

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Wagner Faria Messias

**MÉTODOS DE ESTUDOS DA NEUROPATIA DA HANSENÍASE: AVALIANDO O
EFEITO DA COLEST-4-EN-3-ONA NO COMPORTAMENTO NEURONAL *IN VITRO***

**Juiz de Fora
2023**

Wagner Faria Messias

**MÉTODOS DE ESTUDOS DA NEUROPATIA DA HANSENÍASE: AVALIANDO O
EFEITO DA COLEST-4-EN-3-ONA NO COMPORTAMENTO NEURONAL *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto

**Juiz de Fora
2023**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Messias, Wagner Faria.

Métodos de estudos da neuropatia da hanseníase : avaliando o efeito da colest-4-en-3-ona no comportamento neuronal in vitro / Wagner Faria Messias. -- 2023.

96 p. : il.

Orientador: Bruno de Siqueira Mietto

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2023.

1. Colest-4-en-3-ona. 2. Hanseníase. 3. Neurodegeneração. 4. Neurônios. 5. Mycobacterium leprae. I. Mietto, Bruno de Siqueira, orient. II. Título.

Wagner Faria Messias

**MÉTODOS DE ESTUDOS DA NEUROPATIA DA HANSENÍASE: AVALIANDO O
EFEITO DA COLEST-4-EN-3-ONA NO COMPORTAMENTO NEURONAL *IN VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Aprovada em 10 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Bruno de Siqueira Mietto - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dra. Eliana Cristina de Brito Toscano
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof.^a Dra. Fernanda Martins de Almeida
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 23/11/2023.



Documento assinado eletronicamente por Fernanda Martins de Almeida Maia, Usuário Externo, em 24/11/2023, às 22:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Eliana Cristina de Brito Toscano, Professor(a), em 27/11/2023, às 22:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de](#)

[novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Bruno de Siqueira Mietto, Professor(a), em 28/11/2023, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1592079 e o código CRC BD12A21F.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade de ter desenvolvido este projeto e ter tido a chance de me desafiar academicamente e pessoalmente a cada dia dedicado neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, à CAPES, CNPq e UFJF por viabilizarem o desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos professores e técnicos desse programa, por compartilharem seu conhecimento sempre com paciência e gentileza.

Ao meu orientador, professor Bruno, por compartilhar sua experiência e sabedoria pacientemente durante essa caminhada, e à Jennyfer por nos auxiliar sempre com proatividade e disposição para aprender.

Agradeço também à minha família, em especial à minha mãe Angela, meu irmão João Vitor e minha companheira, Valéria, por me compreenderem e apoiarem nos momentos mais críticos dessa empreitada.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que acomete principalmente a pele e nervos periféricos, levando a grave degeneração do tecido nervoso. Enquanto muito se tem estudado sobre o impacto do bacilo na patofisiologia do nervo e de sua interação com as células de Schwann, consideradas como principais células hospedeiras, pouco se conhece a respeito da interação *M. leprae*–neurônios, bem como o efeito de metabólitos desse patógeno sobre as células neuronais. Um potencial metabólito é a colest-4-en-3-ona (colestonona), um oxicolesterol relacionado à citotoxicidade e neurodegeneração, sintetizado pelo *M. leprae*. Desse modo, o presente estudo objetivou investigar o impacto da colestonona no comportamento e viabilidade neuronal, e a capacidade de internalização da bactéria em neurônios. Para tanto, neurônios do gânglio da raiz dorsal (GRD) de camundongos foram cultivados e estimulados com colestonona e avaliados por microscopia óptica quanto à morfologia, degeneração e viabilidade celular. Além disso, neurônios humanos da linhagem SK-N-AS (SK) foram cultivados e expostos ao *M. leprae* morto e à colestonona, e posteriormente avaliados por citometria de fluxo e microscopia quanto à internalização do bacilo e a viabilidade celular. Nossos resultados revelam a colestonona como um potencial composto de efeito depreciativo da morfologia neuronal, alterando o comprimento e complexidade de neuritos em torno de 30%. Ademais, dados preliminares sugerem a possibilidade desse composto atuar também como indutor degenerativo. Por fim, nós mostramos, pela primeira vez, a capacidade do *M. leprae* morto ser internalizado em neurônios humanos, abrindo novas perspectivas sobre a contribuição da interação neurônio–bactéria no curso da doença. Tomados em conjunto, os resultados em questão apontam um novo caminho para o estudo da patogênese da hanseníase neural, oferecendo novas percepções e modelos sobre a contribuição do bacilo e seus elementos patogênicos para a neuropatologia provocada durante sua infecção.

Palavras-chave: Colest-4-en-3-ona. Hanseníase. Neurodegeneração. Neurônios. *Mycobacterium leprae*.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) that mainly affects the skin and peripheral nerves, leading to severe degeneration of nervous tissue. While much has been studied about the impact of the bacillus on the pathophysiology of the nerve and its interaction with Schwann cells, considered as the main host cells, the interaction *M. Leprae*-neurons, as well as the effect of this pathogen metabolites on neuronal cells are still unclear. A potential metabolite is cholest-4-en-3-one (cholestenone), an oxysterol related to cytotoxicity and neurodegeneration, synthesized by *M. leprae*. Thus, the present study aimed to investigate the impact of cholestenone on neuronal behavior and viability, as well as on the bacteria's internalization capacity in neurons. To that end, mice dorsal root ganglia (DRG) neurons were cultured and stimulated with cholestenone, and evaluated by using optical microscopy for morphology, degeneration and cell viability. Furthermore, human neurons from the SK-N-AS (SK) lineage were cultured and exposed to dead *M. leprae* and cholestenone, and subsequently analyzed with flow cytometry and microscopy for bacillus internalization and cell viability. Our results reveal cholestenone as a potential compound with a detrimental effect on neuronal morphology, altering the length and complexity of neurites by around 30%. Moreover, preliminary data suggest the possibility of the compound acting as a degenerative inducer. Finally, we show, for the first time, the ability of dead *M. leprae* to be internalized into human neurons, paving new perspectives on the contribution of neuron–bacteria interactions to the course of the disease. Taken together, these results point to a new path for the study of neural leprosy pathogenesis, providing new insights and models on the contribution of the bacillus and its pathogenic elements to the neuropathology caused during its infection.

Key words: Cholest-4-en-3-one. Leprosy. Neurodegeneration. Neurons. *Mycobacterium leprae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Paciente com hanseníase.....	18
Figura 2	– Pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar.....	20
Figura 3	– Distribuição mundial dos casos de hanseníase em 2022.....	22
Figura 4	– Frequência de casos por ano no município de Juiz de Fora.....	24
Figura 5	– <i>M. Leprae</i> isolado e agrupado em glóbulo.....	25
Figura 6	– Possíveis vias de transmissão do <i>M. leprae</i>	27
Figura 7	– Estrutura da parede celular do <i>M. Leprae</i>	28
Figura 8	– Células do sistema nervoso.....	33
Figura 9	– Representação do sistema nervoso central e periférico.....	34
Figura 10	– Micrografia eletrônica do nervo periférico.....	35
Figura 11	– Representação dos principais eventos associados à degeneração e regeneração axonal.....	39
Figura 12	– Fibrose em nervo periférico hansênico.....	42
Figura 13	– Estrutura e fórmula química da colest-4-en-3-ona.....	46
Figura 14	– Dissecação da coluna vertebral e obtenção de GRDs em neonatos.....	49
Figura 15	– Embrião de camundongo Balb/C e sua exposição de gânglios.....	51
Figura 16	– Cultura de neurônios de GRDs embrionários em estágio gestacional E13.5	53
Figura 17	– Cultura de neurônios após marcação com azul de tripan.....	54
Figura 18	– Análise de Sholl quanto a complexidade e distância neurítica.....	55
Figura 19	– Morfologia neuronal após o tratamento com a colestenona.....	60
Figura 20	– Curva dose-resposta da colestenona no comportamento neuronal.....	61
Figura 21	– Avaliação do potencial degenerativo da colestenona.....	62
Figura 22	– Efeito da colestenona na viabilidade de neurônios.....	64
Figura 23	– Morfologia das células SK-N-AS.....	66
Figura 24	– Taxa de internalização do <i>M. leprae</i> em células SK-N-AS.....	67
Figura 25	– Estratégia de <i>gate</i> utilizada na análise de citometria de fluxo.....	68
Figura 26	– Histogramas sobrepostos.....	69
Figura 27	– Efeito da colestenona no potencial de membrana mitocondrial das células SK-N-AS.....	70

Figura 28	– Efeito das diferentes concentrações de colesteno na no potencial de membrana mitocondrial das células SK-N-AS.....	71
Figura 29	– Efeito da colesteno na viabilidade das células SK-N-AS.....	73
Figura 30	Micrografia eletrônica de transmissão das células SK-N-AS expostas ao <i>M. leprae</i>	76
Figura 31	– Morfologia mitocondrial das células SK-N-AS expostas ao <i>M. leprae</i>	78
Figura 32	– Descrição anatômica do modelo GRD-NP.....	82
Figura 33	– Lâmina histológica de GRD-NP com 0 dias de cultura.....	83
Figura 34	– GRD-NP em ensaio de 7 dias.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Arabinogalactana
ATCC	American Type Culture Collection
BB	Hanseníase borderline-borderline
BL	Hanseníase borderline-lepromatosa
BT	Hanseníase borderline-tuberculóide
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
DW	Degeneração Walleriana
ENH	Eritema nodoso hansênico ou reação hansênica do tipo 2
GRD	Gânglio da raiz dorsal
GRD-NP	Gânglio da raiz dorsal – nervo periférico
IL	Hanseníase indeterminada
IL	Interleucina
IL-1RA	Antagonista de receptor de interleucina
IN- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LAM	Lipoarabinomanana
LL	Hanseníase lepromatosa ou lepromatosa-lepromatosa
MB	Hanseníase multibacilar ou lepromatosa
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MFI	Intensidade média de fluorescência
MIP-1	Proteína inflamatória de macrófago 1
ML	<i>Mycobacterium leprae</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
mRN	Ácido ribonucleico mensageiro
miRNA	Micro ácido ribonucleico mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associado a patógenos

PB	Hanseníase paucibacilar ou tuberculóide
PI	Iodeto de propídeo
PDIM	Fitocerol dimicocerosato
PGL-1	Glicolípídeo fenólico-1
PGN	Peptidoglicana
RR	Reações hansênicas reversas ou do tipo 1
SK	Células SK-N-AS
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
TLRs	Receptores do tipo toll
TMM	Monomicolatos de trealose
TMRE	Éster etílico de tetrametil-rodamina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR-1	Receptor 1 de TNF
TT	Hanseníase tuberculóide ou tuberculóide-tuberculóide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Hanseníase: aspectos clínicos.....	17
2.2	Epidemiologia.....	21
2.3	Agente etiológico.....	24
2.4	Imunopatologia da Hanseníase.....	29
2.5	Sistema nervoso central e periférico.....	32
2.6	As células de Schwann e seu papel na degeneração e regeneração nervosa.....	36
2.7	Neuropatologia da Hanseníase.....	40
2.8	Metabolismo do colesterol e a colest-4-en-3-ona na neuropatia hansênica.....	44
3	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo geral.....	48
3.2	Objetivos específicos.....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Obtenção dos animais.....	49
4.2	Dissecação e dissociação dos GRDs: obtenção de neurônios primários.....	49
4.3	Plaqueamento dos neurônios primários dissociados.....	52
4.4	Desenho experimental: cultivo celular e ensaios com a colest-4-en-3-ona em neurônios.....	52
4.5	Ensaio imunocitoquímico.....	54
4.6	Quantificação das imagens e análise estatística.....	55
4.7	Exposição do <i>M. leprae</i> em células SK-N-AS (ATCC-2137).....	56
4.8	Avaliação da viabilidade celular em células SK-N-AS: marcação para anexina V, iodeto de propídeo e TMRE.....	57
4.9	Microscopia eletrônica de transmissão das células SK-N-AS expostas ao <i>M.leprae</i>	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Curva dose-resposta da colest-4-en-3-ona em neurônios GRDs.....	59
5.2	Efeito degenerativo da colest-4-en-3-ona em neurônios.....	61

5.3	Efeito da colest-4-en-3-ona sobre a viabilidade de neurônios primários.....	63
5.4	Internalização do <i>M. leprae</i> morto em células SK-N-AS.....	65
5.5	Efeito da colest-4-en-3-ona sobre a viabilidade das células SK-N-AS.....	69
5.6	Análise da internalização do <i>M. leprae</i> morto em células SK-N-AS por microscopia eletrônica de transmissão.....	74
6	CONCLUSÃO	80
7	PERSPECTIVAS	81
8	ATIVIDADES COMPLEMENTARES	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e *Mycobacterium lepromatosis*, que afeta principalmente a pele, nervos periféricos, mucosa, trato respiratório e olhos (WHO, 2022a). Apesar de ser uma doença curável, apenas o diagnóstico precoce e o tratamento em estágios iniciais garantem a prevenção de deformidades e deficiências permanentes (WHO, 2022b). A transmissão da doença acontece principalmente por gotículas advindas das vias respiratórias (Brasil, 2017), e seu período de incubação média é de 5 anos (WHO, 2022b). Acredita-se que grande parte da população tenha imunidade natural ao patógeno, e a maioria dos acometidos pela doença não manifesta sintomas ao ser exposta ao bacilo (Maymone *et al.*, 2020). A hanseníase tem cura e seu tratamento envolve a administração de poliquimioterapia, com base na combinação das drogas rifampicina, dapsona e clofazimina, de acordo com a forma de manifestação da doença (CDC, 2017; WHO, 2022c). Do ponto de vista epidemiológico, o Brasil se encontra no centro dessa problemática, uma vez que apresenta o segundo maior acometimento de casos do mundo (Brasil, 2022a; WHO, 2022c, 2023b).

A hanseníase é uma doença complexa e multifatorial, na qual componentes genéticos, imunológicos e ambientais determinam a susceptibilidade do indivíduo ao bacilo (WHO, 2022c). Neste contexto, um dos principais componentes da parede celular do patógeno, o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), é postulado como fator central para a entrada da bactéria nas células, permitindo sua internalização. Esse antígeno apresenta importante atuação na patogênese da doença, uma vez que facilitaria não somente sua entrada no hospedeiro, mas também estaria envolvido com mecanismos de escape lisossomal e imunossupressor que facilitam a sobrevivência do bacilo (Froes Junior *et al.*, 2022; Ploemacher *et al.*, 2020).

Durante a resposta imunológica ao *M. leprae*, as células de Schwann se destacam pela sua capacidade de processar e apresentar antígenos às células T CD4 o que, no entanto, dispara processos inflamatórios prejudiciais ao tecido nervoso, promovendo, por exemplo, a desmielinização de nervos periféricos e lesões axonais difusas (Andrade *et al.*, 2016; Froes Junior *et al.*, 2022). Esse fato se soma ao que diferentes estudos têm

apontado, de modo que a destruição dos nervos se pauta em decorrência da entrada e persistência do bacilo no microambiente neural (Serrano-Coll *et al.*, 2018). De modo interessante, nosso grupo compilou sistematicamente as alterações genéticas e funcionais descritas na literatura científica, que ocorrem nas células de Schwann após exposição ao *M. leprae* vivo e/ou morto, caracterizando como esta célula favorece a replicação da bactéria e, ainda, como a interação patógeno-hospedeiro está vinculada à patogenia da neuropatia da hanseníase (Brugger *et al.*, 2023).

Além disso, sabe-se que as células de Schwann apresentam papel central na manutenção da homeostasia do nervo periférico, e essa relação glia-neurônio é fundamental para preservar a integridade de axônios mielinizados (Quintes *et al.*, 2010). Elas estão envolvidas em uma gama de doenças devido à sua capacidade de interagir e modular células imunes, produzir mediadores inflamatórios, fagocitar e apresentar antígenos, dentre outros mecanismos de comunicação intercelular que garantem nutrição e proteção axonal, o que as tornam essenciais para progressão de eventos degenerativos e regenerativos (Lopez-Leal *et al.*, 2016; Mietto *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). Sob infecção do *M. leprae*, essas células se apresentam como as principais hospedeiras do bacilo, ao passo que quando invadidas, permitem a persistência bacteriana no microambiente neural por meio da subversão de suas funções em favor do patógeno. Neste contexto, se evidencia uma coevolução bacteriana com as células do sistema nervoso, na qual o patógeno se adaptou para direcionar as funções celulares neurais em sua vantagem, sendo inclusive capaz de reprogramar as células de Schwann para células tronco progenitoras de modo a facilitar sua sobrevivência (Gasque; Neal, 2016; Hess; Rambukkana, 2019).

As lesões nervosas são caracterizadas por infiltrados inflamatórios que se estendem além dos compartimentos nervosos, gerando grande perda de fibras nervosas. As alterações desse microambiente conduzem a deficiências motoras e sensoriais, advindas de um processo patogênico que evolui para a destruição nervosa e fibrose (Antunes *et al.*, 2019). A fibrose da hanseníase neural é de fato única, uma vez que há um alto grau de densidade de deposição de colágeno que não é visto em outras neuropatias, o que, somado a outros fatores clínicos, corrobora para um diagnóstico mais preciso da doença (Antunes *et al.*, 2012). O processo fibrótico é irreversível e deve ser

fortemente evitado por suas conseqüentes incapacidades e deformidades permanentes causadas aos pacientes. Nesse contexto, fica clara a importância das células de Schwann e do microambiente inflamatório no processo neuropático, porém, ainda pouco se tem elucidado sobre os efeitos diretos da infecção do patógeno em células neuronais.

Por outro lado, sabe-se que o bacilo é encontrado residindo em macrófagos e células de Schwann contendo corpúsculos lipídicos, os quais são recrutados e têm sua biogênese induzida pelo próprio patógeno (Matos *et al.*, 2010, 2011a, 2011b; Mietto *et al.*, 2020). Além disso, análises demonstram que o colesterol é o lipídio hospedeiro predominante nessas células infectadas, sendo inclusive sua síntese e captação induzida pela bactéria (Mattos *et al.*, 2014). O bloqueio do metabolismo desse lipídio promove considerável redução na sobrevivência intracelular do bacilo, tanto *in vitro* como *in vivo*, demonstrando sua dependência por essa via metabólica (Lobato *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2015). Contudo, estudos evidenciam que o *M. leprae* perdeu os genes envolvidos no metabolismo do colesterol, mantendo apenas a capacidade de oxidá-lo em colest-4-en-3-ona (colestonona), objeto de investigação do presente estudo. Esses achados sugerem que o recrutamento de corpúsculos constitui um mecanismo de entrega lipídica ao patógeno intracelular, resultando no aumento de sua viabilidade infecciosa (Marques *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2021). A colestonona compõe a classe dos oxicolesteróis, compostos com características aterogênicas, citotóxicas, cancerígenas e mutagênicas (Tenuta-Filho *et al.*, 2003; Wielkoszyński *et al.*, 2006). Tais compostos citotóxicos parecem estar envolvidos em variados processos biológicos, como a ação antiproliferativa, indução de apoptose, alterações funcionais no sistema imune, modificações da membrana plasmática e migração celular (Neuvonen *et al.*, 2014; Wielkoszyński *et al.*, 2006). Ademais, os efeitos citotóxicos desse grupo têm sido relacionados a diferentes células, apresentando influências em doenças vasculares, inflamação e funções cerebrais (Dias *et al.*, 2020).

Diante do exposto, compreender o papel do colesterol e sua oxidação na patogênese do *M. leprae* ainda é um caminho a ser explorado. A elucidação do metabolismo desse esterol na célula hospedeira durante a infecção, somado a análises mais profundas do papel da colestonona no metabolismo da bactéria e seus efeitos nas células hospedeiras, podem abrir portas para uma maior compreensão patológica e a

criação de novas terapias de tratamento. Não obstante, a comunidade científica em hanseníase neural, ainda carece de novos modelos e abordagens *in vivo*, *in vitro* e *ex-vivo*, para avançar o entendimento das bases moleculares, celulares e bioquímicas que regem a evolução da doença e o papel do *M. leprae* no contexto neurológico. Portanto, o presente estudo também buscou validar duas novas abordagens, através de linhagem de neurônios humanos (modelo *in vitro*) e explantes do gânglio da raiz dorsal de camundongos (modelo *ex-vivo* suplementar), a fim de verificar novos métodos científicos e experimentais sobre as possíveis perturbações do *M. leprae* e seus componentes no sistema nervoso periférico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hanseníase: aspectos clínicos

A hanseníase, popularmente conhecida como lepra, é uma doença infecciosa causada pelos bacilos *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e *Mycobacterium lepromatosis* (Brasil, 2017; Maymone *et al.*, 2020). As principais áreas afetadas incluem pele, nervos periféricos, mucosas, trato respiratório superior e olhos. Quando não tratada, a doença pode evoluir, tornar-se transmissível e causar danos progressivos e permanentes nesses órgãos, com especial acometimento aos nervos periféricos (Figura 1) (Brasil, 2017). Seu acometimento é prevalente em todas as idades, seja da infância à vida adulta (Brasil, 2017; WHO, 2022a, 2023a). Vale ressaltar que a hanseníase é uma doença curável por meio da poliquimioterapia e o tratamento em seus estágios iniciais pode prevenir danos permanentes (Brasil, 2017).

Sua transmissão acontece principalmente por gotículas advindas das vias respiratórias, nariz e boca, de pacientes não tratados durante contato próximo e persistente, ou por objetos contaminados utilizados por esses pacientes (WHO, 2022b). Estima-se que grande parte da população possua imunidade natural contra o *M. leprae*. Logo, a maioria das pessoas que entrarem em contato com o bacilo não adoecerão. Ademais, já se sabe que a susceptibilidade ao patógeno possui influência genética, o que explica também a maior chance de familiares de pessoas portadoras da doença contraírem hanseníase (Brasil, 2017; WHO, 2022b).



Figura 1: Paciente com hanseníase. Foto de indivíduo com hanseníase neural. Setas indicam nervos espessados devido a evolução da doença (Brasil, 2017).

Os sintomas podem ocorrer dentro de um ano, ou levar mais de 20 anos para se manifestarem, uma vez que o bacilo se multiplica lentamente e a doença apresenta um período médio de incubação de cinco anos (WHO, 2022b). No entanto, a maioria dos indivíduos expostos a esses organismos não desenvolvem sintomas clínicos, os quais podem variar extensivamente, ainda mais por serem dependentes da resposta imunológica do indivíduo à infecção (Maymone *et al.*, 2020). Os sinais clínicos são de fácil observação, e afetam principalmente a pele, nervos e membranas mucosas. As lesões cutâneas podem se apresentar como manchas esbranquiçadas, pigmentação diferente da pele saudável ao redor, como uma menor pigmentação, vermelhidão, ou cor de cobre, além de apresentarem aspecto liso, elevado ou nodular, com alterações de sensibilidade ao calor, dor ou tato (Brasil, 2017; WHO, 2023a). Já os sintomas das lesões nervosas incluem dormência de áreas afetadas, fraqueza muscular (especialmente nas mãos e pés), espessamento de nervos periféricos (principalmente aqueles presentes no cotovelo, joelho e laterais do pescoço) (Figura 1), e sintomas oculares quando nervos faciais são afetados (Brasil, 2017; CDC, 2017). Se não tratada, a doença pode avançar, incluindo sintomas como paralisia de mãos e pés, encurtamento de dedos, úlceras crônicas, lesões desfigurantes e cegueira (CDC, 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para fins operacionais, os doentes devem ser classificados de acordo com o padrão de lesões, as quais podem ser pontuais ou múltiplas, com ou sem perda de sensibilidade. Tais características são usadas na classificação da doença, a qual é chamada de paucibacilar (PB) ou

tuberculóide, quando há a presença de poucas lesões cutâneas no corpo (de uma a cinco lesões ou um nervo comprometido) e baciloscopia de raspado intradérmico negativo em todos os sítios examinados, ou multibacilar (MB) ou lepromatosa, quando há lesões múltiplas e difusas pelo corpo (mais de cinco lesões ou a presença de nervos comprometidos), ou baciloscopia de raspado intradérmico positiva em todos os sítios examinados (Figura 2) (Brasil, 2017; CDC, 2017; Reibel *et al.*, 2015; WHO, 2023^a).

Outro sistema de classificação é o proposto por Ridley e Jopling em 1966, que combina manifestações clínicas, características histopatológicas e índice bacteriológico. Esse sistema se baseia em dois polos e três formas intermediárias entre eles. Em um dos polos se encontra a hanseníase tuberculóide ou tuberculóide-tuberculóide (TT), no qual a doença apresenta sintomas limitados com poucas lesões, baixa carga bacilar, além de uma expressão predominante de citocinas do tipo Th1, o que se caracteriza por uma imunidade fortemente mediada por células. Já no polo oposto encontramos a hanseníase lepromatosa ou lepromatosa-lepromatosa (LL), a qual apresenta manifestações clínicas mais severas com múltiplas lesões, alta carga bacilar, além de uma expressão predominante de citocinas do tipo Th2, as quais são relacionadas a imunidade humoral e ausência de imunidade mediada por células. Entre os dois polos temos as formas intermediárias denominadas “borderline”, borderline-tuberculóide (BT), bordeline-bordeline (BB) e bordeline-lepromatosa (BL), definidas nessa sequência do polo tuberculóide ao lepromatoso (Froes Junior *et al.*, 2022; Lobato, 2014; Oliveira, 2021). Paralelamente a essas classificações, a forma indeterminada ou lepra indeterminada (IL) é usada para identificar pacientes em estágio inicial da doença que ainda não desenvolveram resposta imune celular, podendo assim progredir tanto para a forma tuberculóide quanto lepromatosa da doença (Maymone *et al.*, 2020). Essa classificação não exclui aquela proposta pela OMS, uma vez que esta foi criada para facilitar esquemas terapêuticos por meio da operacionalização em dois grupos, nos quais as formas clínicas TT e BT se enquadram na forma paucibacilar e as formas BB, BL, e LL se enquadram na forma multibacilar (Lobato, 2014; Oliveira, 2021).



Figura 2: Pacientes com hanseníase paucibacilar e multibacilar. À esquerda, paciente paucibacilar com placa eritematosa única na região lombar, e à direita, paciente multibacilar com placas eritematosas espalhadas pelas costas e braços (Froes Junior *et al.*, 2022).

O tratamento recomendado pela OMS se baseia em uma combinação de drogas antibióticas, uma vez que a administração de apenas um fármaco pode resultar no desenvolvimento de resistência bacteriana (WHO, 2023a). A combinação de fármacos utilizados na poliquimioterapia depende do grau de infecção do paciente, sendo usada rifampicina e dapsona em casos de hanseníase paucibacilar, enquanto a clofazimina é conjugada às últimas duas em casos de hanseníase multibacilar, com uma duração média de seis a doze meses de tratamento. Como profilaxia, uma dose única de rifampicina é fortemente recomendada para quebrar a cadeia de transmissão por indivíduos que mantêm contato com pacientes acometidos pela doença (WHO, 2023a; CDC, 2017; WHO, 2022). O tratamento com a poliquimioterapia é gratuito e disponível em qualquer unidade de saúde nacional (Brasil, 2017). No entanto, o tratamento é susceptível ao aparecimento de diferentes efeitos adversos. Manifestações alérgicas como eritema, coceira e descamação principalmente na face e antebraços, além de febre, dor de garganta, comprometimento renal ou hepático e anemia, são algumas das complicações que podem aparecer durante a administração dos medicamentos, em especial da dapsona (Brasil, 2017; Guragain.; Upadhayay; Bhattarai, 2017). Além disso, estudos apontam que uma alta proporção de pacientes têm desenvolvido resistência a

essas drogas, com uma taxa crescente de resistência desde 2009, o que torna o desafio para o tratamento da doença ainda mais desafiador para os profissionais e sistemas de saúde especializados (Li *et al.*, 2022).

2.2 Epidemiologia

A hanseníase é descrita na literatura desde o estabelecimento de civilizações antigas, sendo inclusive relatada antes de Cristo (ILA, 2023; Reibel *et al.*, 2015). Pessoas acometidas pela doença eram muitas vezes estigmatizadas, excluídas e marginalizadas por suas comunidades (WHO, 2021; 2022a). A doença é classificada pela OMS como uma das vinte doenças tropicais negligenciadas (DTNs), e assim como outras DTNs, sua ocorrência é frequentemente relacionada às más condições socioeconômicas de uma comunidade ou país (WHO, 2021; 2022c). A doença é endêmica em mais de 140 países, incluindo o Brasil (WHO, 2022c; Maymone *et al.*, 2020).

Em 2022, a OMS registrou 174.087 novos casos que, apesar da tendência regressiva da última década, representou um aumento de aproximadamente 24% em relação ao ano anterior, atingindo uma taxa de prevalência populacional de 21,8 a cada um milhão de indivíduos. Isso pode ser explicado tanto pela reabertura dos espaços e diminuição das restrições provocadas pela pandemia de COVID-19, quanto pela volta do pleno funcionamento dos programas de controle que puderam reportar novos casos de forma mais precisa. Desse total, 21.398 foram reportados no continente americano, sendo que 19.635 foram registrados apenas no Brasil, fazendo com que o país, juntamente com Índia e Indonésia, representasse 78,1% dos novos casos globais desse ano (WHO, 2022b; WHO, 2023b) (Figura 3). Esses três países continuam a reportar mais de 10.000 casos anualmente, representando um grupo prioritário a receber enfoque no combate à doença (WHO, 2023b).

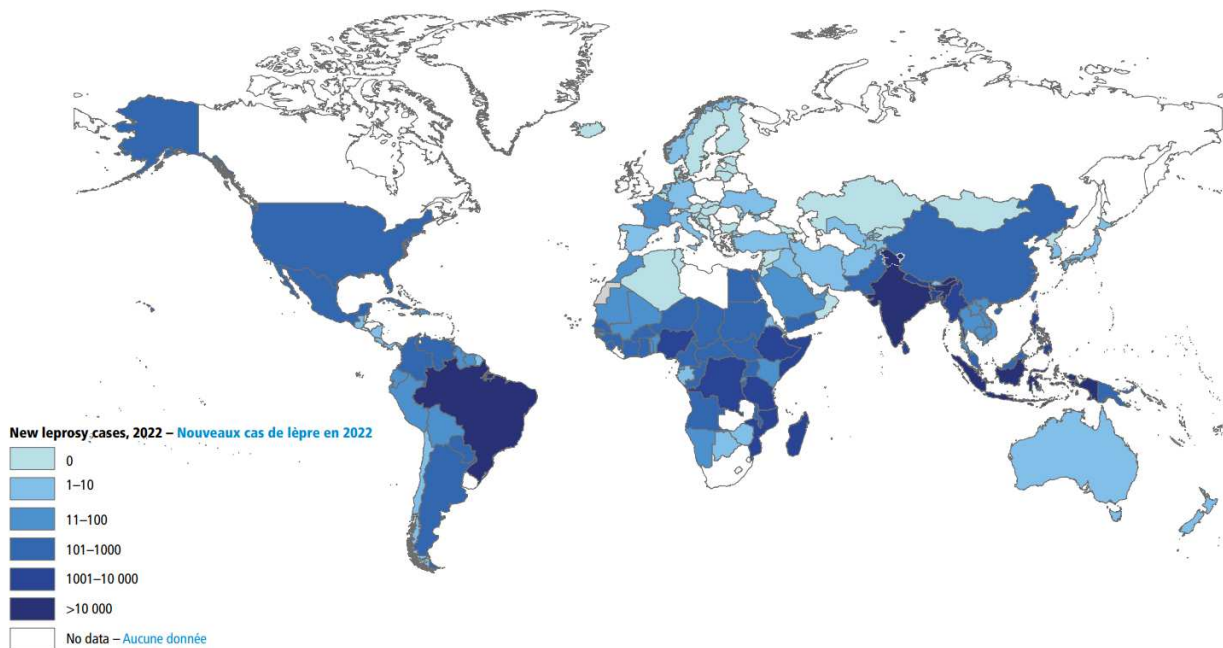


Figura 3: Distribuição mundial dos casos de hanseníase em 2022. Adaptado de WHO, 2023b.

Outro dado alarmante se pauta na ocorrência de recidivas, as quais somam um total global de 3.346 no referido ano, tendo o Brasil como o maior contribuinte dessa soma através de seus 1.277 casos. Dessa forma, os dados evidenciam como é imperativo a realização de esforços globais para erradicação da hanseníase, ao passo que os continentes americano, africano e asiático apresentam as maiores taxas de detecção de novos casos, compondo juntos um total de 95% do acometimento da doença, o que reforça ainda mais seu destaque dentre as DTNs (WHO, 2023b).

Ao olharmos de perto os dados brasileiros, percebemos que a doença ainda permanece como um grande problema de saúde pública, uma vez que o país vem ocupando a segunda posição mundial no número de casos, perdendo apenas para a Índia nos últimos anos (Brasil, 2022a, 2022b; WHO, 2022c, 2023b). Entre 2012 e 2021, 269.086 novos casos foram diagnosticados no país, apresentando uma taxa de detecção de 8,59 casos a cada 100 mil habitantes em 2021 (Brasil, 2023). Só no período de 2015 a 2019 foram diagnosticados 137.495 novos casos no país, dos quais aproximadamente 70% foram notificados pelas equipes de atenção primária à saúde, o que ressalta a importância do setor primário de saúde no combate e redução da doença (Brasil, 2022a).

Além disso, quase 60% dos casos registrados no referido período foram de indivíduos com escolaridade baixa, tendo cursado apenas o ensino fundamental (Brasil, 2022a, 2022b), o que também reforça a necessidade de criação de programas educacionais e de divulgação científica que favoreçam a popularização do conhecimento sobre a hanseníase, assim como esforços governamentais constantes que garantam a ampla escolarização dos brasileiros.

Por último, apesar da queda do número de casos, quando olhamos para as regiões brasileiras, notamos que as regiões norte, nordeste e centro-oeste concentram a maior taxa de detecção de casos por habitantes (Brasil, 2022b), com destaque para os estados do Tocantins e Mato Grosso que apresentaram os maiores números de casos nos últimos anos (Brasil, 2022b; Miguel *et al.*, 2021).

No estado de Minas Gerais, a Secretaria de Estado de Saúde (SESMG) através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), compilou dados epidemiológicos do período de 2017 a 2021, evidenciando 4.856 novos casos diagnosticados no período (SESMG, 2022). Apesar do número significativo, há uma tendência decrescente dos casos que, mais uma vez, pode ser explicada pela ocorrência da pandemia de COVID-19 que, além da diminuição da circulação populacional, também levou a uma sobrecarga do sistema de saúde, promovendo uma diminuição do diagnóstico efetivo de novos casos (Formigosa; Brito; Neto, 2022; SEESMG, 2022). Ao expandirmos o período de análise dos dados epidemiológicos, é possível perceber a relevância da doença no estado de Minas. São 19.473 notificações de novos casos no período de 2010 a 2023 até o momento, com destaque para a forma paucibacilar (SEESMG, 2023), revelando uma média de aproximadamente 1500 casos por ano.

Dentre o total dos casos notificados no referido período, 97 foram registrados na cidade de Juiz de Fora, correspondendo a 0,5% dos casos no estado, o que é relativamente considerável se levarmos em conta que o estado possui um total de 853 municípios, o que corresponderia a uma média de 22,8 casos por município (Figura 4) (SEESMG, 2023). De fato, esses casos se concentram mais em regiões metropolitanas, tornando o município de Juiz de Fora um polo de notificação na região da Zona da Mata mineira, além de ressaltar a importância da necessidade de medidas de controle na cidade.

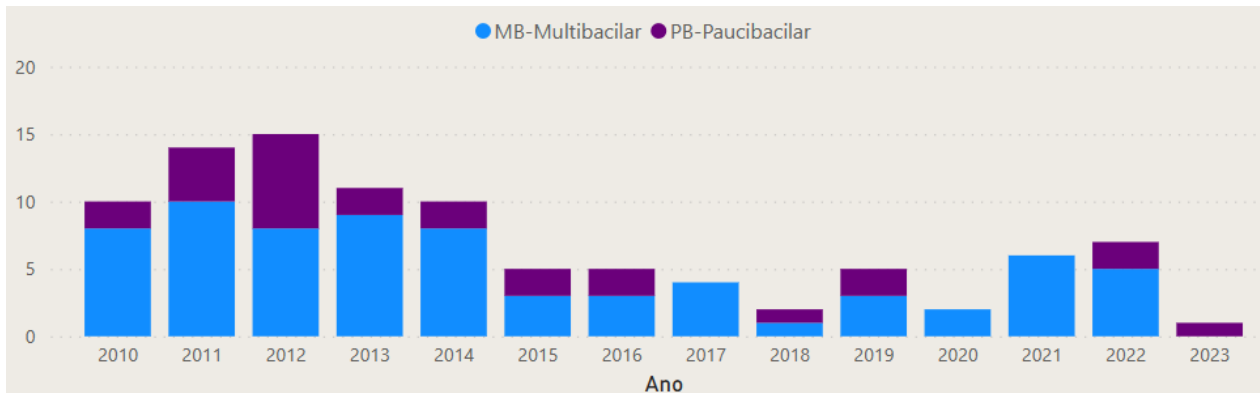


Figura 4. Frequência de casos por ano no município de Juiz de Fora (SEESMG, 2023).

2.3 Agente etiológico

O agente etiológico da hanseníase é caracterizado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) gram positivo do complexo *Mycobacterium Leprae*, que inclui também o *Mycobacterium lepromatosis*, o qual é descrito mais recentemente como outra espécie bacteriana causadora da doença, sem apresentar diferenças nos sinais clínicos (Maymone *et al.*, 2020; Reibel *et al.*, 2015). Sua classificação taxonômica é composta pelo filo Actinomycetota, classe Actinomycetia, ordem Mycobacteriales, família Mycobacteriaceae, gênero *Mycobacterium* (Lastória; Abreu, 2014; Skerman, 1980). Essa bactéria em formato de bastonete foi primeiramente descrita pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873, do qual a doença carrega o nome (Eichelmann *et al.*, 2013). É um organismo intracelular obrigatório de crescimento lento, com tempo de multiplicação de aproximadamente 14 dias, o que provavelmente dificulta o estabelecimento da ligação epidemiológica entre o momento da exposição e o desenvolvimento da doença (Froes Junior *et al.*, 2022).

Essa bactéria tem predileção por células endoteliais e mais especificamente por células fagocíticas como macrófagos na pele e células de Schwann nos nervos (Sugawara-Mikami *et al.*, 2022). Apresenta cerca de 1 a 8 µm de comprimento por 0,3 µm de largura, podendo aglomerar em tecidos infectados formando glóbulos com centenas de bacilos (Figura 5), além de crescer preferencialmente em temperaturas variando de 27°C a 33°C, o que explica sua maior infecção em áreas mais frias e

periféricas do corpo (Eichelmann *et al.*, 2013). Contudo, o patógeno não pode ser cultivado em meio artificial, o que dificulta seu estudo e rápido entendimento como os alcançados pela ciência no estudo de outras microrganismos (CDC, 2017; Froes Junior *et al.*, 2022; Maymone *et al.*, 2020; Reibel *et al.*, 2015).

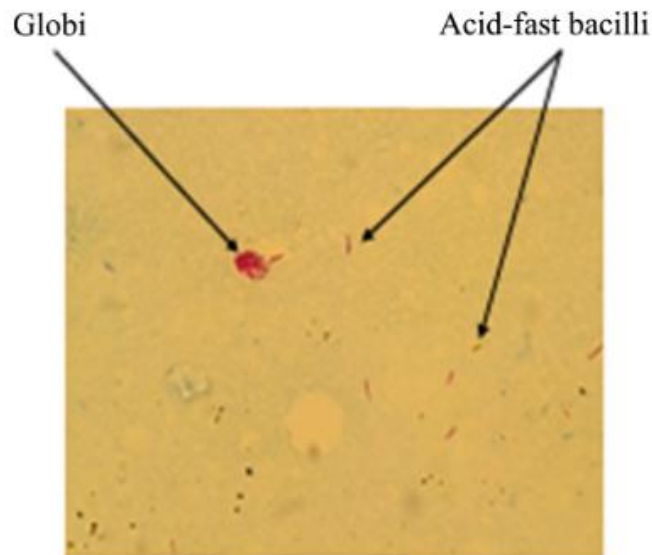


Figura 5: *M. Leprae* isolado e agrupado em glóbulo. Coloração de Ziehl Neelsen (Reibel *et al.*, 2015).

Os mecanismos de transmissão do microrganismo não são completamente entendidos, mas há sólidas evidências da transmissão por via respiratória (WHO, 2022c). Apesar da hanseníase ser considerada uma doença humana, sua transmissão aparenta ser muito mais complexa do que se pensava antes, apresentando outras possibilidades de contágio através de interações antroponóticas e zoonóticas, sugerindo infecções por insetos (carrapatos e barbeiros), esquilos, tatus e até mesmo procedimentos que envolvam inoculação da pele, como as tatuagens (Figura 6) (Froes Junior *et al.*, 2022; Ploemacher *et al.*, 2020; Sugawara-Mikami *et al.*, 2022). O diagnóstico de hanseníase em outros primatas é limitado a alguns relatos de casos, e não é conhecido até que ponto as diferentes espécies podem ser de fato infectadas (Hockings *et al.*, 2021; Ploemacher *et al.*, 2020). É plausível o questionamento se haveria também reservatórios ambientais, uma vez que estudos revelam a presença de *M. leprae* viável em amebas (Sugawara-

Mikami *et al.*, 2022) e em amostras de solo e água no Brasil (Franco-Paredes; Rodriguez-Morales, 2016; Holanda *et al.*, 2017).

Os seres humanos são os principais portadores da infecção por esse patógeno, no entanto, no continente americano, tatus também se apresentam como reservatórios para a bactéria (Maymone *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2015). Há inclusive evidências de que esses animais podem transmitir a doença a humanos (Froes Junior *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2015). A existência de infecção zoonótica por *M. Leprae* aparenta ser um dos grandes desafios para a estratégia de eliminação da hanseníase pela OMS, uma vez que o programa de combate à doença é baseado na interrupção da transmissão entre humanos, sem levar em consideração qualquer tipo de transmissão zoonótica (Maymone *et al.*, 2020; Scollard, 2016; WHO, 2023a).

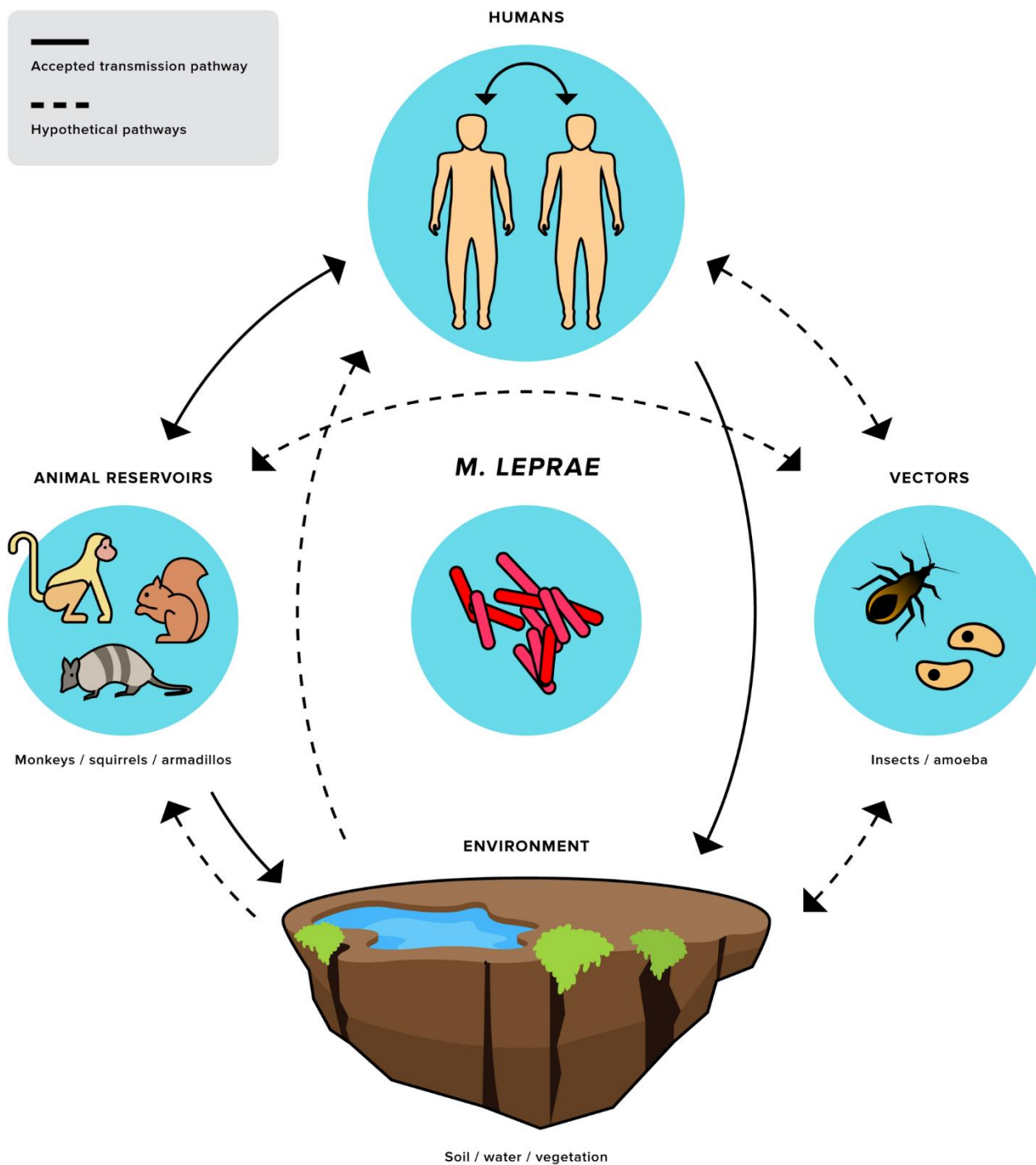


Figura 6: Possíveis vias de transmissão do *M. leprae*. O esquema evidencia as rotas de transmissão aceitas (setas contínuas) e as hipotéticas (setas tracejadas) (Ploemacher *et al.*, 2020).

O *M. leprae* pode ser diferenciado de outras bactérias gram-positivas e negativas por sua robusta parede celular rica em lipídios (Figura 7) (Brennan, 2003). A camada

mais externa da parede apresenta glicolípídeos fenólicos (PGLs) e uma gama de outros lipídeos, dos quais se destacam o fitocerol dimicocerosato (PDIM) e o glicolípídeo fenólico-1 (PGL-1). Tais lipídeos compõem a cápsula (Sugawara-Mikami *et al.*, 2022). A parte mais interna da parede, logo após a membrana plasmática, é rígida e rica em peptidoglicana (PGN) ligada a uma camada de arabinogalactana (AG), formando assim uma camada eletrodensa. Logo acima tem-se ácidos micólicos que se ligam aos terminais da camada de AG compondo o folheto interno de uma falsa bicamada lipídica, seguido de um folheto externo composto de monomicolatos de trealose (TMM), formando assim uma zona eletrotransparente (Lobato, 2014; Sugawara-Mikami *et al.*, 2022). Sua parede também contém polissacarídeos ligados a lipídeos e lipoarabinomanana (LAM) que se ancoram à membrana plasmática (Sugawara-Mikami *et al.*, 2022).

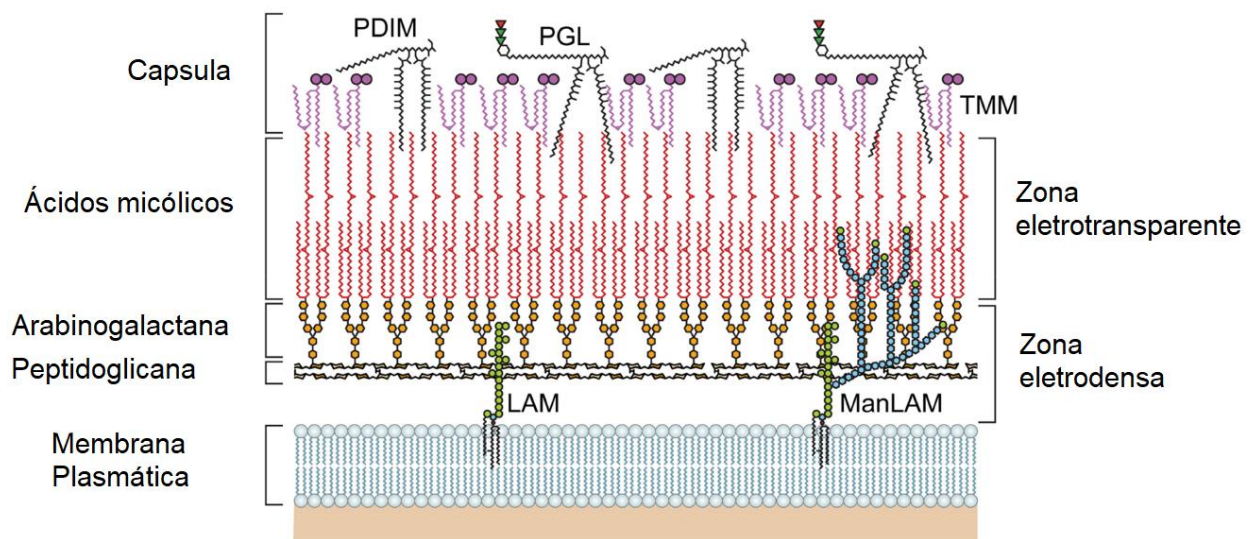


Figura 7. Estrutura da parede celular do *M. Leprae*. Adaptado de Sugawara-Mikami *et al.*, 2022.

O PGL-1 é o lipídeo de maior predominância da parede celular, sendo o principal componente responsável pela especificidade imunológica da bactéria, assim como diversas interações patógeno-hospedeiro (Soares *et al.*, 2020; Spencer; Brennan, 2011; Sugawara-Mikami *et al.*, 2022). Além disso, o PGL-1 apresenta grande importância para ensaios e aplicação de métodos diagnósticos em hanseníase, uma vez que diversos

estudos demonstram a presença desse lipídeo em tecidos, sangue e urina de indivíduos infectados, que também expressam altos títulos de anticorpos contra este antígeno (Lobato, 2014; Silvestre; Lima; Lima, 2018; Zhang *et al.*, 2010). Outra característica deste glicolipídeo se pauta em sua capacidade de mediar a entrada do bacilo no macrófago por meio da fração C3 do complemento, através dos receptores CR1, CR3 e CR4, induzindo a sua fagocitose. Ele se apresenta como um componente chave para a patogênese da doença, sendo ainda envolvido no mecanismo de escape lisossomal, promovendo um papel imunossupressor que facilita a sobrevivência do patógeno dentro do macrófago hospedeiro (Froes Junior *et al.*, 2022).

Do ponto de vista evolutivo, os estudos demonstram que o genoma do patógeno apresenta menos genes codificadores de proteínas do que genes não codificadores e pseudogenes (Cole, 2001), fazendo deste bacilo um microrganismo dependente do metabolismo hospedeiro para sua sobrevivência e replicação (Mungroo *et al.*, 2020). De maneira interessante, diversos genes relacionados ao metabolismo bacteriano foram perdidos, sendo mantidos em seu genoma genes que permitem a manipulação do metabolismo e reprogramação da célula hospedeira a seu favor (Marques *et al.*, 2015; Mungroo *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2021). Dentre esses genes, se encontram os genes do metabolismo do colesterol, os quais foram perdidos, porém, sem que o patógeno perdesse sua capacidade de oxidar o colesterol em colesteno. Tal fato chama a atenção para o questionamento do papel desse composto na sobrevivência e permanência da bactéria na célula hospedeira (Marques *et al.*, 2015).

2.4 Imunopatologia da Hanseníase

A hanseníase apresenta uma fisiopatologia multifatorial, da qual componentes genéticos, imunológicos e ambientais determinam a susceptibilidade de um indivíduo ao bacilo (WHO, 2022c, 2023b). Pessoas com fraca resposta imunológica apresentam resposta humoral intensa com alta produção de anticorpos, mas incapaz de conter a proliferação da bactéria. A susceptibilidade também é influenciada pela herança de vários traços genéticos, dos quais a expressão variada de diferentes genes relacionados a resposta imune se correlaciona às diferentes manifestações da doença. Por exemplo, em

pacientes com a forma multibacilar ou lepromatosa os genes relacionados à resposta humoral são expressos em altos níveis, em particular aqueles relacionados a receptores de imunoglobulina e a proteínas do sistema complemento, enquanto em pacientes com a forma paucibacilar ou tuberculóide os genes envolvidos na resposta imune celular são mais intensamente expressos (Dupnik *et al.*, 2015; Froes Junior *et al.*, 2022).

Pacientes com a forma tuberculóide são capazes de restringir o crescimento do patógeno, apresentando uma predominância de células T CD4⁺ e citocinas do tipo 1, incluindo interleucina 2 (IL2) e interferon γ (IN- γ) em suas lesões cutâneas. Em contrapartida os pacientes com a forma lepromatosa são incapazes de impedir o crescimento e infecção, tendo por sua vez em suas lesões cutâneas uma predominância de células T CD8⁺ e citocinas do tipo 2, incluindo as interleucinas 4 e 10 (IL4 e IL10) (Modlin, 1994). Desse modo, de acordo que as manifestações clínicas evoluem da forma tuberculóide para a lepromatosa, uma transição gradual da resposta imune Th1 para Th2 é observada (Walker; Lockwood, 2006).

Análises de citocinas secretadas por macrófagos *naive* demonstram que o PGL-1 induz uma fraca produção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β e IL-10, enquanto também induz altos níveis de moléculas de regulação negativa, como a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) e o antagonista de receptor de interleucina 1 (IL-1RA) (Froes Junior *et al.*, 2022). Além disso, uma alta expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) é descrita em lesões cutâneas tuberculóides quando comparadas com lesões lepromatosas, o que pode ser explicado pela forte resposta imune Th1 na hanseníase paucibacilar (Froes Junior *et al.*, 2022; Ploemacher *et al.*, 2020).

Outro componente importante na resposta imune ao patógeno é atribuída aos receptores do tipo toll (TLRs). Os TLRs 2 e 4 reconhecem o bacilo, o que promove a liberação de IL-12, a qual induz a produção de outras citocinas inflamatórias e a eliminação do bacilo (Ridley; Jopling, 1994).

Uma alta expressão de marcadores do inflamassoma é reportada em lesões lepromatosas em comparação com lesões indeterminadas e tuberculóides, revelando a ineficiência do inflamassoma no controle da infecção. O inflamassoma é um complexo de proteínas citosólicas que promovem respostas inflamatórias por meio da resposta aos

padrões moleculares associado a patógenos (PAMPs), e aos padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Amin *et al.*, 2017; Froes Junior *et al.*, 2022).

Na resposta imunológica ao *M. leprae*, as células de Schwann são capazes de processar e apresentar antígenos às células T CD4, o que dispara processos inflamatórios prejudiciais a essas células, promovendo a demielinização de nervos periféricos e lesões neurais (Andrade *et al.*, 2016; Froes Junior *et al.*, 2022).

Durante a progressão da doença, temos o aparecimento das chamadas reações hansênicas, as quais representam um aumento da atividade da doença e se manifestam como episódios de hipersensibilidade aguda, caracterizados por uma piora das lesões já existentes ou pelo aparecimento de novas, podendo ocorrer antes, durante ou depois do tratamento (Brasil, 2017). Essas reações são mais frequentes em pacientes multibacilares e representam a principal complicação da doença, demandando tratamento imediato para a prevenção de sequelas neurais (Brasil, 2017; Froes Junior *et al.*, 2022). São reações provenientes da inflamação aguda advinda da resposta imunológica do hospedeiro ao atacar o patógeno. Uma vez que o bacilo afeta a pele e nervos, essas reações promovem inflamações nesses sítios. As inflamações na pele raramente oferecem gravidade, enquanto a inflamação em um nervo pode causar danos graves, como a perda da função devido ao edema e pressão sobre ele (Brasil, 2017). As reações hansênicas podem ser do tipo 1, também chamadas de reações reversas (RR), ou do tipo 2, também chamado de eritema nodoso hansênico (ENH). As RRs são caracterizadas por uma exacerbação da resposta imune celular contra a bactéria, potencializando a eliminação do bacilo por um lado, mas intensificando processos inflamatórios e sintomas por outro, que podem levar ao dano neural sensorio e motor (Andrade *et al.*, 2015; Nery *et al.*, 2013). Já o ENH tem sua caracterização em processos inflamatórios agudos de envolvimento sistêmico devido a deposição extravascular de imunocomplexos e exudatos neutrofílicos, tendo sua ocorrência em pacientes com a forma lepromatosa, dos quais o alto número de antígenos e alta produção de anticorpos, característico da resposta Th2, parece ser um dos fatores contribuintes para a formação desses imunocomplexos (Biswas *et al.*, 2021; Froes Junior *et al.*, 2022; Nery *et al.*, 2013).

2.5 Sistema nervoso central e periférico

O sistema nervoso (SN) é considerado o sistema de órgãos mais sofisticado e complexo já criado pela natureza. As células desse sistema interagem entre si criando os circuitos que desencadeiam sensação, percepção, movimento, fala e emoção (Bear; Connors; Paradiso, 2017). As principais células que compõem esse sistema são os neurônios e as células da glia. Os neurônios são células excitáveis que comandam a maioria das funções exclusivas do SN e são constituídos de 3 partes principais, sendo elas o corpo neuronal, ou soma, dendritos e axônio (Figura 8A). A glia contribui para as funções neurais, principalmente por meio do efeito isolante, de sustentação e de nutrição dos neurônios vizinhos. Dentre as células gliais, podemos destacar os oligodendrócitos e as células de Schwann, as quais envolvem e isolam os axônios formando camadas membranosas que recebem o nome de bainha de mielina (Figura 8B-C). Os oligodendrócitos são encontrados no sistema nervoso central e cada célula é capaz de envolver vários axônios ao mesmo tempo, enquanto as células de Schwann ocorrem no sistema nervoso periférico e cada célula é capaz de mielinizar apenas um axônio (Kandel *et al.*, 2014). A mielinização formada por essas células aumenta a condução do impulso nervoso ao longo do axônio. Ela é interrompida periodicamente deixando pequenos espaços onde a membrana axonal é exposta e segrega os canais iônicos dependentes de voltagem, formando regiões chamadas de nódulos de Ranvier (Bear; Connors; Paradiso, 2017; Kandel *et al.*, 2014).

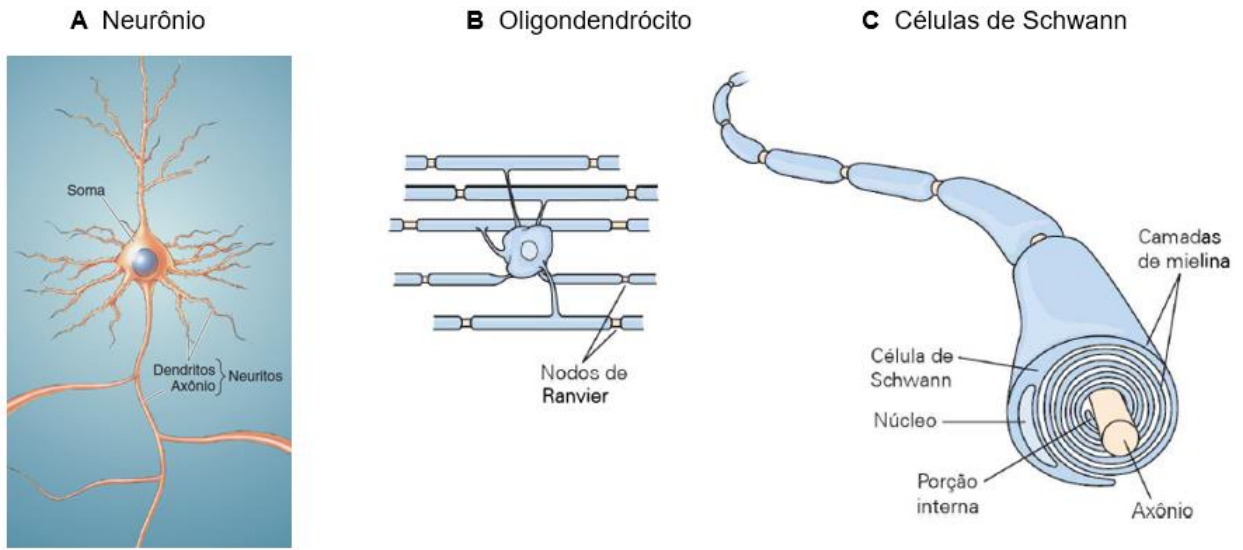


Figura 8. Células do sistema nervoso. Adaptado de Bear, Connors e Paradiso (2017), e Kandel *et al.* (2014).

O SN apresenta uma divisão estrutural básica em duas partes: o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC é composto pelo encéfalo, subdividido basicamente em cérebro, cerebelo e tronco encefálico, e pela medula espinhal, que são revestidos, respectivamente, pelo crânio e pela coluna vertebral (Figura 9A) (Bear; Connors; Paradiso, 2017; Machado, 2006). Da medula espinhal, emergem-se duas projeções de cada segmento medular, sendo elas chamadas de raiz dorsal e raiz ventral. Nestas raízes encontramos os gânglios espinhais, os quais são acúmulos de corpos neuronais pertencentes ao SNP (Figura 9B). Os neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD) desempenham função sensitiva, enquanto os da raiz ventral desempenham função motora (Machado, 2006). Nesse sentido, as fibras nervosas do SNP podem ser classificadas em sensoriais, as quais conduzem informações dos órgãos sensoriais e músculos ao SNC, ou motoras, cuja função é transmitir os impulsos motores do SNC aos músculos e glândulas (Bear; Connors; Paradiso, 2017; Girardi, 2021).

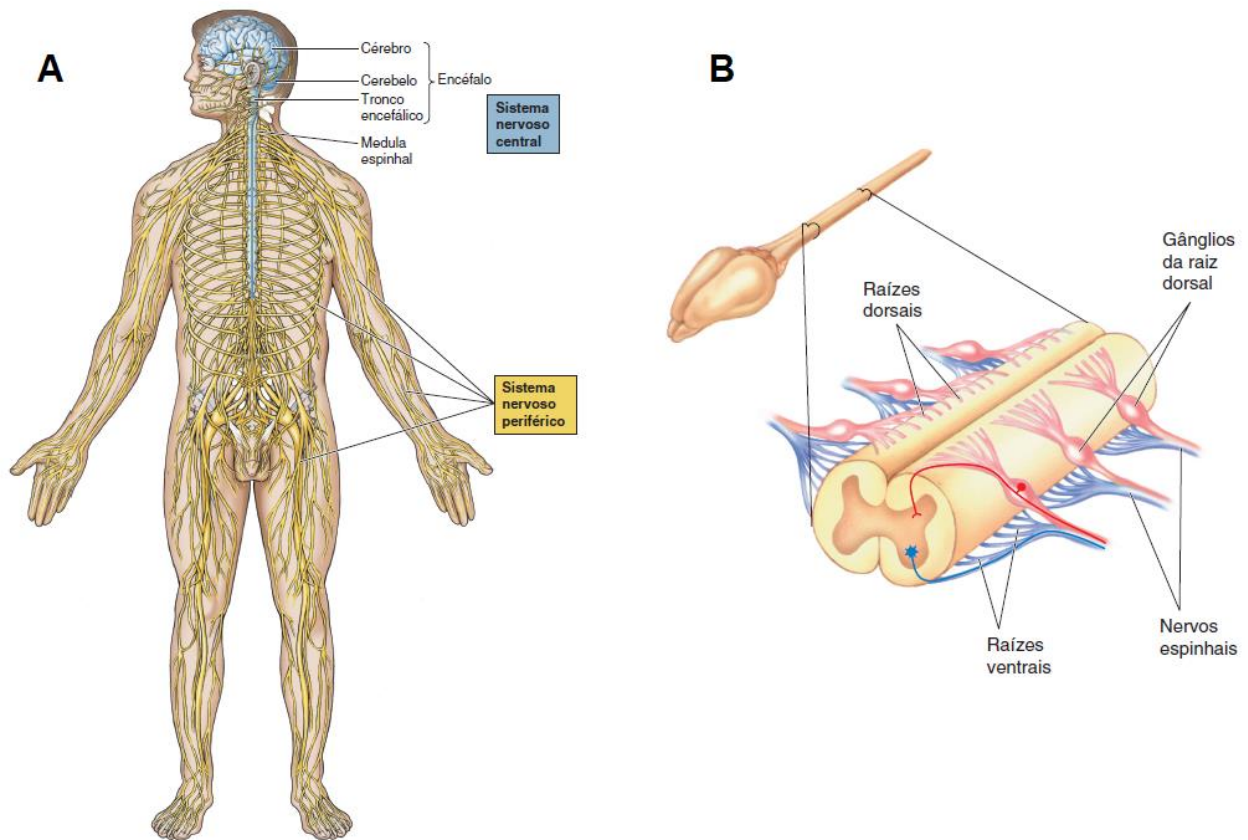


Figura 9. Representação do sistema nervoso central e periférico. (A) Subdivisão do sistema nervoso. (B) Medula espinhal em detalhe evidenciando as raízes dorsais e ventrais (Bear; Connors; Paradiso, 2017).

O SNP é formado, principalmente, por nervos, os quais são formados por um conjunto de fibras nervosas. As fibras nervosas, por sua vez, são conjuntos de axônios advindos dos corpos celulares dos neurônios e envoltos por suas bainhas de mielina (Junqueira; Carneiro, 2013). Os corpos celulares dos nervos motores se encontram no SNC, enquanto os corpos celulares de nervos sensoriais se encontram em gânglios. Os axônios que têm um calibre menor, geralmente são envolvidos por uma única dobra de células de Schwann e, por isso, formam fibras amielínicas. Neste caso, uma única célula de Schwann envolve várias fibras nervosas de forma contínua sem a formação de nódulos de Ranvier. Já os axônios mais calibrosos, são envoltos por mais dobras de células de Schwann e, portanto, formam fibras nervosas mielínicas (Figura 10) (Machado, 2006; Junqueira; Carneiro, 2013).

Ao se agruparem em feixes, as fibras nervosas dão origem aos nervos. Estes são recobertos por uma camada mais externa de tecido conjuntivo denso denominada epineuro, que recobre o nervo e preenche o espaço entre os feixes de fibras nervosas. Os feixes são individualizados por uma camada de células achatadas, justapostas e separadas por fibras colágenas, que recebe o nome de perineuro. As células da camada do perineuro são unidas por junções oclusivas promovendo a formação de uma barreira hemato-nervosa, que dificulta a passagem de macromoléculas e agentes agressivos às fibras nervosas. No interior do perineuro se encontram os axônios envolvidos por suas respectivas bainhas de mielina e um envoltório de tecido conjuntivo constituído principalmente de fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, fibroblastos e matriz extracelular, denominado endoneuro, que permeia as fibras nervosas e as individualizam (Figura 10B) (Junqueira; Carneiro, 2013; Mietto, 2011).

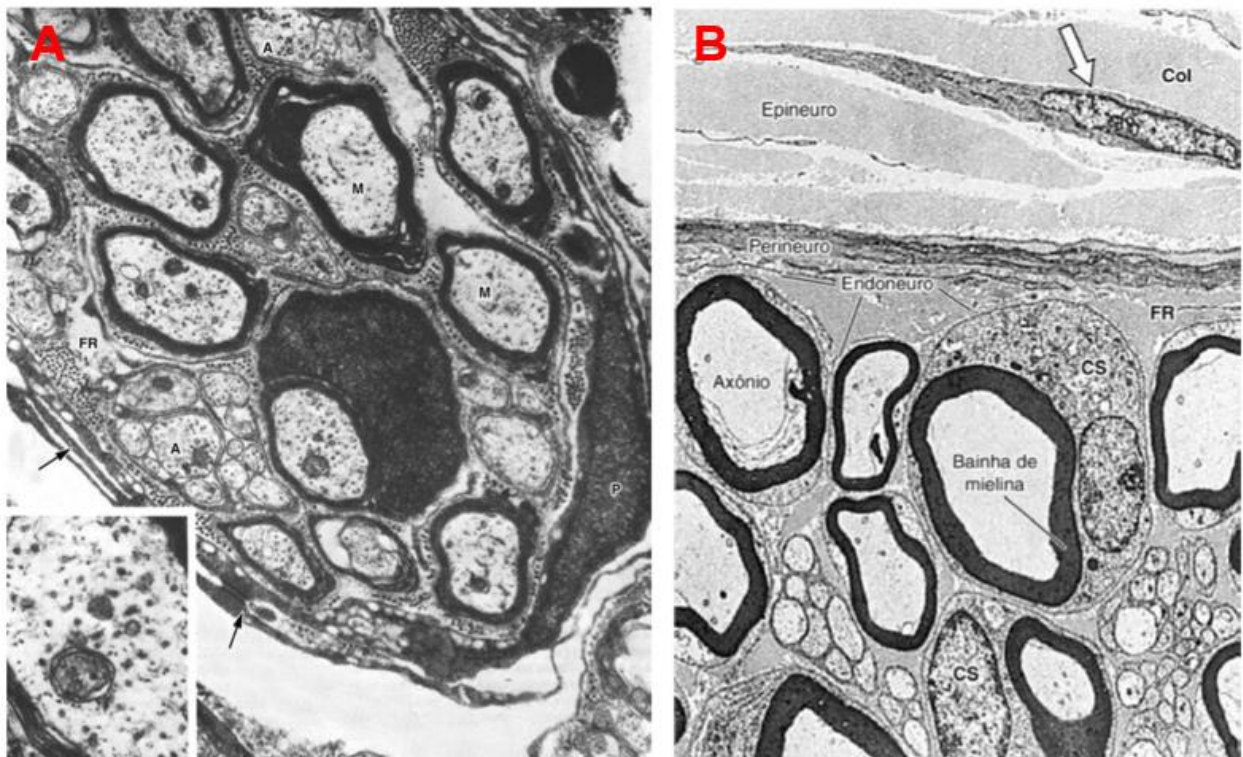


Figura 10. Micrografia eletrônica do nervo periférico. Na figura A temos a representação de nervo (30.000X) com fibras miélicas (M) e amiélicas (A). É possível visualizar o núcleo alongado de uma célula do perineuro (P), o citoplasma de células do perineuro (setas) e a junção entre essas células (seta mais inferior), além das fibras reticulares do endoneuro (FR). A micrografia menor

representa um corte transversal de axônio mielínico ampliado (60.000X) evidenciando os filamentos intermediários e microtúbulos. Na figura B temos a representação de um corte transversal do nervo (1200X) evidenciando epineuro, perineuro e endoneuro. É possível também visualizar as fibras colágenas (Col) e fibroblastos (seta) do epineuro, e as fibras reticulares (FR) do endoneuro produzidas pelas células de Schwann (CS) (Junqueira; Carneiro, 2013).

Por não apresentarem proteção óssea como o SNC, e por estarem localizados mais superficialmente ao longo do corpo humano, os nervos periféricos estão mais susceptíveis a lesões traumáticas (Carvalho; Oliveira; Reis, 2019). Além disso, a barreira hemato-nervosa dos nervos parece ser menos restritiva que a barreira hematoencefálica, sugerindo que o SNP seja também mais susceptível a entrada de patógenos e substâncias (Feldman *et al.*, 2017). Desse modo, doenças que afetam o SNP, as chamadas neuropatias periféricas, são mais comuns, sendo o trauma, a diabetes e os agentes infecciosos algumas das causas mais frequentes dessas lesões (Callaghan *et al.*, 2012; Feldman *et al.*, 2017; Girardi, 2021; Modrak *et al.*, 2020). Dentre os agentes infecciosos, o *M. Leprae* se destaca como um dos responsáveis por tais neuropatias, sendo o agente patológico causador da hanseníase, tornando-o não só um problema de saúde pública, mas também um dos alvos de estudos para se entender os mecanismos que regem as neuropatias periféricas.

2.6 As células de Schwann e seu papel na degeneração e regeneração nervosa

Ao analisarmos os nervos, percebemos a importância das células de Schwann na mielinização e integridade das fibras nervosas, tornando-as intimamente associadas ao axônio neuronal. Há dois grandes fenótipos de células de Schwann no sistema nervoso periférico, as células de Schwann mielinizantes e as não mielinizantes (Campana, 2007). O fenótipo mielinizante, como já descrito, produz mielina e é encontrado encapsulando os axônios, permitindo a propagação do potencial de ação por condução saltatória (Salzer, 2015). O segundo fenótipo circunda axônios de pequenos diâmetros e não os mielinizam (Campana, 2007). Uma única célula de Schwann não mielinizante engloba várias fibras, separando-as pelo seu citoplasma, formando o chamado feixe de Remak. Essas fibras são provenientes de axônios aferentes nociceptivos que formam as

chamadas fibras do tipo C. Dessa maneira, as células de Schwann podem adotar diferentes fenótipos dependendo do tipo de fibra que elas se associam, promovendo ou não a mielinização axonal (Campana, 2007; Feldman *et al.*, 2017; Girardi, 2021; Salzer, 2015). Além de promover o encapsulamento dos axônios, essas células promovem um suporte trófico e parácrino ao nervo, apresentam importante papel na homeostase neuronal e estão envolvidas em um amplo espectro de doenças muito em parte devido à habilidade de interagir e modular células imunes, protegendo assim o microambiente neural (Zhang *et al.*, 2020). Muitas dessas modulações envolvem a produção de mediadores inflamatórios, fagocitose e apresentação de antígenos, que constituem eventos essenciais para a progressão natural da degeneração Walleriana e posterior regeneração nervosa (Mietto *et al.*, 2015). Em nervos danificados, as células de Schwann passam por uma modulação fenotípica que as levam a ganhar novamente a capacidade de proliferar, migrar e secretar inúmeros fatores que controlam a degeneração Walleriana e a regeneração nervosa (Campana, 2007; Nocera; Jacob, 2020).

A degeneração Walleriana (DW) consiste em um conjunto de alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que levam a degeneração do nervo periférico após lesão (Waller, 1850). É um processo inflamatório coordenado que promove a degradação total do coto axonal distal à lesão seguido de posterior regeneração axonal. Apesar da DW ter sido inicialmente descrita em modelos de transecção de nervos, sabe-se que este mecanismo também ocorre em outros tipos de lesões, como compressivas, químicas, metabólicas e em doenças neurodegenerativas (Coleman; Hoke, 2020; Mietto, 2015). Esse processo também ocorre em axônios do SNC, porém, sua progressão ocorre de forma muito mais lenta, variando de meses a anos, se comparado ao SNP, no qual se desenvolve em torno 7 e 14 dias (Vargas; Barres, 2007). Resumidamente, a DW pode ser descrita como uma sequência de eventos na qual incluem a desintegração dos componentes do citoesqueleto axonal, a fragmentação da bainha de mielina, a ativação de células de Schwann e o recrutamento de macrófagos (Mietto, 2011, 2015). Após a desintegração da mielina, as células de Schwann se proliferam intensamente e, juntamente com macrófagos advindos da circulação sanguínea, fagocitam os resíduos axonais e mielínicos, processo fundamental para o curso apropriado da DW e posterior favorecimento da regeneração axonal (Figura).

A regeneração axonal está intimamente ligada a DW, sendo estes processos interdependentes. Após a lesão, há grande produção de moléculas atuantes na regeneração e recrutamento de células no corpo celular do neurônio, de modo a favorecer o crescimento axonal e a proliferação de células de Schwann (Caillaud *et al.*, 2019; Mietto, 2015). Além de se proliferarem, as células de Schwann sofrem dediferenciação possibilitando-as novas atribuições funcionais como migração, fagocitose, secreção de substâncias pró-regenerativas e inflamatórias (Chen; Yu; Strickland, 2007). Essas modificações são cruciais para o correto desencadeamento da DW e consequente regeneração, uma vez que, após a fagocitose dos fragmentos axonais e redução da inflamação, as células de Schwann migram de forma a se alinharem formando as Bandas de Bungner, as quais guiam o axônio em regeneração em direção ao antigo alvo (Chen; Yu; Strickland, 2007; Mietto; Mostacada; Martinez, 2015). Após a regeneração do axônio, há a remielinização pelas células de Schwann através da formação de uma bainha de mielina mais delgada que a anterior. O reestabelecimento dos terminais sinápticos ocorre quando o axônio consegue se reconectar com seu antigo alvo, permitindo assim o reestabelecimento da função original (Figura) (Chen; Yu; Strickland, 2007). No entanto, na prática clínica, esse processo é dependente de diversos fatores, como o tipo, extensão e local da lesão, além da idade do paciente (Modrak *et al.*, 2020). Assim, por diversas vezes, a reconexão com o sítio alvo não é reestabelecida, culminando em um processo regenerativo não efetivo que leva a perda de função. Nesse sentido, estudos que visem compreender os diferentes mecanismos que regem a degeneração e regeneração em neuropatias periféricas são primordiais para o estabelecimento de intervenções terapêuticas, as quais permitam a modulação e recuperação efetiva da funcionalidade de nervos lesados.

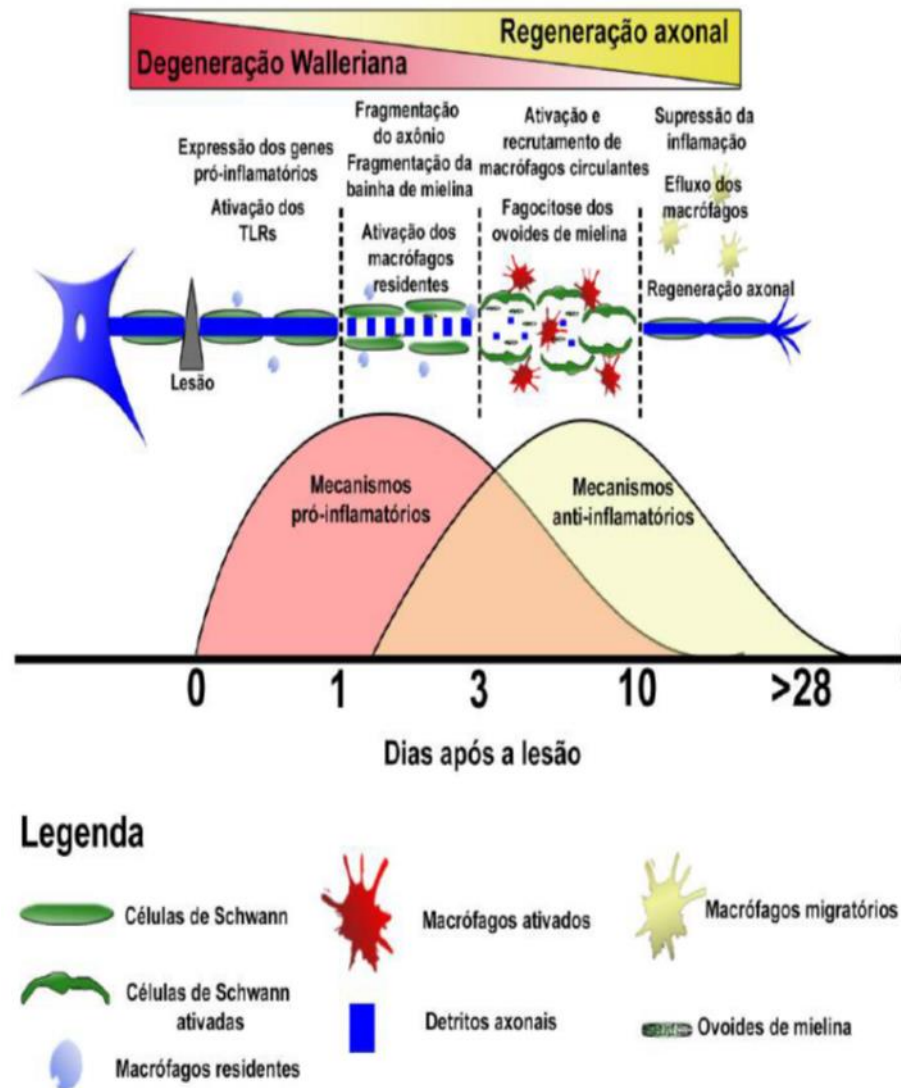


Figura 11. Representação dos principais eventos associados à degeneração e regeneração axonal. É possível notar como os mecanismos inflamatórios e anti-inflamatórios se coordenam de forma a permitir o desencadeamento apropriado de ambas degeneração e regeneração axonal. Retirado de Mietto, 2015.

Por fim, as células de Schwann participam da manutenção axonal através de diversos mecanismos de comunicação intercelular, que incluem o suporte proteico através da transferência de ribossomos, e a melhora da regeneração por meio de vesículas extracelulares chamadas exossomos, as quais contêm mRNAs, miRNAs e proteínas, aumentando a sobrevivência neuronal após estímulo pró-degenerativo (Lopez-Leal *et al.*, 2016; Lopez-Leal; Court, 2016). Similarmente, o aporte iônico neuronal

também se insere nesse acoplamento metabólico, a exemplo do íon ferro que é fornecido às mitocôndrias axonais pelas células de Schwann, o qual se faz necessário para o reparo nervoso adequado (Mietto *et al.*, 2021). Tal interdependência glial se manifesta de forma tão íntima que a relação axônio-células de Schwann se manifesta como um sincício funcional, no qual o relevante suporte metabólico provido por essas células gliais representa um marco evolucionário, podendo inclusive ser um alvo para o tratamento de neuropatias periféricas (Bouçanova; Chrast, 2020; Lopez-Leal *et al.*, 2016; Stassart; Woodho, 2020).

2.7 Neuropatologia da Hanseníase

A neuropatia da hanseníase é causada em parte pela invasão do *M. leprae* às células de Schwann. Ao residir nessas células, o bacilo se beneficia de algumas vantagens que lhe conferem significativa sobrevivência, como seu estabelecimento em um sítio protegido de mecanismos imune do hospedeiro e com acesso limitado de agentes terapêuticos devido a barreira hemato-nervosa (Rambukkana, 2000). Além disso, nosso grupo mostrou que as células de Schwann são excelentes hospedeiras ao fornecerem metabólitos para a replicação intracelular do patógeno, em especial o lactato (Medeiros *et al.*, 2016). De modo interessante, o lactato produzido pela célula de Schwann, ao invés de ser transportado para os neurônios em seu próprio benefício energético, é desviado para síntese de lipídios bacterianos durante a infecção, o que consequentemente gera um déficit energético axonal com posterior degeneração (Girardi *et al.*, 2023). Nosso grupo também evidenciou a capacidade do *M. leprae* em provocar a destruição da bainha de mielina das células de Schwann mielinizantes, como uma etapa crucial para a manutenção da viabilidade do bacilo na célula hospedeira (Mietto *et al.*, 2020).

Não obstante, outros estudos mostram que o tropismo neural da bactéria pelas células de Schwann se estabelece em sua ligação com a lâmina basal que circunda tais células. Um dos maiores componentes dessa lâmina é a laminina-2, a qual foi demonstrada ser o sítio preferencial de ligação do patógeno em análises *in vitro* (Rambukkana *et al.*, 1997; 2004).

Sob o estímulo de uma lesão, as células de Schwann assumem grande protagonismo. Sua plasticidade permite a formação de uma resposta adaptativa à lesão nervosa, promovendo a regeneração através de sua conversão para um fenótipo indutor de reparo. Esse fenótipo ativa funções que promovem a fagocitose da mielina e resíduos de células mortas, previnem a morte neuronal, ajudam no crescimento e guiam neurônios no processo regenerativo em direção a seus alvos, controlam a inflamação local e induzem a formação de novos vasos sanguíneos (Cattin; Lloyd, 2016; Jessen; Mirsky, 2019; Lutz; Barres, 2014). Como já discutido, durante a invasão pelo *M. leprae* no nervo, a célula de Schwann é a principal hospedeira do bacilo, e, quando invadida, permite a persistência da bactéria no microambiente neural, uma vez que esta subverte as funções daquela a seu favor, a ponto de reprogramá-la para um fenótipo de célula tronco progenitora que é mais vulnerável a infecção do *M. leprae* (Gasque; Neal, 2016; Hess; Rambukkana, 2019). Por fim, as diversas modificações sofridas pelas células de Schwann sob a infecção do bacilo promovem o favorecimento energético do patógeno e sua evasão do sistema imune do hospedeiro, uma vez que essas células aumentam sua captação de glicose, reduzem sua atividade mitocondrial, aumentam os níveis de colesterol, aceleram a quebra e remoção da mielina com consequente aumento de corpúsculos lipídicos, e realizam mielinofagia (quebra autofágica da mielina), fatores que permitem maior sobrevivência do patógeno no interior dessas células gliais (Mattos *et al.*, 2011b; Medeiros *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2021; Mietto *et al.*, 2020).

Apesar de sua baixa mortalidade, a neuropatia periférica é a principal causa de morbidade da hanseníase, a qual frequentemente leva a deficiências e deformidades associadas à sua patologia. Sua manifestação neural é limitada ao sistema nervoso periférico. Dentre os nervos mais comumente envolvidos, incluem-se o nervo ulnar e nervos peroneais. No entanto, todos os nervos periféricos principais, assim como troncos nervosos cutâneos, podem também ser afetados (Antunes *et al.*, 2019; Maymone *et al.*, 2020; Pitta *et al.*, 2021). Em biópsias cutâneas, a inflamação perineural é considerada forte marca histopatológica da hanseníase, e devido ao *M. leprae* ser a única bactéria a infectar nervos e células de Schwann, a demonstração de bacilos ácido-resistentes em nervos periféricos é um sinal patognomônico da doença (Scollard *et al.*, 2015).

As injúrias nervosas são caracterizadas por infiltrados inflamatórios que podem exibir granulomas epiteliais, macrófagos espumosos repletos pelo bacilo e intercalados por linfócitos e células do plasma (Antunes *et al.*, 2019). Esses processos inflamatórios se estendem além dos compartimentos nervosos, gerando grande perda de fibras mielinizadas, assim como o comprometimento de fibras não mielinizadas, o que resulta em células de Schwann desnervadas (Antunes *et al.*, 2012). Todas essas alterações conduzem a deficiências motoras e sensoriais, advindas de um processo patogênico que evolui para a destruição nervosa e fibrose (Antunes *et al.*, 2019). A fibrose nervosa é irreversível e deve ser fortemente evitada devido às conseqüentes incapacidades e deformidades permanentes causadas aos pacientes.

A fibrose desenvolvida na hanseníase neural é peculiarmente única, de forma que as biópsias examinadas apresentam tamanho grau de densidade de deposição de colágeno que não é visto em outras neuropatias (Figura 12), o que somado a outros fatores clínicos corrobora para um diagnóstico mais preciso da doença (Antunes *et al.*, 2012).

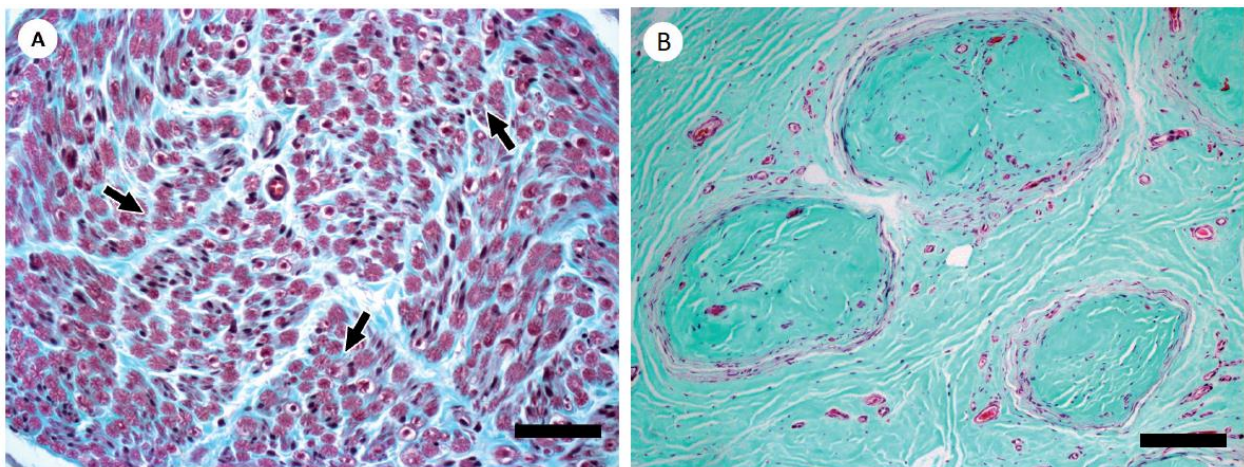


Figura 12: Fibrose em nervo periférico hansênico. (A) Corte histológico de nervo periférico saudável; as bainhas de mielina das fibras nervosas estão marcadas em vermelho (setas); barra de escala: 70µm. (B) Corte histológico de nervo periférico fibrótico; nota-se a perda de mielinização e densa deposição de colágeno nos fascículos nervosos; coloração tricromo de Gomori; barra de escala: 250µm. Adaptado de Antunes *et al.*, 2019.

O desenvolvimento de uma neurite aguda pode se estabelecer em alguns pacientes, a qual é frequentemente acompanhada pelas já descritas reações hansênicas, que podem ter seus mecanismos imunológicos também manifestados nos nervos (Scollard *et al.*, 2015). Além disso, a atrofia axonal (redução do calibre axonal) tem sido descrita em nervos de pacientes e, apesar de não ser totalmente elucidada, se observa seguida de anormalidades na fosforilação de proteínas neurofilamentosas em nervos de pacientes tratados e não tratados. Tais observações sugerem que o bacilo pode iniciar mudanças bioquímicas no compartimento axonal que precedem as mudanças estruturais das fibras nervosas mielinizadas (Save *et al.*, 2004; Scollard *et al.*, 2015).

Ambas as células de Schwann mielinizantes e não mielinizantes podem ser infectadas pelo patógeno, porém, este é muito bem adaptado e de baixa toxicidade, capaz de infectar várias células sem causar disfunções significativas. Em infecções *in vitro*, alterações gerais na morfologia das células de Schwann não são vistas, e sua habilidade em interagir com axônios e produzir mielina não é prejudicada (Hagge *et al.*, 2002; Scollard *et al.*, 2015). Porém, em nervos lepromatosos, as funções dessas células podem ser diferentes, as quais, sob infecção, apresentam aparência espumosa, devido aos corpúsculos lipídicos recrutados para dentro de fagossomos contendo *M. leprae* por meio do próprio patógeno, através de sinalização dependente do receptor do tipo toll – 6 (Mattos *et al.*, 2011a). Essas organelas podem facilitar a permanência do bacilo nas células de Schwann, fornecendo ao patógeno fonte de energia por meio da quebra lipídica (Marques *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2021; Mattos *et al.*, 2014).

Ao considerarmos que a desmielinização de nervos periféricos abrange uma larga gama de vias de sinalização, assim como complexas interações entre glia, axônios e imunidade celular, fica clara a necessidade de maior elucidação dos fatores que permeiam a quebra de mielina após a entrada do bacilo (Mietto *et al.*, 2016).

Estudos demonstram altos níveis de mRNA para TNF e suas metaloproteinases (MMP) 2 e 9 reguladas negativamente em nervos acometidos, além de TNF também ser detectado nas camadas da pele e no soro de lesões cutâneas sob reações hansênicas (Mietto *et al.*, 2016; Teles *et al.*, 2007). Taxas mais altas de mRNA para TNF têm sido encontradas em infiltrados inflamatórios altamente ativados do que nos processos de nervos periféricos em si, gerando forte evidência de que esse mediador desempenha

importante papel na patogênese neural (Teles *et al.*, 2007). As células de Schwann expressam TNF constitutivamente em nervos não lesionados e aumentam drasticamente sua produção após lesão, além de liberar um amplo espectro de mediadores pró-inflamatórios, dos quais incluem IL-1 β , MCP-1 (CCL2), MIP-1 (CCL3), TGF- β , e galectina-3 (Mietto; Mostacada; Martinez, 2015). A rápida liberação de mediadores inflamatórios pelas células de Schwann e macrófagos residentes atrai células imunes adicionais para o nervo periférico lesionado, induzindo então uma exacerbação inflamatória nos nervos infectados, que se segue por uma crônica degeneração axonal e mielínica (Mietto *et al.*, 2016).

Em estudos *in vitro*, o *M. leprae* demonstrou regular positivamente a expressão de TNF ligado a membrana, mas não a secreção dessa citocina nessas células. Além disso, o bacilo também demonstrou estimular a expressão gênica do receptor 1 de TNF (TNFR-1), o qual tem sua ativação associada a diversas doenças neurodegenerativas (Mc Guire *et al.*, 2011). A bactéria também se mostrou capaz de induzir a secreção de IL-23, a qual está relacionada ao início da desmielinização mediada pelo sistema imune (Hu *et al.*, 2006; Mietto *et al.*, 2016). Desse modo, o *M. leprae* parece tornar as células de Schwann mais sensíveis ao TNF exógeno no nervo, produzido por macrófagos residentes e outras células inflamatórias que são recrutadas, o que, juntamente com a indução da IL-23, reforça ainda mais o papel das células de Schwann na indução inicial da resposta imune à infecção e sua contribuição na lesão nervosa (Mietto *et al.*, 2016).

É evidente que as células de Schwann se encontram no centro da patogênese da neuropatia hansênica. Contudo, ainda não é tão claro o quanto desse processo se pauta apenas na infecção dessas células e o quanto é de fato devido ao ambiente inflamatório tóxico gerado em torno dos nervos. Além disso, muito se tem investigado em relação aos processos patológicos que permeiam essas células, e ainda pouco se sabe sobre os efeitos que a infecção do patógeno pode causar diretamente às células neuronais.

2.8 Metabolismo do colesterol e a colest-4-en-3-ona na neuropatia hansênica

Como já discutido anteriormente, vimos que o *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório com um tropismo preferencial por macrófagos da pele e células de Schwann

de nervos periféricos. Sua inabilidade de crescimento extracelular pode ser explicada por sua baixa porcentagem de genes funcionais (1.605 genes) e alta taxa de pseudogenes (1.115 genes) em seu genoma (Cole *et al.*, 2011; Froes Junior *et al.*, 2022). Desse modo, o bacilo é encontrado residindo macrófagos espumosos, os quais apresentam esse fenótipo devido em parte ao acúmulo de corpúsculos lipídicos (Matos *et al.*, 2010). E como descrito previamente, foi observado que o *M. leprae* é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, os quais são recrutados para fagossomos contendo o patógeno em macrófagos e células de Schwann infectadas. Além disso, análises de biópsias e culturas de células de Schwann revelaram que o fenótipo espumoso de nervos lepromatosos também está relacionado à capacidade do patógeno de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos nessas células (Mattos *et al.*, 2011a, 2011b). Outrossim, estudos confirmaram o colesterol como o lipídio hospedeiro a acumular em macrófagos infectados por *M. leprae*, além de demonstrarem que o bacilo aumenta a síntese *de novo* de colesterol, assim como a captação exógena de colesterol LDL por meio da regulação positiva de genes envolvidos nessas vias (Mattos *et al.*, 2014). Notavelmente, o colesterol se mostrou colocalizar aos fagossomos contendo o patógeno, e o bloqueio do metabolismo deste lipídio, tanto pela inibição da síntese *de novo* por estatinas ou pela depleção de colesterol exógeno, promoveu considerável redução na sobrevivência intracelular da bactéria tanto *in vitro* como *in vivo* (Lobato *et al.*, 2014; Mattos *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2015).

A dependência de moléculas lipídicas hospedeiras para sobrevivência e persistência tem sido fortemente analisada em *Mycobacterium tuberculosis*, o qual também promove a formação de células espumosas como forma crítica para sua persistência no hospedeiro (Chandra *et al.*, 2022; Marques *et al.*, 2015; Peyron *et al.*, 2008; Russel *et al.*, 2009). *M. tuberculosis* é capaz de degradar e usar o colesterol como fonte de energia e biossíntese de lipídios micobacterianos (Pandey; Sasseti, 2008), e o estudo da contribuição deste lipídio para o crescimento *in vivo* desse bacilo e a patogênese da tuberculose forneceu a elucidação de genes envolvidos direta e indiretamente no metabolismo do colesterol. Todavia, dados mostram que o *M. leprae* perdeu todos os genes associados ao metabolismo do colesterol em *M. tuberculosis*, porém manteve a capacidade de oxidar o colesterol em colest-4-en-3-ona (colestonona), a qual se apresenta como a primeira etapa de degradação desse esterol (Marques *et al.*,

2015). Desse modo, tem-se evidenciado que o *M. leprae* induz o acúmulo de corpúsculos lipídicos ricos em colesterol em células se Schwann, que são recrutados para as bactérias intracelulares, processo tal que ao ser inibido diminui a sobrevivência bacteriana, e sugere que o recrutamento de corpúsculos constitui um mecanismo de entrega lipídica ao patógeno intracelular, aumentando sua viabilidade infecciosa (Rosa *et al.*, 2021).

A colestenoa (Figura 13) faz parte da classe dos oxicolesterois, os quais são formados a partir de ações enzimáticas ou de radicais livres sofridas pelo colesterol (Wielkoszyński *et al.*, 2006). Oxicolesterois também podem ser encontrados em alimentos, principalmente os fritos e processados, como resultado da oxidação do colesterol, apresentando características aterogênicas, citotóxicas, cancerígenas e mutagênicas (Tenuta-Filho *et al.*, 2003). Esses compostos citotóxicos parecem estar envolvidos em diversos mecanismos biológicos, como a inibição da atividade da HMG-CoA redutase (ou 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase), ação antiproliferativa, indução de apoptose, mudanças na estrutura e funcionalidade da membrana celular, e alterações funcionais no sistema imune (Neuvonen *et al.*, 2014; Wielkoszyński *et al.*, 2006). Ademais, os efeitos citotóxicos dos oxicolesterois têm sido relacionados a diferentes células, especialmente as vasculares, desempenhando também influência em doenças vasculares, inflamação e funções cerebrais (Dias *et al.*, 2020).

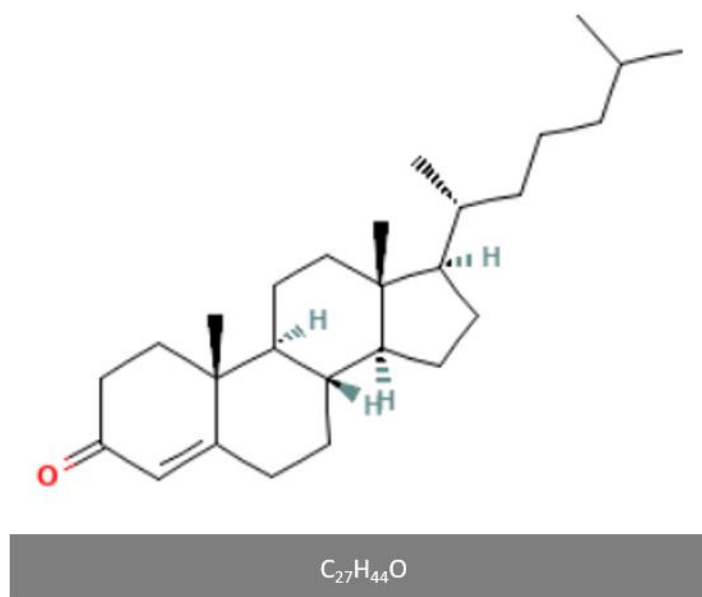


Figura 13. Estrutura e fórmula química da colest-4-en-3-ona. Adaptado de NLM, 2023.

Entender as bases bioquímicas do papel do colesterol e sua oxidação na patogênese do *M. leprae* constitui um desafio a ser elucidado. Desvendar o metabolismo desse esterol na célula hospedeira durante a infecção do bacilo pode oferecer mecanismos pelo qual esse lipídio promove a sobrevivência intracelular do patógeno, abrindo portas para possíveis terapias de tratamento. Além disso, análises mais profundas do papel da colestenoína no metabolismo da bactéria podem fornecer novas vias terapêuticas e diagnósticas. Por exemplo, estudos recentes apontam o acúmulo do composto em amostras clínicas, como secreções do trato respiratório e plasma sanguíneo, sugerindo seu uso como um biomarcador para detecção da tuberculose (CHANDRA et al, 2022). Logo, estudos que visem entender o papel da colestenoína na patogênese da hanseníase podem de fato contribuir não só para o entendimento neurobiológico da doença, como também o entendimento clínico, abrindo portas em áreas multidisciplinares que permitam melhor enfrentamento da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a contribuição da colest-4-en-3-ona e a exposição do *M. leprae* no comportamento de neurônios periféricos e da linhagem celular humana SK-N-AS.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o efeito da colest-4-en-3-ona na arborização dos neurônios do gânglio da raiz dorsal.

3.2.2 Avaliar o potencial degenerativo da colest-4-en-3-ona em neurônios do gânglio da raiz dorsal.

3.2.3 Testar a toxicidade da colest-4-en-3-ona em neurônios do gânglio da raiz dorsal.

3.2.3 Verificar a capacidade de internalização do *M. leprae* em neurônios humanos da linhagem SK-N-AS.

3.2.4 Testar a toxicidade e a atividade mitocondrial da colest-4-en-3-ona em neurônios SK-N-AS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos animais

Camundongos Balb/c neonatos (P1-P2) e fêmeas Balb/c na idade gestacional E13.5 foram produzidos e fornecidos pelo Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Todos os procedimentos experimentais seguiram as normas e regulamentos da licença CEUA 046/2019.

4.2 Dissecação e dissociação dos GRDs: obtenção de neurônios primários

Os neonatos (P1-P2) foram eutanasiados por decapitação e tiveram a coluna vertebral dissecada de forma a permitir o acesso aos gânglios da raiz dorsal (GRDs) (Figura 14).

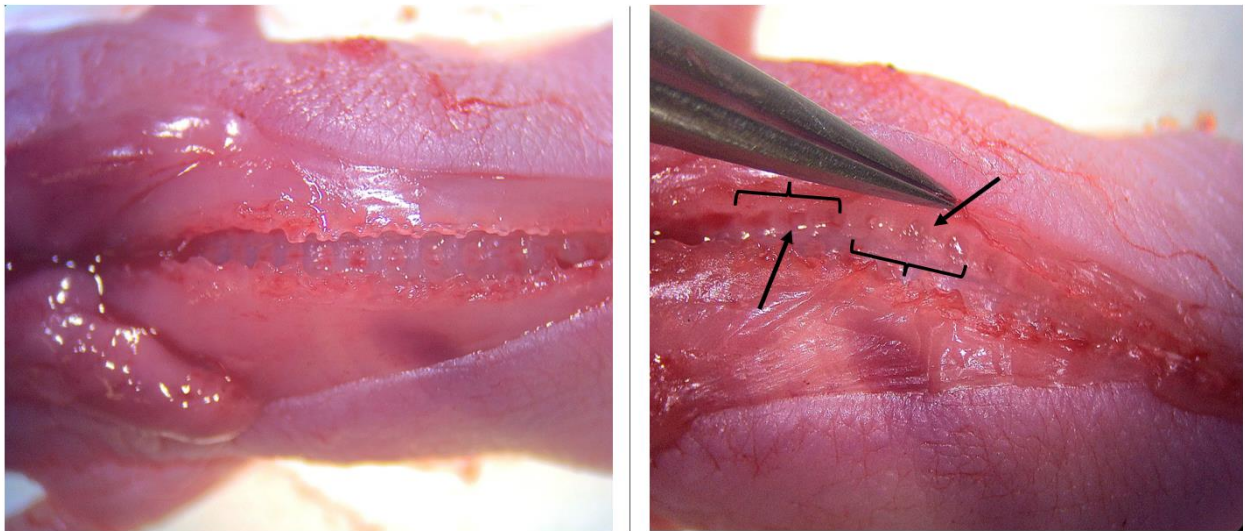


Figura 14. Dissecação da coluna vertebral e obtenção de GRDs em neonatos. À esquerda, coluna vertebral seccionada e exposta após retirada da medula espinhal. À direita, exposição dos GRDs; colchete e seta da esquerda evidenciando forames intervertebrais após retirada de GRDs; colchete e seta da direita evidenciando GRDs em seus forames. Imagens fotografadas sob lupa de dissecação.

Os GRDs foram retirados e coletados em eppendorf contendo meio L-15 (L5520 – Sigma). Após a coleta, os gânglios foram digeridos por solução enzimática contendo tripsina (15090-046 – Gibco) na concentração de 0,25%, diluída em meio Neurobasal® (21103-049 – Gibco), por 30 min à 37°C (Mietto *et al.*, 2021).

Posteriormente, a reação de dissociação foi interrompida com a adição de soro fetal bovino (12657-029 – Gibco) na quantidade do mesmo volume presente no eppendorf. Em seguida, o conteúdo foi mecanicamente dissociado com a ajuda de uma pipeta de 1000µl, e por uma seringa de insulina de agulha 26G ½ (Mietto *et al.*, 2021). A seguir, a solução foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (pellet) ressuspenso em meio neurobasal completo contendo soro fetal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina a 1% (15140-122 – Gibco), suplemento B-27® a 1% (0080085SA – Gibco) e fator de crescimento neural (NGF) a 25 ng/ml (13257-019 – Gibco).

Para obtenção dos GRDs E13.5, os embriões foram removidos do saco embrionário em meio L15 e tiveram os órgãos ventrais removidos, a fim de evidenciar apenas a coluna vertebral. Em seguida, o dorso foi dissecado e os GRDs extraídos em meio L15 (Figura 15).

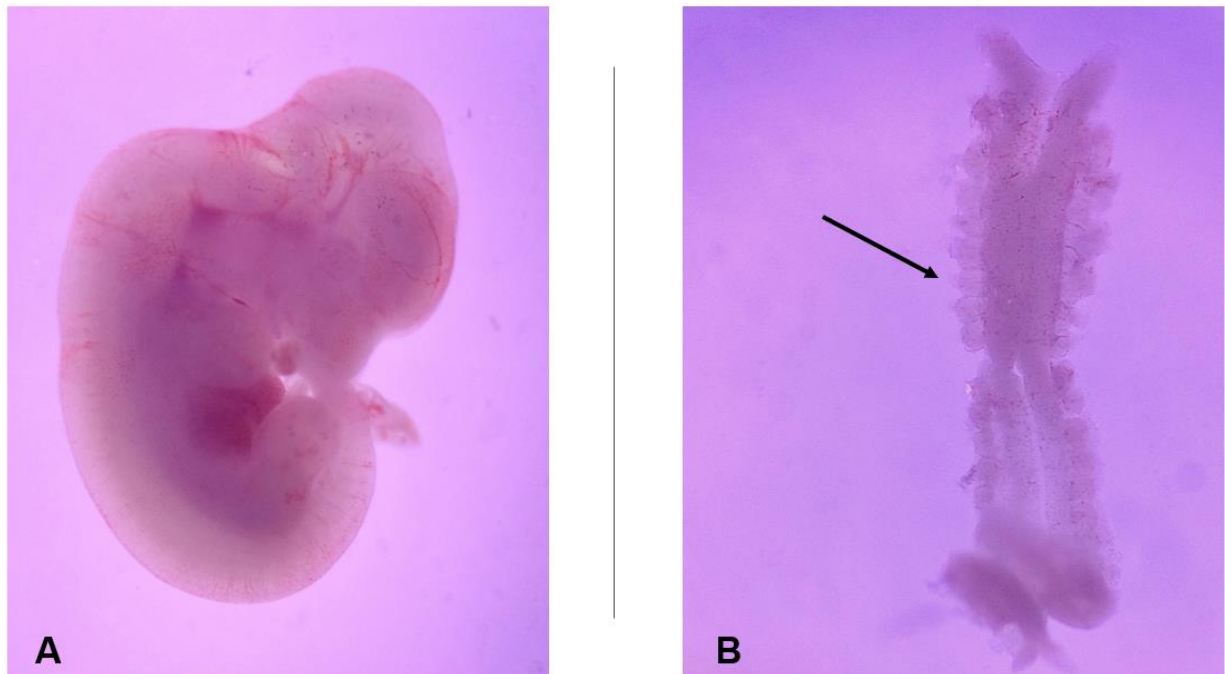


Figura 15. Embrião de camundongo Balb/C e sua exposição de gânglios. **(A)** Embrião em estágio gestacional E13.5; **(B)** GRDs em evidência após dissecação do embrião e exposição da coluna vertebral e medula. A seta denota os GRDs presos na medula. Imagens fotografadas sob lupa de dissecação.

A dissociação dos GRDs embrionários foi feita de forma semelhante aos de neonatos. No entanto, o precipitado foi ressuspenso em meio neurobasal contendo tripsina-EDTA a 0,05% (25200056 - Gibco) e incubado por 25 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 1 minuto. A solução foi descartada e a dissociação mecânica dos gânglios foi feita apenas com a ajuda de uma pipeta de 1000 μ l, com posterior centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. A seguir, o precipitado foi ressuspenso em neurobasal completo contendo todos os componentes anteriores, à exceção do soro fetal bovino, nesse caso a 2%, e da adição de glutamina a 2 mM (25030081 – Gibco), 5-Fluoro-2-deoxiuridina 5- monofosfato de sódio (F3503-Sigma) a 1 μ M e uridina (U3003-Sigma) também a 1 μ M, sendo estes dois últimos utilizados para inibir mitose de células não neuronais. Toda a metodologia para coleta, processamento e cultura dos neurônios embrionários foi adaptada de Shin e Cho (2020).

4.3 Plaqueamento dos neurônios primários dissociados

Placas de cultura de 24 poços (K12-024 - Kasvi) contendo lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro (K5-0013 – Olen) foram previamente tratadas no dia anterior com poli-D-lisina a 10 µg/ml (A38904-01 - Gibco) e laminina também a 10 µg/ml (23017-015 – Invitrogen) e deixadas em incubadora de CO₂ a 37°C. As células foram plaqueadas igualmente em cada poço em um volume total de 400 µl de meio neurobasal completo, conforme composição descrita anteriormente para cada tipo de neurônio, neonatal ou embrionário, sob o desenho experimental a seguir.

4.4 Desenhos experimentais: cultivo celular e ensaios com colest-4-en-3-ona em neurônios

Cada evento amostral foi realizado em duplicata por pelo menos três vezes de forma a testar o efeito da colestenona no comportamento neuronal *in vitro*. Para isso, neurônios neonatais foram cultivados em meio neurobasal completo contendo a substância em questão nas concentrações de 5 µM, 2,5 µM, 1 µM e 0,1 µM. O controle foi composto por etanol puro, veículo da substância, e adicionado no mesmo volume de correspondência. Após 24 horas, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (P6148-500G Sigma) e processadas para ensaio de imunocitoquímica.

Neurônios embrionários foram cultivados por 5 a 7 dias antes de receberem a colestenona, para que houvesse robustez de crescimento neurítico. Para esse ensaio, foi utilizado apenas a concentração de 5 µM e o controle com etanol puro. Os poços foram fotografados após 0h, 24h, 48h e 72h de exposição, em campo claro em microscópio de luz invertido (Zeiss – Primovert / AxioCam ICc3) (Figura 16).

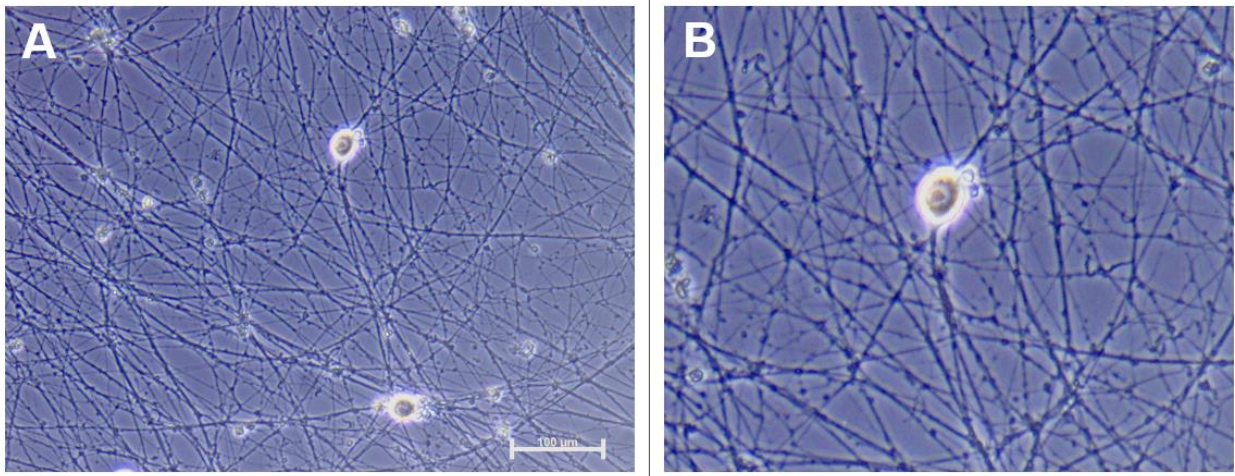


Figura 16. Cultura de neurônios de GRDs embrionários em estágio gestacional E13.5. (A), sob objetiva de 20X, imagem evidenciando a complexidade da projeção neurítica após 7 dias de crescimento em cultura, e dois corpos neuronais em foco. (B), recorte da imagem mostrando em detalhe o corpo celular e suas projeções.

Para o ensaio de viabilidade, neurônios primários neonatais foram processados e cultivados em placas de 24 poços em meio de cultura completo, conforme processo descrito anteriormente. Foi adicionado colesteno na concentração final de 5 μ M por 24h ou 48h. Quando estimuladas por 48h, uma segunda adição de colesteno foi realizada após as primeiras 24h, respeitando a mesma concentração já estabelecida. Como controle, foi utilizado DMSO puro na concentração final de 2%, adaptado de Galvão *et al.* (2014) e Hanslick *et al.* (2009). Após decorrido o tempo de estímulo, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados uma vez com PBS 1X por 3 minutos. Em seguida, os neurônios foram tratados com azul de tripan (Sigma-Aldrich - T6146) diluído em PBS 1X na concentração de 2% durante um minuto. A solução foi retirada e os poços preenchidos novamente com PBS 1X para posterior fotografia imediata em microscópio de luz invertido. O protocolo de coloração acima foi adaptado de Perry, Epstein e Gelbard, (1997), e Aras, Hartnett e Aizenman (2008). As fotos foram tiradas em objetiva de 20X, sob as funções de cor RGB e Min/Max ativadas. As fotografias foram adquiridas posicionando-se o foco no centro dos poços, de forma a capturar a melhor definição do campo claro. As células coradas com azul de tripan foram quantificadas e a proporção

em relação às células não coradas foi estabelecida ao longo de cada evento amostral para determinar a viabilidade das células (Figura 17).

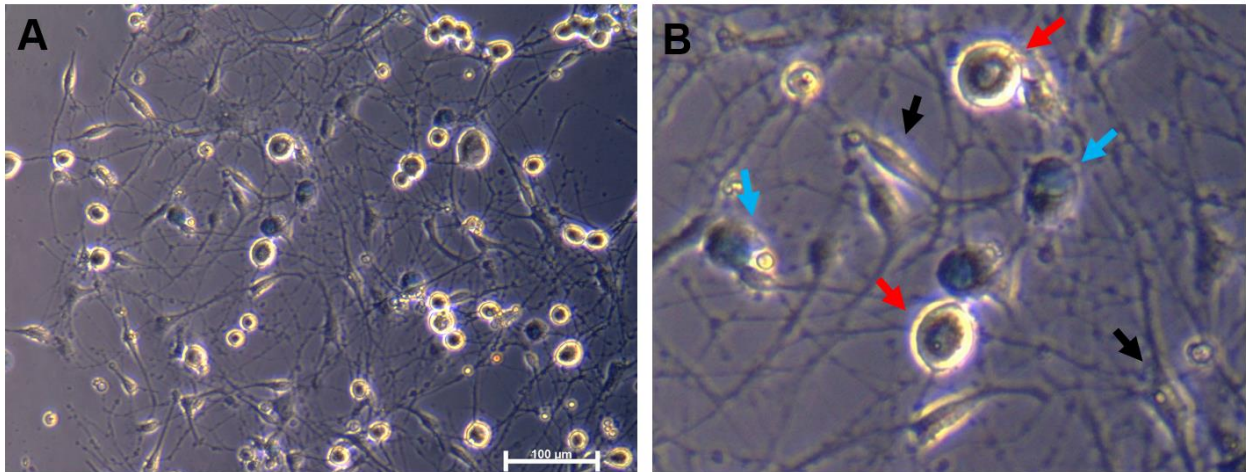


Figura 17. Cultura de neurônios após marcação com azul de tripan. (A) Visualização da cultura em objetiva de 20X após marcação. (B) Recorte em detalhe evidenciando as células não viáveis marcadas pelo azul de tripan (setas azuis), células viáveis (setas vermelhas) e fibroblastos (setas pretas).

4.5 Ensaio imunocitoquímico

Após a fixação, as lamínulas foram retiradas dos poços e submetidas a ensaio imunocitoquímico. As células foram bloqueadas por 1 hora em solução contendo 2% de gelatina da pele de peixe de água doce (G7041-Sigma), 5% de soro normal de cabra (PCN500-Life technologies) e 0,1% de triton x-100, diluídos em PSB 1X. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X por duas vezes e incubadas por 1 hora com anticorpo primário monoclonal anti-tubulina produzido em camundongo (T6793-Sigma), diluído na solução de bloqueio na concentração de 1:1000, seguido de duas lavagens consecutivas com PBS 1X. Posteriormente, incubou-se as células por 1h ao abrigo da luz com anticorpo secundário IgG Alexa Fluor 488 anti-camundongo produzido em cabra (A11001-Invitrogen) na concentração de 1:500. Novamente as lamínulas foram lavadas com PBS 1X por duas vezes, com uma última lavagem com água destilada por 5 minutos. Em seguida, as lamínulas foram montadas em lâminas com meio de montagem

Fluoromount-G contendo DAPI (00-4959-52-Invitrogen). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus-BX60) para a captura das imagens dos neurônios individualizados para posterior quantificação.

4.6 Quantificação das imagens e análise estatística

As imagens obtidas nos tratamentos da curva dose-resposta foram quantificadas quanto a complexidade da arborização neuronal e a distância neurítica máxima partindo do centro do corpo celular até o final do último prolongamento neurítico. Para isso utilizou-se o plugin Sholl Analysis do software ImageJ, por meio da binarização da imagem em cores preto e branco, de forma a pintar o neurônio na cor preta para que este pudesse ser analisado isoladamente sob um fundo branco de imagem. A distância neurítica foi mensurada através de projeção radial partindo do corpo celular para as bordas, detectando a presença de prolongamentos neuríticos a cada 10 μm até que não houvessem mais projeções em nenhuma direção (Figura 18). As médias de complexidade e distância neurítica dos resultados obtidos para o grupo controle foram utilizadas como referência de 100% na comparação com os diferentes grupos de colesteno.

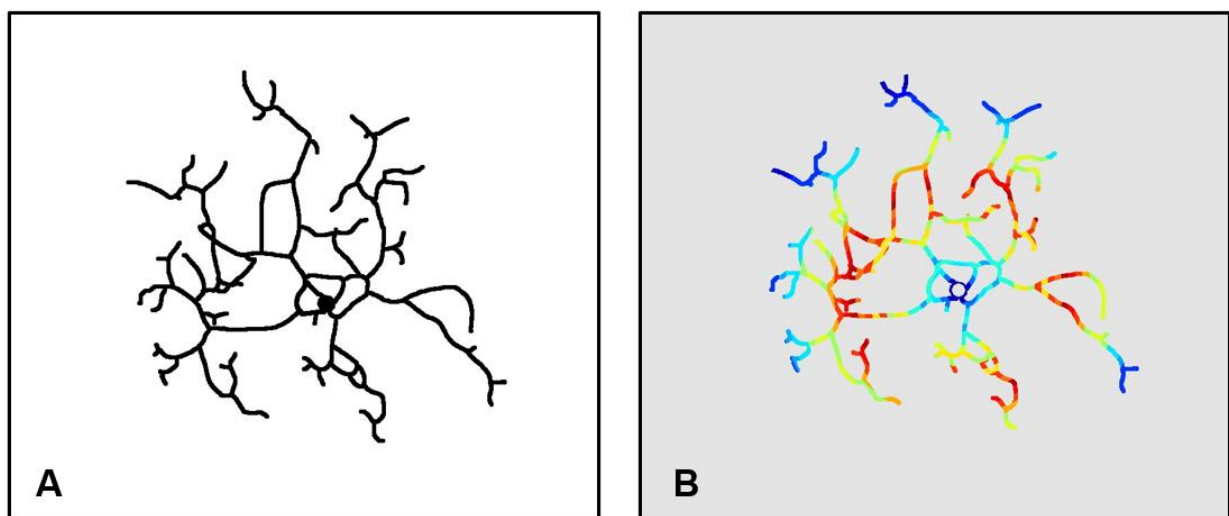


Figura 18. Análise de Sholl quanto a complexidade e distância neurítica. **(A)** Imagem gerada após binarização do neurônio. **(B)** Imagem representativa da projeção radial do neurônio.

A análise estatística foi realizada por meio do programa Graph Pad Prism versão 7.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, Califórnia, USA). Os resultados foram expressos em média seguido de erro padrão da média (SE). Para a comparação entre grupos, foi utilizado o teste t-student, e o um intervalo de confiança de 95% ($P < 0,05$).

4.7 Exposição do *M. leprae* em células SK-N-AS (ATCC-2137)

As células SK-N-AS constituem uma linhagem de neuroblastoma humano, a qual foi adquirida do banco de células americano ATCC (do inglês “American Type Culture Collection”) pela Dr. Myrna Cristina Bonaldo, chefe do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). As células foram cultivadas em garrafas de cultura (K11-2250 – Kasvi) com meio DMEM/F12 (10565-018 Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino. Após 5 - 6 dias de cultura, as células foram repicadas e plaqueadas em placa de 6 poços (K12-006 - Kasvi) na quantidade de 300 mil por poço. Após 24h, a exposição à bactéria foi realizada.

Para realizar a exposição das células ao *M. leprae* morto, foi utilizada suspensão de bactérias da cepa Thai-1 fornecida pelo professor Dr. Flávio Lara da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil. Tal suspensão foi previamente purificada conforme descrito em Medeiros *et al.* (2016).

As bactérias foram alíquotadas nas respectivas MOIs de 1:1, 1:10 e 1:50. As alíquotas foram ressuspendidas em DPBS 1X estéril (14190-136 - Gibco) e centrifugadas a 14 mil rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi solubilizado em 100 μ l de diluente C para marcação geral de membrana (CGLDIL – Sigma) contendo 1 μ l de PKH67 green (kit - MIDI67) por 15 minutos para realizar a coloração do *M. leprae*. Posteriormente, 400 μ l de soro fetal bovino foram adicionados e as células levadas a centrifugação nas mesmas condições descritas. Adaptado de Mietto *et al.* (2020).

O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio de cultura descrito anteriormente, seguido de sua aplicação nos diferentes poços contendo as células SK-N-AS, de acordo com a respectiva MOI. Após 24h, o meio foi descartado e as células foram lavadas com DPBS estéril e tripsinizadas na concentração de 0,125% por 2 a 4 minutos, seguido da adição de meio DMEM/F12 contendo soro fetal bovino para

bloqueio da tripsina. Cada poço foi transferido para um eppendorf e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em paraformaldeído a 2%, com posterior análise em citometria de fluxo (citômetro FacsCanto II – software FacsDiva) na configuração de 5 mil eventos por amostra. Os gráficos foram analisados pelo programa FlowJo versão 10 e a análise estatística feita pelo Graph Pad Prism versão 8.0.

4.8 Avaliação da viabilidade celular em células SK-N-AS: marcação para anexina V, iodeto de propídeo e TMRE

Para investigar a viabilidade de células SK-N-A-S, foi realizado ensaio de marcação para Anexina V - FITC (BD Pharmingen 51-65874X) e Iodeto de Propídeo (PI) (BD Pharmingen 51-66211E) de acordo com o recomendado pelo fabricante em seu kit (556547 – BD Biosciences), objetivando analisar a ocorrência de células apoptóticas e/ou necróticas. Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o éster etílico de tetrametil-rodamina (TMRE) (Sigma 879117), de acordo com as instruções do fabricante.

As células foram plaqueadas na quantidade de 250 a 300 mil por poço, em placas de 6 poços, contendo o meio de cultura descrito anteriormente. Após 24h do plaqueamento, as células foram estimuladas com colesteno na concentração final de 5 μ M por 24h. Em seguida, com exceção dos poços destinados ao ensaio de TMRE, o sobrenadante de cada poço foi recolhido e transferido para seus respectivos tubos falcon, de forma a evitar o descarte das células mortas que estariam suspensas nos poços. Os poços foram lavados com 1 ml de PBS 1X, sendo este volume também recolhido junto aos respectivos tubos falcon para manter as possíveis células mortas flutuantes. Posteriormente, para ambos os ensaios, as células foram tripsinizadas a 0,125% e incubadas de 2 a 5 min a 37°C, com posterior bloqueio da tripsina ao adicionar duas vezes mais o volume de meio completo presente no poço.

Os sobrenadantes com as células foram recolhidos aos seus respectivos tubos anteriores. Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos e tiveram seus sobrenadantes descartados. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1ml de

tampão HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (14025092 – Thermo Fisher) com glicose. Foi realizada a contagem das células de cada grupo em câmara de Neubauer e o volume referente a 4×10^5 células foi recolhido.

Após o processamento e incubação das células com os marcadores conforme recomendação do fabricante, completou-se as amostras para um volume final por tubo de 400 μ L, e realizou-se a leitura imediata em citometria de fluxo.

4.9 Microscopia eletrônica de transmissão das células SK-N-AS expostas ao *M. leprae*

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão, foram plaqueadas 30 mil células por poço em “chamber slides” (Thermo Scientific™ Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System – 154534). As células foram cultivadas nas mesmas condições de meio descritas anteriormente no item 4.7, sendo expostas a MOI 1:50 do *M. leprae* morto.

As amostras aderidas às lâminas (chamber slides) foram fixadas em solução fresca de aldeídos (1% paraformaldeído e 1% de glutaraldeído) por 1h, seguidas por duas lavagens com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme previamente em Melo *et al.* (2014). As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato, pH 7,4, por 10 min à temperatura ambiente e lavadas com o mesmo tampão. Em seguida, foram contrastadas *in bloc* em acetato de uranila 2% (EMS) por 2h novamente à temperatura ambiente, e lavadas no mesmo tampão de antes da desidratação em sequência graduada de álcoois e acetona. A infiltração e inclusão foi realizada em sequência de óxido de propileno-epon (Resina Eponato 12; Ted Pella, Redding, CA, EUA). Após polimerização a 60 °C por 16h, cortes ultrafinos foram realizados com navalhas de diamante em ultramicrotomo (Leica, Bannockburn, IL). As secções foram montadas em telinhas gradeadas de malha de cobre (Ted Pella) e contrastadas com citrato de chumbo. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-20-ThermoFischer Scientific/FEI, Eindhoven, Holanda) a 60–80 KV.

A análise das células foi realizada com o auxílio do software ImageJ, e utilizou-se o software Graph Pad Prism e teste t (Mann-Whitney test) para análise estatística.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva dose-resposta da colest-4-en-3-ona em neurônios do GRD

Com o objetivo de verificar o impacto da colestetona na arborização e crescimento neuronal, as células foram plaqueadas e, logo em seguida, receberam um pulso de colestenona (em diferentes concentrações, sendo 0,1, 1, 2,5 e 5 μM). Paralelamente, foram realizados cultivos de neurônios que foram submetidos ao estímulo do etanol (veículo da colestenona) ou apenas o meio controle, como parâmetros de comparação. As células de ambos os grupos foram fixadas após 24 horas *in vitro*.

Inicialmente, foi possível verificar relevante mudança na morfologia neuronal, que se mostrou mais evidente na concentração de 5 μM de colestenona. Neurônios do grupo controle se mostraram mais complexos quanto às suas ramificações (arborização) e prolongamento de neuritos, enquanto as células expostas à colestenona apresentaram prejuízo no seu desenvolvimento neuronal (Figura 19).

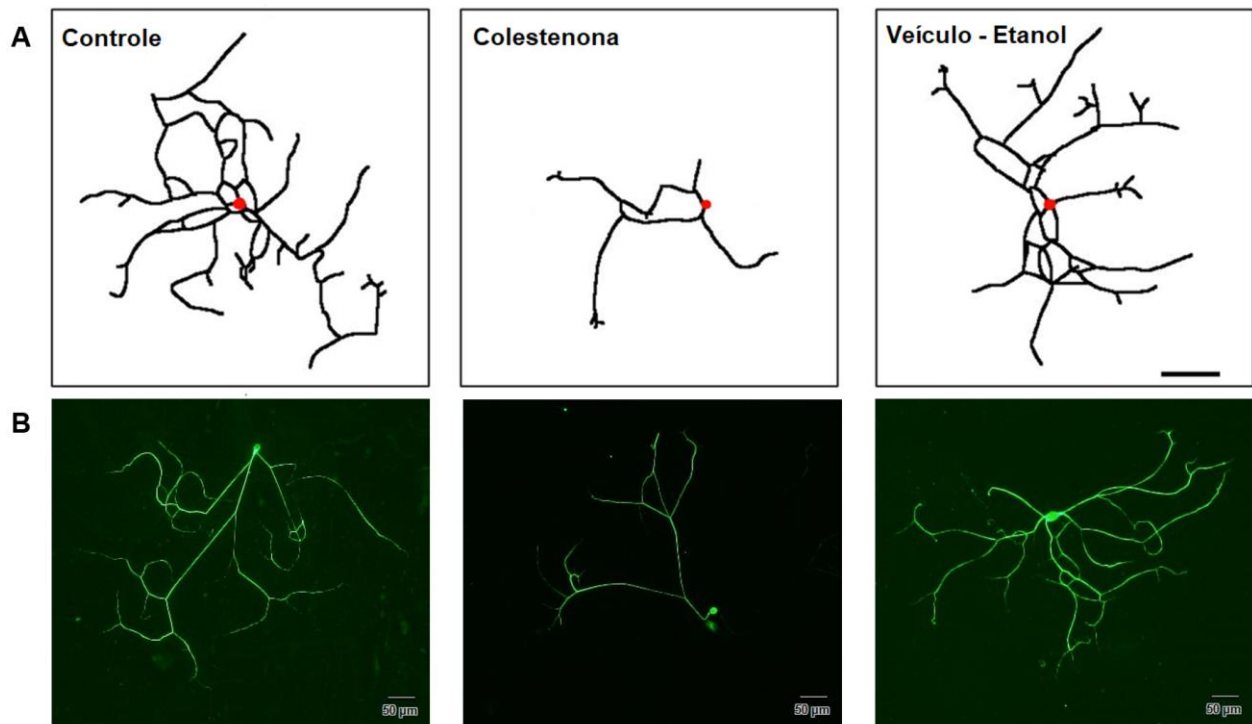


Figura 19. Morfologia neuronal após o tratamento com a colestenona. **(A)** Imagens após binarização no software ImageJ para posterior aplicação do método de Sholl e avaliação da morfologia neuronal. Representação das condições controle, colestenona 5 μM , e etanol, destacando o corpo celular em vermelho. **(B)** Imagens representativas da imunomarcação para tubulina evidenciando os prolongamentos dos neurônios nas condi es controle, colestenona 5 μM , e etanol.

Ao analisarmos a curva dose-resposta de colestenona nota-se um gradiente inibitório tanto na complexidade neuronal quanto no comprimento neur tico. Evidencia-se uma redu o decrescente que alcança aproximadamente 30% quanto a complexidade e 20% quanto ao comprimento, ambas na concentra o final de 5 μM (Figura 20). Tais resultados corroboram para uma interpreta o positiva quanto ao efeito do composto na saúde neuronal, expondo-o como um dos possíveis agentes desencadeadores do processo degenerativo causado pela entrada e permanência do *M. leprae* no nervo. Esse déficit na complexidade neuronal pode, por exemplo, estar relacionado a prejuízos nas vias citoesquel ticas envolvidas na forma o do cone de crescimento axonal, estrutura fundamental para o crescimento e proje o de neur tos (Gordon-Weeks, 1993; Tanaka; Ho; Kirschner, 1995).

Quando olhamos para as concentrações de 1 μM e 0,1 μM , não detectamos uma redução significativa nos quesitos analisados e dentro da janela temporal estudada (24 horas), o que pode sugerir uma possível formação de efeito tóxico acumulativo causado pela permanência do patógeno no microambiente neural, onde o bacilo produziria colesteno de forma contínua e duradoura, até que esta atingisse níveis críticos que contribuiriam para o disparo do processo degenerativo. Dessa forma, estudos que mimetizem a produção contínua de colesteno pelo bacilo podem clarificar o efeito crônico da exposição a esse componente.

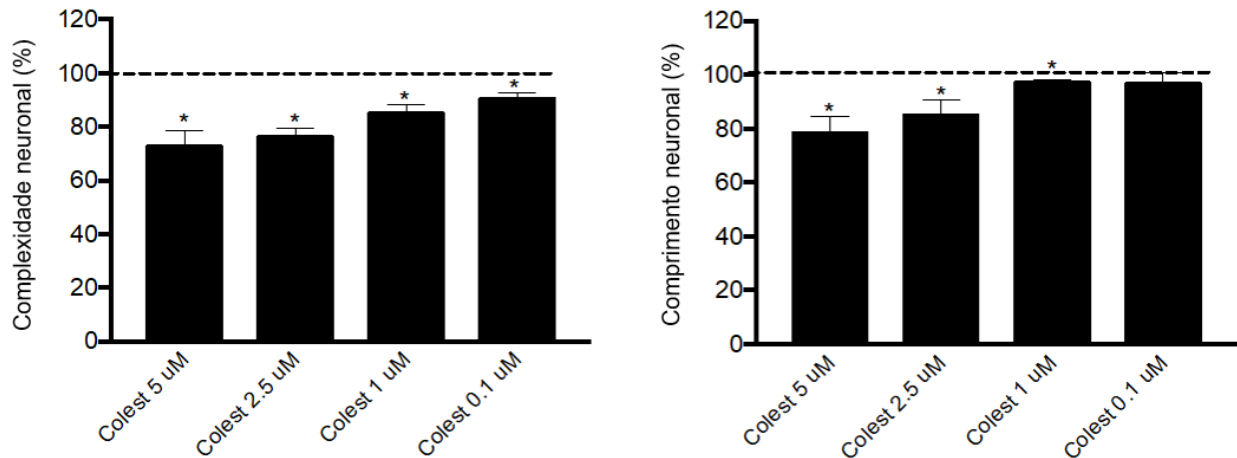


Figura 20. Curva dose-resposta da colesteno no comportamento neuronal. À esquerda, gráfico representativo do efeito do composto em relação a complexidade neuronal (arborização), e à direita, gráfico representativo do efeito sob o comprimento neuronal. Resultados de quatro experimentos independentes para cada concentração. O controle é representado pelas linhas tracejadas, de modo a fornecer comparação base de 100% de cada fator analisado. Foi aplicado o test T para comparação dos dados. *P < 0,05 (Mann-Whitney test).

5.2 Efeito degenerativo da colest-4-en-3-ona em neurônios

No ensaio anterior, nós observamos que a colesteno foi capaz de afetar a expansão e arborização dos neurônios. Dessa forma, nosso próximo objetivo foi entender se a colesteno seria também capaz de induzir a degeneração dos neuritos, após estes já estarem desenvolvidos. Para tanto, utilizamos o cultivo de neurônios E13.5, que

permite vasta expansão e ramificação *in vitro*. As células foram mantidas em cultura por 5 a 7 dias, para obter confluência neurítica robusta que permitisse a criação de um modelo de estudo para a avaliação da colestenoa (e possivelmente outros compostos) sobre a degeneração axonal *in vitro*.

Neste modelo, diversos testes foram feitos para padronizar cada etapa, incluindo a forma de dissecação e dissociação dos neurônios, a composição e concentração da matriz de cobertura da placa de cultura, os componentes e concentrações ideais do meio e, por fim, a metodologia e estratégia para fotografar um mesmo campo visual ao longo de dias. Após intensa investigação, os resultados obtidos sugerem o possível efeito degenerativo por parte da colestenoa ao longo dos dias. Esse efeito parece se apresentar mais visível após 72h, o que poderia apontar para uma ação deletéria crônica, dependente de subsequentes estímulos dessa substância (Figura 21). Tal achado se relaciona com a literatura de forma a corroborar para a já estabelecida cronicidade da doença, a qual se manifesta cada vez mais destrutiva ao sistema periférico ao longo do tempo (Antunes *et al.*, 2012; 2019). Dessa maneira, a colestenoa poderia ser um dos fatores desta trama degenerativa, desempenhando papel aditivo no processo inflamatório e progressivo da doença.

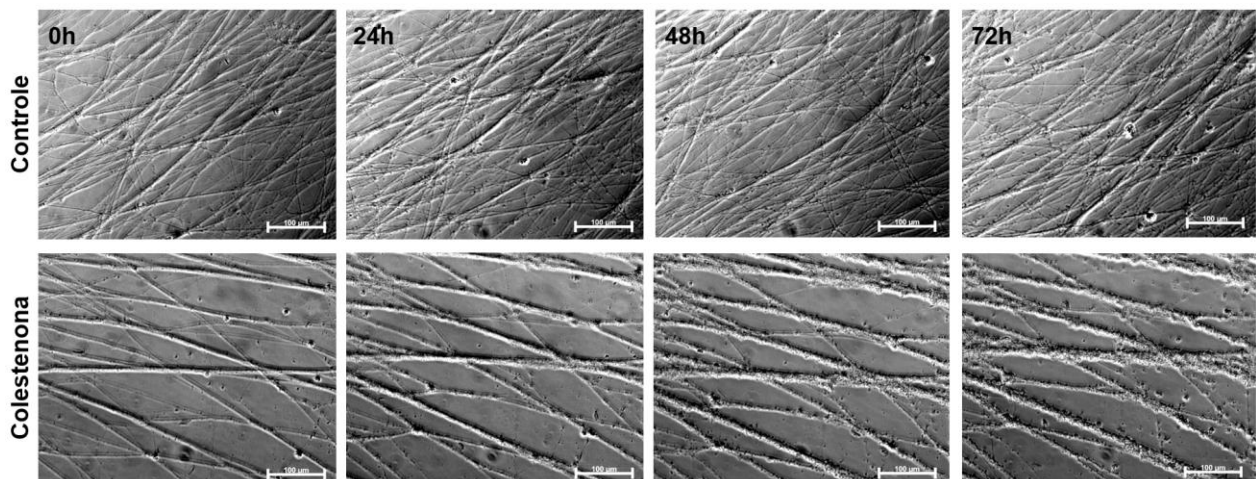


Figura 21. Avaliação do potencial degenerativo da colestenoa. Na linha de cima, sequência de imagens da cultura de neurônios embrionários após 7 dias de crescimento estimulados com o controle veículo (etanol) ao longo de 72h. Na linha de baixo, sequência de imagens da cultura estimulada com colestenoa 5 µM. Imagens fotografadas em campo claro na objetiva de 20X, função black-white. Barras de escala: 100 µm.

A toxicidade cumulativa de compostos liberados por células de Schwann em modelos de neuropatia periférica tem sido investigada, e a exposição crônica de neurônios do GRD a um determinado composto tóxico promoveu a degeneração axonal ao longo do tempo (Viader *at al.*, 2013). A visualização desse efeito pode ser vista de forma progressiva após a aplicação repetida de compostos químicos na cultura neuronal ao longo de dias (Shin; Cho, 2020; Viader *at al.*, 2013). O efeito a longo prazo da exposição crônica das células neuronais a um agente deletério é provavelmente o cenário mais plausível em uma situação *in vivo*. Desse modo, o acúmulo de colesteno produzida pelo *M. leprae* no microambiente neural poderia ser um dos fatores a contribuir para a degeneração axonal, ou a piora desta, durante a progressão da doença.

Embora seja possível notar visualmente certo efeito do composto na dinâmica neuronal, não foi possível estabelecer réplicas amostrais confiáveis que permitissem posterior quantificação e análise estatística até o momento. Logo, ainda se faz necessária a realização de novos ensaios, assim como a quantificação por meio da análise de software, para detecção do real grau de degeneração.

5.3 Efeito da colest-4-en-3-ona sobre a viabilidade de neurônios primários

Visando explorar novas vias de investigação dos efeitos da colesteno em neurônios primários, avaliou-se o efeito deste composto na viabilidade dos neurônios do GRD. Os resultados obtidos indicam tímida diferença no percentual de morte celular entre grupos teste e controle veículo, após 24h de estímulo. A colesteno foi responsável por uma taxa média percentual de aproximadamente 7% de células mortas (Figura 22). Mesmo ao considerarmos o percentual sobre o total de células analisadas em todos os ensaios, encontramos uma taxa abaixo de 10%. Essa diferença se sobressai quando estendemos o tempo de incubação a 48h, acompanhado de um novo pulso de colesteno após 24 horas, obtendo-se aproximadamente 13% de morte celular. No entanto, o controle se mantém praticamente estável variando de aproximadamente 5% de morte em 24h a 7% em 48h. Apesar da taxa de morte dobrar após 48 horas de

exposição, os efeitos da colestenona sobre a viabilidade de neurônios primários aparentam se manifestar de forma lenta e cumulativa.

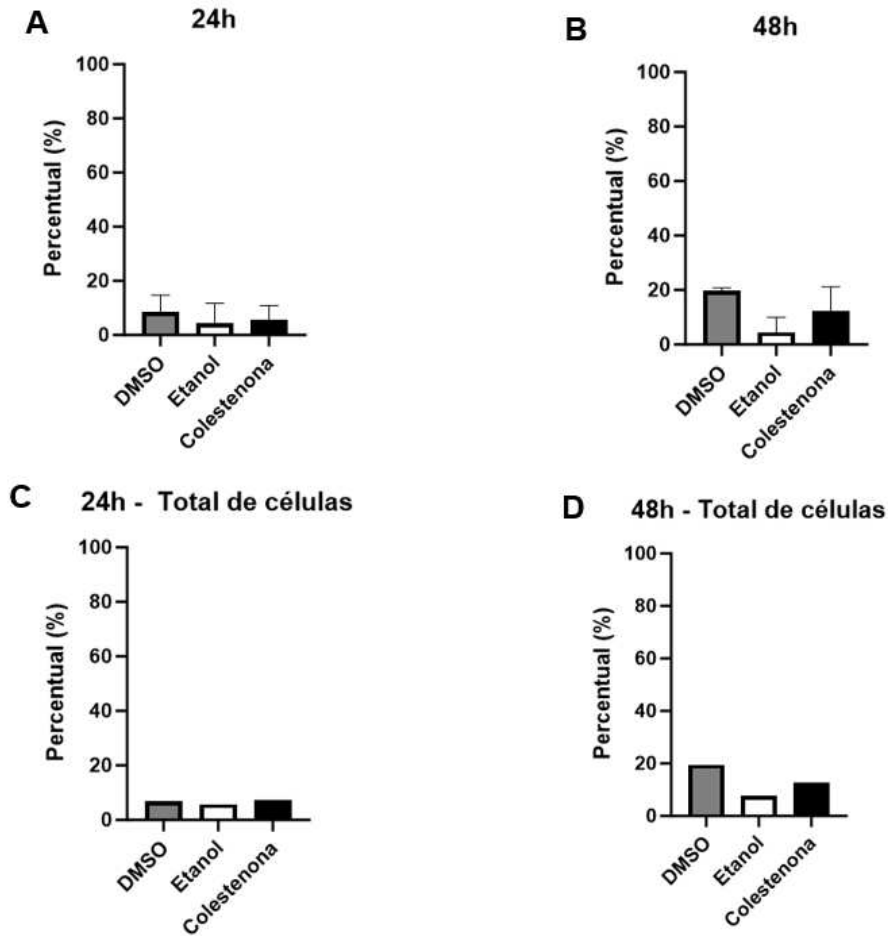


Figura 22. Efeito da colestenona na viabilidade de neurônios. Imagens A e B representam a taxa de células não viáveis após 24h e 48h de estímulo comparadas entre cada evento amostral. Imagens C e D representam a taxa total de células não viáveis em relação ao total de células analisadas de todos os eventos amostrais. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Embora não haja estudos avaliando o efeito direto da colestenona na viabilidade celular, há evidências de que o composto seja altamente móvel na membrana plasmática, afetando consideravelmente sua organização, e sua persistência na membrana parece causar defeitos celulares funcionais como perturbações na mobilidade celular (Neuvonen *et al.*, 2014).

Nesse sentido, ainda que nossos resultados não demonstrem significativa diferença estatística, esses achados podem novamente corroborar para um efeito a longo prazo. O acúmulo e persistência da colestenoína em nervos poderia contribuir para diferentes alterações funcionais dos neurônios, as quais se manifestariam progressivamente, promovendo o comprometimento neuronal na patologia da hanseníase.

5.4 Internalização do *M. leprae* morto em células SK-N-AS

Enquanto se conhece a capacidade do *M. leprae* de infectar diferentes células, como macrófagos e células de Schwann, pouco se sabe a respeito da capacidade da internalização da bactéria em neurônios humanos. Ainda, de fato, pouco se entende sobre a interação direta desse patógeno nos neurônios, apesar das células neuronais sofrerem diretamente as consequências da entrada e persistência do bacilo no ambiente neural (Girardi *et al.*, 2023; Mietto *et al.*, 2016; 2020; 2021). Tal lacuna permite o questionamento dos diversos fatores que poderiam reger essa interação. Uma questão ainda não respondida repousa no questionamento da capacidade do *M. leprae* de ser ou não internalizado por neurônios. Para tentar responder essa pergunta, buscamos verificar a internalização do patógeno por meio de ensaios com a linhagem neuronal SK-N-AS.

As células SK apresentam morfologia epitelial (Figura 23), são aderentes e apresentam alta taxa de multiplicação, o que facilita seu cultivo para diferentes ensaios nas áreas da imunologia e neurociências (ATCC, 2023). Neste trabalho, a linhagem se mostrou eficaz quanto a manipulação e cultivo para exposição ao bacilo.

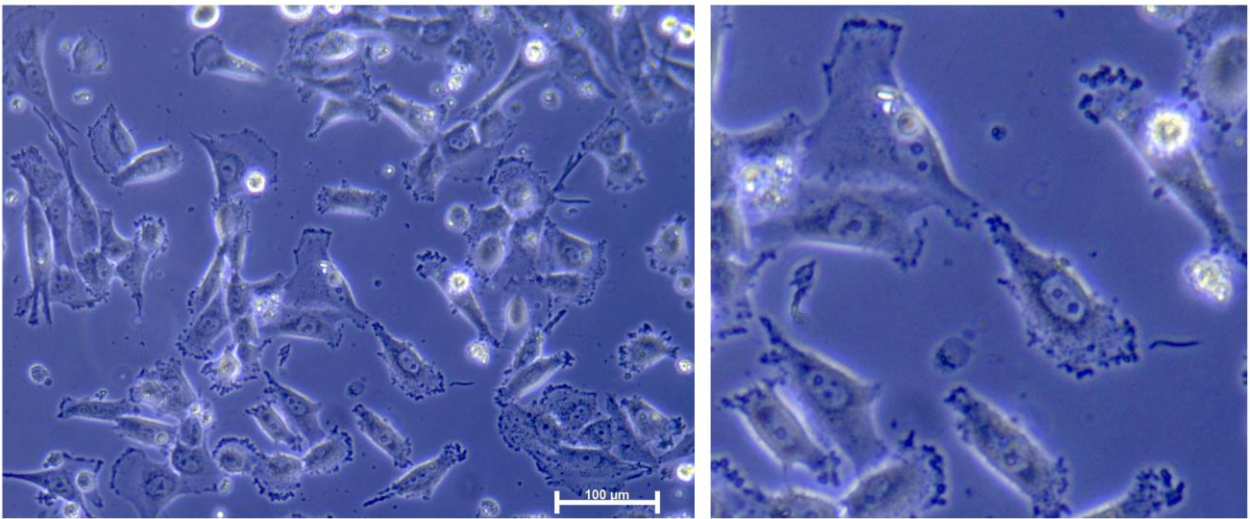


Figura 23. Morfologia das células SK-N-AS. Imagens da cultura de células fotografadas em campo claro. À esquerda, foto tirada sob a objetiva de 20x demonstrando a morfologia geral da cultura. À direita, ampliação da foto evidenciando a morfologia individual das células.

A internalização do bacilo morto se mostrou dependente das diferentes relações de MOI (multiplicidade de infecção), sendo aqui definida pela relação da quantidade de células cultivadas por bactérias adicionadas à cultura: representada por célula:bactéria (Figura 24). É possível observar uma curva crescente em relação a taxa de internalização e as diferentes concentrações de bactérias. Houve um aumento significativo na porcentagem de internalização nos grupos MOI 1:1, 1:10 e 1:50 em relação ao grupo não exposto (NE). Além disso, é possível notar que a relação 1:50 teve maior porcentagem de internalização em relação ao grupo 1:1. Nós confirmamos esses resultados ao analisarmos o gráfico de intensidade média de fluorescência (MFI), no qual demonstramos que o grupo MOI 1:50 apresentou maior MFI em relação aos demais grupos. Dessa forma, quanto maior a relação MOI, maior a proporção de bactérias no interior das células.

Quando analisada a MFI, percebemos um gradiente ainda mais incisivo, demonstrando que, quanto maior é a relação bactéria/célula, maior é a intensidade de fluorescência detectada na amostra, indicando que não só há internalização celular como há também maior proporção de bactérias em uma mesma célula. Ambos os dados convergem para o estabelecimento da internalização do *M. leprae* nas células SK-N-AS. Estes resultados sugerem que o patógeno pode infectar neurônios saudáveis, ao passo

que a linhagem celular utilizada neste trabalho é de neuroblastoma, a qual de fato compartilha semelhante carga genética das células neuronais.

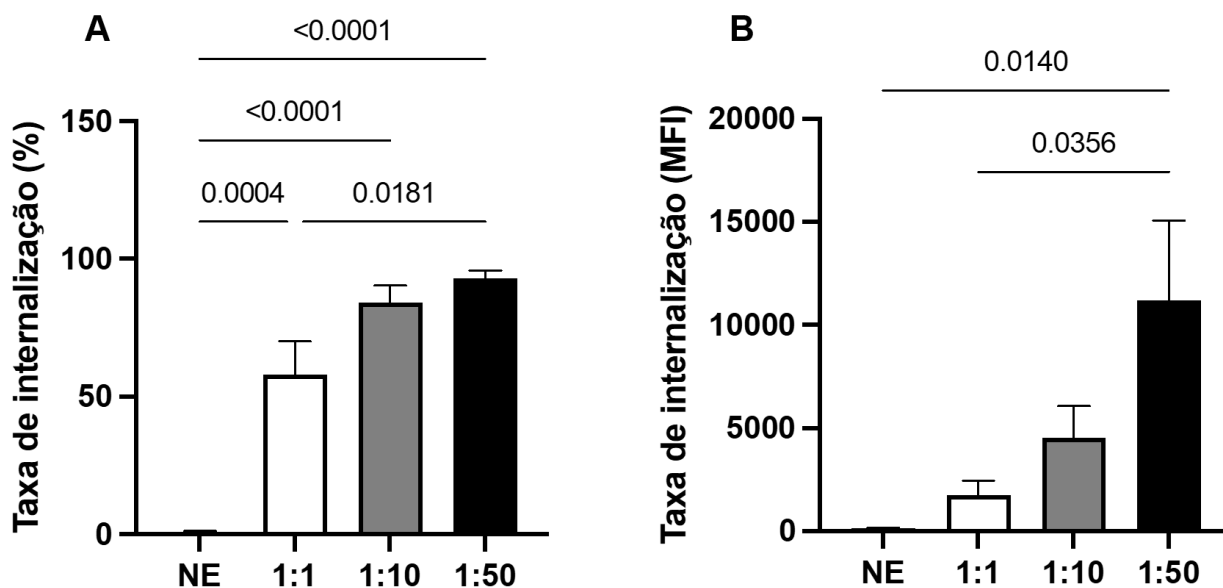


Figura 24. Taxa de internalização do *M. leprae* em células SK-N-AS. (A) Gráfico representando a taxa de internalização bacteriana em porcentagem de eventos positivos. (B) Taxa de internalização mensurada através da média da intensidade de fluorescência (MFI). NE representa o controle não exposto à bactéria. As barras representam média \pm erro padrão da média de 4 experimentos independentes. Foram aplicados os testes de Tukey e ANOVA, e considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Para a determinação da amostra populacional utilizada, foi feito a delimitação do reconhecimento das células por tamanho e granulosidade (estratégia de *gate*), com subsequente exclusão de células agrupadas (*doublets*), e posterior determinação da área do histograma a ser analisada, após desconsiderada a auto-fluorescência do controle não exposto (Figura 25).

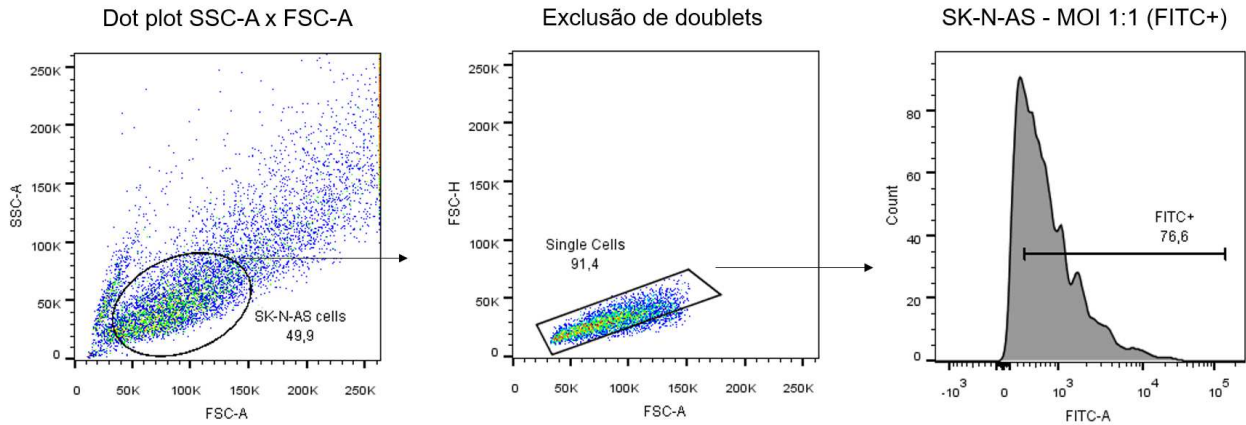


Figura 25. Estratégia de *gate* utilizada na análise de citometria de fluxo. Sequência utilizada para delimitação da amostra populacional a ser utilizada na quantificação por citometria. Da esquerda para direita temos a delimitação da relação tamanho x granulosidade considerada das células (SSC-A x FSC-A); a exclusão de células agrupadas (doublets) buscando a delimitação de uma amostra com células individualizadas; a determinação da área do histograma a ser considerada para análise da fluorescência (FITC+), no exemplo em questão temos uma amostra de MOI 1:1.

Ao olharmos a sobreposição dos histogramas fica evidente o aumento da intensidade de fluorescência de acordo com o aumento da MOI (Figura 26). O deslocamento gráfico gradativo para a direita reforça a curva crescente de internalização vista nos gráficos anteriores, demonstrada aqui tanto pela positividade dos eventos quanto pela intensidade fluorescente destes.

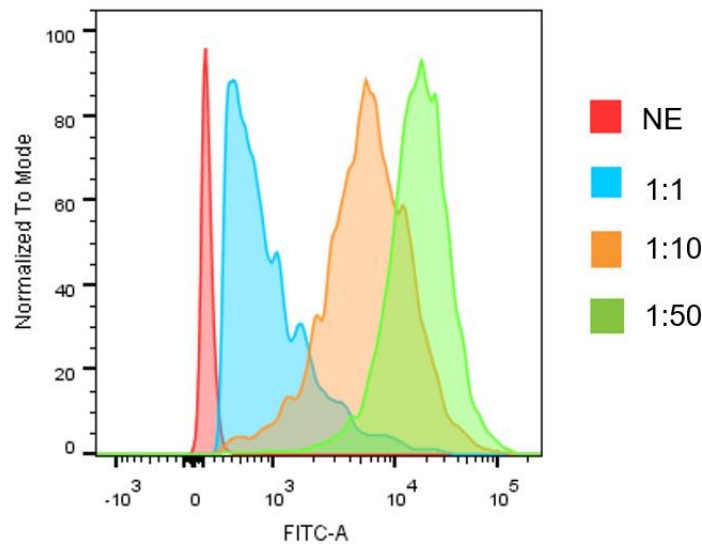


Figura 26. Histogramas sobrepostos. Sobreposição representativa dos histogramas gerados em um dos eventos amostrais analisados. O deslocamento gradativo dos gráficos reforça o aumento da intensidade da internalização sob as diferentes concentrações de bactéria (MOI 1:1; 1:10; 1:50).

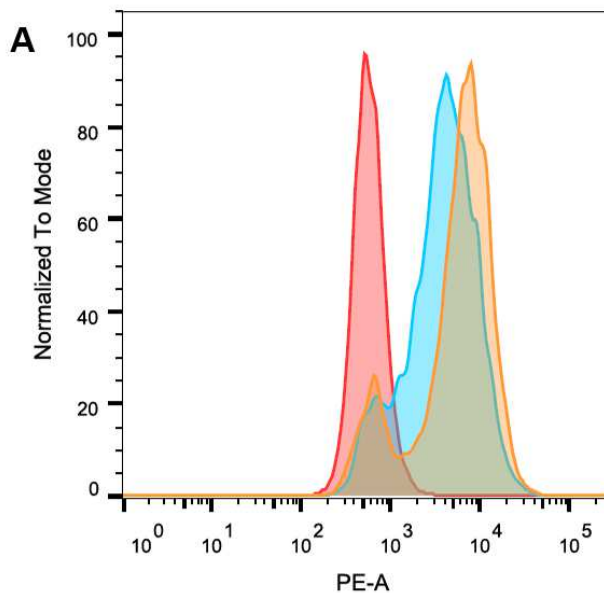
5.5 Efeito da colest-4-en-3-ona sobre a viabilidade das células SK-N-AS.

Após verificarmos os efeitos da colestenoa em neurônios do GRD, restou-se o questionamento sobre o possível efeito do composto nas células SK. Visando expandir nossa investigação, avaliamos o efeito da colestenoa quanto a viabilidade celular e atividade mitocondrial nessa linhagem neuronal.

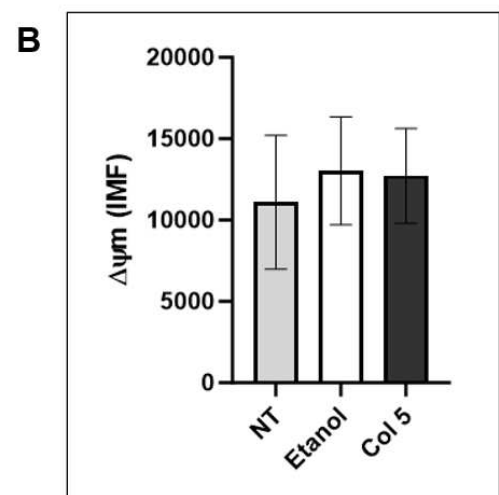
O ensaio de TMRE visa quantificar o potencial de membrana mitocondrial das células. É um fluoróforo catiônico permeável que se acumula no interior de mitocôndrias ativas, uma vez que estas apresentam potencial de membrana interno negativo (mitocôndrias polarizadas). Mitocôndrias inativas ou despolarizadas apresentam menor potencial de membrana, não permitindo ligação satisfatória do TMRE, o que diminui sua fluorescência emitida (Barteneva *et al.*, 2014; Crowley; Christensen; Waterhouse, 2019). Ao considerarmos o papel direto que as mitocôndrias desempenham na regulação e desencadeamento da morte celular por apoptose, e que o evento de permeabilização da membrana externa mitocondrial, presente na cascata de sinalização da via intrínseca apoptótica, é indispensável para esse processo (Haas, 2019), podemos inferir que

alterações ou perdas do potencial de membrana dessa organela sugerem consideravelmente a existência de processo de morte celular em andamento (Crowley; Christensen; Waterhouse, 2019; Rosa, 2021). Desse modo, ao analisarmos o ensaio de TMRE por citometria de fluxo é possível apontar, através da variação da intensidade de sua fluorescência, se a colestenona pode levar a alterações no metabolismo oxidativo que promovam o desencadeamento de morte celular.

Os resultados obtidos no experimento em questão demonstram não haver diferenças significativas na fluorescência entre os grupos analisados, sugerindo que o composto avaliado não desempenha papel determinante na disfunção mitocondrial (Figura 27). No entanto, esses dados refletem efeitos de uma exposição de 24h ao composto, permitindo-se a indagação de seu efeito cumulativo ao longo do tempo nas células. Diversas substâncias tóxicas produzidas por patógenos manifestam seus efeitos deletérios em culturas celulares após longos períodos de exposição, evidenciando seu caráter prejudicial através de seu acúmulo e sobrecarga ao metabolismo celular (Viader *et al.*, 2013).



	Sample Name	Subset Name	Count
Orange	Specimen_001_Col 5 + TMRE.fcs	Single Cells	4690
Cyan	Specimen_001_Etanol + TMRE.fcs	Single Cells	4662
Red	Specimen_001_NT + TMRE.fcs	Single Cells	4744



COL = Colestenona.
Etanol = Controle etanol.
NT = Não tratado.

Figura 27. Efeito da colestenona no potencial de membrana mitocondrial das células SK-N-AS. **(A)** Histograma representativo da intensidade de fluorescência; a sobreposição sugere diferenças não significativas entre controle e teste. **(B)** Gráfico representativo da intensidade de fluorescência. Não houve diferença estatística significativa entre controle e teste. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

Excepcionalmente, também foi realizado um ensaio único com as mesmas concentrações de colestenona utilizadas na curva dose-resposta de neurônios primários, a fim de especular um possível efeito dose-dependente do composto no metabolismo oxidativo. Porém, em consonância com o experimento anterior, novamente não foi identificado diferenças significativas, o que fica evidente pela sobreposição dos histogramas das diferentes concentrações analisadas (Figura 28).

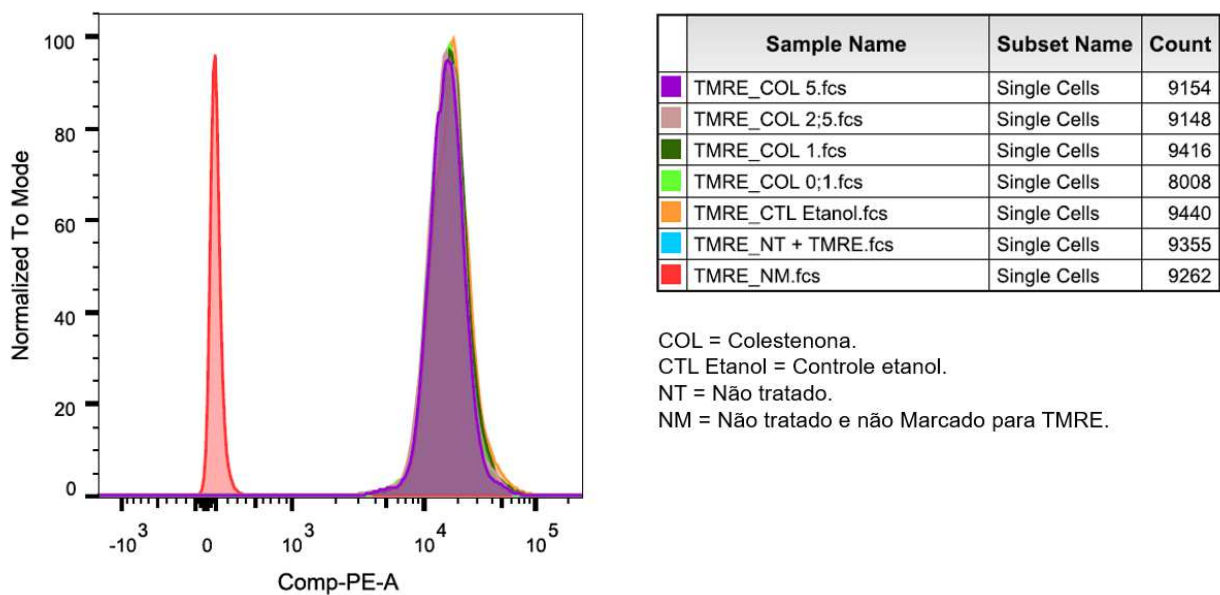


Figura 28. Efeito das diferentes concentrações de colestenona no potencial de membrana mitocondrial das células SK-N-AS. Concentrações de 5 μM , 2,5 μM , 1 μM e 0,1 μM foram testadas. A sobreposição dos histogramas sugere não haver diferença significativa de efeito ao longo das concentrações.

A anexina V é uma proteína celular do grupo das anexinas, proteínas estruturalmente relacionadas que se ligam aos fosfolípidios (Oliani; Gil, 2006), frequentemente usada em ensaios de viabilidade celular para detectar células

apoptóticas, por sua capacidade de se ligar à fosfatidilserina, um fosfolípido presente na superfície interna da bicamada lipídica da membrana plasmática (Crowley *et al.*, 2016). Em estágios iniciais da apoptose, a membrana plasmática começa a se desorganizar, perdendo sua simetria, causando a translocação da fosfatidilserina para o folheto externo da membrana. O aparecimento desse lipídeo na superfície externa age como um marcador de apoptose, que sinaliza o estágio inicial desse processo, ao passo que a perda da integridade membranar acompanha os estágios finais da morte celular, seja por processo apoptótico ou necrótico (Vermes *et al.*, 1995). Dessa forma, a marcação de anexina é uma grande ferramenta para investigar células em estágio apoptótico inicial.

O iodeto de propídeo é utilizado para distinguir células apoptóticas de necróticas (Crowley *et al.*, 2016). É uma molécula capaz de se intercalar com o DNA, desde que haja permeabilidade na membrana celular, uma vez que seu tamanho molecular não permite sua passagem pela membrana intacta (Rieger *et al.*, 2011). Durante a apoptose, a membrana plasmática fica intacta ao longo da maior parte do processo, se desintegrando apenas nos estágios finais, enquanto na necrose, há perda de integridade membranar (Vermes *et al.*, 1995), o que permite a reação do iodeto de propídeo com o DNA nuclear. Assim, essa molécula é capaz de marcar células necróticas e em apoptose tardia, a qual quando conjugada ao ensaio de anexina, permite distinguir células viáveis e em processos de morte, compondo então um método satisfatório para este tipo de investigação.

Nos ensaios de apoptose e necrose realizados, também não foram encontradas diferenças significativas nas marcações para anexina V e iodeto de propídeo entre as células tratadas com colesteno e o controle veículo. Tais observações não permitem afirmar com precisão se o composto possui efeito significativo na indução de necrose ou apoptose das células SK-N-AS (Figura 29). É possível notar que a cultura celular apresenta por si só considerável percentual de células mortas, em torno de 50%, o que nos faz especular uma possível taxa de morte basal característica da cultura realizada. Além disso, o processo de tripsinização para posterior coragem e leitura por citometria, gera relevante estresse às células, podendo assim causar notável morte basal em culturas celulares. Uma significativa parte das células mortas foi detectada em processo apoptótico, o que poderia corroborar para a morte basal discutida acima, dado que o

estresse sofrido pelas células durante o processamento seria capaz de induzir o início do processo apoptótico. Apesar de não significativo, um tímido aumento de células apoptóticas é visto no grupo colesteno, podendo sugerir possível influência no estresse oxidativo com conseqüente apoptose. Todavia, esses dados também refletem uma curta exposição de 24h, falhando em explorar o efeito crônico que a substância possa ter sobre a cultura de células. Dessa forma, estudos sequenciais que explorem possíveis efeitos cumulativos da colesteno, assim como modificações em protocolo experimental que permitam a redução da morte basal, são necessários para determinar se esse composto de fato atua de forma sólida nas vias de morte celular.

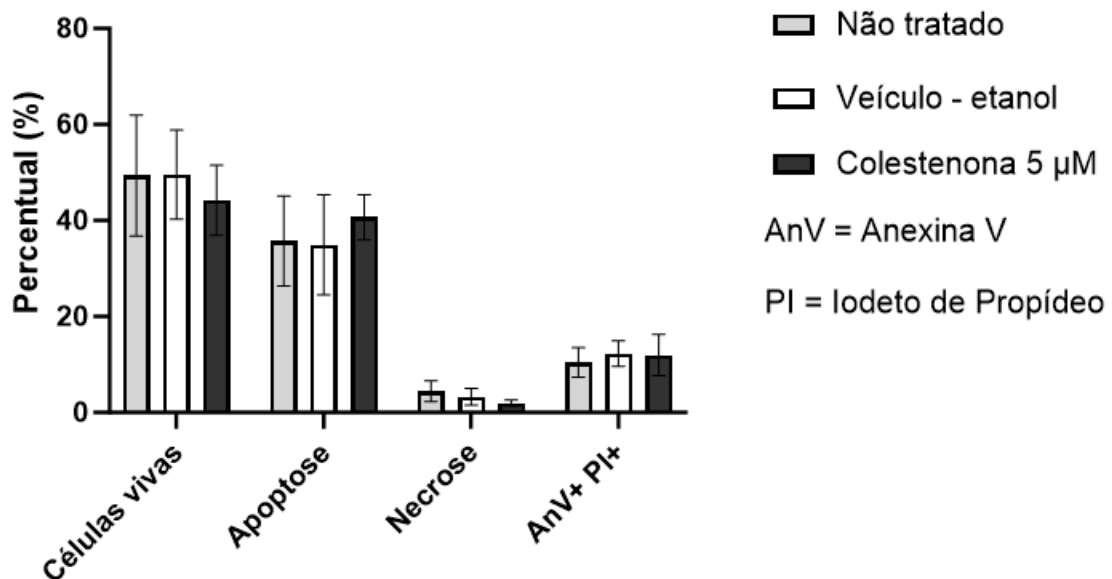


Figura 29. Efeito da colesteno na viabilidade das células SK-N-AS. Gráfico representativo da porcentagem de células apoptóticas (Anexina V) e necróticas (Iodeto de propídeo) após tratamento com a colesteno. Não houve diferença estatística significativa entre controle e teste. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5.6 Análise da internalização do *M. leprae* morto em células SK-N-AS por microscopia eletrônica de transmissão

Com o intuito de validar nossas análises sobre a internalização do *M. leprae* nas células SK, buscamos confirmar nossos achados por microscopia eletrônica de transmissão, a qual permite análises morfológicas e estruturais em escalas nanométricas que não são possíveis por microscopia óptica (Souza, 2007).

Até o momento, faltam estudos que evidenciem a infecção ou internalização do *M. leprae* em cultura celular de neurônios, sendo amplamente estudado a capacidade do bacilo ser fagocitado por células de Schwann, assim como as consequentes modificações que sua internalização gera na interação Schwann-axônio. A microscopia eletrônica de biópsias de pacientes e camundongos demonstram a presença de bacilos viáveis e não viáveis em fagossomos no interior de axônios mielínicos e amielínicos de nervos periféricos (Boddingius, 1974; Job e Verghese, 1974; Imaeda e Imaeda, 1986). No entanto, apenas uma pequena porcentagem de axônios infectados é encontrada nessas análises, tornando raro a infecção neuronal pelo patógeno (Hess e Rambukkana, 2019; Job e Verghese, 1974). Além disso, estudos a partir de autópsias de pacientes também evidenciam a presença de antígenos do *M. leprae* em neurônios do SNC, indicando a presença do patógeno para além dos nervos periféricos (Aung *et al.*, 2007; Garg *et al.*, 2023).

No presente ensaio foram avaliadas um total de 32 células mostrando todo o perfil celular, sendo 15 do grupo controle e 18 do grupo exposto ao bacilo. Pela primeira vez, foi possível confirmar a internalização do bacilo morto pela linhagem de células neuronais humana SK-N-AS (Figura 30F). Foram encontrados vacúolos fagocíticos contendo bactérias ou resto das células bacterianas no grupo exposto em uma proporção de 0,55 vacúolos por secção celular. Um percentual de 44,4% das células expostas apresentou esses vacúolos, os quais não foram observados no grupo controle. A internalização do bacilo corrobora com outros estudos realizados com outra espécie do gênero, o *Mycobacterium tuberculosis*, o qual foi capaz de ser internalizado por células neuronais tanto *in vivo* quanto *in vitro*, incluindo pela linhagem de células neuronais humana SK-N-SH (Randall *et al.*, 2014). A capacidade fagocítica de diferentes células neuronais *in vivo*

e *in vitro* já foi demonstrada, sugerindo que a fagocitose neuronal possa favorecer a progressão de doenças, assim como a morte dessas células (Bowen *et al.*, 2007). Dessa maneira, a internalização do *M. leprae* em neurônios pode demonstrar a importância dessas células como hospedeiras do bacilo na progressão da hanseníase, assim como estimular novas investigações sobre a interação patógeno-neurônio através de ensaios *in vitro*.

Além da internalização, um aumento significativo da vacuolização celular foi observado (Figura 30A-B-D). A vacuolização é um fenômeno morfológico bem conhecido observado em células de mamíferos após a exposição a patógenos bacterianos e virais, assim como diferentes compostos químicos, sendo frequentemente acompanhada de morte celular (Aki *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2020; Shubin *et al.*, 2016). Na maioria dos casos, sua formação se dá a partir de componentes do retículo endoplasmático ou organelas lisossomais e endossomais, e sua ocorrência está relacionada não só a morte celular, mas também a um aumento do potencial de sobrevivência (Shubin *et al.*, 2016).

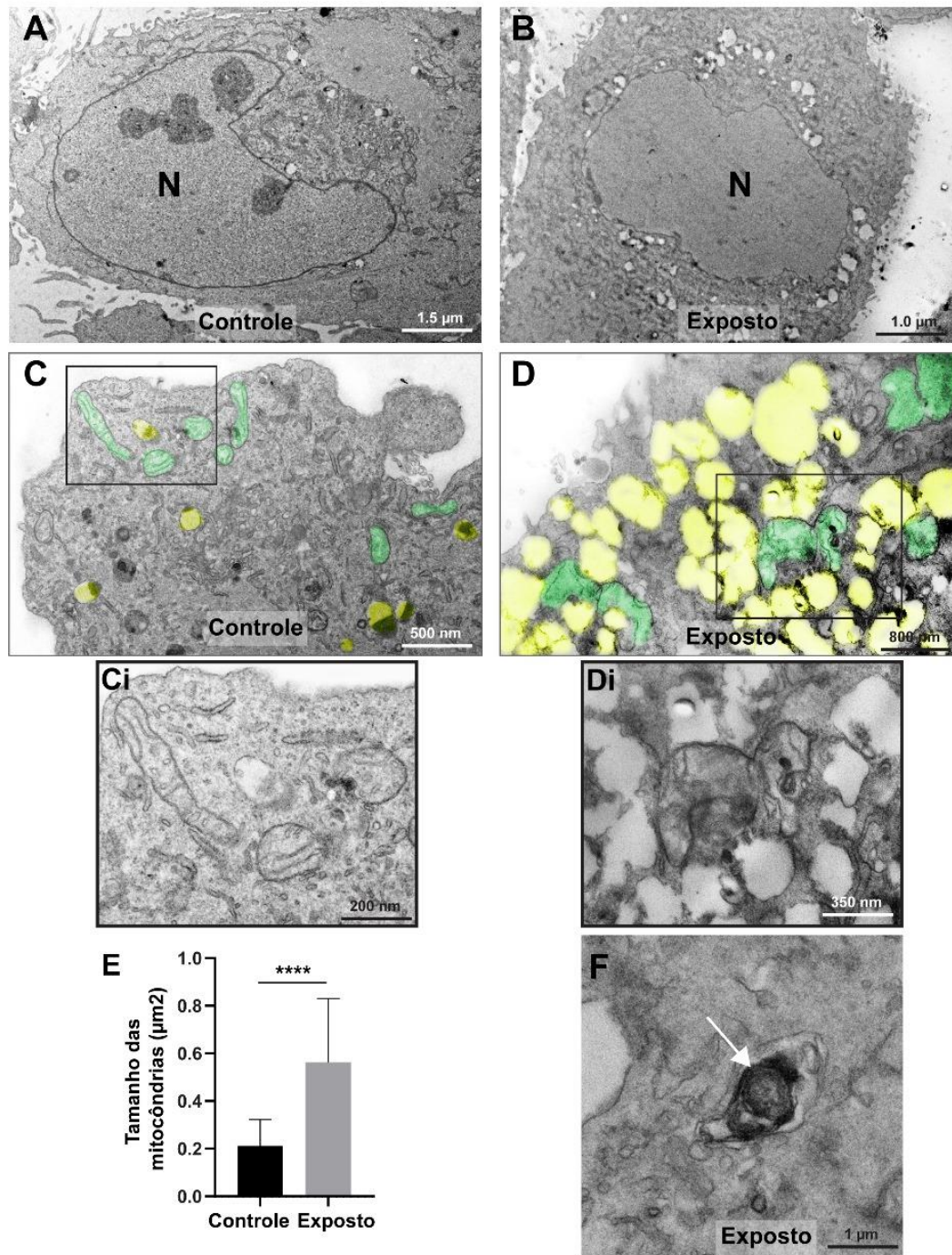


Figura 30. Micrografia eletrônica de transmissão das células SK-N-AS expostas ao *M. leprae*. (A) Célula controle evidenciando a delimitação do núcleo (N) e a presença de poucos vacúolos, representados por pequenos pontos brancos no interior da célula. (B) célula exposta ao bacilo evidenciando o aumento da vacuolização celular, principalmente na região ao redor do núcleo. (C) Recorte de uma célula controle evidenciando as mitocôndrias em verde e os vacúolos em

amarelo. (D) Recorte de uma célula exposta evidenciando a alta densidade de vacúolos e a alteração morfológica das mitocôndrias. (Ci – Di) Ampliação da área retangular delimitada nas imagens C e D apresentando em maior detalhe a vacuolização e morfologia das mitocôndrias. (E) Gráfico comparativo do tamanho das mitocôndrias encontradas no grupo controle e exposto. (F) Vacúolo fagocítico contendo a bactéria, ou restos bacterianos, no interior de uma célula exposta.

Apesar de não haver dados suficientes para apontar a vacuolização como um evento relacionado diretamente a morte, em alguns casos, a vacuolização do retículo endoplasmático pode ser causada por disfunção mitocondrial e depleção de ATP, as quais são causas de morte celular (Shubin *et al.*, 2016). Tal fato poderia reforçar os resultados obtidos, uma vez que as mitocôndrias do grupo exposto se mostraram especialmente alteradas em relação ao controle, apresentando diferentes alterações mitocondriais (Figuras 30C-D e 31). Um total de 228 mitocôndrias foi analisado, sendo 103 do grupo controle e 125 do grupo exposto. Diversas alterações mitocondriais foram observadas nas células expostas, como deformidades no formato mitocondrial, vacuolização mitocondrial, colapso e rarefação das cristas mitocondriais, obtendo-se um total de aproximadamente 80% de mitocôndrias danificadas (Figura 31). O tamanho dessas organelas também se mostrou bastante alterado, e, no grupo exposto, as mitocôndrias apresentaram um tamanho médio quase três vezes maior que o controle (Figura 30Ci-Di-E).

Mudanças na morfologia e remodelamento mitocondrial são coletivamente conhecidas como dinâmica mitocondrial (Pernas; Scorrano, 2016). Essa dinâmica está envolvida em diferentes funções celulares como diferenciação, produção de energia, morte celular e, mais recentemente, tem sido considerada um ponto crítico do controle da função de células imunes e da resposta imune de células hospedeiras frente a infecção bacteriana e viral (Cervantes-Silva; Cox; Curtis, 2021). A dinâmica mitocondrial é determinada pelo balanço de dois processos opostos, a fissão e fusão mitocondrial, e, quando esse equilíbrio é quebrado, a mitocôndria perde sua forma característica exibindo variações morfológicas (Zemirli; Morel; Molino, 2018). Nesse sentido, as variações observadas nos resultados podem refletir um desequilíbrio dessa dinâmica, dado que a

internalização do patógeno pode desencadear diferentes respostas celulares e imunológicas.

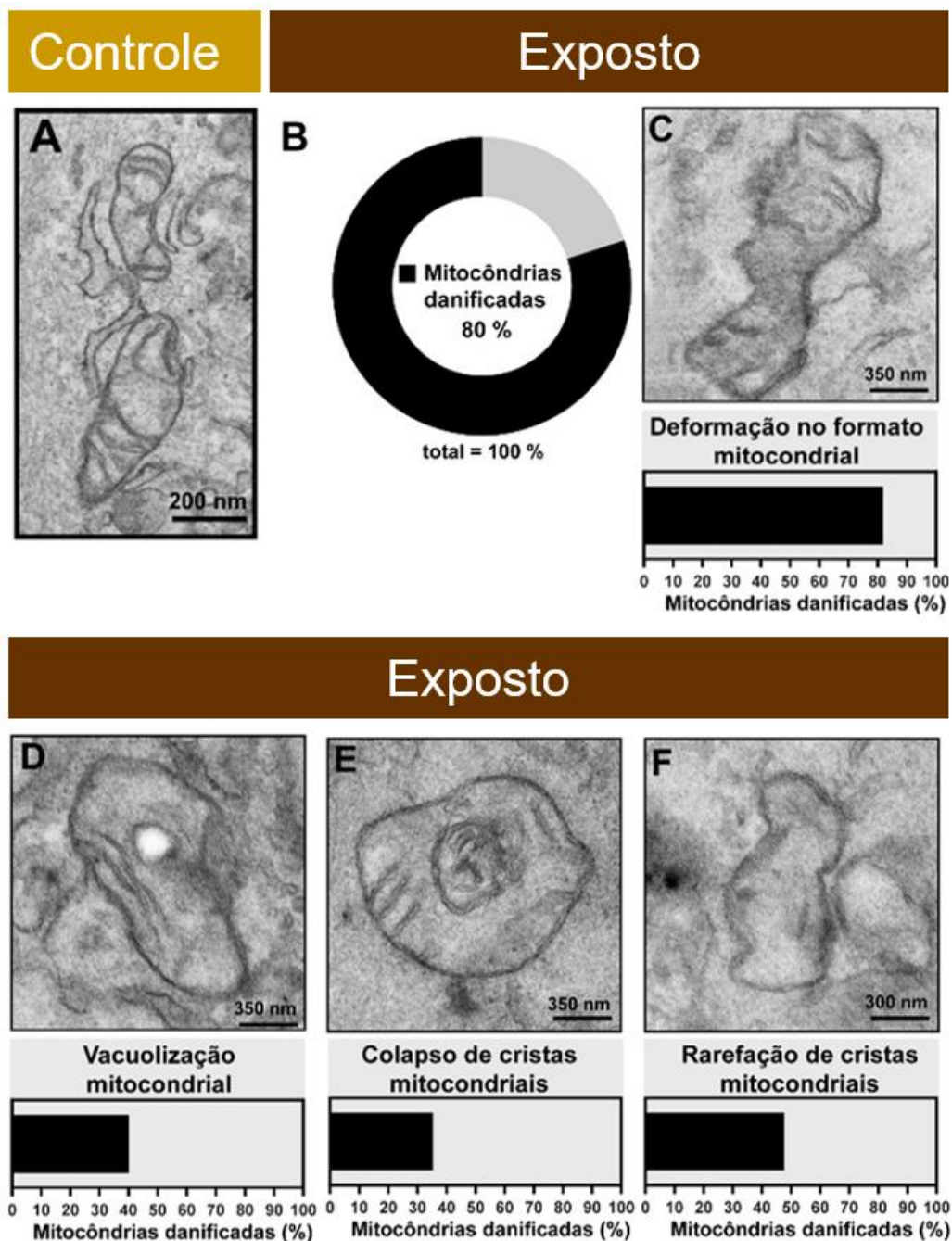


Figura 31. Morfologia mitocondrial das células SK-N-AS expostas ao *M. leprae*. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão evidenciando as diferentes alterações morfológicas encontradas nas mitocôndrias. É possível notar diferenças entre a morfologia dessas organelas nas células controle (A) em relação às células expostas. De todas as organelas analisadas, 80%

apresentaram alguma alteração morfológica (B), das quais podemos notar alterações de formato (C), presença de vacúolos (D), colapso de cristas (E) e a rarefação delas (F).

Estudos prévios reportaram um desligamento da mitocôndria em células de Schwann infectadas, assim como o inchaço de mitocôndrias de axônios mielinizados e não mielinizados de nervos hansênicos (Medeiros *et al.*, 2016). Essa regulação mitocondrial negativa tem sido vista como uma adaptação do *M. leprae* para reduzir o estresse oxidativo interno, uma vez que o patógeno reduz o potencial de membrana mitocondrial da célula hospedeira e evita a geração e emissão de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (Girardi *et al.*, 2023; Medeiros *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2021). Dessa maneira, o patógeno também subverteria a resposta imune hospedeira, prejudicando o desencadeamento da imunidade mitocondrial inata e consequentemente favorecendo sua sobrevivência e permanência na célula hospedeira (Oliveira *et al.*, 2021).

O inchaço mitocondrial representa um evento típico de células danificadas, relacionada ao aumento da permeabilidade mitocondrial, o qual pode levar a morte celular (Medeiros *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2021). Portanto, o aumento do tamanho das mitocôndrias encontrado nas células neuronais expostas ao bacilo poderia representar uma das primeiras alterações que resultaria na morte neuronal característica da hanseníase. Logo, enquanto o bacilo faz uso de diversos mecanismos para subverter o metabolismo da glicose nas células de Schwann em prol de sua sobrevivência (Medeiros *et al.*, 2016), refletindo assim uma possível adaptação evolutiva patógeno-hospedeiro, as alterações morfológicas mitocondriais vistas em neurônios poderiam representar efeitos paralelos à infecção do *M. leprae* em nervos. Alterações estas que refletiriam uma não adaptação evolutiva entre a bactéria e o neurônio que permitisse sua permanência sem causar a morte neuronal, fato que também justificaria a rara presença do *M. leprae* em axônios *in vivo*.

Por fim, se também considerarmos a origem bacteriana ancestral da mitocôndria, podemos esperar que o avanço do entendimento da relação *M. leprae*-organela revele novos alvos antibacterianos e imunomodulatórios, tornando as alterações mitocondriais possíveis focos de abordagem terapêutica no controle da infecção.

6 CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados, é possível concluir que a colesteno apresenta considerável toxicidade às células neuronais. A redução da complexidade de arborização neuronal assim como a redução do comprimento de seus neuritos, demonstram possível interferência metabólica nessas células. Vias envolvidas na formação do citoesqueleto, podem ser acometidas, uma vez que microtúbulos desempenham papel primordial na formação de cones de crescimento axonal. Ademais, o experimento piloto de degeneração corrobora para mais uma interferência na saúde neuronal que, a princípio, culmina na degeneração de neuritos ao longo do tempo. Todavia, os efeitos da colesteno sobre a viabilidade celular não foram significativos, tanto em neurônios do GRD quanto naqueles da linhagem SK, necessitando experimentos futuros que investiguem possíveis efeitos da exposição crônica dessas células ao composto.

Outrossim, nossos resultados revelam considerável internalização do patógeno nos neurônios SK, além de demonstrar diferentes alterações morfológicas nas mitocôndrias dessas células, sugerindo algumas das possíveis alterações iniciais que culminam na morte neuronal. Nesta perspectiva, uma nova seara de estudos se faz necessária, uma vez que pouco se tem investigado sobre a interação direta do bacilo e as células neuronais.

7 PERSPECTIVAS

A partir dos dados obtidos até o momento com o presente estudo, pretende-se:

Avaliar o potencial degenerativo da colestenona em neurônios;

Investigar o efeito da colestenona sobre o potencial regenerativo de neurônios;

Investigar possíveis alterações no cone de crescimento axonal causadas pela colestenona;

Investigar o efeito de longo prazo da colestenona em neurônios primários e nas células SK-N-AS.

8 ATIVIDADES COMPLEMENTARES

De forma complementar, nosso grupo tem trabalhado no desenvolvimento de um modelo alternativo de interação patógeno–nervo, através do cultivo do GRD explante associado ao seu segmento de nervo periférico (GRD-NP), uma vez que não há, até o momento, modelo animal que mimetize a neuropatia da hanseníase humana (Figura 32). Assim, buscamos compreender os eventos de degeneração nervosa induzidos pela infecção, através de um modelo que possibilite mimetizar as características do microambiente neural e que apresente todos os elementos celulares e estruturais do nervo periférico. Tal conquista nos capacitará aplicar testes não só com a colestenoa, mas também com diferentes drogas e fármacos promissores para ensaios clínicos prospectivos.

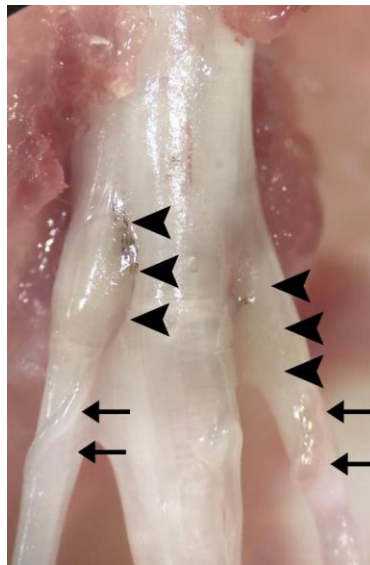


Figura 32. Descrição anatômica do modelo GRD-NP. Foto após dissecação da medula espinal de camundongo. As cabeças de seta apontam para o GRD, enquanto as setas denotam o nervo periférico.

Até o momento, temos realizado progresso na padronização do processo de dissecação e cultura do modelo GRD-NP, obtendo sucesso na sua manutenção, cultivo e entendimento de sua morfologia (Figura 33). De maneira preliminar, iniciamos alguns testes com o *M. leprae* morto para especular seus possíveis efeitos nesse modelo

experimental, de modo a avaliar seu impacto ao longo do tempo (Figura 34). A princípio, um possível efeito degenerativo foi detectado no modelo, após estímulo de 7 dias com a bactéria. Todavia, análises e observações mais detalhadas, assim como subsequentes ensaios, são necessários para discernir mais precisamente quanto desses danos são de fato causado pela presença do patógeno.

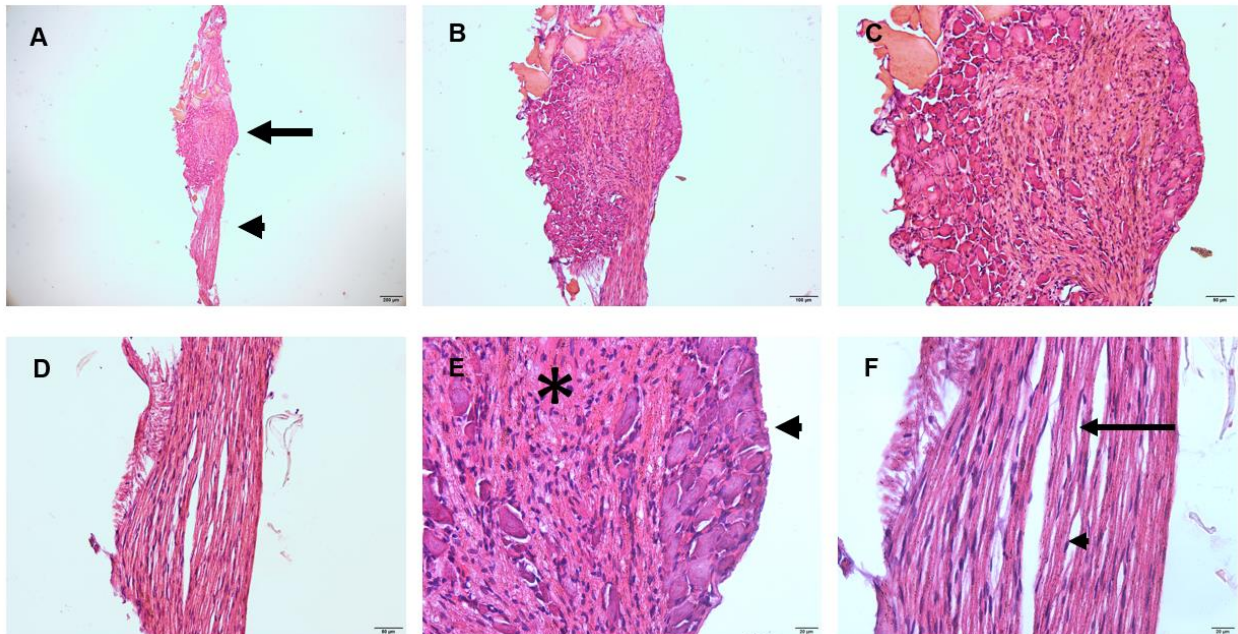


Figura 33. Lâmina histológica de GRD-NP com 0 dias de cultura. (A) GRD-NP sob objetiva de 4X; barra de escala: 200 μ m. Em evidência o gânglio (seta) e seu nervo periférico distal (cabeça de seta). (B)(C) Gânglio em evidência sob objetiva de 10X e 20X respectivamente; barras de escala: 100 e 50 μ m. (D) Nervo periférico em evidência sob objetiva de 20X; barra de escala: 50 μ m. (E) Gânglio sob o aumento de 40X permitindo a visualização das células neuronais (cabeça de seta) rodeadas por células satélites, e seu denso feixe axonal que se encaminha na direção distal (asterisco); barra de escala: 20 μ m. (F) Nervo periférico sob objetiva de 40X permitindo a visualização do feixe axonal, incluindo a individualização de axônios (seta) e as células de Schwann que os acompanham (cabeça de seta); barra de escala: 20 μ m. Coloração por hematoxilina-eosina. Fotos retiradas em microscópio de fluorescência Olympus BX63.

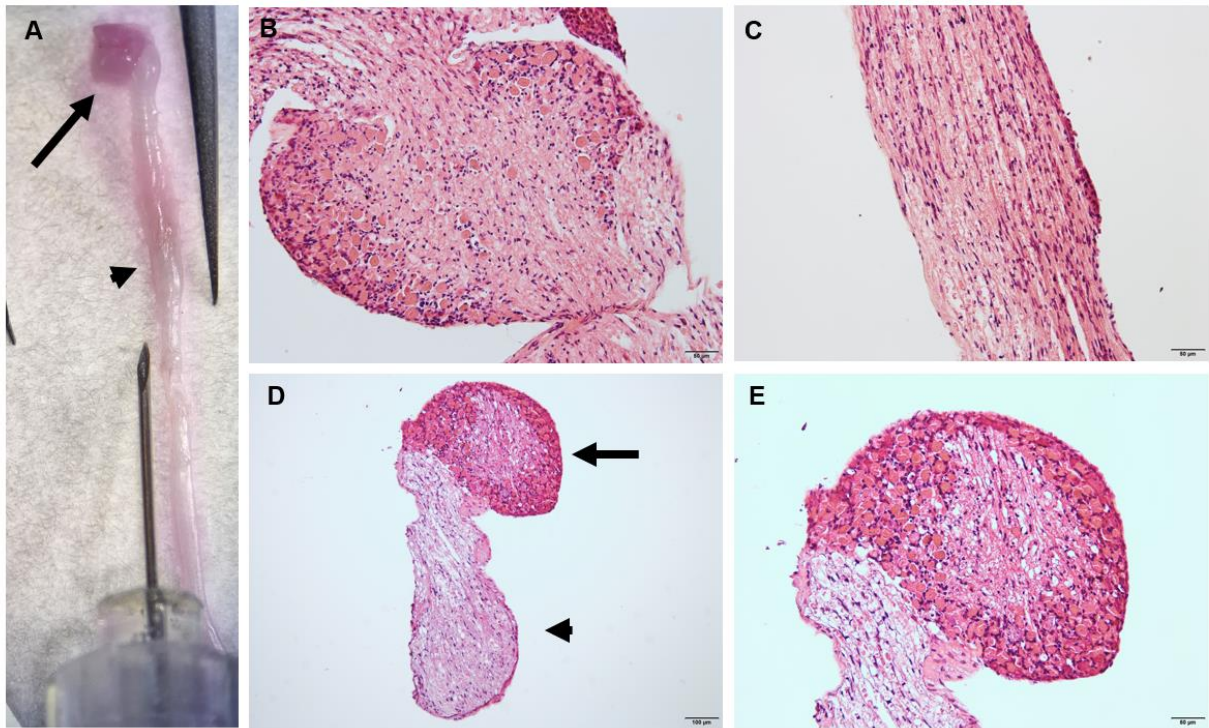


Figura 34. GRD-NP em ensaio de 7 dias. (A) Detalhe do ensaio de infecção do modelo GRD-NP através da injeção do conteúdo bacteriano no nervo. Gânglio (seta) e nervo distal (cabeça de seta) em destaque. (B) Gânglio e (C) nervo distal sem tratamento após 7 dias de cultura em aumento de 20X; barra de escala: 50 µm. (D) (E) GRD-NP exposto ao *M. leprae* morto após 7 dias de cultura - aumento de 10X e 20X respectivamente; barras de escala: 100 e 50 µm.

Por fim, temos em andamento a produção de um manuscrito intitulado “Specific antigens for *Mycobacterium leprae* and measurement of chemokines in the identification of infected people” em colaboração com grupo parceiro, que visa contribuir para o aperfeiçoamento de métodos diagnósticos de casos de hanseníase em regiões de baixa endemicidade, trazendo para o nosso grupo a ampliação de uma visão mais clínica da patogênese hanseníase, de modo a complementar a ciência de base que desenvolvemos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKI, T.; NARA, A.; UEMURA, K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. **Cell Biology and Toxicology**, v 28, n 3, p. 125-131, jun. 2012.
- AMIN, J.; BOCHE, D.; RAKIC, S. What do we know about the inflammasome in humans? **Brain Pathology**, v 27, p.192-204, 2017.
- ANDRADE, P. R. *et al.* Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. **Expert Review of Clinical Immunology**, v 11, n 3, p.391-407, 2015
- ANDRADE, P. R. *et al.* Inflammatory Cytokines Are Involved in Focal Demyelination in Leprosy Neuritis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v 75, n 3, p.272-283, 2016.
- ANTUNES, S. L. G. *et al.* Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v 107, n 2, p.246-253, 2012.
- ANTUNES, S. L. G. *et al.* Fibrosis: a distinguishing feature in the pathology of neural leprosy. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, v 114: e190056, 2019.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. SK-N-AS. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2137>. Acesso em: 10/02/2023.
- ARAS, M. A.; HARTNETT, K. A.; AIZENMAN, E. Assessment of Cell Viability in Primary Neuronal Cultures. In: Wiley, J. & SONS, INC. **Current Protocols in Neuroscience: Neurochemistry/Neuropharmacology**. v 44, n 1, jul. 2008.
- AUNG, T. *et al.* Mycobacterium leprae in neurons of the medulla oblongata and spinal cord in leprosy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v 66, n 4, p. 284-294, abr. 2007.
- BARTENEVA, N. S. *et al.* Mitochondrial Staining Allows Robust Elimination of Apoptotic and Damaged Cells during Cell Sorting. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v 62, n 4, p. 265–275, 2014.
- BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael, A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BISWAS, D. *et al.* T-Regulatory Cells in Erythema Nodosum Leprosum: An Immunohistochemical and Image Morphometric Study. **The American Journal of Dermatopathology**, v 43, n 12, p.e149-e157, 2021.

BODDINGIUS, J. The occurrence of Mycobacterium leprae within axons of peripheral nerves. **Acta Neuropathologica**, v 27, n 3, p. 257-70, mar. 1974.

BOUÇANOVA, F.; CHRAST, R. Metabolic Interaction Between Schwann Cells and Axons Under Physiological and Disease Conditions. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v 14, n 148, maio 2020.

BOWEN, S. *et al.* The phagocytic capacity of neurones. **European Journal of Neuroscience**, v 25, n 10, p. 2947–2955, maio 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico]**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Hanseníase no Brasil: perfil epidemiológico segundo níveis de atenção à saúde**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase**. Número especial. Brasília: Ministério da Saúde, 2022b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase**. Número especial. Brasília: Ministério da Saúde, 2023.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v 83, n 1-3, p. 91-97, 2003.

BRUGGER, L. M. O.; SANTOS, M. M. L.; LARA, F. A.; Mietto, BS. What happens when Schwann cells are exposed to Mycobacterium leprae - a systematic review. **Ibro Neuroscience Reports**, v. 1, p. 11-16, 2023.

CAILLAUD, M. *et al.* Peripheral nerve regeneration and intraneural revascularization. **Neural Regeneration Research**, v 14, n 1, p. 24-33, 2019.

CALLAGHAN, B. C. *et al.* Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments. **The Lancet Neurology**, v 11, n 6, p. 521-534, jun. 2012.

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, jul. 2007.

CATTIN, A. L.; LLOYD, A.C. The multicellular complexity of peripheral nerve regeneration. **Current Opinion in Neurobiology**, v 39, n 1, p.38-46, ago. 2016.

CARVALHO, C. R.; OLIVEIRA, J. M.; REIS, R. L. Modern trends for peripheral nerve repair and regeneration: beyond the hollow nerve guidance conduit. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v 7, n 337, nov. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Clinical Disease. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/leprosy/health-care-workers/clinical-diseases.html>. Acesso em: 11/01/2023.

CERVANTES-SILVA, M. P.; COX, S. L.; CURTIS, A. M. Alterations in mitochondrial morphology as a key driver of immunity and host defence. **EMBO Reports**, v 22, n 9, set. 2021.

CHANDRA, P. *et al.* Macrophage global metabolomics identifies cholestenone as host/pathogen cometabolite present in human Mycobacterium tuberculosis infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v 3, n 132, e152509, feb. 2022.

CHEN, Z. L.; YU, W. M.; STRICKLAND, S. Peripheral Regeneration. **Annual Review of Neuroscience**, v 30, n 1, p. 209–233, mar. 2007.

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v 409 (6823), p.1007-1011, 2001.

COLEMAN, M. P.; HOKE, A. Programmed axon degeneration: from mouse to mechanism to medicine. **Nature Reviews Neuroscience**, v 21, n 4, p. 183-196, abr. 2020.

CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. **Cold Spring Harbor Protocols**, v 12, 2016.

CROWLEY, L. C. *et al.* Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v 11, 2016.

DIAS, I. H. K. *et al.* Inflammation, lipid (per)oxidation and redox regulation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v 33, n 3, 2020.

DUPNIK, K. M. *et al.* Transcriptional Changes That Characterize the Immune Reactions of Leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v 211, n 10, p. 1658–1676, maio 2015.

EICHELMANN, K. *et al.* Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v 104, n 7, p. 554-563, set. 2013.

FELDMAN, E. V. *et al.* New horizons in diabetic neuropathy: mechanisms, bioenergetics, and pain. **Neuron**, v 93, n 6, p. 1296-1313, mar. 2017.

FRANCO-PAREDES, C.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Unsolved matters in leprosy: a descriptive review and call for further research. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v 15, n 33, maio 2016.

FORMIGOSA, C. A. C.; BRITO, C. V. B.; NETO, O. S. M. Impacto da COVID-19 em doenças de notificação compulsória no Norte do Brasil. **Revista Brasileira em**

Promoção da Saúde, [S. l.], v. 35, p. 11, 2022.

FROES JUNIOR, L. A. R.; SOTTO, M. N.; TRINDADE, M. A. B. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 97, n3, p.338-347, 2022.

GALVAO, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. **The FASEB Journal**, v 18, n 3, p.1317-1330, mar. 2014.

GARG, R. K. *et al.* The spectrum of central nervous system manifestations in leprosy: a systematic review of published case reports and case series. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, trad072, out. 2023.

GASQUE, P.; NEAL, J. W. The role of primary infection of Schwann cells in the aetiology of infective inflammatory neuropathies. **The Journal of Infection**, v 73, n 5, p.402-418, nov. 2016.

GIRARDI, K. C. V. **Análise do impacto do remodelamento do metabolismo central da célula de Schwann infectada pelo Mycobacterium leprae sobre neurônios**. 2021. 119p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

GIRARDI, K. C. V. *et al.* Phenolic glycolipid-1 of Mycobacterium leprae is involved in human Schwann cell line ST8814 neurotoxic phenotype. **Journal of Neurochemistry**, v. 164, n 2, p. 158-171, 2023.

GORDON-WEEKS, P. R. Organization of microtubules in axonal growth cones: a role for microtubule-associated protein MAP 1B. **Journal Neurocytology**, v 22, n9, p.717-725, set. 1993.

GURAGAIN, S.; UPADHAYAY, N.; BHATTARAI, B. M. Adverse reactions in leprosy patients who underwent dapsone multidrug therapy: a retrospective study. **Clinical Pharmacology: Advances and Applications**, v 9, p. 73-78, 2017.

HAAS, R. H. Mitochondrial Dysfunction in Aging and Diseases of Aging. **Biology**, v 8, n 2, 2019.

HAGGE, D. A. *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, nov. 2002.

HANSLICK, J. L. *et al.* Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Produces Widespread Apoptosis in the Developing Central Nervous System. **Neurobiology of Disease**, v 34, n 1, p.1-10, abr. 2009.

HESS, S.; RAMBUKKANA, A. Cell Biology of Intracellular Adaptation of Mycobacterium leprae in the Peripheral Nervous System. **Microbiology Spectrum**, v 7, n 4, p.1-19, jul. 2019.

HOCKINGS, K. J. *et al.* Leprosy in wild chimpanzees. **Nature**, v 598, n 7882, p. 652-656, out. 2021.

HOLANDA, M. V. *et al.* Presence of Mycobacterium leprae genotype 4 in environmental waters in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 50, n 2, p. 216-222, abril 2017.

HU, W. *et al.* Interleukin 23 in acute inflammatory demyelination of the peripheral nerve. **Archives in Neurology**, v 63, n 6, p.858-864, 2006.

HUANG, Y. *et al.* Autophagy participates in lysosomal vacuolation-mediated cell death in rgnnv-infected cells. **Frontiers in Microbiology**, v 11, n 790, p. , abr. 2020.

IMAEDA, T.; IMAEDA H. Electron microscopy of Mycobacterium leprae in cutaneous nerve components. **Cutis**, v 37, n 1, p. 59-61, jan. 1986.

INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION. Geographical Region – World. Disponível em: https://leprosyhistory.org/geographical_region/world. Acesso em: 10/01/2023.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v 13, n 33, fev. 2019.

JOB. C. K.; VERGHESE, R. Electronmicroscopic demonstration of Myco leprae in axons. **Leprosy Review**, v 45, n 3, p. 235-239, sep. 1974.

JUNQUEIRA, Luis C.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KANDEL, Eric R. *et al.* Princípios de Neurociências. 5. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 89, n 2, p. 205-218, abr. 2014.

LI, X. *et al.* Drug Resistance (Dapsone, Rifampicin, Ofloxacin) and Resistance-Related Gene Mutation Features in Leprosy Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v 23, n 12443, out. 2022.

LOBATO, L. S. **Análise da eficácia de drogas inibidoras da síntese de colesterol (estatinas) no controle da infecção por micobactérias**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

LOBATO, L. S. *et al.* Statins Increase Rifampin Mycobactericidal Effect. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v 58, n10, p.5766-5774, 2014.

LOPEZ-LEAL, R.; ALVAREZ, J.; COURT, F. A. Origin of axonal proteins: Is the axon-schwann cell unit a functional syncytium? **Cytoskeleton**, v 73, n 10, p.629-639, 2016.

LOPEZ-LEAL, R.; COURT, F. A. Schwann Cell Exosomes Mediate Neuron-Glia Communication and Enhance Axonal Regeneration. **Cellular and Molecular neurobiology**, v 36, n 3, p.429-436, 2016.

LUTZ, A. B. ; BARRES, B. A. Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. **Developmental Cell**, v 28, n 1, p.7-17, jan. 2014.

MACHADO, Angelo. Neuroanatomia funcional. 1. ed. São Paulo: Atheneu; 2006.

MATTOS, K. A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and Mycobacterium leprae pathogenesis. **Journal of Leukocyte Biology**, v 87, n 3, p. 371-384, 2010.

MATTOS, K. A. *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, 2011a.

MATTOS, K. A. *et al.* Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v 13, n 2, p. 259-273, 2011b.

MATTOS, K. A. *et al.* Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cellular Microbiology**, v 16, n 6, p. 797-815, 2014.

MARQUES, M. A. M. *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, 2015.

MAYMONE, M. B. C. *et al.* Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v 83, n 1, p. 1-14, 2020.

MC GUIRE, C.; BEYAERT, R.; VAN LOO, G. Death receptor signaling in central nervous system inflammation and demyelination. **Trends in Neuroscience**, v 34, n 12 p.619-628, 2011.

MEDEIROS, R. C. A. *et al.* Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by Mycobacterium leprae. **The Journal of Biological Chemistry**, v 291, n 41, p.21375-21387, out. 2016.

MELO, R. C. N.; MORGAN, E. ; MONAHAN-EARLEY, R. ; DVORAK, A. M ; WELLER, P. F. Pre-embedding immunogold labeling to optimize protein localization at subcellular compartments and membrane microdomains of leukocytes. **Nature Protocols** (Print), v. 9, p. 2382-2394, 2014.

MIETTO, B. S. **Camundongos galectina-3^{-/-} exibem uma acelerada degeneração walleriana após lesão compressiva do nervo Isquiático**. 2011. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

MIETTO, B. S. **Mecanismos inflamatórios desencadeados durante a degeneração e regeneração de nervos do sistema nervoso periférico**. 2015. 146p. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MIETTO, B. S.; MOSTACADA, K.; MARTINEZ, A. M. Neurotrauma and inflammation: CNS and PNS responses. **Mediators Inflammation**, v 2015: 251204, 2015.

MIETTO, B. S. *et al.* Demyelination in Peripheral Nerves: Much to Learn from Leprosy Neuropathy. **Journal of Multiple Sclerosis**, v 3, n 2 :174, 2016.

MIETTO, B. S. *et al.* Myelin breakdown favours Mycobacterium leprae survival in Schwann cells. **Cellular Microbiology**, v 22, n 1: e13128, jan. 2020.

MIETTO, B. S. *et al.* Schwann Cells Provide Iron to Axonal Mitochondria and Its Role in Nerve Regeneration. **Journal of Neuroscience**, v 41, n 34, p.7300-7313, ago. 2021.

MIGUEL, C. B. *et al.* Leprosy morbidity and mortality in Brazil: 2008–2018. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v 25, n 6: 101638, 2021.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. **The Journal of Investigative Dermatology**, v 102, n 6, p.802-832, 1994.

MODRAK, M. *et al.* Peripheral nerve injury and myelination: potential therapeutic strategies. **Journal of Neuroscience Research**, v 98, n 5, p. 780-795, maio 2020.

MUNGROO, M. R.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Mycobacterium leprae: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. **Microbial Pathogenesis**, v149, 104475, 2020.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. National Center for Biotechnology Information. PubChem. Cholest-4-en-3-one. 2023. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholest-4-en-3-one>. Acesso em: 03/02/2023.

NERY, J. A. C. *et al.* Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v 88, n 5, p.787-92, 2013.

NEUVONEN, M. *et al.* Enzymatic Oxidation of Cholesterol: Properties and Functional Effects of Cholestenone in Cell Membranes. **Plos One**, v 9, n 8, e103743, aug. 2014.

NOCERA, G.; JACOB, C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v 77, n 20, p. 3977-3989, abr. 2020.

OLIANI, S. M.; GIL, C. D. Anti-inflammatory protein annexin 1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Arquivos de ciências da saúde**, v 13, n 4, p.215-220, dez. 2006.

OLIVEIRA, D. A. S. **Propagação in vitro e produção de cepa transgênica de *Mycobacterium Leprae* em linhagem IDE8 de *Ixodes Scapularis***. 2021. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2021.

OLIVEIRA, M. F. *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, maio 2021.

PANDEY, A. K.; SASSETI, C. M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **PNAS**, v 105, n 11, p.4376-4380, 2008.

PERNAS, L.; SCORRANO, L. Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. **Annual Review of Physiology**, v 78, n 1, p. 505-531, nov. 2015.

PERRY, S. W. ; EPSTEIN, L. G.; GELBARD, H. A. In Situ Trypan Blue Staining of Monolayer Cell Cultures for Permanent Fixation and Mounting. **Biotechniques**, v 22, n 6, p.1020-1024, Jun. 1997.

PEYRON, P. *et al.* Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **Plos Pathogens**, v 4, n 11, e1000204, 2008.

PITTA, I. J. R. *et al.* Clinical, Neurophysiological and Histopatological correlations in Pure Neural Leprosy. **Brazilian Journal of Case Reports**, v 1, n 4, p.105-113, dez. 2021.

PLOEMACHER, T. *et al.* Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v 14, n 4: e0008276, 2020.

QUINTES, S. *et al.* Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v 15, n 1, p.10-16, 2010.

RAMBUKKANA, A. *et al.* Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. **Cell**, v 88, n 6, p.811-821, 1997.

RAMBUKKANA, A. How does *Mycobacterium leprae* target the peripheral nervous system? **Trends In Microbiology**, v 23, n 1, p.23-28, 2000.

RAMBUKKANA, A. Mycobacterium leprae-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. **Current Opinion in Immunology**, v 16, n 4, p.511–518, ago. 2004.

RANDALL, P. J. *et al.* Neurons are host cells for mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**, v 82, n 5, p. 1880-1890, maio 2014.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Médecine et maladies infectieuses**, v 45, n 9, p. 383–393, 2015.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International journal of Leprosy and Other Mycobacterial diseases**, v.34, n 3, p.255-73, 1966.

RIEGER, A. M.; NELSON, K. L.; KONOWALCHUK, J. D.; BARREDA, D. R. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. **Journal of Visualized Experiments**, v 50, e2597, p.1-4, 2011.

ROSA, L. R. **Avaliação do efeito antitumoral do tratamento combinado com C6-ceramida e 7-cetocolesterol em uma linhagem celular de câncer de mama**. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

ROSA, T. L. S. A. *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, n 1: 709972, jul. 2021.

RUSSEL, D. G. *et al.* Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature Immunology**, v 10, p.943-948, 2009.

SALZER, J. L. Schwann cell myelination. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v 7, n 8: a020529, jun. 2015.

SAVE, M. P. *et al.* Alterations in neurofilament protein(s) in human leprosy nerves: morphology, immunohistochemistry and Western immunoblot correlative study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v 30, n 6, p. 635-650, 2004.

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

SCOLLARD, D. M. Infection with *Mycobacterium lepromatosis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v 95, n 9 p. 500-501, 2016.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Hanseníase em Minas Gerias. **Boletim Epidemiológico – 2022**. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Saúde, 2022.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. Hanseníase. Painel Epidemiológico Hanseníase. 2023 Disponível em: <https://www.saude.mg.gov.br/hanseniaese#>. Acesso em: 30/08/2023.

SERRANO-COLL, H. *et al.* Mycobacterium leprae-induced nerve damage: direct and indirect mechanisms. **Pathogens and Diseases**, v 76, n 6, jul. 2018.

SHARMA R. *et al.* Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. **Emerging Infectious Disease**, v 21, n 12, p. 2127–2134, dez. 2015.

SHIN, E. J.; CHO, Y. Assessing Axonal Degeneration in Embryonic Dorsal Root Ganglion Neurons In Vitro. In: BABETTO, E. **Axon Degeneration: Methods in Molecular Biology**. 1 ed. New York. Springer Nature, 2020. p. 41 – 54.

SHUBIN, A. V. *et al.* Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. **Oncotarget**, v 7, n 34, p. 55863–55889, jun. 2016.

SILVESTRE, M. P. S. A.; LIMA, M. F.; LIMA, L. N. G. C. Sensitivity of Anti-PGL-1 Elisa test using mixed antigens (disaccharide + trisaccharide) for the diagnosis and epidemiological surveillance of leprosy. **Leprosy Review**, v 89, n 4, p.376 – 386, 2018.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names. **International journal of systematic bacteriology**, v 30, n 1, p. 225-420, 1980.

SOARES, B. A.; SCANDELARI, J. P. S.; BOTTOLO, B. M. W.; MOURA, J. Chapter 30 - Engineered biomarkers for immunodiagnosis of leprosy. **Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers**, p. 309-317, 2020.

SOUZA, W. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. 3 ed., Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The Role of Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. **Leprosy Review**, v 82, n 4, p. 344-357, 2011.

STASSART, R. M.; WOODHO, A. Axo-glial interaction in the injured PNS. **Developmental Neurobiology**, v 81, n 5, p.490-506, 2020.

SUGAWARA-MIKAMI, M.; Tanigawa, K.; Kawashima, A.; Kiriya, M.; Nakamura, Y.; Fujiwara, Y.; Suzuki, K. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. **Virulence**, v. 13, n 1, p.1985–2011, out. 2022.

TANAKA, E.; HO, T.; KIRSCLMER, M. W. The Role of Microtubule Dynamics in Growth Cone Motility and Axonal Growth. **The Journal of Cell Biology**, v 128, n 1 & 2, p139-155, Jan. 1995.

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

TENUTA-FILHO, A. *et al.* Óxidos de colesterol em alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v 39, n 3, 2003.

VARGAS, M. E.; BARRES, B. A. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow? **Annual Review of Neuroscience**, v 30, p. 153-179, jul. 2007.

VERMES, I. *et al.* A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v 184, n 1, p. 39-51, jul. 1995.

VIADER, A. *et al.* Aberrant Schwann Cell Lipid Metabolism Linked to Mitochondrial Deficits Leads to Axon Degeneration and Neuropathy. **Neuron**, v 77, n 5, p. 886-896, mar. 2013.

WALKER, S. L.; LOCKWOOD, D. N. J. The clinical and immunological features of leprosy. **British Medical Bulletin**, v 77-78, p.103–121, 2006.

WALLER, A. V. Experiments on the section of the glosso-pharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibres. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v 140, pp. 423-429, jan. 1850.

WIELKOSZYŃSKI, T. *et al.* Cellular toxicity of oxysterols. **BioEssays**, v 28, n 4, p. 387-398, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy. 2022a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>. Acesso em: 10/01/2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy (Hansen's disease). 2022b. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansens-disease>. Acesso em: 10/01/2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Towards Zero Leprosy. Global Leprosy (Hansen's disease) Strategy 2021–2030. **New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia**. 15 abr. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290228509>. Acesso em: 11/01/2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. **Weekly epidemiological record**, v 97, n 36, p. 429-450. 2022c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy (Hansen's disease). 2023a. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leprosy#tab=tab_3. Acesso em: 10/01/2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy (Hansen disease) update, 2022: new paradigm – control to elimination. *Weekly epidemiological record*, v 98, n 37, p. 409-430. 2023b.

ZEMIRLI, N.; MOREL, E.; MOLINO, D. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. ***International Journal of Molecular Science***, v 19, n 2, fev. 2018.

ZHANG J. *et al.* A modified synthesis and serological evaluation of neoglycoproteins containing the natural disaccharide of PGL-I from *Mycobacterium leprae*. ***Bioorganic Medical Chemistry Letters***, v 20, n 11, p. 3250–3253, jun. 2010.

ZHANG, S. H. *et al.* Immunomodulation by Schwann cells in disease. ***Cancer Immunology, Immunotherapy***, v 69, n 2, p.245-253, fev. 2020.