 |
| | Elbow | 6 (75%) | 5 (83%) | |
| | Arm | 0 (0%) | 0 (0%) | |
| TD* ulnar nerve segment | Forearm | 17 (57%) | 3 (50%) | P = 0.1979 |
| | Elbow | 6 (20%) | 3 (50%) | |
| | Arm | 7 (23%) | 0 (0%) | |

mNCS = motor nerve conduction study; Dem = demyelination; NC = No Conduction; CB = conduction block; TD = temporal dispersion;

* exams were excluded when there was no conduction in the ulnar nerve (8 nerves in the leprosy group and 2 nerves in the non leprosy group).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t004>

higher than CB (CB x TD = $p = 0.000079$ $\chi^2 = 14.26$). In the non leprosy group the frequency of TD was equal to that of CB. There was no difference when comparing CB in the leprosy group with CB in the compressive group together at any point. Exams of nerves with no conduction were excluded (Table 4).

Leprosy reactions were associated to focal demyelinating lesions at the elbow and TD (Table 5). However, there was no statistically significant difference in the distribution of CB and TD in the different reaction types (TD, $p = 0.1561$); (CB, $p = 0.6794$) (Table 6). In addition, there was no statistically significant difference in the distribution of the occurrence of CB and TD in the groups with neuritis and that without neuritis (TD, $p = 0.3510$); (CB, $p = 0.2876$) (Table 7).

The type of UN was significantly different between patients with or without leprosy reactions ($P = 0.00006$, $\chi^2 = 24.44$) (Table 8).

Table 5. Evaluation of type of segmental demyelination in the leprosy group with any leprosy reaction.

| | | Leprosy reaction | | p value |
|---------------------|-----|------------------|----------------|---------|
| | | No (n = 102)* | Yes (n = 76) * | |
| conduction block | No | 98 (96%) | 72 (95%) | 0.341 |
| | Yes | 4 (4%) | 4 (5%) | |
| temporal dispersion | No | 91(89%) | 57(75%) | 0.006 |
| | Yes | 11(11%) | 19(25%) | |

* nerves with no conduction were excluded (6 nerves in non-reaction leprosy patients and 2 nerves in leprosy reaction patients).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t005>

Table 6. Evaluation of type of segmental demyelination by types of leprosy reaction.

| | | Reactions ^a | | | | P value |
|---------------------|-----|------------------------|--------------|-------------------|----------------------|------------|
| | | RR (n = 21) | ENL (n = 10) | Neuritis (n = 25) | RR+neuritis (n = 20) | |
| conduction block | No | 20 (95%) | 10 (100%) | 23 (92%) | 19 (95%) | p = 0.6794 |
| | Yes | 1 (5%) | 0 | 2 (8%) | 1 (5%) | |
| temporal dispersion | No | 16 (76%) | 8 (80%) | 18 (72%) | 15 (75%) | p = 0.1561 |
| | Yes | 5 (24%) | 2 (20%) | 7 (28%) | 5 (25%) | |

RR = Reversal Reaction; ENL = *Eritema nodosum leprosum*;

^aexcluding those with no nerve conduction (6 nerves in non-reaction leprosy patients and 2 nerves in leprosy reaction patients—1 with neuritis and 1 with RR).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t006>

Cytokine levels

TNF and IL-6 levels were evaluated in serum samples from people affected by leprosy and UN with or without ulnar CB. As observed in Fig 1, IL-6 levels were significantly higher in sera from patients with CB when compared with samples from patients without CB ($p = 0.002$). On the other hand, there were no significant differences for TNF levels (p -value = 0.16).

To ascertain if the increased levels of IL-6 would be derived from reactional episodes or neuritis we selected the serum from leprosy patients without reactional episodes or neuritis and evaluated IL-6 and TNF levels by ELISA (Fig 2). Surprisingly, IL-6 levels were still statistically different between the evaluated groups. Together, these data suggest that IL-6 could be involved CB, a specific nerve impairment that is not related either to the cutaneous reactional episodes or neuritis.

Discussion

Leprosy is an example of an infectious disease that affects the peripheral nervous system (PNS). The diagnosis of leprosy is often delayed, mainly when there is neurological impairment without the classic hypo/anesthetic dermatological lesions, such as in pure neural leprosy. Neuritis is the classic clinical picture of leprosy and is featured by thickening and pain on palpation and nerve damage associated with sensory or sensory and motor impairment [17]. The non-toxic nature of *M. leprae* guarantees the survival of Schwann Cells (SC) during long-term incubation without inducing apoptosis or toxicity. *M. leprae* is likely to reside and replicate in SC for a long time before immune cells actively enter the scene and initiate an inflammatory response, which eventually manifests clinically as this classic neuritis [18].

The ulnar nerve is classically known as one of the nerves most affected by leprosy at any stage and/or clinical form of the disease in the medial epicondyle [3]. However the

Table 7. Evaluation of type of segmental demyelination during episodes of neuritis.

| | | Reaction ^a | | P value |
|---------------------|-----|-----------------------|---|------------|
| | | No neuritis (n = 31) | Neuritis (isolated or with RR) (n = 45) | |
| conduction block | No | 30 (97%) | 42 (93%) | p = 0.2876 |
| | Yes | 1 (3%) | 3 (7%) | |
| temporal dispersion | Não | 24 (77%) | 33 (73%) | p = 0.3510 |
| | Sim | 7 (23%) | 12 (27%) | |

RR = reversal reaction CB = conduction block; TD = temporal dispersion excluding those with no nerve conduction (6 nerves in non-reaction leprosy patients and 2 nerves in leprosy reaction patients—1 with neuritis and 1 with RR).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t007>

Table 8. Type of nerve lesions during reactions episodes.

| | Reaction | | P value |
|---------------|--------------|--------------|------------------------|
| | No (n = 102) | Yes (n = 76) | |
| Normal | 72 (70%) | 35 (46%) | 0.0001 |
| Axonal | 10 (10%) | 4 (5%) | X ² = 24.44 |
| Demyelinating | 10 (10%) | 24 (32%) | |
| Combined | 9 (9%) | 5 (7%) | |
| NC | 1 (1%) | 8 (10%) | |

NC = no conduction.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.t008>

involvement of the ulnar nerve in the elbow segment is also the second most common cause of neuropathy in the upper foci, behind only to the compression of the median nerve in the wrist segment—carpal tunnel syndrome [2]. For this reason a careful investigation should be carried out for the differential diagnosis in a patient with ulnar neuropathy, especially in leprosy endemic areas.

Our clinical findings corroborate those of other authors that demonstrated that in leprosy neuropathy sensory impairment occurs before motor impairment [19, 20]. This fact may be related to the assessment of fine fibers that are affected early in leprosy [20, 21]. On the other hand, external compression of the ulnar nerve may preferentially affect the fibers within the fascicle nearest to the compression, thereby affecting the muscle that those fibers innervate [22]. The bilateral predominance of ulnar impairment in the leprosy group in relation to patients with compressive neuropathy could be explained by the fact that, in leprosy, nerve damage presents a more diffuse pattern [23]. Nerve enlargement was another parameter which was statistically significant in comparison to compressive the neuropathy group. This is a classic feature in leprosy neuropathy [1].

Electrodiagnostic criteria play a crucial role in the routine investigation of nerve conduction studies (NCS). They could provide information about myelin sheath and axons of diseased peripheral nerves [24]. The defining electrodiagnostic criteria for primary demyelination include not only the slowing of motor conduction, but also abnormal temporal dispersion of the CMAP and motor conduction block. Ulnar-nerve entrapment at the elbow is diagnosed when there are demyelinating finds in the NCS in the elbow segment of the nerve [25]. We did

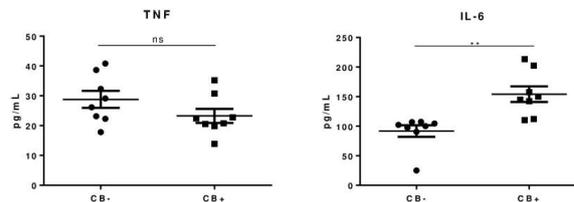


Fig 1. Serum levels of TNF and IL-6 in patients affected by leprosy with ulnar neuropathy and conduction block (CB+, n = 8) and without conduction block (CB-, n = 8). Patients with leprosy neuropathy and CB+ presented significantly increased levels of IL-6, in comparison with CB- patients (P = 0.002). Unpaired t test was performed. TNF levels were similar for both groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.g001>

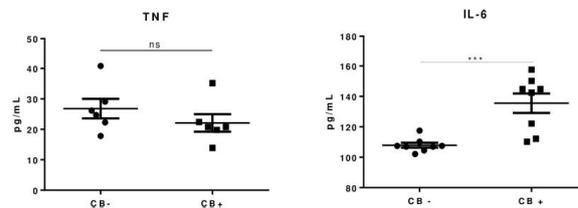


Fig 2. Serum levels of TNF and IL-6 in leprosy patients with conduction block (CB+) and without conduction block (CB-) that did not have reactional episodes or leprosy neuritis (n = 6). For IL-6, CB+ was significantly higher in comparison with CB- ($P = 0.0009$). TNF levels were not statistically different ($P = 0.30$). Unpaired t test was performed.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259804.g002>

not find statistical significance in relation to CB between the leprosy and non-leprosy groups. It could be because most compressive neuropathy did not meet the criteria for CB identification.

We found more demyelinating features in both groups, however, in the leprosy group, TD was more frequent and statistically significant. This could be explained due to the pathophysiology of leprosy neuropathy. The asymmetry of fiber impairment among the fascicles is a feature of this pathology, especially during reactions when there is rapid demyelination secondary to inflammation and increased vascular permeability following increased antigen load [26]. The result is a difference in conduction velocity among the axons. The motor unit potentials will be more desynchronized with longer conduction distances, which may lead to less complete summation and altered phase cancellation leading to changes of the CMAP morphology. Demyelination occurs more frequently in patients during reaction episodes and it is characterized by TD, even in the group of patients without clinical signs of neuritis. This could be caused by silent neuritis.

The role of cytokines and inflammatory milieu in the establishment of demyelination was not fully understood. Here, we evaluated serum levels of both TNF and IL-6 in leprosy patients with or without CB. Our findings showed an increase of IL-6 in leprosy neuropathy patients with nerve CB in comparison with patients without CB ($P = 0.002$). The triggering mechanisms of reactional episodes are not yet agreed upon. However, when we evaluated the IL-6 levels in leprosy patients without reactional episodes or neuritis, we observed that concentrations of this cytokine were still significantly higher in patients with ulnar CB, suggesting that IL-6 may play a critical role in the specific stage of nerve damage related to temporal dispersion, despite circumstances with acute cytokine presence, such as reactional episodes. The results presented in this study open new perspectives to understand the clinical manifestations of the conduction block and the behavior of the immune system during the process of nerve impairment.

Clinical signs such as evaluation of sensory and motor impairment, nerve enlargement and bilateral ulnar nerve injury associated with electrodiagnostic criteria such as demyelinating finds, specifically temporal dispersion, could be tools to help us decide on the best conduct in patients with elbow ulnar neuropathy, and more specifically, to decide if we will indicate a nerve biopsy to for the diagnosis of pure neural leprosy.

Supporting information

S1 File.
(XLSX)

S2 File.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: Márcia Jardim, Euzenir N. Sarno.

Formal analysis: Márcia Jardim, Robson T. Vital, Ximena Illarramendi, Mariana Hacker, Roberta O. Pinheiro.

Funding acquisition: Izabela J. R. Pitta.

Investigation: Márcia Jardim, Robson T. Vital, Beatriz Junqueira, Izabela J. R. Pitta, Roberta O. Pinheiro, Euzenir N. Sarno.

Methodology: Márcia Jardim, Robson T. Vital, Izabela J. R. Pitta, Roberta O. Pinheiro, Euzenir N. Sarno.

Project administration: Euzenir N. Sarno.

Resources: Beatriz Junqueira, Roberta O. Pinheiro.

Software: Ximena Illarramendi, Mariana Hacker.

Supervision: Euzenir N. Sarno.

Writing – original draft: Márcia Jardim.

Writing – review & editing: Ximena Illarramendi, Roberta O. Pinheiro, Euzenir N. Sarno.

References

1. Jardim MR, Antunes SLG, Santos AR, Nascimento OJM, Nery JAC, Sales AM et al. Criteria for diagnosis of pure neural leprosy. *J Neurol.* 2003; 250: 806–809. <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1081-5> PMID: 12883921
2. Dumitru D ZM. Focal peripheral neuropathies. In: Dumitru D AA, Zwarts MJ, ed. *Electrodiagnostic Medicine.* 2 ed. Philadelphia: Hanley and Belfus 2002:1043–126.
3. Vital RT, Illarramendi X, Antunes SL, Nascimento M, Nery JA, Nascimento O, et al. Isolated median neuropathy as the first symptom of leprosy. *Muscle & nerve.* 2013 <https://doi.org/10.1002/mus.23731> PMID: 23681846
4. Kitzinger HB AO, Moser VL, Frey M. Significance of electroneurographic parameters in the diagnosis of chronic neuropathy of the ulnar nerve at the elbow. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2005; 4(37):276–81.
5. Dimberg Elliot L. Electrodiagnostic evaluation of ulnar neuropathy and other upper extremity mono-neuropathies. *Neuro Clin.* 2012 May; 30(2):479–503. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2011.12.003> PMID: 22361371
6. Brown T. R., Kovindha A., et al. Leprosy neuropathy: correlation of clinical and electrophysiological tests. *Indian J Lepr.* 1996; 68(1):1–14. PMID: 8727109
7. Bathala L., Kumar K., Pathapati R, Jain S, Visser LH. Ulnar neuropathy in Hansen disease: clinical, high-resolution ultrasound and electrophysiologic correlations. *J Clin Neurophysiol.* 2012; 29(2):190–3. <https://doi.org/10.1097/WNP.0b013e31824d969c> PMID: 22469686
8. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994; 93:2431–7. <https://doi.org/10.1172/JCI117251> PMID: 8200978
9. Chattopadhyay S, Myers RR, Janes J, et al. Cytokine regulation of MMP9 in peripheral glia: Implications for pathological processes and pain in injured nerve. *Brain Behav Immun.* 2007; 21:561–8 <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.10.015> PMID: 17189680
10. Andrade PR, Jardim MR, Silva ACC, Manhaes PS, Antunes SLG, Vital RV et al. Inflammatory Cytokines Are Involved in Focal Demyelination in Leprosy Neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016; 75(3):272–283. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlv027> PMID: 26888306

11. De Macedo C. S., de Carvalho F. M., Amaral J. J., de Mendonça Ochs S., Assis E. F., Sarno et al. (2018). Leprosy and its reactional episodes: Serum levels and possible roles of omega-3 and omega-6-derived lipid mediators. *Cytokine*. 2018; 112:87–94. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.008> PMID: 30017389
12. Angst DBM, Finheiro RO, Vieira JSDS, Cobas RA, Hacker MAV, Pitta LJR et al. Cytokine Levels in Neural Pain in Leprosy. *Front Immunol*. 2020; 11:23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00023> PMID: 32038662
13. Vital RT, Illaramendi X, Nascimento O, Hacker MA, Samo EN, Jardim MR. Progression of leprosy neuropathy: a case series study. *Brain and behavior*. 2012; 2(3):249–51 <https://doi.org/10.1002/brb3.40> PMID: 22741099
14. DeLisa J. A. (1994). *Manual of nerve conduction velocity and clinical neurophysiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
15. Fuglsang-Frederiksen A, Pugdahl K. Current Status on Electrodiagnostic Standards and Guidelines in Neuromuscular Disorders. *Clinical Neurophysiology* 2010; 122:440–55. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2010.06.029> PMID: 20673740
16. Tankisi H, Pugdahl K, Fuglsang-Frederiksen A, Johnsen B, de Carvalho M, Fawcett PR, et al. Pathophysiology inferred from electrodiagnostic nerve tests and classification of polyneuropathies. Suggested guidelines. *Clin Neurophysiol*. 2005; 116(7):1571–80. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2005.04.003> PMID: 15907395
17. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19(2):338–381. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006> PMID: 16614253
18. Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16:511–518. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.05.021> PMID: 15245748
19. Pearson JM, Ross WF. Nerve involvement in leprosy—pathology, differential diagnosis and principles of management. *Leprosy review*. 1975; 46(3):199–212. <https://doi.org/10.5935/0305-7518.19750022> PMID: 1186413
20. Srinivasan H. Nerve damage, surgery and rehabilitation in leprosy. *Trop Med Parasitol*. 1990; 41(3):347–9 PMID: 2255859
21. Dastur DK, Pandya SS, Antia NH. Nerves in the arm in leprosy. 2. Pathology, pathogenesis and clinical correlations. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1970; 38(1):30–48. PMID: 4098603
22. Preston D;C and Shapiro B.E. ELECTROMYOGRAPHY AND NEUROMUSCULAR DISORDERS: ISBN: 978-0-323-66180-5 CLINICAL-ELECTROPHYSIOLOGIC-ULTRASOUND CORRELATIONS, Elsevier. 3rd ed. 2021. 402–416.
23. McLeod JG, Hargrave JC, Walsh JC, Booth GC, Gye RS, Barron A. Nerve conduction studies in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1975; 43(1):21–31 PMID: 1171828
24. VAN DEN BERGH P.Y.K. and PIERET F. Electrodiagnostic Criteria For Acute And Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve*. 2004; 29: 565–574. <https://doi.org/10.1002/mus.20022> PMID: 15052622
25. Abuzinadah Ahmad R and Addas Bassam M.J. 2019. Ulnar Neuropathy at the Elbow Associated With Focal Demyelination in the Proximal Forearm and Intraoperative Imaging Correlation. *Front Neurol*. 2019; 27, 10:292
26. Thacker A.K., Chandra S., Mukhija R.D., Sarkari N.B.S. Electro-physiological evaluation of nerves during reactions in leprosy. *J Neurol*. 1996; 243:530–535. <https://doi.org/10.1007/BF00886875> PMID: 8836943

ARTIGO 4: Artigo de revisão relacionado ao tema da tese.

Título: Innate Immune Responses in Leprosy. *Frontiers in Immunology*.

Autores: Roberta Olmo Pinheiro; Veronica Schmitz; Bruno Jorge de Andrade Silva; André Dias Alves; **Beatriz Junqueira de Souza**; Mayara Garcia de Mattos Barbosa; Danuza de Almeida Esquenazi; Maria Cristina Vidal Pessolani; Euzenir Nunes Sarno.

Revista: FRONTIERS IN IMMUNOLOGY. v. 9, p. 1-15, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00518>.



Innate Immune Responses in Leprosy

Roberta Olmo Pinheiro^{1*}, Veronica Schmitz¹, Bruno Jorge de Andrade Silva¹, André Alves Dias², Beatriz Junqueira de Souza¹, Mayara Garcia de Mattos Barbosa¹, Danuza de Almeida Esquenazi¹, Maria Cristina Vidal Pessolani² and Euzenir Nunes Sarno¹

¹Leprosy Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ²Cellular Microbiology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Leprosy is an infectious disease that may present different clinical forms depending on host immune response to *Mycobacterium leprae*. Several studies have clarified the role of various T cell populations in leprosy; however, recent evidences suggest that local innate immune mechanisms are key determinants in driving the disease to its different clinical manifestations. Leprosy is an ideal model to study the immunoregulatory role of innate immune molecules and its interaction with nervous system, which can affect homeostasis and contribute to the development of inflammatory episodes during the course of the disease. Macrophages, dendritic cells, neutrophils, and keratinocytes are the major cell populations studied and the comprehension of the complex networking created by cytokine release, lipid and iron metabolism, as well as antimicrobial effector pathways might provide data that will help in the development of new strategies for leprosy management.

Keywords: leprosy, innate immune responses, skin, *Mycobacterium leprae*, autophagy, toll-like receptors, inflammasomes

TRANSMISSION OF LEPROSY

Leprosy is a chronic granulomatous disease, which affects dermis and peripheral nerves and also can involve the eye, the mucosa of the upper respiratory tract, muscle, bone, and testes, caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae* (1, 2).

Early diagnosis of leprosy is a prerequisite for effective therapy and rehabilitation. According to Ridley (3) the earliest lesion in leprosy is an intraepidermal lymphocytic infiltration. Although the transmission pathways of *M. leprae* are not fully understood (4), there are several results that suggest that *M. leprae* is mainly dispersed by the nose, not the skin. The protective mucosal innate mechanism in the respiratory tract may contribute to low infectivity of *M. leprae* after exposition. The release of bacilli by multibacillary patients supports a respiratory transmission (5). Viable bacilli have been found for at least 2 days in discharged nasal secretion (6). The hypothesis of respiratory transmission is validated by studies that demonstrated that adhesins present in *M. leprae* surface, like heparin-binding hemagglutinin and histone-like protein may attach in alveolar and nasal epithelial cells and both cell types are capable of sustaining bacterial survival (7, 8). In addition, a previous study demonstrated that mce1a gene is found in *M. leprae* genome and that mce1a product is associated with *M. leprae* entry into respiratory epithelial cells (9).

HISTOPATHOLOGICAL FEATURES IN LEPROSY

The association of the histopathologic aspects and the immune state of the patient has made it the basis of the all leprosy classification and has helped to understanding the immunologic background of this disease and its transmission.

OPEN ACCESS

Edited by:

Vânia Nieto Brito De Souza,
Instituto Lauro de Souza
Lima, Brazil

Reviewed by:

Antônio GI Castro,
University of Minho, Portugal
Antonio C. R. Vallinoto,
Institute of Biological Sciences (ICB)
of Federal University of Pará, Brazil
Francisco Javier Sánchez-García,
Instituto Politécnico Nacional, Mexico

*Correspondence:

Roberta Olmo Pinheiro
robertaolmo@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 25 September 2017

Accepted: 27 February 2018

Published: 28 March 2018

Citation:

Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA,
Dias AA, de Souza BJ,
de Mattos Barbosa MG,
de Almeida Esquenazi D,
Pessolani MCV and Sarno EN
(2018) Innate Immune
Responses in Leprosy.
Front. Immunol. 9:518.
doi: 10.3389/fimmu.2018.00518

The histopathology of the nose demonstrates that the majority of all bacilli are present mainly in macrophages, as observed in lepromatous skin and other tissues. Bacilli were also seen inside monocytes, Schwann cells, polymorphs and columnar and goblet cells of the pseudostratified epithelium, secretory gland, and ducts (10).

Ridley and Jopling (11) classification establishes that the disease may present different clinical forms that may vary accordingly to histopathological findings and the immune status of the host. Tuberculoid or paucibacillary leprosy is characterized by cell-mediated immune responses to mycobacterial antigens and low infection whereas lepromatous or multibacillary leprosy is characterized by humoral immune response and high bacillary load. The different degree of cellular immune response to *M. leprae* is responsible for different types of granulomatous reaction. Analysis of skin lesion cells demonstrated that epithelioid cells are usually seen in paucibacillary patients [tuberculoid (TT) and borderline tuberculoid], whereas foamy macrophages are found in multibacillary cases [borderline lepromatous (BL) and lepromatous lepromatous (LL)]. Macrophages may present a granular eosinophilic cytoplasm with large numbers of bacilli in early and active lesions. In older lesions, on the other hand, cells are highly vacuolated and the cytoplasm has a foamy appearance (1). Recent studies have demonstrated that the macrophages in lepromatous skin cells are positive for ADRP, suggesting that their foamy aspect may be derived from lipid bodies accumulation induced by *M. leprae* (12, 13).

Two types of leprosy reactions may occur in leprosy patients. Reversal reaction is an acute inflammatory episode in skin and nerves that occurs because of an increase or emergence of cellular immunity against *M. leprae* antigens in lower or previously non-responder patients and may occur in patients of the whole clinical spectrum, except the tuberculoid, TT form (14). In addition, neuritis is frequently associated with reversal reaction episodes. Erythema nodosum leprosum (ENL) occurs in approximately 50% of patients from lepromatous pole due to a complex interaction between innate and cellular immunity poorly understood. Reversal reaction lesions show activated epithelioid macrophages, organized or not as granuloma (15, 16). The hallmark of ENL is an infiltrate of neutrophils in the profound dermis and hypodermis, frequently accompanied by macrophages (17–20). However, neutrophils are not always present (21–23) and skin fragments collected after 72 h demonstrate the presence of lymphocytes, plasma cells, and mast cells (24).

The pathogenesis of nerve destruction varies accordingly the clinical form of the disease (25); although the understanding of mechanisms associated with nerve damage and regeneration in leprosy-associated neuropathy are not fully understood (26). In the pure neural leprosy, bacilli are rarely detected despite the clinical neurological impairment. In multibacillary cases, which show macrophages in considerable numbers within the nerve, bacilli are in greater numbers, often as large bundles or globi. Ultrastructural analyses demonstrate that BL and LL foamy macrophages and vacuolated Schwann cells contain numerous electrondense structures considered as deteriorated and fragmented *M. leprae*. The dense materials are also found in the cytoplasm of

vascular endothelial cells. In lepromatous cells both Schwann and endothelial cells frequently harbor *M. leprae* (25). The nerves are progressively destroyed and replaced by fibrous tissue, in both paucibacillary and multibacillary cases (27).

The peripheral nerve damage in leprosy often results in sensory and motor dysfunctions that lead to permanent deformities and/or disabilities (28). Innate immune and inflammatory genes were modulated by *M. leprae* during early infection (29). Therefore, the understanding of the innate immune pathways in the local of infection is crucial for the development of new strategies to control leprosy and its reactional episodes (Table 1).

INNATE IMMUNE CELLS IN LEPROSY

The use of monoclonal antibodies to label specific membrane antigens is one of the most used tools to identify the presence and the frequency of different cell populations in tissue. Several studies demonstrated an enormous diversity in cell phenotypes present in different tissues. The proportions of each cell type amongst the total population of non-lymphoid mononuclear cells are different in the various leprosy infiltrates (58). In addition, the characterization of different cell phenotypes in dermis and epidermis has been shown by many studies (16, 59–61).

Despite the existence of predominant macrophage phenotypes well described in literature, between the polar forms of leprosy, it is widely recognized that some terminologies are simplistic and cells like macrophages may present a broad spectrum of differentiation states, continuously regulated by a myriad of signals from the microenvironment (62, 63). In conjunction of Th1–Th2 dichotomy, macrophages have been classified in M1 and M2. Stimulation with proinflammatory cytokines as interferon (IFN)- γ activate M1 macrophages, characterized by enhanced antimicrobial, inflammatory, and antigen-presenting properties, whereas cytokines like interleukin (IL)-4 and IL-13 activate M2 macrophages, which portray anti-inflammatory actions, being associated with tissue repair and fibrosis (62, 63).

TABLE 1 | Innate immunity-modulating strategies and possible therapeutic targets.

| Targets | Therapeutic strategies | Reference |
|-----------|------------------------------------|-----------|
| TLR2 | Vaccine | (30, 31) |
| | Vaccine adjuvant | (32) |
| TLR4 | Vaccine | (33, 34) |
| | Vaccine adjuvant | (35, 36) |
| | Adjuvant immunotherapy | (37, 38) |
| TLR9 | Vaccine adjuvant | (39, 40) |
| NOD1 | Immunostimulant therapy | (41, 42) |
| NOD2 | Immunotherapy | (43) |
| | Vaccine adjuvant | (44) |
| Bcl-2 | Induction of apoptosis | (45, 46) |
| TNF | Inhibition of TNF cytokine effects | (47, 48) |
| Autophagy | Vaccine | (49) |
| | Pathogen replication control | (50) |
| | Restriction of mycobacteria growth | (51–57) |

Our previous study has demonstrated that in skin cells from lepromatous patients that developed reversal reaction there is a coexistence of M1 and M2 populations in the midst of the inflammatory environment, together with a wide diversity of DC subsets (15, 64). The hallmark of the reversal reaction has been broadly accepted as the appearance of immature and loose epithelioid granulomas, which differ from the typical mature epithelioid granuloma seen in the TT forms. The epithelioid cell is described as a non-phagocyte of unknown ontogeny with high secretory capacity that could be a differentiation state of skin macrophage populations (65, 66). Facchetti et al. (67) described a cell type they called plasmacytoid monocytes (PM) and suggested, based on ultrastructure and immunohistochemical data, that they are the precursors of the epithelioid cells (68). These cells' phenotypic profile includes DCs and macrophage markers, being identified as a CD3⁺, CD11c⁻, CD14⁻, CD20⁻, CD36⁺, CD56⁻, CD68⁺, CD123⁺, BDCA2⁺ population (69). Since PMs produce high levels of type I IFN and express CD123, they are also thought to be a previous immature state of the plasmacytoid DC (pDC) (67).

Although efforts to identify cell markers and inflammatory mediators *in situ* the immunopathogenesis of leprosy is not fully understood. The high heterogeneity and the existence of mixed cell phenotypes in different timepoints of infection that are influenced by the mediators produced in tissue microenvironment together with the inexistence of antibodies highly specific to clearly differentiate human cells contribute to the difficulty of establish a precise role of each cell type in leprosy immunopathogenesis.

Macrophages

Macrophages have been identified as key players in the pathogenesis of leprosy. It has been demonstrated that during an inflammatory response, bone marrow derived monocytes enter the tissue in large numbers and take part in the defense against the pathogens. In a very elegant study, Kibbie et al. (70) demonstrated that unstimulated endothelial cells trigger monocytes to become M2 macrophages and that IFN- γ activates endothelial cells to induce monocyte to differentiate into M1 macrophages by a mechanism regulated by Jagged 1 (JAG1), a protein localized in the vascular endothelium. It is known that tissue macrophage populations have a mixed embryonic and postnatal bone marrow origin, but the exact mechanisms of differentiation and activation is not understood. There are a lot of evidences that a significant percentage of tissue macrophages are independent from blood monocytes and different phenotypes or functions are the result of different macrophages origin (71). Therefore, it is not possible to differentiate resident-tissue macrophages and recruited monocyte-macrophages once they coexist in a common environment (63).

The heterogeneity of tissue resident macrophages during homeostasis and inflammation shows that macrophages cannot be correctly classified as M1 or M2 when in a specific tissue. Although too simplistic, this nomenclature has been used in order to establish the pivotal role of macrophages in the establishment of the different forms of the disease. Each clinical presentation in leprosy is associated with a different macrophagic

population in host tissue. Macrophages can present a proinflammatory M1 phenotype in which vitamin D-dependent antimicrobial pathway predominates, as observed in the paucibacillary lesions and in the onset of reversal reaction (72, 73); through to anti-inflammatory M2 phenotype in which there is an upregulation of phagocytic pathways as found in lepromatous skin tissues (72–75).

Immunohistochemistry analysis demonstrated a high expression of Galectin-3 on macrophages found in skin lesions of lepromatous patients; in contrast, it is almost undetectable in tuberculoid lesions. The increase of Galectin-3 in lepromatous cells contributes for reduced T cell activation in these patients (76).

de Sousa et al. (74) have demonstrated that the understanding of the role of cytokines, arginase 1, and costimulatory molecules in macrophages may contribute for the comprehension of innate immunity function in the establishment of the polar forms of leprosy. In addition, Teles et al. demonstrated that in macrophages present in lepromatous skin cells there is an upregulation of IL-27 (77), a paradoxal cytokine that may activate IFN- β and IL-10 that contribute for the blockade of antimicrobial pathways (78).

Although the predominance of specific cell markers of M1 or M2 in the different clinical forms of leprosy, there is a continuum of phenotypes between these ranges with some cells sharing phenotypes of both M1 and M2 macrophages. Lepromatous macrophages, while predominantly expressing M2 markers like CD163, indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), arginase, and SRA-I (16, 61, 79–81), have some M1 characteristics like increased iron storage and a diminished expression of the iron exporter Ferroportin (Fpn-1) as well, which indicates that augmented iron deposits may favor *M. leprae* survival inside the foamy macrophages (79) (Figure 1).

Besides iron, *M. leprae* incorporates cholesterol and converts it to cholestenone; however, it does not use cholesterol as a nutritional source (82), although cholesterol colocalizes to *M. leprae*-containing phagosomes, and the blockade of cholesterol decreases the bacterial survival (83). Previous studies have demonstrated that *M. leprae* induces lipid body biogenesis and cholesterol accumulation in host cells (84). In lepromatous lesions, host-derived oxidized phospholipids were detected in macrophages, and one specific oxidized phospholipid, 1-palmitoyl-2-(5, 6-epoxyisoprostane E2)-sn-glycero-3-phosphorylcholine accumulate in macrophages infected with live mycobacteria (85). Normal HDL, a scavenger of oxidized phospholipids, may revert the inhibition of innate immune responses caused by mycobacterial infection. However, this effect was not observed when they have used HDL from lepromatous patients (85).

Dendritic Cells

In skin, DCs are located in the epidermis, as Langerhans cells and in the dermis, as dermal DCs (59). Langerhans cells in leprosy skin lesions express CD1a and langerin. These cells efficiently present antigens to T cells as part of the host response to *M. leprae* (86).

Previous reports have demonstrated that Langerhans cells are dendritic cells; however, recent findings that evaluate the

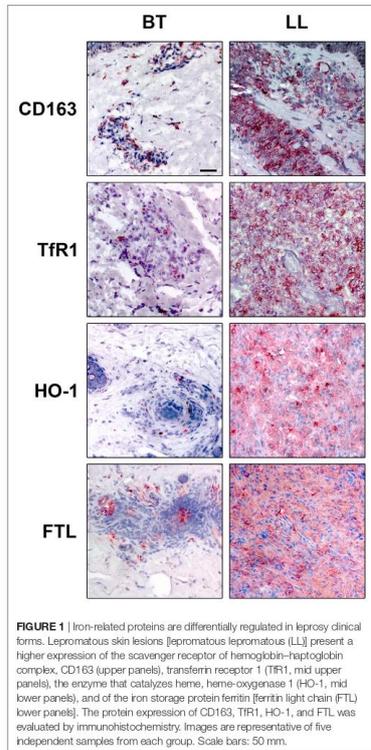


FIGURE 1 | Iron-related proteins are differentially regulated in leprosy clinical forms. Lepromatous skin lesions [lepromatous lepromatous (LL)] present a higher expression of the scavenger receptor of hemoglobin-haptoglobin complex, CD163 (upper panels), transferrin receptor 1 (TfR1, mid upper panels), the enzyme that catalyzes heme, heme-oxygenase 1 (HO-1, mid lower panels), and of the iron storage protein ferritin [ferritin light chain (FTL) lower panels]. The protein expression of CD163, TfR1, HO-1, and FTL was evaluated by immunohistochemistry. Images are representative of five independent samples from each group. Scale bars: 50 μ m.

weak expression of CD1 in lepromatous lesions is not result to a primary defect of the CD1 system itself because CD1a, CD1b, and CD1c could be induced to similar levels in both tuberculoid and lepromatous monocytes. Therefore, local factors at the site of infection may be responsible for the blockade of CD1 expression in lepromatous cells (90).

In lesions from tuberculoid leprosy patients, dendritic cells were linked with matrix metalloproteinase (MMP)-12 and contribute to granuloma formation (75). Previous studies have demonstrated that IDO-1 expression in myeloid dendritic cells and macrophages are part of the immune response associated with granuloma formation and may be associated with the granulomatous reactions in the skin (92). Our previous study has demonstrated that in lepromatous lesions IDO⁺ cells with a dendritic-like morphology are detected on the dermis and in some endothelial cells (16). The characterization of IDO⁺ cell phenotype demonstrates that almost all cells constituting the lepromatous dermal infiltrate are positive for HLA-DR, CD11c, CD86, and CD68. In tuberculoid lesion a few cells are positive for IDO and CD11c⁺ and CD86⁺ cells are detected in the center of the granuloma probably corresponding to epithelioid macrophages (16). In lepromatous patients that develop reversal reaction an increase in IDO gene expression is observed (15). The morphological changes in the reversal reactions skin lesions are accompanied by phenotypic heterogeneity of myelomonocytic populations. The epithelioid cells exhibit both DC and macrophage markers, hinting at the complexity of this cell type. These cells found in the reversal reaction granuloma are CD68⁺, CD83⁺, CD206⁺, CD209⁺, CD1b⁺, CD11c⁺, and CD123⁺, but did not express CD163. Double-immunofluorescence data also show that these cells express BDCA2 and BDCA4, suggesting that define pDC populations.

Mycobacterium leprae components trigger CD209 on DCs to induce IL-10 production in lepromatous cells (93). In addition, CD209 may function as a receptor of entry for *M. leprae* in host cells (94). The dendritic cells phagocytose *M. leprae* and express antigens derived from the bacteria, such as phenolic glycolipid 1 (PGL-1). Hashimoto et al. (95) demonstrated that *M. leprae* infection decreases the capacity of DCs in inducing T-cell responses by a mechanism that involves PGL-1, since the blockade of PGL-1 in the surface of DCs enhanced CD4(+) and CD8(+) T-cell responses. Other studies have also demonstrated that PGL-1 impairs dendritic cells maturation and activation, thereby facilitating *M. leprae* survival (96, 97).

Keratinocytes

The response of the epidermis to *M. leprae* infection can be shown by the different aspects seen along the spectrum as well as during reactional states. The epidermis plays an important role in the local inflammatory response detected in leprosy. Keratinocytes expressing ICAM-1 are found in lesions from leprosy patients that present strong cellular immune response against *M. leprae* (tuberculoid, reversal reaction), but not in lepromatous lesions (98). PCR analysis demonstrated the expression of inflammatory cytokines TNF, IL-6, and IL-12 besides high expression of ICAM-1 in the epidermis of reactional leprosy lesions (99).

transcriptional profile have suggested that Langerhans cells may be considered resident macrophages (87, 88). Since several published studies classified these cells as dermal dendritic cells, we maintain this definition in this review.

CD1a⁺ cells are associated with the outcome of reactional episodes in leprosy (89). CD1a is expressed in CD123⁺ cells located in the dermis from both lepromatous and reversal reactional patients (15). Quantitative analysis showed a clear predominance of dendritic cells in tuberculoid leprosy (80, 89–91), whereas lesions from patients with the lepromatous pole of the disease show weak induction of CD1 proteins (89, 90). This

Keratinocytes are more susceptible to *M. leprae* infection than dendritic cells that spontaneously present higher concentrations of the antimicrobial peptide cathelicidin (100). Previous study demonstrated an up-regulation of human beta-defensins 2 and 3 (hBD2 and hBD3) in keratinocytes stimulated with *M. leprae*, which is reverted by corticosteroids. In addition, they have demonstrated that corticosteroid treatment of patients with reversal reactions causes a suppression of hBD2 and hBD3 in skin biopsies, as measured by qPCR (101).

The role of keratinocytes during the reactional episodes needs to be better evaluated since besides their possible role in reversal reaction, these cells may be involved in the pathogenesis of ENL. It was demonstrated that Thalidomide therapy down-regulates the expression of ICAM-1 and HLA-DR antigens in keratinocytes (102).

HLA-DR⁺ keratinocytes could present *M. leprae* antigens to well-defined CD4⁺ cells (103). However, increased keratinocyte expression did not represent a control of bacillary load since recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) administered intradermally or by subcutaneous route leads to enhanced keratinocyte growth but the bacillary numbers remain unchanged (104). In tuberculoid skin lesion cells keratinocytes are the major producer of CXCL-10 but not in lepromatous cells (105), probably because it is necessary IFN- γ produced by T cells to induce this chemokine.

Schwann Cells

Mycobacterium leprae may cause peripheral neuropathy. *M. leprae* is able to overcome a succession of physical barriers—epineurium, perineurium and endoneurium—until it reaches the Schwann cell, taking advantage of the difficulty of immune cells to access these impervious barriers (106–108). *M. leprae* may infect both myelinating and non-myelinating Schwann cells in patients with leprosy, but *M. leprae* preferentially infects the non-myelinating Schwann cells (109). There is not a consensus if the neural damage is a result of *M. leprae* entry inside cells or it occurs because of the inflammatory infiltrate.

Masaki et al. (110) demonstrated that *M. leprae* may generate dedifferentiated Schwann cells by causing initial demyelination to establish infection, colonize the cells, and subsequently reprogram them to a progenitor/stem cell-like cells (pSLCs) stage to spread the infection. In addition to downregulating Schwann cell lineage transcripts and reactivating developmental genes, *M. leprae* induce a large numbers of immune-related genes comprising mostly innate immunity from the very early stage of Schwann cell infection and peaking in their expression when Schwann cells have changed their cell identity to pSLCs (29). A previous study demonstrated that *M. leprae* could modulate Schwann cell glucose metabolism to increase the generation of the reduction capacity and free-radical control (111), but the impact of these regulation in nerve damage needs to be more clarified.

Schwann cells in skin lesions from leprosy patients express TLR2 (112, 113). In nerve biopsies from patients with neuritis, it was identified TNE, TNF receptors and TNF-converting enzyme in Schwann cells (26). It was speculated that *M. leprae* ligands induce Schwann cell death by a pathway that involves both TLR2

and TNF. It is possible that the pro inflammatory cytokines may contribute for Schwann cell apoptosis after cell interaction with *M. leprae*, which is associated with the pathogenesis of nerve damage (112, 113).

Analysis of nerves of pure neuritic patients demonstrated that MMP-2, MMP-9, and TNF mRNA production is highly induced in the AFB(-) lesions in relation to AFB(+) neuritic leprosy and non-leprosy control group (114), whereas CCL2 and CXCL10 chemokines are not determinant for the establishment of AFB(+) or AFB(-) in advanced stages of leprosy nerve lesions. CCL2 expression is associated with macrophage recruitment and fibrosis (115).

Recent findings have demonstrated that nerve damage begins in the early stages of the disease and may be more strongly related to response of innate immunity. In this context, the complement system has been placed with relevant role. This system is part of the innate immunity against bacterial pathogens through the formation of Membrane Attack Complex (MAC), but can lead to an inflammatory process followed by tissue injury if activated uncontrollably. Histopathological studies demonstrated MAC deposition on cutaneous sensory nerves (116) and on damaged nerves of lepromatous patients. However, the same was not found for tuberculoid patients (117).

Advancing in studies related to the complement system as a trigger for nerve damage, a pathogen-associated molecular pattern (PAMP), the glycolipid lipoarabinomannan (LAM), a component of the mycobacteria cell wall, has been investigated as the starting mechanism for activation of this pathway. It has been shown *in vitro* that this PAMP activates the Schwann cell by the formation of opsonin C3 and MAC (118). In nerve biopsies of leprosy patients, in turn, the LAM and MAC antigen deposition was found. MAC and LAM colocalizes on axons suggesting a relation between LAM in complement activation and nerve damage (117). In a mouse nerve lesion model, the interaction of LAM with the nerve was observed, activating the pathway of the complement system (117).

Recent evidences suggest that axon demyelination occurs in function of the interaction of PGL-1 with myelinating glia and their infection. According to Madigan et al. (119) demyelination and axonal damage are initiated by infected macrophages that patrol axons. PGL-1 induces nitric oxide synthase in infected macrophages that results in damaged axons by injuring their mitochondria and inducing demyelination (119).

Neutrophils

Little attention has been given to the function of the neutrophils in leprosy. It was previously demonstrated that both circulating neutrophils and monocytes are loaded with intracellular *M. leprae* without obvious inflammatory phenomena (120, 121). We reported that neutrophils isolated from lepromatous leprosy patients with or without ENL release TNF and IL-8 after stimulation with *M. leprae* (122). Moreover, the apoptotic rate of ENL neutrophils is higher as compared to lepromatous patients and healthy volunteers (122).

Microarrays analyses comparing skin lesions of lepromatous patients and patients with ENL revealed the up-regulation of cell movement genes, including E-selectin and its ligands, key

molecules that mediate neutrophil recruitment to inflammatory sites (123). According to these results "granulocyte adhesion and diapedesis" were identified by Dupnik et al. (124) as one of the top canonical pathways characterizing ENL. Moreover, neutrophil and endothelial cell gene networks were identified in ENL samples as part of the vasculitis that results in tissue injury (75).

Recently, we reported that during ENL, but not in RR, circulating neutrophils express CD64 on cell surface, while nonreactive leprosy or healthy volunteers have lower levels of CD64 expression. CD64 expression on circulating neutrophils and in ENL lesion is down modulated after thalidomide treatment. Moreover, the severity of ENL is associated with high levels of CD64 expression, also pointed as an early biomarker for ENL (20). Increased CD64 expression *in vivo* has been associated with an increase in neutrophil function and adhesion to the endothelium (125–128).

Elevated levels of TNF and other proinflammatory cytokines have been associated with episodes of ENL, while suppression of TNF leads to clinical improvement (102, 129). We reported evidence that pentraxin-3 (PTX3), originally described as a protein induced by primary inflammatory signals, such as TNF and IL-1 β , is released systemically and at the site of ENL lesions (130). We also demonstrated that there is a positive correlation between PTX3 serum levels and CD64 surface expression on circulating neutrophils. Moreover, we showed that the majority of neutrophils (MPO⁺ cells) presented throughout the ENL lesion express PTX3 (130). Additionally, thalidomide treatment of ENL downregulated PTX3 levels. Interestingly, PTX3 serum levels were higher in lepromatous patients without reaction that developed ENL, persisting after the onset. In contrast, lepromatous patients that developed reversal reaction had lower levels of PTX3 prior and during the inflammatory episode. Those data indicate that high levels of PTX3 may be associated with ENL occurrence and point to PTX3 as a potential ENL biomarker able to differentiate from a reversal reaction episode. Belone et al. (131) previously reported the PTX3 mRNA is exclusively expressed in ENL lesions.

MANIPULATION OF INNATE IMMUNITY BY *M. leprae*

To survive within the host cell, mycobacteria must escape intracellular mycobactericidal mechanisms.

The activation of innate immunity may occur after the interaction of PAMPs, which are conserved microbial structures, with their respective pattern recognition receptors (PRRs), present in host cells. PRRs are also able to recognize endogenous molecules from damaged cells, known as damage-associated molecular patterns (DAMPs), resulting in several chronic inflammatory and autoimmune diseases. After the interaction of PAMPs and/or DAMPs with PRRs, the release of intracellular signals leads to the induction of important genes transcription for cellular activation or induction of phagocytosis. Different PRRs are expressed in the same cell, which makes it able to recognize several classes of microorganisms and different endogenous molecules. The PRRs described so far are C-type lectin receptors,

Nod-like receptors (NLRs), RIG-I-like receptors, and toll-like receptors (TLRs) (132–134).

Complement activation, apoptosis, and autophagy are other innate mechanisms modulated by the mycobacteria. The understanding of the mechanisms and pathways used by mycobacteria to manipulate the innate immunity may contribute for the development of new strategies of diagnostic and control of the disease.

Toll-Like Receptors

Several studies indicate that the recognition of mycobacteria by TLRs represents an essential step in generating an immune response capable of protecting the infection.

Different molecules that constitute *M. leprae* have been characterized as ligands and potent stimulators of TLRs, mainly involving TLR2. Killed *M. leprae* is able to mediate TLR2/1 heterodimers and TLR2 homodimers cell activation, indicating the presence of triacylated lipoproteins in the bacterium (135). In fact, a genome-wide scan of *M. leprae* identified 31 lipoproteins with potential to act as ligands of TLR2/1 heterodimer (135). As *M. leprae* cannot be grown *in vitro*, the purification of proteins from the few bacteria in armadillos becomes very difficult. Therefore, Krutzik et al. (135) used synthetic lipopeptides to show that the 19 and 33-kDa lipoproteins from *M. leprae* are capable to activate *in vitro* both monocytes and dendritic cells. In addition, lesions from leprosy patients with localized tuberculoid form displayed more strongly expression of TLR2 and TLR1 as compared with the lepromatous form of the disease. These data suggest the involvement of TLRs in the host defense against the mycobacteria.

Nerve damage is an important clinical hallmark of leprosy disease responsible for the patient morbidity. In this sense, the activation and expression of TLR2 have also been investigated in human Schwann cells (112). The lipopeptide that mimics the *M. leprae* 19-kDa lipoprotein, and can act as TLR2 agonist, induced an increase in the number of apoptotic cells during activation of Schwann cells (112). It was possible to identify the expression of TLR2 in Schwann cells present in lesions from tuberculoid patients, in addition to cells that had undergone apoptosis *in vivo* (112), providing a link between innate immune response and nerve injury in leprosy.

The presence of foamy cells highly infected is characteristic in lepromatous, but not in tuberculoid lesions. The foamy phenotype results from the capacity of *M. leprae* to induce and recruit host-derived lipids to bacterial-containing cells, forming lipid droplets (12). Interestingly, TLR6 is essential for lipid droplets biogenesis in *M. leprae*-infected Schwann cells, but not TLR2 (136). On the other hand, the formation of lipid droplets in *M. leprae*-bearing macrophages appeared to be only partially dependent on both TLR2 and TLR6 (12). These data suggest the involvement of alternative TLRs or additional receptors associated with the innate immune response for *M. leprae* recognition in leprosy.

Polycarpou et al. (137) demonstrated that *M. leprae* activates TLR4, by containing uncharacterized ligands, since the classic ligand agonist of TLR4 is LPS (138). TLR4 neutralizing antibody pretreatment decreased the production of TNF, IL-6, and CXCL-10 in human macrophages stimulated with *M. leprae* (137).

Furthermore, *M. leprae* upregulates TLR4 protein expression on macrophages from healthy subjects, but not in macrophages from BCG-vaccinated donors (137). Macrophages from non-vaccinated healthy donors treated with BCG present reduced TLR4 expression suggesting a role of TLR in the protective effect of BCG. Associated with this, the treatment of reversal reaction with corticosteroids decrease gene and protein expression of both TLR2 and TLR4 in skin lesion cells (139), indicating the involvement of receptors also in triggering the inflammatory process. A study linking the innate immunity pathways with the development of ENL suggested that recognition of DNA by TLR9 constitutes a major inflammatory pathway activated during ENL (140). The proinflammatory cytokines storm observed during ENL seems to be related to the massive release of mycobacterial TLR9 ligands during multidrug therapy (140). Moreover, the inflammatory response could be amplified by the binding of endogenous DNA to TLR9 (140), since expressive tissue destruction also occurs during ENL (141). Dias et al. (140) demonstrated a higher TLR9 expression in cells from ENL patients when compared with nonreactional lepromatous controls. In addition, significantly increased circulating levels of human and mycobacterial DNA-histone complexes were detected in ENL patients when compared with nonreactional controls (140). Furthermore, TLR9 agonists were able to induce the secretion of higher levels of TNF, IL-6, and IL-1 β in ENL when compared with nonreactional patients and healthy individuals (140). The same effect was observed in the cells stimulated with lysed *M. leprae* (140). The use of a synthetic antagonist of nucleic acid-sensing TLRs suggested that this may be an alternative for the development of more effective drugs to treat ENL.

The genetic association demonstrated several single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in TLR genes that may be associated with susceptibility or resistance to leprosy and leprosy reactions. However, most studies in this area focused mainly on the mutation of TLRs 1 and 2 and their correlation with the disease. The SNP within TLR1 (I602S) is associated with reduced responses to mycobacterial agonists (142). The TLR1 602S variant, but not the TLR1 602I variant, in heterologous systems showed the expected absence of the receptor on the plasma membrane (142). The 602S allele is associated with a reduced incidence of leprosy (142).

Previous studies showed that TLR1 variants N248S is a susceptibility factor for leprosy (143, 144). Additionally, PBMCs from individuals carrying 248S produce a lower TNF/IL-10 proportion levels after stimulation *in vitro* with *M. leprae*, but not with controls as LPS (TLR4 agonist) or PAM3CSK4 (TLR2 agonist) (144). Analysis of samples from patients that developed reactional episodes demonstrated that a TLR1 N248S-linked feature is associated with the development of disabilities and the progression from infection to disease (143).

Another transmembrane domain polymorphism in TLR1 (T1805G) was associated with susceptibility to leprosy, regulating the innate immune response (145). The group analyzed 933 Nepalese leprosy patients, 238 of whom with reversal reaction, and investigated the association of TLR1 variation with different clinical forms of leprosy or reversal reaction, demonstrating that the T1805G allele is associated with protection from reversal reaction (145).

A TLR2 mutation in the lepromatous, but not in tuberculoid patients, was also identified (146). TLR2 from PBMCs from lepromatous patients presented a C to T substitution at nucleotide 2029 from the start codon. This modification was not identified in tuberculoid individuals (146). In fact, periphery monocytes from leprosy patients with modification in TLR2 (Arg677Trp) were significantly less responsive to cell lysate of *M. leprae* than subjects carrying wild-type TLR2 (147). Additionally, the secretion of IL-12 was lower in patients with TLR2 mutation (147). A study performed in Ethiopian patients investigated different polymorphisms in TLR2 (597C \rightarrow T, 1350T \rightarrow C, and a microsatellite marker) (148). The mutation-associated risk of developing leprosy was assessed. The microsatellite and the 597C \rightarrow T polymorphisms were both associated with susceptibility to reversal reaction as predicted by reversal reaction.

The roles of TLR1 and 2 in leprosy and leprosy reactions were described and it may contribute for perspectives in leprosy management.

NLRs

The nucleotide-oligomerization domain (NOD) proteins are intracellular and cytoplasmic receptors. Previous data have demonstrated that the blockade of phagocytosis inhibits IL-1 β and TNF production in response to *M. leprae*, suggesting that intracellular signaling is also required for macrophage activation after *M. leprae* infection. In addition, NF- κ B activation and expression of TNF and IL-1 β were observed in NOD1- and NOD2-transfected cells stimulated with *M. leprae* (149).

NLRPs are intracellular receptors that recognize PAMPs and induce the secretion of both caspase-1 and IL-1 β in the context of inflammasome. SNPs in NLRP1 and NLRP3 genes were analyzed in Brazilian leprosy patients. The NLRP1 combined haplotype rs2137722/G-rs12150220/T-rs2670660/G was significantly more frequent in patients than in controls as well as in paucibacillary than in multibacillary patients (150). The NLRP1 combined haplotype rs2137722/G-rs12150220/A-rs2670660/G was associated with paucibacillary leprosy suggesting that NLRP1 might be involved in the susceptibility to leprosy (150).

Nod-like receptors may recruit and activate inflammatory caspases into inflammasomes or may trigger inflammation via different pathways including the NF- κ B mitogen-activated protein kinase and regulatory factor pathways (151).

Polymorphisms in NOD2 are associated with leprosy susceptibility. Activation of monocytes via NOD2 induces preferentially the differentiation into dendritic cells, which was mediated by IL-32. Notably, IL-32 is able to induce monocytes from healthy donors or from tuberculoid patients to rapidly differentiate into DCs, which is more efficient than GM-CSF-derived DCs in presenting antigen to major histocompatibility complex class I-restricted CD8(+) T cells (152). In contrast, monocytes from patients with the lepromatous form of leprosy did not produce IL-32 in response to NOD2L and did not induce DC differentiation by a mechanism that is mediated by IL-10 (152). In tuberculoid patients there was a higher expression of NOD2 and IL-32 as well as the frequency of CD1b (+) DCs at the site of leprosy infection when compared with lepromatous patients (152, 153).

Complement Cascade

Lipoarabinomannan is a molecule from *M. leprae* that is associated with nerve damage. Curiously, previous studies demonstrated that LAM activates complement and previous study demonstrated the important role of complement in nerve damage in leprosy (117). Analysis of skin biopsies demonstrates that the percentage of CD3d, MAC, and LAM deposition is significantly higher in lepromatous when compared to tuberculoid patients (154). MAC deposition colocalizes with LAM and is found on axons in skin lesions of lepromatous patients. In tuberculoid lesions, the presence of T cells positive for CD3d was observed in surrounding granulomas without MAC deposition (154). Analysis of skin lesions from reactional patients demonstrated an increase in MAC immunoreactivity when compared to non-reactional leprosy patients (154). Immunofluorescence analysis showed an increase of C1q deposition in both reversal reaction and ENL lesions when compared to non reactional matched patients (124).

Lahiri et al. demonstrated that when disrupted, *M. leprae* could activate complement (155) and polymorphisms in genes of complement cascade suggest an association of complement genes with leprosy susceptibility (156).

Apoptosis

Analysis of skin lesion cells demonstrated that apoptosis is more frequent in tuberculoid and reversal reaction than in lepromatous cells (157–159). Lepromatous cells present increased expression of the antiapoptotic protein Bcl-2, suggesting that the decrease in cell death could contribute for sustains the infection (158).

The hypothesis of the involvement of apoptosis in the control of bacillary load was reinforced by *in vitro* studies that demonstrated that clofazimine, a compound used for the treatment of leprosy since the 1960s has the capacity to induce apoptosis in macrophages, suggesting that the antibacterial and anti-inflammatory properties of this drug are mediated by apoptosis (160). Analysis of apoptosis in skin cells from treated patients revealed that in both tuberculoid and lepromatous lesions, there is an increase in the frequency of apoptotic cells at 3 and 6 months after the start of the treatment (161). Analysis of lesions in either reversal reaction or ENL demonstrated a significant increase in apoptosis only in ENL lesions and those that were at 6 months of treatment (161).

Although several studies suggesting the antibacterial role of apoptosis in infected cells, there are evidences that in tuberculoid patients apoptosis is a mechanism that contributes to maintain the infection, instead of the pro inflammatory infiltrate and the presence of pro inflammatory cytokines. In tuberculoid lesions predominate a M1 phenotype, although few M2 cells were present in the skin lesions of these patients (16, 61). We have previously demonstrated that *in vitro* GM-CSF-differentiated monocytes (M1) stimulated with both *M. leprae* and apoptotic cells change their phenotype and express M2 cells-specific markers, such as CD163 and SRA-I. Moreover, the phagocytosis of apoptotic cells by *M. leprae*-infected macrophages increases the secretion of anti-inflammatory mediators as IL-10, TGF- β , and arginase, corroborating the hypothesis that in paucibacillary

patients, although the presence of an effective cellular immune response, efferocytosis contributes to maintain few susceptible macrophages in skin lesions which contributes for sustain the infection (81).

The induction of apoptosis in Schwann cells stimulated with *M. leprae* was previously demonstrated (112, 113) and some studies associated apoptosis in Schwann cells as an important event for nerve damage. *M. leprae* induces demyelination in Schwann cells by a pathway that involves the activation of the MAPK (ERK 1/2). A previous study has demonstrated that the ganglioside 9-O-acetyl GD3 is associated with *M. leprae* entry in Schwann cells and that the blockade of this ganglioside may result in a reduced activation of the MAPK (ERK 1/2) pathway (162).

Autophagy

The canonical macroautophagy (hereafter termed autophagy) pathway is an evolutionarily conserved mechanism through which organelles and proteins are degraded and recycled by the lysosomal system to promote cellular and organismal homeostasis. The major hallmark of autophagy is the formation of double-membrane vesicles called autophagosomes, which engulf and driving intracellular targets for degradation. Autophagy impairment is widely implicated in the pathology of several diseases, including microbe infection, cancer, and metabolic, cardiovascular, and neurodegenerative disorders (163).

During infectious processes, autophagy helps the immune system by degrading intracellular microbes through a selective form of autophagy called xenophagy. The significance of autophagy in numerous infectious processes was established, including those caused by bacterial, parasitic, and viral pathogens, as well as the microbial strategies used to avoid or subvert autophagy and promote their own survival (164, 165). In contrast, the role of autophagy in leprosy pathogenesis remained unknown until recently. The first evidence that *M. leprae* can be targets for autophagy was revealed by transmission electron microscopy studies. It was observed that during the initial growth phase of *M. leprae* in macrophages, the mycobacteria are present in single membrane vacuoles with few nearby lysosomes, and the bacilli are intact. At the peak of the growth phase, the number of lysosomes increases and *M. leprae* is located in a large number of double membrane vacuoles.

During the stationary phase, macrophages have a vacuolar appearance and contain a significant number of lysosomes. *M. leprae* organisms are inside double membrane vacuoles, and most of these bacteria are degenerate (166). Chandi and Job (167) described the presence of double membrane phagosomes in macrophages after 40 min of *M. leprae* exposure, and after that, the lysosomes fuse with these *M. leprae*-containing vacuoles. These data provide evidences that *M. leprae* may have been the first bacterial pathogen to interact with the autophagic pathway and reinforces the role of autophagy in leprosy.

A genomewide association study of leprosy revealed that a polymorphism in the upstream autophagy activator gene NOD2 is a susceptibility factor to develop *M. leprae* multibacillary infection (168, 169). Interestingly, the polymorphisms in other autophagy-associated genes such as PARK2, VDR, and TLR2, are also correlated with the multibacillary leprosy susceptibility

(51, 146, 170–174). In other hand, these triggers of autophagy are preferentially expressed in the skin lesions of the auto limited tuberculoid clinical form (72, 135, 152). Subsequently, it has been suggested that the polymorphism in the autophagy gene IRGM, which is linked to susceptibility to Crohn's disease and tuberculosis (175–178), is associated with an increased risk of developing leprosy because it affects the production of inflammatory cytokines such as IFN- γ (179). In addition, increased IRGM expression was observed in monocytes and macrophages infected with *M. leprae*, as well as, monocytes from the self-limited tuberculoid form presented a higher expression of IRGM, as compared to cells of clinically progressive lepromatous patients (180). IRGM, an effector of IFN- γ -mediated autophagy, controls the autophagic pathway through their interaction with ULK1 and BECN1, governing the assembly of the initiation complex, and then together with ATG16L1 and NOD2, forms a molecular complex that promotes antimycobacterial defense (181, 182).

More recently, our group described an association between *M. leprae* death and targeting of mycobacteria to the autophagic pathway in human macrophages. It has been shown that the genetic silencing of the OASL antiviral protein, which is produced through the detection of *M. leprae* DNA mediated by STING sensor, increases the levels of autophagy and decreases the viability of the mycobacteria, being reversed by

the autophagy blockade (183). Ma and cols (184) suggested that although autophagy could promote the elimination of intracellular pathogens, the induction of the autophagic pathway by *M. leprae* would be a mycobacteria pro-persistence factor. It has been reported that although activation of autophagy occurs in response to *M. leprae* infection in macrophages, it also promotes an IL-10-producing T cell-mediated anti-inflammatory response, which in a negative feedback cycle inhibits autophagy and allows *M. leprae* survival in macrophages (184). However, this work was based only on the alone use of CYTO-ID/CAT, an acidotropic dye from the monodansylcadaverine group recently developed to monitor autophagy in living cells (185), which is not recommended by autophagy experts (186).

Finally, we demonstrated the key role of autophagy in leprosy polarization (187). We showed that autophagy is differentially regulated between leprosy polar forms, uncovering an essential role for Beclin 1 protein in this process, which was upregulated in tuberculoid patients. In contrast, a higher expression of BCL2 protein was determined in lepromatous patients. While Beclin 1 is a key initiator of the functional formation of autophagosomes in mammals and may be induced by IFN- γ to activate autophagy, the BCL2 antiapoptotic protein inhibits autophagy by binding and sequestering Beclin 1 from the class III PIK3 complex (188). In tuberculoid skin lesion cells IFN- γ -induced autophagy

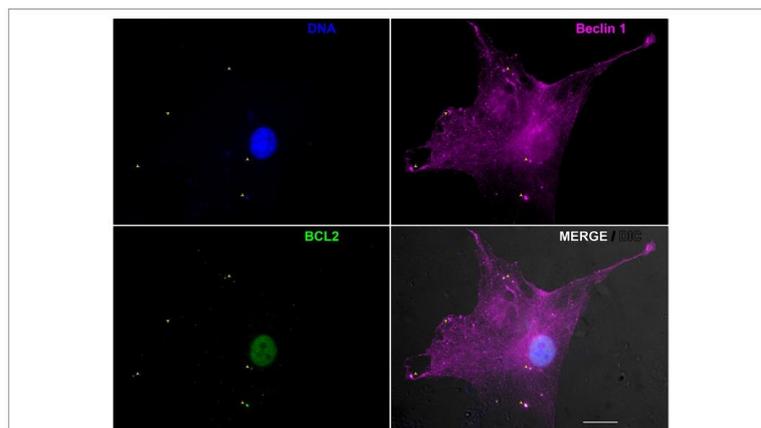


FIGURE 2 | Beclin 1-mediated autophagy during *Mycobacterium leprae* infection in skin lesion-derived lepromatous macrophage. Macrophages were isolated from the skin lesion of a lepromatous leprosy patient and cultured for 18 h in full nutrient medium. Cells were fixed and immunofluorescence for Beclin 1 (magenta) and BCL2 (green) was performed. Cellular and bacterial DNA were stained with DAPI (blue). Cell and mycobacteria morphology are shown by Nomarski differential interference contrast (gray). This image shows a lepromatous tissue macrophage interacting with *M. leprae*. BCL2 colocalizes with Beclin 1-entrapped mycobacteria (arrowheads) allowing *M. leprae* survival through autophagy inhibition. The modulation of autophagy has the potential to be useful in the leprosy treatment, as well as to prevent leprosy reactional episodes. Scale bar: 20 μ m.

contributes for *M. leprae* control, whereas in lepromatous cells the BCL2-mediated block of the Beclin 1 autophagic pathway promotes the mycobacterial persistence (Figure 2). As previously described (184), we also observed an inhibition of autophagy triggered by live *M. leprae* infection in lepromatous macrophages, however, it can be reverted by IFN- γ treatment. In addition, the levels of autophagy were restored in lepromatous patients who developed the reversal reaction episodes, an inflammatory state associated with increased IFN- γ expression (187). Thus, autophagy is an important innate mechanism associated with leprosy immunopathogenesis.

PERSPECTIVES

The influential role of innate immunity in leprosy biology and their potential as therapeutic targets are now widely recognized. To gain a better understanding of these pathways and to discover new ones, new technologies such as single cell RNA sequencing studies are needed.

Future works should aim to determine further the roles of the neutrophils in host-mycobacteria interaction, with a focus in their role during disease progression. This review supports the role of neutrophils as effector cells and not only as migratory cells following chemoattractants in the context of leprosy. Another promising field that should be investigated by leprologists is the innate lymphoid cell (ILC) biology. ILCs have already been implicated in many studies including metabolism, tissue remodeling and protection against infection.

Although tissue resident macrophages have been extensively studied, phenotypic and functional characteristics of skin resident macrophages and its interaction with the skin sensory nervous system are not fully understood. Furthermore, the dynamic interaction of the resident and the migratory immune cells in the skin may improve our understanding of the immunological events that occur *in situ*. Of note, a recent report demonstrated that nitric oxide secreted by *M. leprae*-carrying macrophages directly damage nerve fibers, by inducing axonal and mitochondrial swelling followed by demyelination phenotype (119). This

was a first report showing detrimental roles of infected macrophages that patrols the nerve and induces nerve pathology.

Local Innate immune mechanisms are crucial to determine the outcome of the different clinical forms and the reactional episodes in leprosy patients. The evaluation of the single cell gene expression using RNA sequencing (scRNAseq) emerged as a powerful tool in genomics. scRNAseq provides the expression profile of individual cells. Studies of scRNAseq in leprosy field is a valuable strategy and may shed light on the understanding of the functionality of each cell populations as well as the innate mechanisms induced by *M. leprae* that may contribute for the development of new strategies of control of the disease.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Concept of the review: RP and ES. Design and write the review: RP, VS, BJAS, BJS, AD, DE, and MP. Figures and legends: RP, VS, BJAS, MB, and ES. Final approval of the version to be published: RP, VS, and ES.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the contribution of Bernardo Bascarelli Miguel de Oliveira Pascarelli for helping us in editing the Figure files included in this manuscript.

FUNDING

Authors have grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (www.cnpq.br) 311488/2009-9 and 311489/2009-9 to RP and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (www.faperj.br) 203675 to RP, ES, MP, and RP are research fellows of the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development—CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Desikan KV, Iyer CG. The distribution of *Mycobacterium leprae* in different structures of the skin. *Lepr Rev* (1972) 43:30–7.
- Kaplan G, Cohn ZA. Regulation of cell-mediated immunity in lepromatous leprosy. *Lepr Rev* (1986) 57:199–202.
- Ridley DS. Pathology and bacteriology of early lesions in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* (1971) 39:216–24.
- Bratschi MW, Steinhilber P, Wickenden A, Gillis TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Lepr Rev* (2015) 86:142–55.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* (2006) 19:338–81. doi:10.1128/CMR.19.2.338-381.2006
- Davey TF, Rees RJ. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr Rev* (1974) 45:121–34.
- de Lima CS, Marques MA, Debrrie AS, Almeida EC, Silva CA, Brennan PJ, et al. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* (2009) 292:162–9. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01488.x
- Silva CA, Daneshmandi L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet E, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infect Immun* (2013) 81:2645–59. doi:10.1128/IAI.00147-13
- Sato N, Fujimura T, Masuzawa M, Yogi Y, Matsuoka M, Karoh M, et al. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. *J Dermatol Sci* (2007) 46:101–10. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.01.006
- McDougall AC, Rees RJ, Weddell AG, Kanan MW. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. *J Pathol* (1975) 115:215–26. doi:10.1002/path.1711150406
- Ridley DS, Jepling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* (1966) 34:255–73.
- Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VGC, Sarno EN, Atella GC, et al. Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* (2010) 87:371–81. doi:10.1189/jlb.0609433
- Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in

- Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2012) Suppl 1: 156–66. doi:10.1590/S0074-02762012000900023
14. Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Odoia MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol* (2014) 71:795–803. doi:10.1016/j.jaad.2014.03.034
 15. Andrade PR, Amadeu TP, Nery JA, Pinheiro RO, Sarno EN. CD123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy reversal reaction. *Br J Dermatol* (2015) 172:268–71. doi:10.1111/bjd.13430
 16. de Souza Sales J, Lara FA, Amadeu TP, de Oliveira Fulco T, da Costa Nery JA, Sampaio EP et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in lepromatous leprosy immunosuppression. *Clin Exp Immunol* (2011) 165:251–63. doi:10.1111/j.1365-2239.2011.04412.x
 17. Job CK, Gude S, Macaden VP. Erythema nodosum leprosum, a clinicopathologic study. *Int J Lepr* (1964) 32:177–84.
 18. Anthony J, Vaidya MC, Dasgupta A. Ultrastructure of skin in erythema nodosum leprosum. *Cytobios* (1983) 36:17–23.
 19. Santa S, Muhammed K, Najeeb R, Rajan GN, Anza K, Binitha MP, et al. A study on histological features of lepra reactions in patients attending the Dermatology Department of the Government Medical College, Calicut, Kerala, India. *Lepr Rev* (2013) 84:51–64.
 20. Schmitz V, Pratt RB, Barbosa MG, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et al. Expression of CD84 on circulating neutrophils favoring systemic inflammatory status in erythema nodosum leprosum. *PLoS Negl Trop Dis* (2016) 10:e004955. doi:10.1371/journal.pntd.0004955
 21. Waters MF, Turk JL, Wenambu SN. Mechanisms of reactions in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* (1971) 39:417–28.
 22. Rea TH, Levan NE. Erythema nodosum leprosum in a general hospital. *Arch Dermatol* (1975) 111:1575–80. doi:10.1001/archderm.111.12.1575
 23. Hussain R, Lucas SB, Kifayet A, Jamil S, Raynes J, Uqaili Z, et al. Clinical and histological discrepancies in diagnosis of ENL reactions classified by assessment of acute phase proteins SAA and CRP. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* (1995) 63:222–30.
 24. Mahalay MC, Helwig EB, Tolentino JG, Binford CH. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* (1965) 33:28–49.
 25. Kumar V, Sachan T, Natrajan M, Sharma A. High resolution structural changes of Schwann cell and endothelial cells in peripheral nerves across leprosy spectrum. *Ultrastruct Pathol* (2014) 38:86–92. doi:10.3109/01913123.2013.870273
 26. Andrade PR, Jardim MR, da Silva AC, Manhas PS, Antunes SL, Vital R, et al. Inflammatory cytokines are involved in focal demyelination in leprosy neuritis. *J Neuropathol Exp Neurol* (2016) 75:272–83. doi:10.1093/jnen/nlv027
 27. Petito RB, Amadeu TP, Pascarelli BM, Jardim MR, Vital RT, Antunes SL, et al. Transforming growth factor-beta1 may be a key mediator of the fibrogenic properties of neural cells in leprosy. *J Neuropathol Exp Neurol* (2013) 72:351–66. doi:10.1097/NEN.0b013e31828b6c60
 28. Wilder-Smith EP, Van Brakel WH. Nerve damage in leprosy and its management. *Nat Clin Pract Neurol* (2008) 4:556–63. doi:10.1038/nclinpractneurol.0941
 29. Masaki T, McClintchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambhadrana A. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cell Reprogram* (2014) 16:9–17. doi:10.1089/cell.2013.0064
 30. Lau YF, Delyannis G, Zeng W, Mansell A, Jackson DC, Brown LE. Lipid-containing mimetics of natural triggers of innate immunity as CTL-inducing influenza vaccines. *Int Immunol* (2006) 18:1801–13. doi:10.1093/intimm/dx114
 31. Ingale S, Wolfert MA, Gaekwad J, Buskas T, Boons G-J. Robust immune responses elicited by a fully synthetic three-component vaccine. *Nat Chem Biol* (2007) 3:663–7. doi:10.1038/nchembio.2007.25
 32. Bessler WG, Mittensbühler K, Esche U, Huber M. Lipopeptide adjuvants in combination treatment. *Int Immunopharmacol* (2003) 3:1217–24. doi:10.1016/S1567-5769(03)00227-4
 33. Vernacchio L, Bernstein H, Pelton S, Allen C, MacDonald K, Dunn J, et al. Effect of monophosphoryl lipid A (MPL) on T-helper cells when administered as an adjuvant with pneumococcal-CRM197 conjugate vaccine in healthy toddlers. *Vaccine* (2002) 20:3658–67. doi:10.1016/S0264-410X(02)00413-9
 34. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi. *Expert Rev Vaccines* (2003) 2:219–29. doi:10.1586/14760584.2.2.219
 35. Kaufmann SH, Vith U, Thele JE, Van Embden JD, Finmrich F. Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kDa protein. *Eur J Immunol* (1987) 17:351–7. doi:10.1002/eji.1830170308
 36. Ishizaka ST, Hawkins LD. E6020: a synthetic toll-like receptor 4 agonist as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* (2007) 6:773–84. doi:10.1586/14760584.6.5.773
 37. Drachenberg KJ, Heinzkill M, Urban E, Woronicki SR. Efficacy and tolerability of short-term specific immunotherapy with pollen allergoids adjuvanted by monophosphoryl lipid A (MPL) for children and adolescents. *Allergol Immunopathol (Madr)* (2003) 31:270–7. doi:10.1016/S0301-0546(03)79195-2
 38. Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, et al. Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* (2003) 33:198–208. doi:10.1046/j.1365-2222.2003.01699.x
 39. Lefter CA, Verhelshly D, Kliman DM. Heterogeneity in the human response to immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunother* (2003) 26:313–9. doi:10.1097/0002371-200307000-00003
 40. Tulic MK, Fiset P-O, Christodouloupolos P, Vaillancourt P, Desrosiers M, Lavigne F, et al. A 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* (2004) 113:235–41. doi:10.1016/j.jaci.2003.11.001
 41. Sato Y, Maruyama S, Kawai C, Matsumori A. Effect of immunostimulant therapy on acute viral myocarditis in an animal model. *Am Heart J* (1992) 124:428–34. doi:10.1016/0002-8703(92)90609-Y
 42. Yokota Y, Watanabe Y, Wakai Y, Mine Y. Protective effects of immunoreactive peptide, FK565 against systemic and local infections with herpes simplex virus and murine cytomegalovirus and respiratory tract infection with influenza virus in mice. *J Antibiot* (1992) 45:258–64. doi:10.7164/antibiotics.45.258
 43. Watanabe T, Asano N, Murray PJ, Ozato K, Tailor P, Fuss II, et al. Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* (2008) 118:545–59. doi:10.1172/JCI33345
 44. Meshcheryakova E, Malanov E, Philippot D, Andronova T, Ivanov V. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramylpeptides. *Vaccine* (2007) 25:4515–20. doi:10.1016/j.vaccine.2007.04.006
 45. Zangmeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, Simões-Wüst AP, Gautschi O, Luedke GH, et al. A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-xL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* (2000) 6:2547–55.
 46. Tsang SP, Kim KM, Basañez C, Giedt CD, Simon J, Zimmerberg J, et al. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol* (2001) 3:183–91. doi:10.1038/50955095
 47. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Barbra CA, et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum* (2003) 48:35–45. doi:10.1002/art.10697
 48. Gupta AK, Skinner AR. A review of the use of infliximab to manage cutaneous dermatoses. *J Cutan Med Surg* (2004) 8:77–89. doi:10.1177/12034754040800202
 49. Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* (2009) 15:267–76. doi:10.1038/nm.1928
 50. Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, Campbell GR, Zou Z, Kinch L, et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature* (2013) 494:201–6. doi:10.1038/nature11866
 51. Faber M, Stenger S, Shin D-M, Yuk J-M, Liu PT, Realegeno S, et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med* (2011) 3:104ra102. doi:10.1126/scitranslmed.3003045

52. Kim J-I, Lee H-M, Shin D-M, Kim W, Yuk J-M, Jin HS, et al. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimicrobial drug action. *Cell Host Microbe* (2012) 11:457–68. doi:10.1016/j.chom.2012.03.008
53. Floto RA, Sarkar S, Perlestein EO, Kampmann B, Schreiber SL, Rubinsztein DC. Small molecule enhancers of rapamycin-induced TOR inhibition promote autophagy, reduce toxicity in Huntington's disease models and enhance killing of mycobacteria by macrophages. *Autophagy* (2007) 3:620–2. doi:10.4161/aut.4898
54. Panhar SP, Guler R, Khaulang R, Lang DM, Hurdal R, Mhlanga MM, et al. Statin therapy reduces the *Mycobacterium tuberculosis* burden in human macrophages and in mice by enhancing autophagy and phagosome maturation. *J Infect Dis* (2014) 209:754–63. doi:10.1093/infdis/jit550
55. Rekha RS, Rao Murva SSVI, Wan M, Raqib R, Bergman P, Brighenti S, et al. Phenylbutyrate induces LL-37-dependent autophagy and intracellular killing of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Autophagy* (2015) 11:1688–99. doi:10.1080/15548627.2015.1075110
56. Schiebeler M, Brown K, Hegyi K, Newton SM, Rema M, Hepburn L, et al. Functional drug screening reveals anticonvulsants as enhancers of mTOR-independent autophagic killing of *Mycobacterium tuberculosis* through inositol depletion. *EMBO Mol Med* (2015) 7:127–39. doi:10.15252/emmm.20140137
57. Juárez E, Carranza C, Sánchez G, González M, Chávez J, Sarabia C, et al. Loperamide restricts intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2016) 55:837–47. doi:10.1165/rncmb.2015-0383OC
58. Collings LA, Waters MF, Poulter LW. The involvement of dendritic cells in the cutaneous lesions associated with tuberculoid and lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol* (1985) 62:458–67.
59. Ochoa MT, Lencastre A, Krutzik SR, Becker TC, Modlin RL. "Dermal dendritic cells" comprise two distinct populations: CD1⁺ dendritic cells and CD209⁺ macrophages. *J Invest Dermatol* (2008) 128:225–31. doi:10.1038/jid.2008.56
60. Rea TH, Shen JY, Modlin RL. Epidermal keratinocyte Ia expression, langerhans cell hyperplasia and lymphocytic infiltration in skin lesions of leprosy. *Clin Exp Immunol* (1986) 65:253–9.
61. Moura DE, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, et al. CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol* (2012) 42:2925–36. doi:10.1002/eji.201142198
62. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci* (2015) 724:11026. doi:10.1007/s00018-015-1995-y
63. Gordon S, Plüddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol* (2017) 15:53. doi:10.1186/s12915-017-0392-4
64. Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MG, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Rev Clin Immunol* (2015) 11:391–407. doi:10.1586/1744666X.2015.1012501
65. Epstein WL. Granuloma formation in man. *Pathobiol Annu* (1977) 7:1–30.
66. Turk JL, Narayanan RB. The origin, morphology, and function of epithelioid cells. *Immunobiology* (1982) 161:274–82. doi:10.1016/S0171-2985(82)80083-1
67. Facchetti E, De Wolf-Peters C, De Vos R, van den Oord JJ, Palford KA, Desmet VJ. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T cells) in granulomatous lymphadenitis. *Hum Pathol* (1989) 20:588–93. doi:10.1016/0046-8177(89)90248-7
68. Facchetti E, Candlago E, Verni W. Plasmacytoid monocytes express IL-3 receptor alpha and differentiate into dendritic cells. *Histopathology* (1999) 35:88–9. doi:10.1046/j.1365-2559.1999.07284.x
69. Facchetti F, Verni W. Plasmacytoid monocytes and plasmacytoid dendritic cells. Immune system cells linking innate and acquired immunity. *Pathologica* (2002) 94:163–75. doi:10.1007/s102420200027
70. Kibbie J, Teles RM, Wang Z, Hong P, Montoya D, Krutzik S, et al. Jagged1 instructs macrophage differentiation in leprosy. *PLoS Pathog* (2016) 12:e1005808. doi:10.1371/journal.ppat.1005808
71. Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology* (2015) 144:541–8. doi:10.1111/imm.12451
72. Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe* (2009) 6:343–53. doi:10.1016/j.chom.2009.09.002
73. Montoya D, Modlin RL. Learning from leprosy: insight into the human innate immune response. *Adv Immunol* (2010) 105:1–24. doi:10.1016/S0065-2776(10)05001-7
74. de Sousa JR, de Sousa RP, Araújo TL, Dias LB Jr, Carneiro FR, Fuzi HT, et al. In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop* (2016) 157:108–14. doi:10.1016/j.actatropica.2016.01.008
75. Inkeles MS, Teles RM, Poulard D, Andrade PR, Madigan CA, Lopez D, et al. Cell-type deconvolution with immune pathways identifies gene networks of host defense and immunopathology in leprosy. *JCI Insight* (2016) 1:e88843. doi:10.1172/jci.insight.88843
76. Chung AW, Sieling PA, Schenk M, Teles RM, Krutzik SR, Hsu DK, et al. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis* (2013) 207:947–56. doi:10.1093/infdis/jis920
77. Teles RMB, Kelly-Scumpia KM, Samo EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, et al. IL-27 suppresses antimicrobial activity in human leprosy. *J Invest Dermatol* (2015) 135:2410–7. doi:10.1038/jid.2015.195
78. Teles RM, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ. Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science* (2013) 339:1448–53. doi:10.1126/science.1233665
79. de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BI, da Paixão, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes Infect* (2017) 19(11):505–14. doi:10.1016/j.micinf.2017.06.006
80. Fachin LR, Soares CT, Belone AF, Trombone AP, Rosa PS, Guidella CC, et al. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol* (2017) 32:385–96. doi:10.14670/HH-11-804
81. de Oliveira Pulco T, Andrade PR, de Mattos Barbosa MG, Pinto TG, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infect Immun* (2014) 82:3968–78. doi:10.1128/IAI.02194-14
82. Marques MA, Berrêdo-Pinho M, Rosa TL, Pujari V, Lemes RM, Lery LM, et al. The essential role of cholesterol in the intracellular survival of *Mycobacterium leprae* is not coupled to central carbon metabolism and energy production. *J Bacteriol* (2015) 197:3698–707. doi:10.1128/JB.00625-15
83. Mattos KA, Oliveira VC, Berrêdo-Pinho M, Amara JJ, Antunes LC, Melo RC, et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol* (2014) 16:797–815. doi:10.1111/cmi.12279
84. Lobato LS, Rosa PS, Ferreira J, da S, Neumann A, da S, et al. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob Agents Chemother* (2014) 58:5766–74. doi:10.1128/AAC.01826-13
85. Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, et al. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest* (2008) 118:2917–28. doi:10.1172/JCI34189
86. Hanger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugra M, Burdick AE, Rea TH, et al. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* (2004) 113:701–8. doi:10.1172/JCI200419655
87. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* (2013) 14:986–95. doi:10.1038/ni.2705
88. Doebel T, Voisin B, Nagao K. Langerhans cells – the macrophage in dendritic cell clothing. *Trends Immunol* (2017) 38(11):817–28. doi:10.1016/j.it.2017.06.008
89. Miranda A, Amadeu TP, Schuder G, Alvares FB, Dappert N, Ferreira H, et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology* (2007) 51:649–56. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02848.x
90. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, Tedder TF, Rea TH, Modlin RL, et al. CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol* (1999) 162:1851–8.
91. Hirai KE, Araújo TL, Silva LM, de Souza JR, de Souza J, Dias LB Jr, et al. Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients. *Microb Pathog* (2016) 91:18–25. doi:10.1016/j.micpath.2015.11.013

92. Von Bubnoff D, Scheler M, Wilms H, Wenzel J, von Bubnoff N, Häcker G, et al. Indoleamine 2,3 dioxygenase – expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. *J Am Acad Dermatol* (2011) 65:819–32. doi:10.1016/j.jaad.2010.07.050
93. Kumar S, Naqvi RA, Bhat AA, Rani R, Ali R, Agnihotri A, et al. IL-10 production from dendritic cells is associated with DC SIGN in human leprosy. *Immunobiology* (2013) 218:1488–96. doi:10.1016/j.imbio.2013.05.004
94. Solleux EJ, Sarno EN, Hernandez MO, Moseley E, Horsley J, Lopes UG, et al. DC-sign association with the Th2 environment of lepromatous lesions: cause or effect? *J Pathol* (2006) 209:182–9. doi:10.1002/path.1972
95. Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, et al. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun* (2002) 70:5167–76. doi:10.1128/IAI.70.9.5167-5176.2002
96. Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol* (2007) 178:338–44. doi:10.4049/jimmunol.178.1.338
97. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev* (2011) 82:344–57.
98. Sullivan L, Sano S, Pirmez C, Salgame P, Mueller C, Hofman F, et al. Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect Immun* (1991) 59:4154–6.
99. Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res* (2002) 294:355–62. doi:10.1007/s00403-002-0340-0
100. Lyrio EC, Campos-Souza IC, Coriêa LC, Lechuga GC, Vericimo M, Castro HC, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with the HaCaT human keratinocyte cell line: new frontiers in the cellular immunology of leprosy. *Exp Dermatol* (2015) 24:536–42. doi:10.1111/exd.12714
101. Cogen AL, Walker SL, Roberts CH, Haggé DA, Neupane KD, Khadge S, et al. Human beta-defensin 3 is up-regulated in cutaneous leprosy type 1 reactions. *PLoS Negl Trop Dis* (2012) 6:e1869. doi:10.1371/journal.pntd.001869
102. Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JA, Miguez CP, Viana SM, et al. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* (1993) 168:408–14. doi:10.1093/infdis/168.2.408
103. Mutis T, De Bueger M, Bekker A, Ottenhoff TH. HLA class II+ human keratinocytes present *Mycobacterium leprae* antigens to CD4+ Th1-like cells. *Scand J Immunol* (1993) 37:43–51. doi:10.1111/j.1365-3083.1993.tb01663.x
104. Kaplan G, Walsh G, Guido LS, Meyn P, Burkhardt RA, Abalos RM, et al. Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* (1992) 175:1717–28. doi:10.1084/jem.175.6.1717
105. Kaplan G, Luster AD, Hancock G, Cohn ZA. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* (1987) 166:1098–108. doi:10.1084/jem.166.4.1098
106. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* (2005) 6:671–82. doi:10.1038/nrn1746
107. Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog Neurobiol* (2010) 91:102–7. doi:10.1016/j.pneurobio.2009.12.002
108. Neal JW, Gasque P. The role of primary infection of Schwann cells in the aetiology of infective inflammatory neuropathies. *J Infect* (2016) 73:402–18. doi:10.1016/j.jinf.2016.08.006
109. Jin SH, An SK, Lee SB. The formation of lipid droplets favors intracellular *Mycobacterium leprae* survival in SW-10, non-myelinating Schwann cells. *PLoS Negl Trop Dis* (2017) 11:e0005687. doi:10.1371/journal.pntd.0005687
110. Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raoum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell* (2013) 152:51–67. doi:10.1016/j.cell.2012.12.014
111. Medeiros RCA, Girardi K, do C, de V, Cardoso FKL, Mietto B, et al. Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* (2016) 291:21375–87. doi:10.1074/jbc.M116.725283
112. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* (2003) 71:1427–33. doi:10.1128/IAI.71.3.1427-1433.2003
113. Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, et al. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol* (2005) 64:882–90. doi:10.1097/01.jen.0000182982.09978.66
114. Teles RM, Antunes SL, Jardim MR, Oliveira AL, Nery JA, Sales AM, et al. Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients. *J Peripher Nerv Syst* (2007) 12:195–204. doi:10.1111/j.1529-8027.2007.00139.x
115. Medeiros MF, Rodrigues MM, Vital RT, da Costa Nery JA, Sales AM, de Andrea Hacker M, et al. CXCL10, MCP-1, and other immunologic markers involved in neural leprosy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2015) 23:220–9. doi:10.1097/PAL.0000000000000074
116. Gomes GL, Nahn EP Jr, Santos RK, Da Silva WD, Kipnis TL. The functional state of the complement system in leprosy. *Am J Trop Med Hyg* (2008) 78:605–10.
117. Bshia El Idrissi N, Das PK, Fluiter K, Rosa PS, Vreijling J, Troost D, et al. *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipopolysaccharide as the dominant complement activator. *Acta Neuropathol* (2015) 129:653–67. doi:10.1007/s00401-015-1404-5
118. Ramaglia V, King RH, Nourallah M, Wolterman R, de Jonge R, Ramkema M, et al. The membrane attack complex of the complement system is essential for rapid Wallerian degeneration. *J Neurosci* (2007) 27:7663–72. doi:10.1523/JNEUROSCI.5623-06.2007
119. Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng TY, Zailaa J, et al. A macrophage response to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid initiates nerve damage in leprosy. *Cell* (2017) 170:973–85. doi:10.1016/j.cell.2017.07.030
120. Drutz DJ, Chen TS, Lu WH. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. *N Engl J Med* (1972) 287:159–64. doi:10.1056/NEJM197207272870402
121. Padma MN, Premanath M, Desikan KV. Bacillæmia in reactive states of leprosy. *Lepr India* (1976) 48:413–8.
122. Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JA, Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol* (1999) 65:364–71. doi:10.1002/jlb.65.3.364
123. Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RI, Damosseaux R, et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis* (2010) 201:558–69. doi:10.1093/infdis/jiu612
124. Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, Amorim FM, Costa MR, Keesen TSL, et al. Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. *J Infect Dis* (2015) 211:1658–76. doi:10.1093/infdis/jiu612
125. Höglund M, Hakansson L, Venge P. Effects of in vivo administration of G-CSF on neutrophil functions in healthy volunteers. *Eur J Haematol* (1997) 58:195–202. doi:10.1111/j.1600-0609.1997.tb00947.x
126. Turzanski J, Crouch SP, Fletcher J, Hunter A. Ex vivo neutrophil function in response to three different doses of glycosylated rHuG-CSF (lenograstim). *Br J Haematol* (1997) 96:46–54. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2000.x
127. Repp R, Valerius T, Sandler A, Gramatzki M, Iro H, Kalden JR, et al. Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* (1991) 78:885–9.
128. Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* (1998) 91:266–74.
129. Sampaio EP, Moraes MO, Nery JA, Santos AR, Matos HG, Sarno EN. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin Exp Immunol* (1998) 111:300–8. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00510.x
130. Mendes MA, de Carvalho DS, Amadeu TP, Silva BI, de A, Prata RB, et al. Elevated pentraxin-3 concentrations in patients with leprosy: potential

- biomarker of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* (2017) 216:1635–43. doi:10.1093/infdis/jix267
131. Belone A, de FF, Rosa PS, Trombone APF, Fachin LR, Guidella CC, et al. Genome-wide screening of mRNA expression in leprosy patients. *Front Genet* (2015) 6:334. doi:10.3389/fgene.2015.00334
 132. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* (1997) 91:295–8. doi:10.1016/S0092-8674(00)80412-2
 133. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* (2003) 278:8869–72. doi:10.1074/jbc.C200651200
 134. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* (2010) 140:805–20. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
 135. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu S, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* (2003) 9:525–32. doi:10.1038/nm864
 136. Mattos KA, Oliveira VG, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* (2011) 187:2548–58. doi:10.4049/jimmunol.1101344
 137. Polycarpou A, Holland MJ, Karageorgiou I, Edlaoui A, Walker SL, Willocks S, et al. *Mycobacterium leprae* activates toll-like receptor-4 signaling and expression on macrophages depending on previous bacillus calmette-guérin vaccination. *Front Cell Infect Microbiol* (2016) 6:72. doi:10.3389/fcimb.2016.00072
 138. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* (1998) 282:2085–8. doi:10.1126/science.282.5396.2085
 139. Walker SL, Roberts CH, Atkinson SE, Khadge S, Macdonald M, Neupane KD, et al. The effect of systemic corticosteroid therapy on the expression of toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 in the cutaneous lesions of leprosy reversal reactions. *Br J Dermatol* (2012) 167:29–35. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.10891.x
 140. Dias AA, Silva CO, Santos JPS, Batista-Silva LR, Acosta CCD, Fontes ANB, et al. DNA sensing via TLR-9 constitutes a major innate immunity pathway activated during erythema nodosum leprosum. *J Immunol* (2016) 197:1905–13. doi:10.4049/jimmunol.1600042
 141. Murphy GH, Sanchez NP, Flynn TC, Sanchez JL, Mihm MC Jr, Soter NA. Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. *J Am Acad Dermatol* (1986) 14:59–69. doi:10.1016/S0190-9622(86)70008-X
 142. Johnson CM, Lyle EA, Omuetti KO, Stephens VA, Yegin O, Alpsy E, et al. Cutting edge: a common polymorphism impairs cell surface trafficking and functional responses of TLR1 but protects against leprosy. *J Immunol* (2007) 178:7520–4. doi:10.4049/jimmunol.178.12.7520
 143. Schuring RP, Hamann L, Faber WR, Pahan D, Richardus JH, Schumann RR, et al. Polymorphism N248S in the human toll-like receptor 1 gene is related to leprosy and leprosy reactions. *J Infect Dis* (2009) 199:1816–9. doi:10.1093/infdis/jnn121
 144. Marques C, de S, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. *J Infect Dis* (2013) 208:120–9. doi:10.1093/infdis/jit133
 145. Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* (2008) 2:e231. doi:10.1371/journal.pntd.0000231
 146. Kang TJ, Chae GT. Detection of toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2001) 31:53–8. doi:10.1111/j.1574-695X.2001.tb01586.x
 147. Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine* (2002) 20:56–62. doi:10.1006/cyto.2002.1982
 148. Bochud P-Y, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* (2008) 197:253–61. doi:10.1086/524688
 149. Kang TJ, Chae GT. The role of intracellular receptor NODs for cytokine production by macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Immune New* (2011) 11:424–7. doi:10.4110/in.2011.11.6.424
 150. Pontillo A, Laurentino W, Crowella S, Pereira AC. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol* (2013) 19:274–9. doi:10.1016/j.meegid.2013.06.006
 151. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. *Front Immunol* (2013) 4:333. doi:10.3389/fimmu.2013.00333
 152. Schenk M, Krutzik SR, Sieling PA, Lee DJ, Teles RM, Ochoa MT, et al. NOD2 triggers an interleukin-32-dependent human dendritic cell program in leprosy. *Nat Med* (2012) 18:555–63. doi:10.1038/nm.2650
 153. Schenk M, Mahapatra S, Le P, Kim HJ, Choi AW, Brennan PJ, et al. Human NOD2 recognizes structurally unique intramural dipeptides from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* (2016) 84(9):2429–38. doi:10.1128/IAI.00334-16
 154. Bahia El Idrissi N, Iyer AM, Ramaglia V, Rosa PS, Soares CT, Baas F, et al. In situ complement activation and T-cell immunity in leprosy spectrum: an immunohistological study on leprosy lesional skin. *PLoS One* (2017) 12:e0177815. doi:10.1371/journal.pone.0177815
 155. Lahiri R, Sandoval FG, Krahenbuhl JL, Shannon EJ. Activation of complement by *Mycobacterium leprae* requires disruption of the bacilli. *Lepr Rev* (2008) 79:311–4.
 156. Zhang DF, Huang XQ, Wang D, Li YY, Yao YG. Genetic variants of complement genes ficolin-2, mannose-binding lectin and complement factor H are associated with leprosy in Han Chinese from Southwest China. *Hum Genet* (2013) 132:629–40. doi:10.1007/s00439-013-1273-8
 157. Walsh DS, Lane JE, Abalos RM, Myint KS. TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2004) 41:265–9. doi:10.1016/j.femsim.2004.04.002
 158. Brito de Souza VN, Nogueira ME, Belone A, de F, Soares CT. Analysis of apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2010) 60:270–4. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00746.x
 159. Patnaik N, Agarwal S, Sharma S, Sharma S, Pandhi D. Evaluation of apoptosis in skin biopsies of patients of borderline leprosy and lepra reversal reaction. *Indian J Dermatol* (2015) 60:60–5. doi:10.4103/0019-5154.147795
 160. Fukutomi Y, Maeda Y, Makino M. Apoptosis-inducing activity of clofazimine in macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* (2011) 55:4000–5. doi:10.1128/AAC.00434-11
 161. Ajith C, Gupta S, Radotra BD, Arora SK, Kumar R, Dogra S, et al. Study of apoptosis in skin lesions of leprosy in relation to treatment and lepra reactions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* (2005) 73:269–76.
 162. Ribeiro-Resende VT, Ribeiro-Guimarães ML, Lemes RM, Nascimento LC, Alves L, Mendez-Otero R, et al. Involvement of 9-O-acetyl GD3 ganglioside in *Mycobacterium leprae* infection of Schwann cells. *J Biol Chem* (2010) 285:34086–96. doi:10.1074/jbc.M110.147272
 163. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* (2013) 368:651–62. doi:10.1056/NEJMe1205406
 164. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Botza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect* (2009) 11:181–90. doi:10.1016/j.micinf.2008.11.006
 165. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* (2009) 5:527–49. doi:10.1016/j.chom.2009.05.016
 166. Evans MJ, Levy L. Ultrastructural changes in cells of the mouse footpad infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* (1972) 5:238–47.
 167. Chandl SM, Job CK. The early cellular response to *M. leprae*. An ultrastructural study. *Lepr India* (1978) 50:345–57.
 168. Zhang F-R, Huang W, Chen S-M, Sun L-D, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* (2009) 361:2609–18. doi:10.1056/NEJMoa0903753
 169. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Husseym S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* (2010) 11:55–62. doi:10.1038/ni.1823
 170. Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis* (1999) 179:187–91. doi:10.1086/314536

171. Mira MT, Alcais A, Nguyen VT, Moraes MO, Di Flumeri C, Vu HT, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* (2004) 427:636–40. doi:10.1038/nature02326
172. Yuk J-M, Shin D-M, Lee H-M, Yang C-S, Jin H-S, Kim K-K, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe* (2009) 6:231–43. doi:10.1016/j.chom.2009.08.004
173. Shin D-M, Yuk J-M, Lee H-M, Lee S-H, Son JW, Harding CV, et al. Mycobacterial lipoprotein activates autophagy via TLR2/1/CD14 and a functional vitamin D receptor signalling. *Cell Microbiol* (2010) 12:1648–65. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01497.x
174. Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature* (2013) 501:512–6. doi:10.1038/nature12566
175. Parkes M, Barrett JC, Prescott NI, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* (2007) 39:830–2. doi:10.1038/ng2061
176. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* (2007) 447:661–78. doi:10.1038/nature05911
177. Intemann CD, Thye T, Niemann S, Browne ENL, Amanua Chinbuah M, Enimil A, et al. Autophagy gene variant IRGM -261T contributes to protection from tuberculosis caused by *Mycobacterium tuberculosis* but not by *M. africanum* strains. *PLoS Pathog* (2009) 5:e1000577. doi:10.1371/journal.ppat.1000577
178. King KY, Lew JD, Ha NR, Lin JS, Ma X, Graviss EA, et al. Polymorphic allele of human IRGM1 is associated with susceptibility to tuberculosis in African Americans. *PLoS One* (2011) 6:e16317. doi:10.1371/journal.pone.0016317
179. Yang D, Chen J, Shi C, Jing Z, Song N. Autophagy gene polymorphism is associated with susceptibility to leprosy by affecting inflammatory cytokines. *Inflammation* (2014) 37:593–8. doi:10.1007/s10753-013-9773-1
180. Yang D, Chen J, Zhang L, Cha Z, Han S, Shi W, et al. *Mycobacterium leprae* upregulates IRGM expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Inflammation* (2014) 37:1028–34. doi:10.1007/s10753-014-9825-1
181. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* (2004) 119:753–66. doi:10.1016/j.cell.2004.11.038
182. Chauhan S, Masdel MA, Deretic V. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell* (2015) 58:507–21. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.020
183. de Toledo-Pinto TG, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BI, et al. STING-dependent 2'-5' oligoadenylate synthetase-like production is required for intracellular *Mycobacterium leprae* survival. *J Infect Dis* (2016) 214:311–20. doi:10.1093/infdis/jiv144
184. Ma Y, Zhang L, Lu J, Shui T, Chen J, Yang J, et al. A negative feedback loop between autophagy and immune responses in *Mycobacterium leprae* infection. *DNA Cell Biol* (2017) 36:1–9. doi:10.1089/dna.2016.3446
185. Chan LL-Y, Shen D, Wilkinson AR, Patton W, Lai N, Chan E, et al. A novel image-based cytometry method for autophagy detection in living cells. *Autophagy* (2012) 8:1371–82. doi:10.4161/auto.21028
186. Khionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abdelvovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* (2016) 12:1–222. doi:10.1080/15548627.2015.1100356
187. Silva BJ, Barbosa MG, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA, Córte-Real S, et al. Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization. *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006103. doi:10.1371/journal.ppat.1006103
188. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Caruti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* (2005) 122:927–39. doi:10.1016/j.cell.2005.07.002

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Pinheiro, Schmitts, Silva, Dias, de Souza, de Mattos Barbosa, de Almeida Esquerazi, Pessolani and Sarna. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

11 APÊNDICE C – CURRÍCULO LATTES



Beatriz Junqueira de Souza

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6498132330325027>
ID Lattes: **6498132330325027**
Última atualização do currículo em 13/06/2022

Biomédica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e especialista em Análises Clínicas e Microbiologia. Mestre em Engenharia Neural pelo Programa de Engenharia Biomédica (COPPE/UFRJ). Cursando o doutorado em neuroimunologia pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Aprovada em 2015 para o concurso de professor substituto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), em 2017, aprovada como tutora presencial em biologia celular e molecular do CEDERJ e em 2018 aprovada no concurso de professor substituto da UFRJ campus xerém. Cumpriu parte de seu doutorado na Universidade da Califórnia (UCSD) - Estados Unidos, onde estuda o papel da inflamação no dano neural da Hanseníase, no Cressida Madigan Lab. Professora da Universidade Estácio de Sá (UNESA) e Coordenadora titular do curso de Biomedicina da Universidade Estácio de Sá - Campus Nova Iguaçu. (Texto informado pelo autor)

Identificação

| | |
|--|--|
| Nome | Beatriz Junqueira de Souza |
| Nome em citações bibliográficas | SOUZA, B. J.; SOUZA, BEATRIZ; Beatriz J Souza; DE SOUZA, BEATRIZ JUNQUEIRA; SOUZA, BEATRIZ JUNQUEIRA |
| Lattes ID | http://lattes.cnpq.br/6498132330325027 |

Endereço

| | |
|------------------------------|---|
| Endereço Profissional | Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz. Avenida Brasil - 4365 Manguinhos 21040360 - Rio de Janeiro, RJ - Brasil Telefone: (21) 25984220 URL da Homepage: www.fiocruz.br/loc |
|------------------------------|---|

Formação acadêmica/titulação

| | |
|--------------------|---|
| 2016 | Doutorado em andamento em Biologia Parasitária (Conceito CAPES 7). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. com período sanduíche em Universidade da Califórnia (Orientador: Cressida Ariana Madigan). Título: Avaliação dos mecanismos imunopatogênicos associados à desmielinização na Hanseníase. Orientador: Euzenir Nunes Sarno. Coorientador: Bruno de Siqueira Miletto. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: imunologia; peripheral neuropathy; Leprosy. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia / Subárea: neuroimunologia. Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico. Mestrado em Engenharia Biomédica (Conceito CAPES 6). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Título: Estudo da neuroseletividade somatossensitiva por corrente senoidal através de diferentes configurações de eletrodos, Ano de Obtenção: 2016. Orientador: Carlos Julio Tierra Criollo. Coorientador: Antonio Fernando Catelli Infantesi. Bolsista do(a): Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ, FAPERJ, Brasil. Palavras-chave: Engenharia neural; Engenharia biomédica; neurofisiologia. |
| 2014 - 2016 | |

| | |
|-------------|--|
| | Grande área: Engenharias Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia / Subárea: Fisiologia de Órgãos e Sistemas / Especialidade: Neurofisiologia. Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico. Especialização em Análises clínicas e Microbiologia. (Carga Horária: 450h). Universidade Cândido Mendes, UCAM, Brasil. Título: Diagnóstico Laboratorial em Tuberculose e Hanseníase. |
| 2015 - 2020 | |
| 2010 - 2013 | Graduação em Ciências biológicas - modalidade médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Título: Avaliação farmacológica de novos candidatos a fármacos para prevenção e tratamento da dor neuropática causada pelo diabetes. Orientador: Gisele Zapata-Sudo. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. |
| 2007 - 2009 | Ensino Médio (2º grau). Colégio Santa Mônica, CSM, Brasil. |

Formação Complementar

| | |
|-------------|---|
| 2015 | Pós Graduação Lato Sensu em Análises Clínicas e Microbiologia. (Carga horária: 450h). Universidade Cândido Mendes, UCAM, Brasil. |
| 2016 - 2016 | Neuroimunologia. (Carga horária: 4h). Academia Brasileira de Neurologia, ABN, Brasil. |
| 2016 - 2016 | Neuropatias periféricas. (Carga horária: 4h). Academia Brasileira de Neurologia, ABN, Brasil. |
| 2014 - 2014 | Aq., Proces, vis. e análise de imagens do cérebro. (Carga horária: 4h). Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, SBEB, Brasil. |
| 2014 - 2014 | Introdução as Redes Neurais Artificiais. (Carga horária: 6h). Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia, COPPE, Brasil. |
| 2014 - 2014 | Realidade virtual no gerenciamento da dor. (Carga horária: 1h). Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, SBEB, Brasil. |
| 2014 - 2014 | Brain-Computer Interface (BCI) -gtech. (Carga horária: 3h). Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica, SBEB, Brasil. |
| 2011 - 2011 | Laserterapia no Rejuvenescimento Facial. (Carga horária: 4h). Núcleo de Estudo e Treinamento Ana Carolina Puga, NEPUGA, Brasil. |
| 2011 - 2011 | Anticorpos. (Carga horária: 7h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. |
| 2010 - 2010 | Introdução à Antropologia Biológica. (Carga horária: 5h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. |
| 2010 - 2010 | Neurociência Comportamental. (Carga horária: 5h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. |
| 2001 - 2009 | Inglês. (Carga horária: 4h). Centro de Cultura Anglo-Americana, CCAA, Brasil. |

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2016 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Mestranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2012 - 2013 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno de Iniciação científica, Carga horária: 20

Atividades

03/2014 - Atual Pesquisa e desenvolvimento, COPPE/UFRJ.

Linhas de pesquisa
estimulação somatosensorial periférica

07/2012 - Atual Direção e administração, Empresa Júnior Antônio Paes de Carvalho.

Cargo ou função
Diretora de Recursos Humanos.

Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Doutoranda, Carga horária: 40

Universidade da Califórnia, UCSD, Estados Unidos.

Vínculo institucional
2019 - 2020

Vínculo: horista, Enquadramento Funcional: Junior Specialist, Carga horária: 40

Universidade Estácio de Sá, UNESA, Brasil.

Vínculo institucional
2021 - Atual
Vínculo institucional
2020 - Atual

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Coordenador titular, Carga horária: 20

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Professor, Carga horária: 20

Linhas de pesquisa

1. estimulação somatosensorial periférica
Objetivo: Avaliar a neuroseletividade sensorial pelo estímulo elétrico; Avaliar pacientes portadores de neuropatias periféricas, em especial a Hanseníase, na percepção da sensibilidade; Avaliar o potencial evocado em regime permanente..
Palavras-chave: Processamento de sinais biológicos; Potencial evocado; neuropatias.

Projetos de pesquisa

- 2014 - Atual**
- Avaliação de sensações somatossensitivas evocadas artificialmente por estimulação por corrente em regime permanente
Descrição: Mediante a importância das contribuições do estudo da resposta somatossensitiva, o presente trabalho tem como objetivo analisar, através do estímulo elétrico senoidal em diferentes frequências, a melhor configuração de eletrodos na avaliação da neuroseletividade dos receptores das fibras aferentes sensoriais (A β , A δ e C) através da respostas psico-físicas, em relação as sensações eliciadas artificialmente..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .
- 2012 - 2013**
- Iniciação Científica - Laboratório de Farmacologia Cardiovascular
Descrição: Avaliação farmacológica e toxicológica de novos candidatos a fármacos para prevenção e tratamento da miocardiopatia e neuropatia causadas pelo Diabetes Mellitus.
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) .
- Integrantes: Beatriz Junqueira de Souza - Integrante / Carlos Julio Tierra Criollo - Coordenador.
- Integrantes: Beatriz Junqueira de Souza - Integrante / Gisele Zapata Sudo - Coordenador.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia / Subárea: Fisiologia de Órgãos e Sistemas/Especialidade: Neurofisiologia.
2. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: neuroimunologia.
3. Grande área: Ciências Humanas / Área: Psicologia / Subárea: Psicologia Fisiológica/Especialidade: Neurologia, Eletrofisiologia e Comportamento.

Idiomas

Português
Inglês
Espanhol

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

- 2019**
2018
- Trainee Professional Development Award, Society for Neuroscience (SFN).
Scholarship para participação do Cell Biology Summer Course - Santiago (Chile), Institute Curie e Fundacion Ciencia y Vida.
- 2018**
- Menção Honrosa, VII Simpósio de Neurociências da UFF e II Simpósio de Neurociências UFF-Fiocruz.
- 2017**
- Aprovação em 1º lugar para tutoria presencial em Biologia Celular na UENF - Pólo São Gonçalo, CEDERJ.

- RATS AFTER TREATMENT WITH SULFONYLHYDRAZONE DERIVATIVE. In: 45º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental- SBITE, 2013, Ribeirão Preto. Pain and Nociception, 2013.
- ZAPATA-SUDO, GISELE ; LIMA, LIDIA ; PEREIRA, S. L. ; TRACHEZ, MARGARETE ; **SOUZA, B. J.** ; MONTEIRO, CARLOS ; BARREIRO, ELIEZER ; SUDO, ROBERTO . IMPROVEMENT OF DIABETIC NEUROPATHY IN RATS AFTER TREATMENT WITH A NOVEL SULFONYLHYDRAZONE DERIVATIVE. In: ANESTHESIOLOGY? - 2013 Annual Meeting, 2013, São Francisco. CHRONIC AND CANCER PAIN, 2013.

Apresentações de Trabalho

- SOUZA, B. J.**; LARA, F. A. ; PINHEIRO, ROBERTA OLMO ; SARNO, EUZENIR NUNES . Myelin breakdown favors Mycobacterium leprae survival in Schwann cells. 2021. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- SOUZA, B. J.**; SARNO, E. N. ; PINHEIRO, R. O. ; LARA, F. A. ; MIETTO, B. S. . Myelin breakdown favors Mycobacterium leprae survival in Schwann cells. 2019. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- SOUZA, B. J.**; SARNO, E. N. ; PINHEIRO, R. O. ; LARA, F. A. ; MIETTO, B. S. . Myelin breakdown favors Mycobacterium leprae survival in Schwann cells. 2019. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- Beatriz J Souza**; MIETTO, B. S. ; NERY, M.S.R.; PINHEIRO, R. O. ; SARNO, E. N. . Evaluation of the immunopathogenic mechanisms associated with demyelination in Leprosy. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- SOUZA, B. J.**; MIETTO, B. S. ; SOUZA, M. S. R. N. ; PINHEIRO, R. O. ; SARNO, E. N. . I Simpósio de Medicina Tropical e Doenças Negligenciadas da UFRJ. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- SOUZA, B. J.**; NERY, M.S.R.; PINHEIRO, R. O. ; SARNO, E. N. ; MIETTO, B. S. . Evaluation of the immunopathogenic mechanisms associated with demyelination in Leprosy. 2018. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- SOUZA, B. J.**; SOUZA, M. S. R. N. ; PINHEIRO, R. O. ; SARNO, E. N. ; MIETTO, B. S. . Evaluation of the immunopathogenic mechanisms associated with demyelination in Leprosy. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- MIETTO, B. S. ; **SOUZA, B. J.** ; SARNO, E. N. ; LARA, F. A. . ML-infected Schwann cells induce axon damage and myelin degradation. 2017. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- SOUZA, BEATRIZ**. Avaliação dos mecanismos imunopatogênicos associados à desmielinização em Hanseníase. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
- SOUZA, B. J.**. Evaluation of the immunopathogenic mechanisms associated with demyelination in Leprosy. 2017. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- SOUZA, B. J.**; JARDIM, M. M. ; INFANTOSI, A. F.C. ; TIERRA-CRIOLLO, C.J. . AVALIAÇÃO DA PERCEPÇÃO DE FIBRA FINA POR ELETRODOS SILVER SPIKE POINT EM HANSENÍASE: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA NEUROPATIAS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- SOUZA, B. J.**; INFANTOSI, A. F.C. ; TIERRA-CRIOLLO, C.J. . DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE NOVAS CONFIGURAÇÕES DE ELETRODOS PARA AVALIAÇÃO DE FIBRAS SENSORIAIS PERIFÉRICAS. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- Beatriz J Souza**; Mike M. Wilmer ; Antonio F. C. Infatosi ; Carlos Julio Tierra-Criollo . Sensitivity threshold sinusoidal electrical stimuli for evoking somatosensitive response using different electrode configurations. 2015. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
- SOUZA, B. J.**; INFANTOSI, A. F.C. ; JARDIM, M. M. ; TIERRA-CRIOLLO, C.J. . Sensitivity Threshold Sinusoidal Electrical Stimuli using Silver Spike Point Electrodes: A New Perspective for Neuropathies. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- SOUZA, B. J.**; INFANTOSI, A. F.C. ; TIERRA-CRIOLLO, C.J. . Avaliação do limiar de percepção a corrente senoidal utilizando diferentes configurações de eletrodos. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- SOUZA, B. J.**; SUDO, ROBERTO ; ZAPATA-SUDO, GISELE . DERIVADOS SULFONILIDRAZÔNICOS REDUZEM ALODINIA MECÂNICA EM RATOS DIABÉTICOS. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- SOUZA, B. J.**; SUDO, R. T. ; SUDO, G. Z. . DERIVADOS SULFONILIDRAZÔNICOS REDUZEM ALODINIA MECÂNICA EM RATOS DIABÉTICOS. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- SOUZA, B. J.**; PEREIRA, S. L. ; TRACHEZ, MARGARETE ; SUDO, G. Z. ; MONTEIRO, CARLOS ; BARREIRO, ELIEZER ; SUDO, R. T. . SULFONYLHYDRAZONE DERIVATIVE REDUCES MECHANICAL ALLODYNIA AND THERMAL HYPERALGESIA IN STREPTOZOTOCIN-INJECTED RATS. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
- SOUZA, B. J.**; MELO, J. P. ; BRANCO, M. T. L. C. ; SOUZA, H. S. P. ; BELMIRO, C. L. R. ; PAVAÓ, M. S. G. . NANOPARTÍCULAS DE HEPARINA DE INVERTEBRADOS MARINHOS: EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO EM MODELO DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

- SOUZA, B. J.**; BARROS, J. H. D. S.. Identificação de variantes no gene TYMS através do mapeamento fino e priorização para aplicação em futuro estudo de associação em famílias portadoras de NS FL+FP (fenda labial com ou sem fenda palatina não síndrômica). 2019. Fundação Oswaldo Cruz.
- SOUZA, B. J.**; BARROS, J. H. D. S.. ESTUDO LONGITUDINAL DE INFECÇÃO POR GIARDIA DUODENALIS EM DOIS MUNICÍPIOS DAS REGIÕES NORDESTE E SUDESTE DO BRASIL. 2019. Fundação Oswaldo Cruz.
- SOUZA, B. J.**; BARROS, J. H. D. S.. Impacto da Toxoplasmose Experimental no Desenvolvimento do Tecido Muscular Estriado Esquelético. 2019. Fundação Oswaldo Cruz.
-

Trabalho de conclusão de curso de graduação

1. Erick Santana. Fisiopatologia dos quadros demenciais: Uma revisão bibliográfica. Início: 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Estácio de Sá. (Orientador).

Iniciação científica

1. Marina Scharra Rangel Nery. Avaliação da desmielinização em células de schwann infectadas por M. leprae. Início: 2020 - Fundação Oswaldo Cruz. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Marina Scharra Rangel Nery de Souza. Título do projeto: Desenvolvimento de um modelo de desmielinização para testes de fármacos com ação na neuropatia hansênica. 2017. Iniciação Científica - Fundação Oswaldo Cruz, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do RJ. Orientador: Beatriz Junqueira de Souza.

Inovação

Projetos de pesquisa

2014 - Atual

Avaliação de sensações somatossensitivas evocadas artificialmente por estimulação por corrente em regime permanente
Descrição: Mediante a importância das contribuições do estudo da resposta somatossensitiva, o presente trabalho tem como objetivo analisar, através do estímulo elétrico senoidal em diferentes frequências, a melhor configuração de eletrodos na avaliação da neuroseletividade dos receptores das fibras aferentes sensoriais (A β , A δ e C) através da respostas psico-físicas, em relação as sensações eliciadas artificialmente..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

Integrantes: Beatriz Junqueira de Souza - Integrante / Carlos Julio Tierra Criollo - Coordenador.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 27/06/2022 às 16:24:12

[Imprimir currículo](#)