



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Mariane Bertolucci Casalenovo

**Avaliação de Marcadores de Diferenciação em Células de
Schwann Murinas Submetidas à Infecção por
*Mycobacterium leprae***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre (a) em
Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu
2017

Mariane Bertolucci Casalenovo

Avaliação de Marcadores de Diferenciação em Células de Schwann Murinas Submetidas à Infecção por *Mycobacterium leprae*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre (a) em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Nieto Brito de Souza

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Casalenovo, Mariane Bertolucci.

Avaliação de marcadores de diferenciação em células de Schwann Murinas submetidas à infecção por *Mycobacterium leprae* / Mariane Bertolucci Casalenovo. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Vânia Nieto Brito de Souza
Coorientador: Maria Renata Sales Nogueira
Capes: 21102007

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Células de Schwann. 3. Camundongo como animal de laboratório. 4. Nervo ciático.

Palavras-chave: Camundongo *nude*; Células de Schwann; *Mycobacterium leprae*.

*“Querido Deus, te agradeço pelas bênçãos sem fim e pela
alegria de viver em Tua presença”*

Salmo 21:6

Dedicatória

À DEUS,

Pelos milagres que tem realizado em minha vida, eu te amarei Senhor de todo o meu coração.

“Bendito seja Deus, que não rejeitou a minha oração, nem desviou de mim a sua misericórdia”

Salmo 66:20

À MINHA FAMÍLIA,

Mãe, seu cuidado e dedicação me deram esperanças para seguir em frente.

Pai, sua presença me deu segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Eu os agradeço do fundo do meu coração.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr.^a Maria Renata Sales Nogueira, pelo apoio imensurável, competência e eficiência com que conduziu a orientação deste trabalho. Agradeço por todo o ensinamento, paciência, confiança, zelo e cuidado. Sempre vou tê-la como referência e serei eternamente agradecida.

À Prof^a. Dr.^a Vânia Nieto Brito de Souza, sou grata pela oportunidade, suporte, confiança e amizade.

Aos colaboradores deste estudo, Patrícia Sammarco, Daniele Bertolucci e Dejair Caitano do Nascimento, muito obrigada pela enorme contribuição, pelos conselhos, ensinamentos e pela amizade conquistada.

A todos os pesquisadores do Instituto Lauro de Souza Lima, Ana Carla, Carol, Elaine, Eliane, Esther, Fabiana, Fátima, Ida, Renata, Sônia, Suzana, pela agradável convivência e por todo carinho e apoio recebido ao longo do caminho.

A todos os amigos de laboratório, Adriana Sierra, Amanda Finardi, Beatriz Sartori, Bruna Gimenez, Dayana Sales, Élderson Valois, Eloise Brasil, Giovanna Germano, Keren Valezi, Priscila Balalai, Priscila Rodrigues, Rafaela Pavanelli, que compartilharam comigo todos os momentos durante o percurso acadêmico. Foram presentes que ganhei ao longo do caminho e que guardarei com carinho em minhas lembranças. A eles o meu carinho.

À Shelly do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP de Botucatu pela atenção e carinho dispensados para a realização das análises de microscopia confocal, agradeço imensamente.

À da Equipe Técnica de Biologia Celular, Equipe Técnica de Microbiologia, Equipe Técnica de Patologia e Setor de Biotério, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Às minhas queridas tias, Maria e Cida, por todas as orações, pelo incentivo e apoio em todos os momentos, por sempre torcerem pelo meu sucesso. A elas a minha gratidão.

As minhas eternas amigas-irmãs Graziela Gonçalves, Luana Ferrarezi, Natália Santos por sempre me incentivarem nessa caminhada.

A minha prima Aline Casalenovo, por estar presente em todos os momentos, pelas orações, e pelo grande amor que nos une nessa vida.

Agradecimentos Institucionais

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Estadual Paulista UNESP/Botucatu.

A Seção Técnica de Pós-Graduação, especialmente a secretária Bruna Jorgetto pela gentileza e atenção de sempre com os alunos.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima.

À Fundação Paulista contra a Hanseníase e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro, que viabilizaram a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

A infecção por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) desencadeia alterações no *status* funcional das células de Schwann (SCs), responsáveis pela produção da bainha de mielina e homeostasia neural. Estudos prévios indicam que lesões nos nervos periféricos modulam a expressão de fatores-chave envolvidos na diferenciação e maturação das SCs. Na hanseníase, alterações funcionais nessas células podem estar envolvidas na patogênese do dano neural. O presente estudo buscou determinar a expressão dos fatores de transcrição KROX-20, SOX-10, JUN e do receptor p75NTR, envolvidos nos processos de diferenciação e maturação de SCs. Os dados foram obtidos a partir de cultura primária de SCs murinas expostas ao *M. leprae* durante sete e 14 dias, com diferentes multiplicidades de infecção (MOI 100:1, MOI 50:1). Os mesmos fatores foram avaliados *in vivo*, em nervos ciáticos de camundongos *nude* (NU-*Foxn1^{mu}*), após seis e nove meses de infecção. Comparando-se grupos experimentais em relação aos controles, nossos resultados em cultura de SCs demonstram redução significativa de KROX-20 e SOX-10, bem como elevação na frequência de células imunomarcadas por p75NTR. Paralelamente, nervos ciáticos de camundongos *nude* infectados por *M. leprae* apresentaram queda de KROX-20 e aumento de p75NTR, quando comparados aos animais não infectados. Em conjunto, nossos resultados corroboram achados prévios sobre a interferência de *M. leprae* na expressão de fatores-chave envolvidos na maturação celular, favorecendo a manutenção de fenótipo não mielinizante nas SCs, com possíveis implicações na reparação de nervos periféricos adultos.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae*, Células de Schwann, Experimentação animal

ABSTRACT

Mycobacterium leprae infection (*M. leprae*) triggers changes in the functional status of Schwann cells (SCs), which are responsible for the production of myelin sheath and neural homeostasis. Previous studies indicate that peripheral nerve injury modulates the expression of key factors involved in the differentiation and maturation of SCs. In leprosy, functional changes in these cells may be involved in the pathogenesis of neural damage. The present study sought to determine the expression of the transcription factors KROX-20, SOX-10, JUN and the neurotrophic receptor p75NTR, involved in the differentiation and maturation processes of SCs. Data were obtained from primary murine SCs culture exposed to *M. leprae* for seven and 14 days, with different multiplicities of infection (MOI 100:1, MOI 50:1). The same factors were evaluated in vivo on sciatic nerve of nude mice (NU-Foxn1^{mu}), after six and nine months of infection. By comparing experimental groups versus controls, our SC culture results demonstrate significant reduction of KROX-20 and SOX-10, as well as elevation in the frequency of cells immunolabelled by p75NTR. In parallel, sciatic nerves of nude mice infected with *M. leprae* showed a decrease in KROX-20 and an increase of p75NTR when compared to uninfected animals. Our results corroborate previous findings on *M. leprae* interference in the expression of key factors involved in cell maturation, favoring the maintenance of a non-myelinating phenotype in SCs, with possible implications for the repair of adult peripheral nerves.

Key words: *Mycobacterium leprae*, Schwann cells, Animal experimentation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cultura primária de células de Schwann. Caracterização por contraste de fase e imunofluorescência em SCs obtidas de nervos ciáticos de camundongos *Swiss white*.

Figura 2. Células de Schwann e nervos ciáticos murinos após infecção experimental por *M. leprae*. Avaliação morfológica por coloração de Hematoxilina-Eosina e identificação de bacilos intracelulares por coloração de Fite-Faraco.

Figura 3. Detecção por imunofluorescência do fator de transcrição KROX-20 em cultura primária de células de Schwann (SCs) obtidas de nervos ciáticos de camundongos *Swiss white*.

Figura 4. Determinação de KROX-20 em nervos ciáticos de camundongos *nude* não infectados e infectados por *M. leprae* ao longo de seis e nove meses.

Figura 5. Detecção por imunofluorescência do fator de transcrição SOX-10 em cultura primária de células de Schwann (SCs) obtidas de nervos ciáticos de camundongos *Swiss white*.

Figura 6. Determinação de SOX-10 em nervos ciáticos de camundongos *nude* não infectados e infectados por *M. leprae* ao longo de seis e nove meses.

Figura 7. Detecção por imunofluorescência do receptor p75NTR em cultura primária de células de Schwann (SCs) obtidas de nervos ciáticos de camundongos *Swiss white*.

Figura 8. Determinação de p75NTR em nervos ciáticos de camundongos *nude* não infectados e infectados por *M. leprae* ao longo de seis e nove meses.

Figura 9. Detecção por imunofluorescência do fator de transcrição JUN em cultura primária de células de Schwann (SCs) obtidas de nervos ciáticos de camundongos *Swiss white*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg - Micrograma

µl - Microlitro

µm - Micrometro

µM - Micromolar

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

BB - *Borderline borderline leprosy* (Hanseníase dimorfa)

BDNF - *Brain derived neurotrophic factor* (Fator neurotróficos derivado do cérebro)

BL - *Borderline lepromatous leprosy* (Hanseníase dimorfa-virchowiana)

BSA - *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)

BT - *Borderline tuberculoid leprosy* (Hanseníase dimorfa-tuberculóide)

cAMP - *Cyclic adenosine monophosphate* (Monofosfato cíclico de adenosina)

CCL2 - *C-C motif chemokine ligand 2*

CEUA-ILSL - Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima

EDN1 - *Endothelin 1*

ENH - Eritema Nodoso Hansênico

ERBB2 - *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

ERK1 - *Extracellular signal-regulated kinase*

FGF2 - *Fibroblast growth factor 2* (Fator de crescimento fibroblástico 2)

GDNF - *Glial cell derived neurotrophic factor* (Fator neurotrófico derivado da glia)

GFAP - *Glial fibrillary acidic protein* (Proteína ácida fibrilar glial)

HRG - *Heregulin β1*

IB - Índice baciloscópico

ID4 - *Inhibitor of DNA binding 4*

IL-1α - *Interleukin 1 alpha*

IL-1β - *Interleukin 1 beta*

JUN - *Jun proto-oncogene/c-Jun*

Kg - Kilograma

KROX-20 - *Early growth response 2/EGR2*

L1-CAM - *L1 cell adhesion molecule*

LIF - *Interleukin 6 family cytokine*

LL - *Lepromatous leprosy* (Hanseníase virchowiana)
M. leprae - *Mycobacterium leprae*
MAG - *Myelin associated glycoprotein* (Glicoproteína associada a mielina)
MBP - *Myelin basic protein* (Proteína básica da mielina)
Mg - Miligrama
mL - Mililitro
MPZ - *Myelin protein zero* (Proteína zero da mielina)
NCAM-1 - *Neural cell adhesion molecule* (Molécula de adesão celular neuronal)
Ng - Nanograma
NGF - *Nerve growth factor* (Fator de crescimento neural)
NGS - *Normal goat serum* (Soro normal de cabra)
NRG1 - *Neuregulin 1*
NT-3 - *Neurotrophin 3* (Neurotrofina-3)
NU-Foxn1^{nu} - Camundongo *nude* atímico
OCT-6 - *POU class 3 homeobox 1*
OMS - Organização Mundial da Saúde
p38 MAPK - *p38 mitogen-activated protein kinase* (Proteína quinase ativada por mitógeno p38)
p75NTR - *Nerve growth factor receptor* (Receptor neurotróficos p75)
PAX-3 - *Paired box 3*
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada)
PGL-1 - *Phenolic glycolipid 1* (Glicolípido fenólico 1)
PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
PLCG1 - *Phospholipase C gamma 1*
PRX - *Periaxin*
pSLC - Células progenitoras *stem-like*
rpm - Rotações por minuto
RR - Reação reversa
RT1 - Reação do tipo 1
RT2 - Reação do tipo 2
SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SC - *Schwann cell* (Célula de Schwann)
SFB - Soro fetal bovino
SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

SNPA - Sistema nervoso periférico autônomo

SNPM - Sistema nervoso periférico motor

SOX-10 - *SRY-box 10*

SOX-2 - *SRY-box 2*

SW - *Swiss white*

TA - Temperatura ambiente

TFAP2A - *Transcription factor AP-2 alpha*

TNF- α - *Tumor necrosis factor-alpha* (Fator de necrose tumoral-alfa)

TT - *Tuberculoid leprosy* (Hanseníase tuberculóide)

VEGF - *Vascular endothelial growth factor* (Fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Hanseníase sob a perspectiva de neuropatia periférica.....	1
1.2. Características estruturais do sistema nervoso periférico.....	3
1.3. Desenvolvimento das células de Schwann.....	5
1.4. Envolvimento das células de Schwann na reparação dos nervos periféricos.....	7
1.5. Neuropatias periféricas infecciosas.....	8
1.6. Interação patógeno-hospedeiro na hanseníase.....	9
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Animais experimentais.....	15
3.2. Isolamento de tecidos e cultivo celular.....	15
3.3. Obtenção de <i>M. leprae</i>	16
3.4. Infecção <i>in vitro</i>	16
3.5. Infecção <i>in vivo</i>	16
3.6. Morfologia e determinação do índice baciloscópico.....	17
3.7. Imunofluorescência.....	17
3.8. Análise Estatística.....	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Morfologia celular e identificação de <i>M. leprae</i>	20
4.2. <i>M. leprae</i> modula KROX-20 e SOX-10 em modelo murino de infecção.....	23
4.3. Células e nervos infectados por <i>M. leprae</i> demonstram aumento p75NTR.....	28
5. DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	39
ANEXO	52
Manuscrito.....	53

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Hanseníase sob a Perspectiva de Neuropatia Periférica

O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) é uma micobacteria patogênica, de baixa virulência, responsável pelo desenvolvimento da hanseníase em seres humanos, embora também infecte outros mamíferos, que podem vir a apresentar manifestações clínicas similares (Singh, Cole, 2011). Identificado em 1873, por Gerhard Henrick Armauer Hansen (Alter et al., 2008), *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) que se apresenta na forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, se desenvolve idealmente em temperaturas inferiores a 37°C e exibe peculiaridades como seu tempo de multiplicação excepcionalmente longo, além de sua limitação de cultivo *in vitro* (Oliveira et al., 2005). A redução evolucionista sofrida pelo genoma do *M. leprae* gerou, ao longo dos séculos, um número limitado de genes funcionais, tornando o bacilo adaptado ao parasitismo intracelular e, portanto, totalmente dependente da célula hospedeira para sobrevivência e propagação (Cole et al., 2001).

A transmissão da hanseníase ocorre predominantemente por vias aéreas superiores, durante convívio íntimo e prolongado entre indivíduos suscetíveis e pacientes portadores de altas cargas bacilares (Reibel et al., 2015; Talhari, Neves, 1997). A grande maioria dos indivíduos é naturalmente resistente à infecção, porém, em uma pequena parte eventualmente suscetível da população, a infecção evolui para uma das formas clínicas sintomáticas (Araujo et al., 2015; Scollard et al., 2006). Embora tenha um agente etiológico geneticamente conservado, a hanseníase exibe um espectro heterogêneo de manifestações clínicas, o que está diretamente associado com o tipo de resposta imune do hospedeiro (Oliveira et al., 2005; Shimoji et al., 1999).

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram uma classificação para as múltiplas manifestações da hanseníase com base em critérios clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos (Ridley, Jopling, 1966). A partir de então, a doença foi dividida em duas formas polares, tuberculóide (TT) e virchowiana (LL), e subdividida em formas intermediárias, como hanseníase dimorfa (BB), dimorfa-tuberculóide (BT) e dimorfa-virchowiana (BL) (Moschella, 2004; Rodrigues, 2011; Bhat, Prakash, 2012).

A hanseníase tuberculóide apresenta lesões eritemato-hipocrômicas, eritematosas, com bordas discretamente elevadas ou com microtubérculos e limites precisos, variando em formato, tamanho e número. A baciloscopia (índice baciloscópico, IB) de lesões cutâneas na forma tuberculóide é habitualmente negativa, enquanto a reação de Mitsuda é positiva (Bhat, Prakash, 2012). A hanseníase virchowiana apresenta infiltração difusa com lesões polimorfas e em geral de limites imprecisos. A deficiência específica de resposta imune permite a disseminação dos bacilos por via linfática e sanguínea, atingindo mucosas e vísceras, de modo que infiltrados bacilíferos podem ser encontrados em todas essas localizações. A reação de Mitsuda é negativa, com IB positivo (Walker, Lockwood, 2006; Bhat, Prakash, 2012). Na hanseníase dimorfa (BT-BB-BL) as lesões são polimorfas com contornos internos bem definidos e externos mal definidos. Pelo seu caráter instável, assemelha-se a lesões bem delimitadas da hanseníase tuberculóide e/ou lesões disseminadas da hanseníase virchowiana. Pacientes BT apresentam Mitsuda e IB positivos ou negativos, enquanto em que pacientes BL se observam, predominantemente, Mitsuda negativo e IB positivo (Kahawita, Lockwood, 2008; Bhat, Prakash, 2012).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou os pacientes hansênicos conforme o número de lesões cutâneas, em paucibacilares e multibacilares, de modo que a presença de até cinco lesões definiria os casos paucibacilares, enquanto que acima desse número de lesões estariam os casos multibacilares (WHO, 1995). O comprometimento neural ocorre em todas as formas clínicas de hanseníase, sendo que nas formas paucibacilares (TT e BT) se inicia de modo agudo e apresenta manifestação focal (Franco-Paredes, Rodriguez-Morales, 2016), enquanto que nos pacientes multibacilares (BB, BL e LL), evolui de modo insidioso e disseminado (Zhu et al., 2017). Aproximadamente 4-10% dos pacientes com hanseníase pode manifestar a forma neural primária, uma neuropatia silenciosa que afeta troncos nervosos na ausência de sinais cutâneos (Walker, Lockwood, 2006).

O curso crônico da hanseníase pode ser entremeado por episódios inflamatórios agudos, que agravam o dano neural periférico e acarretam frequentemente incapacidades irreversíveis (Britton, Lockwood, 2004; Nery et al., 2013). Esses surtos inflamatórios são classificados como, reação do tipo 1 (RT1), ou reação reversa (RR), e reação do tipo 2 (RT2), ou eritema nodoso hansênico (ENH) (Antunes et al., 2013). A resposta imune de cada

indivíduo à infecção determina nesses casos, o tipo de reação que se desenvolve. Pacientes TT, BT e BB, frequentemente são acometidos pela RT1, enquanto que BL e LL apresentam RT2 (Voorend, Post, 2013; Scollard et al., 2015).

A hanseníase afeta funções sensitivas, motoras e autonômicas, contudo as fibras nervosas sensitivas são comprometidas mais precocemente. A sensibilidade tátil é mediada por fibras densamente mielinizadas da derme, enquanto que a térmica é mediada por fibras menos calibrosas mielinizadas e fibras do tipo C não mielinizadas na epiderme, as terminações nervosas livres (Ebenezer et al., 2007). Evidências sugerem que fibras C são as primeiras a sofrer degeneração, o que de fato é consistente com observações clínicas, onde a sensação térmica representa o principal componente para o diagnóstico precoce (van Brakel et al., 2008). Uma vez que há o comprometimento de terminações nervosas cutâneas nos estágios iniciais da infecção, posteriormente, troncos nervosos são afetados (Garbino, 2016; Dyck, Thomas, 2005).

O dano neural na hanseníase leva a deficiências físicas e incapacidades permanentes, responsáveis pelo sofrimento social, econômico e psicossocial dos pacientes, além da redução da qualidade de vida (Boku et al., 2010; Monteiro et al., 2014). Prevenção e reparação estão entre os principais desafios da doença, que podem ser minimizados com a detecção precoce e intervenções imediatas visando prevenção de incapacidades, responsáveis pelo estigma e elevada morbidade na hanseníase (Moura et al., 2013; Monteiro et al., 2014).

1.2. Características Estruturais do Sistema Nervoso Periférico

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

O SNPA é constituído por fibras motoras que conduzem impulsos do SNC aos músculos lisos viscerais e à musculatura cardíaca. SNPA é dividido em simpático e parassimpático, que se distinguem em estrutura e função. Os gânglios das vias simpáticas localizam-se próximos à medula espinhal, mas distantes do órgão efector. Nas vias parassimpáticas, os gânglios encontram-se distantes da medula e próximos ou até mesmo dentro do órgão efector. O SNPA simpático estimula ações que mobilizam energia, permitindo ao organismo responder a situações de estresse, enquanto que o parassimpático estimula principalmente atividades relaxantes. No SNPA simpático, nervos raquidianos ou espinhas, partem das regiões torácica e lombar da medula. Os nervos parassimpáticos partem do encéfalo e da região sacral da medula (McCorry, 2007; Chang et al., 2015).

Os nervos podem ser compostos por fibras aferentes, que conduzem informações obtidas do meio externo e do interior do organismo para o SNC e eferentes, que levam impulsos produzidos no SNC para órgãos efetores. Nervos sensitivos são aqueles que possuem fibras aferentes e nervos motores, aqueles que possuem fibras eferentes. Existem ainda nervos mistos, que possuem fibras de dois tipos e representam a maioria dos nervos periféricos adultos, compostos por fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas (Ordovas-Montanes et al., 2015; Salzer, 2012).

Cada fibra nervosa é composta por axônios envolvidos por células de Schwann (SCs) e pelo endoneuro, uma delicada camada de tecido conjuntivo frouxo, além de outros tipos celulares, como fibroblastos e pericitos. O agrupamento de fibras nervosas, denominado feixe ou fascículo, é revestido pelo perineuro, um invólucro mecanicamente resistente, também constituído por fibras colágenas e vasos sanguíneos. Mais externamente, recobrimo grupos de feixes nervosos, encontra-se o epineuro, composto por tecido conjuntivo denso, tecido adiposo e vasos sanguíneos (Ziskind-Conhaim, 1988).

Dentre os componentes do SNP, a glia periférica é formada por classes distintas de SCs, cada uma das quais, intimamente associada a diferentes tipos de neurônios (Jessen, 2004). As denominadas células olfativas revestem os axônios do nervo olfatório, e axônios terminais nas junções neuromusculares esqueléticas estão firmemente envolvidos pela teloglia ou glia terminal. Corpos neuronais dos gânglios sensitivos da raiz dorsal são recobertos pelas células satélites, enquanto que SCs mielinizantes recobrem axônios nos troncos nervosos. Nas

terminações dos nervos autonômicos e sensitivos da pele, associações irregulares com SCs não mielinizantes são estabelecidas (Jessen, Mirsky, 2005).

A estrutura de nervos mielinizados ou não, depende da relação axônio-gliã estabelecida, desse modo, as SCs destinadas a mielinizar envolvem axônios individuais e produzem uma bainha de mielina compacta, promovendo a rápida condução do estímulo nervoso (Jessen, Mirsky, 2005). SCs não mielinizantes por sua vez, embainham múltiplos axônios de pequeno diâmetro, formando os chamados feixes Remak (Taveggia et al., 2005).

1.3. Desenvolvimento das Células de Schwann

O desenvolvimento da linhagem glial no SNP abrange uma rica sequência de eventos moleculares e celulares, na qual células-tronco da crista neural se diferenciam em SCs precursoras, seguidas de células imaturas que, por fim, geram SCs mielinizantes e não mielinizantes (Liu et al., 2015). A diferenciação terminal das SCs é regulada por sua relação com axônios de calibres diferentes. Axônios de diâmetros maiores expressam níveis elevados do fator de crescimento NRG1 (*neuregulin 1*) e promovem a diferenciação mielinizante, ao passo que axônios de pequeno diâmetro apresentam níveis mais baixos de NRG1, levando à diferenciação em SCs não mielinizantes (Jessen, Mirsky, 2008). Em contrapartida ao estímulo neuronal, as SCs precursoras fornecem suporte trófico aos axônios, estabelecendo assim um estado de interdependência com os mesmos (Jessen, Mirsky, Loyd, 2015).

As SCs precursoras se caracterizam como uma população de células migratórias e proliferativas (Wanner et al., 2006). Sua sobrevivência depende de sinais axonais, sobretudo de NRG1, determinante para que as SCs precursoras se convertam em imaturas e alcancem o estágio seguinte no desenvolvimento celular (Newbern, Birchmeier, 2010; Raphael, Talbot, 2011). A eficácia de NRG1 é aumentada pela ativação do receptor NOTCH1 (*notch 1*), que estimula a diferenciação de SCs precursoras em imaturas, além de atuar como potente indutor da proliferação glial nos nervos em desenvolvimento (Woodhoo et al., 2009). A diferenciação de células precursoras em imaturas depende, ainda, de fatores de crescimento como FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (Mirsky, Jessen, 2005), enquanto que TFAP2A (*transcription factor AP-2 alpha*) e EDN1 (*endothelin 1*) atrasam essa diferenciação (Brennan et al. 2000).

A ativação de vias pró-mielinizantes tem NRG1 como um dos sinais extrínsecos mais bem caracterizados (Nave, Salzer, 2006). Vias de sinalização ativadas a partir da ligação entre NRG1 e ERBB2 (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2/NEU/HER-2, TKR1/CD340*) exercem papéis críticos no processo de mielinização (Newbern, Birchmeier, 2010). As principais vias de sinalização intracelular incluem PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) (Ogata et al., 2006), PLCG1 (*phospholipase C gamma 1*) (Kao et al., 2009), p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) (Haines et al., 2008) e cAMP (Crawford et al., 2008; Monje et al., 2010). Adicionalmente, miRNAs têm sido implicados como importantes reguladores pós-transcricionais de mielinização (Pereira et al., 2012).

A diferenciação das SCs mielinizantes pode sofrer interferência de vias inibitórias que controlam negativamente a expressão de genes responsáveis pela formação da bainha de mielina. NOTCH1 e JUN (*Jun proto-oncogene/c-Jun; AP-1 transcription factor subunit*) (Parkinson et al., 2004, 2008) destacam-se entre os reguladores negativos do programa de mielinização (Woodhoo, Sommer, 2008; Woodhoo et al., 2009), do mesmo modo que SOX-2 (*SRY-box 2*) (Le et al., 2005), PAX-3 (*paired box 3*) e ID4 (*inhibitor of DNA binding 4, HLH protein*) (Jessen; Mirsky, 2008). O fenótipo mielinizante envolve, ainda, a inativação de um número de genes ligados à produção de marcadores de SCs imaturas, como GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), L1-CAM (*L1 cell adhesion molecule*), NCAM-1 (*neural cell adhesion molecule 1/NCAM/CD56*) e p75NTR (*nerve growth factor receptor/NGFR/CD271/TNFRSF16*) (Decker et al., 2006).

Alguns fatores de transcrição são responsáveis por garantir a maturação apropriada nas SCs (Bremer et al., 2011). SOX-10 (*SRY-box 10*) age sinergicamente com um segundo fator, OCT-6 (*POU class 3 homeobox 1/POU3F1/SCIP*), resultando na expressão de KROX-20 (*early growth response 2/EGR2/CMT1D/CMT4E*) (Arroyo et al., 1998; Bermingham et al., 2006). KROX-20 é indutor fundamental da expressão de genes de mielina, como *MBP* (*myelin basic protein*), *MPZ* (*myelin protein zero; P0*), *MAG* (*myelin associated glycoprotein*) e *PRX* (*periaxin*) (Corfas et al., 2004; Jagalur, et al., 2011). A manutenção do fenótipo mielinizante requer, portanto, a expressão contínua de KROX-20 e SOX-10, considerando que a inativação de ambos resulta em desdiferenciação das SCs (Decker et al., 2006; Bremer et al., 2011).

1.4. Envolvimento das Células de Schwann na Reparação dos Nervos Periféricos

As SCs adultas apresentam a notável capacidade de se desdiferenciar e rediferenciar repetidamente, como observado após a ocorrência de uma lesão no ambiente neural (Monje et al., 2010; Jessen, Mirsky, 2016). Esta plasticidade singular contribui largamente para certa superioridade regenerativa do SNP em relação ao SNC (Fancy et al., 2011; Rambukkana, 2010). No momento em que nervos periféricos sofrem algum tipo de agressão, mecânica ou inflamatória, em sua porção distal, se estabelece o processo denominado degeneração Walleriana (Chen et al., 2007; Allodi et al., 2012). A degeneração Walleriana é caracterizada pela delaminação e retração axonal da bainha de mielina após uma agressão. Com a degradação dessas estruturas, macrófagos migram para o local da lesão, fagocitam restos celulares e tornam-se vacuolizados devido ao acúmulo do conteúdo fagocitado e à saturação metabólica, podendo permanecer desse modo por meses (Saxena, Caroni, 2007).

Outros eventos consequentes da degeneração Walleriana incluem a perda de integridade da barreira hematoneural, migração de fibroblastos, produção de fibras colagênicas, bem como a tentativa de reorganização dessas estruturas durante o reparo (Terenghi, 1999). Os produtos desse processo, juntamente com mediadores secretados por macrófagos, estimulam modificações nas células gliais junto à lâmina basal remanescente, que sofrem alterações de diferenciação e assumem alto potencial proliferativo, promovendo um ambiente de suporte à regeneração axonal (Gaudet et al., 2011). Formam-se então, arranjos tubulares denominados como bandas de Büngner que guiam os axônios proximais de volta aos devidos alvos (Parrinello et al., 2010). Quando a regeneração é bem-sucedida, as extremidades dos axônios, ou cones de crescimento, buscam por um microambiente adequado ao seu restabelecimento (Bixby et al. 1988). Porém, sem fatores neurotróficos e guias adequadas, os neuritos não voltam a se alongar e o espaço perineural é substituído por tecido conjuntivo fibroso (Reynolds, Wolf, 1993). Se a atrofia axonal não se reverte em tempo devido, as SCs se tornam cada vez menos responsivas e quaisquer expectativas de reversão da lesão diminuem progressivamente (Corfas et al., 2004).

Agressões nos nervos periféricos induzem nas SCs um processo caracterizado recentemente como reprogramação celular adaptativa (Jessen, Mirsky, Loyd, 2015). Nesse processo, as células sofrem desdiferenciação, assemelhando-se às células encontradas no

desenvolvimento neural, assumem propriedades reparativas e passam a ser denominadas células de Büngner (Arthur-Farraj et al., 2012). Após dar suporte à regeneração de axônios lesionados, as células de Büngner se rediferenciam e remielinizam os nervos periféricos (Tanaka, Webster, 1991; Heinen et al., 2013). O estabelecimento do fenótipo reparador é acompanhado pela queda na expressão de genes que definem o perfil mielinizante, seguida da elevação de padrões moleculares observados em estágios precoces de desenvolvimento (Yang et al., 2012; Jessen, Mirsky, Loyd, 2015).

A despeito da semelhança com SCs imaturas, as células de Büngner se distinguem por secretar elevados níveis de fatores de crescimento, como GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*), BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NT-3 (*neurotrophin 3*; NTF3), NGF (*nerve growth factor*; NGFB) e VEGF (*vascular endothelial growth factor A*; VEGFA) (Brushart et al., 2013; Wood, Mackinnon, 2015). As células de Büngner participam ativamente da resposta imune, secretando mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*; TNFA/TNFSF2), LIF (*LIF, interleukin 6 family cytokine*; CDF), IL-1 α (*interleukin 1 alpha*), IL-1 β (*interleukin 1 beta*) e CCL2 (*C-C motif chemokine ligand 2*; MCP-1), além de degradar *debris* de mielina que potencialmente poderiam inibir a regeneração axonal (Vidal et al., 2013). A conversão das células de Büngner é controlada por JUN, que tem seus níveis drasticamente aumentados em decorrência de uma lesão neural, por meio de mecanismos ainda pouco conhecidos (Arthur-Farraj et al., 2012; Weiss et al., 2016).

O proto-oncogene JUN está presente em altos níveis nas SCs anteriormente ao estabelecimento do perfil mielinizante e sua expressão é suprimida por KROX-20 durante o processo de diferenciação (Heinen et al., 2013). JUN atua como um importante regulador de maturação celular, opondo-se às funções de KROX-20 (Parkinson et al., 2008). A restrição da atividade de JUN interfere, ainda, na expressão de importantes fatores neurotróficos e proteínas de superfície celular, limitando o potencial de reparo nos nervos periféricos (Arthur-Farraj et al., 2012; Painter et al., 2014).

1.5. Neuropatias Periféricas Infecciosas

As neuropatias periféricas podem ser divididas, conforme a estrutura envolvida, como neuropatias axonais, desmielinizantes ou mistas. Afetam cerca de 2-8% da população mundial

(Ubogu, 2012) e podem resultar de traumas, distúrbios metabólicos, infecções, drogas e toxinas, deficiências nutricionais, neoplasias e processos inflamatórios (White, Jung et al., 2007). Infecções sistêmicas causadas por vírus, bactérias e protozoários representam relevantes causas globais de incapacidades físicas (Brizzi, Lyons, 2014; Sindic, 2013).

A maioria dos microrganismos associados à inflamação neural periférica não infecta diretamente os componentes celulares dos nervos (Neal, Gasque, 2016). O dano neural, em tais circunstâncias, resulta comumente dos efeitos indiretos da infecção, como o mimetismo molecular e depósito de imunocomplexos, com consequente desmielinização e degeneração axonal (Ang et al., 2004).

O *Treponema pallidum* e a *Borrelia burgdorferi*, agentes etiológicos da sífilis e da doença de Lyme, são exemplos de patógenos indutores de neuropatias periféricas e o controle dos mesmos é dado pela ação efetiva de receptores de reconhecimento padrão e pelas células gliais, que estimulam resposta imune eficaz e previnem a infecção intracelular (Halperin, 2003; Goethals et al., 2010). Dois patógenos intracelulares obrigatórios, *Trypanosoma cruzi* e *M. leprae*, se destacam por sua capacidade de interferir na homeostasia e diferenciação das SCs, desencadeando dano neural persistente (Girschick et al., 1996). Os fatores subjacentes à vulnerabilidade das células hospedeiras desses agentes são considerados potenciais alvos terapêuticos (Neal, Gasque, 2016).

Atualmente, o tratamento das neuropatias periféricas infecciosas recai sobre a administração de antimicrobianos e anti-inflamatórios (Lehmann, Hoke, 2010), porém as evidências sobre novos padrões de interação patógeno-hospedeiro (Masaki et al., 2013) permitem valiosas reflexões sobre a participação das SCs na patogênese das neuropatias periféricas, especialmente no que se refere à capacidade de reparo dos tecidos neurais (Glenn, Talbot, 2013).

1.6. Interação Patógeno-Hospedeiro na Hanseníase

As SCs proporcionam um ambiente apropriado à colonização de *M. leprae*, que conserva a viabilidade das células hospedeiras, além de induzir desdiferenciação e proliferação nas mesmas, tornando-as altamente permissivas à invasão bacilar (Tapinos;

Rambukkana, 2005; Rambukkana, 2010). Um efeito inicialmente favorável à sobrevivência de ambos, parasita e célula hospedeira, porém desfavorável à manutenção da homeostasia neural periférica (Tapinos, Ohnishi, Rambukkana, 2006, 2006).

SCs mielinizantes e não-mielinizantes exibem respostas funcionais distintas à infecção pelo *M. leprae*, que preferencialmente invade as células não-mielinizantes. Nessas células maduras e quiescentes, o bacilo induz o reingresso no ciclo de divisão celular a fim de gerar maior disponibilidade de células-alvo (Rambukkana, 2002; Scollard et al., 2006). Aparentemente, a mielina compacta confere certa resistência ao *M. leprae*, porém, nos estágios iniciais da infecção, o comprometimento da integridade celular e subsequente desmielinização, favorece a disseminação do patógeno (Rambukkana, 2004).

O tropismo do *M. leprae* pelas SCs foi atribuído à sua interação, por meio do glicolípido PGL-1 (*phenolic glycolipid 1*), com o complexo formado pelo receptor distroglicana- α e pelo domínio G da cadeia $\alpha 2$ de laminina-2, na superfície das SCs (Rambukkana et al., 1998). Foi observado posteriormente que a colonização dos nervos periféricos pode ser mediada pela ligação do *M. leprae* ao receptor ERBB2 nas SCs (Marques et al., 2001; Soares de Lima et al., 2005).

Estudos prévios indicam que as alterações celulares em decorrência da infecção por *M. leprae* resultam da ativação da via de sinalização ERK1 (*Extracellular signal-regulated kinase 1/MAP kinase 1*; MAPK), (Tapinos, Rambukkana, 2005). ERBB2 parece atuar como um receptor funcional para o estabelecimento da colonização bacteriana, estimulando a via ERK1/2 com subsequente indução de desmielinização precoce. Nesse contexto, o bacilo utilizaria a via ERK1/2 para manipular a diferenciação, proliferação e potencial mielinizante das SCs (Tapinos, Rambukkana, 2005; Tapinos, Ohnishi, Rambukkana, 2006), o que poderia também trazer consequências negativas à capacidade de reparação dos nervos periféricos.

Masaki et al. (2013) constataram que *M. leprae* explora a plasticidade de SCs adultas ao subverter seu programa de diferenciação. Os autores demonstraram que SCs infectadas *in vitro*, sofrem reprogramação ao ponto de se converter em células semelhantes às da crista neural, denominadas células progenitoras *stem-like* (pSLC). Tal conversão se daria por meio da remoção de marcadores de linhagem celular, como SOX-10, e pela manutenção de

marcadores de células tronco, como SOX-2. A configuração do fenótipo SOX-2⁺/SOX-10⁻/p75NTR⁻ torna as células reprogramadas altamente proliferativas, migratórias e imunomodulatórias (Masaki et al. 2013). A permanência de marcadores de linhagem, como SOX-10, é determinante para a rediferenciação eficaz das SCs após agressão e durante o processo de reparo dos nervos periféricos (Finzsch et al, 2010).

Esse estudo se propôs a descrever a expressão de marcadores críticos dentro da linhagem de células de Schwann em cultivo celular e nervos ciáticos de camundongos infectados com *M. leprae*. O estudo busca contribuir para a nossa compreensão sobre mudanças nas células de Schwann após a infecção e sua reprogramação por *M. leprae*, que se acredita estar ligada à neurodegeneração e desmielinização de nervos periféricos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Descrever a expressão de marcadores críticos relacionados à diferenciação e maturação glial, em células de Schwann infectadas experimentalmente por *M. leprae*.

2.2. Objetivos Específicos

Determinar a expressão dos fatores de transcrição KROX-20, SOX-10, JUN e do receptor p75NTR, em cultura primária de células de Schwann obtidas de nervos ciáticos de camundongos da linhagem *Swiss white* (SW), infectadas por *M. leprae*.

Avaliar nervos ciáticos de camundongos *nude* atímicos (NU-*Foxn1^{nu}*) inoculados com *M. leprae*, em seis e nove meses, quanto à expressão de KROX-20, SOX-10, JUN e p75NTR.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais experimentais

O experimento foi conduzido em 20 camundongos da linhagem *Swiss white* (SW) e 36 *nude* atímicos (NU-*Foxn1^{mu}*), com 30 a 60 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima/SES, Bauru/SP. Os nervos ciáticos dos camundongos *nude* foram utilizados para o estudo *in vivo* de infecção por *M. leprae*, enquanto que os nervos ciáticos dos camundongos SW forneceram SCs para avaliações *in vitro*. A morte dos animais foi induzida por sobredose de quetamina 200 mg/kg (Vetnil) e Rompun® 30 mg/kg (Bayer), via intraperitoneal. O manuseio dos animais experimentais esteve em conformidade com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima (CEUA-ILSL, parecer nº 001/16), a partir de Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.2. Isolamento de tecidos e cultivo celular

Os procedimentos a seguir são descritos a partir de Honkanen et al. (2007), Päiväläinen et al. (2008), Liu et al. (2013), Tao (2013) e Lutz (2014).

Os nervos ciáticos foram cuidadosamente destacados de cada epineuro e fragmentados em recipientes contendo solução salina tamponada (PBS. Sigma-Aldrich), a 4 °C. Os fragmentos foram transferidos para um tubo cônico e lavados por centrifugação a 1200 rpm por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-High glucose. Gibco®) com soro fetal bovino 10% (SFB. Sigma-Aldrich), suplementados com heregulina β 1 10 ng/mL (HRG. Sigma-Aldrich), forskolina 2 μ M (Sigma-Aldrich) e penicilina/estreptomicina 1% (Gibco®). Os fragmentos foram mantidos explante por sete dias, em incubadora com 5% de CO₂ com 95% de umidade, a 37 °C.

Em seguida, os espécimes foram centrifugados em 1200 rpm por 5 minutos, a 4 °C, ressuspenso em solução contendo DMEM-Hg, penicilina/estreptomicina 1%, colagenase tipo

I 0,5 mg/mL e dispase II 2,5 mg/mL (Gibco®) e mantidos em incubadora de CO₂, por 24 horas. Ao final do período, o tecido digerido foi homogeneizado em agulhas hipodérmicas graduadas (18G e 21G). A suspensão celular foi filtrada em membrana de 40 µm, transferida para tubo cônico com DMEM-Hg/SFB 10% e centrifugada em 1500 rpm por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspensado em DMEM-Hg/SFB 10% para contagem e teste de exclusão de viabilidade por azul de tripan. A densidade celular foi ajustada para $2,5 \times 10^4$ células/cm². As células foram então semeadas em placas de poliestireno com 24 poços, pré-tratadas com laminina 20 µg/mL (Sigma-Aldrich). A cultura prosseguiu com trocas de meio suplementado a cada 48 horas.

3.3. Obtenção de *M. leprae*

O inóculo foi obtido de passagens seriadas em coxins plantares de camundongos *nude* atômicos (NU-*Foxn1*tm), provenientes do Biotério Central do Instituto Lauro de Souza Lima/SES/SP, Bauru/SP, conforme técnica descrita previamente (Truman, Krahenbuhl, 2001; Trombone et al., 2014). Resumidamente, os animais foram inoculados nos coxins plantares das patas traseiras com 30 µL de suspensão contendo 1×10^8 BAAR/mL, em cada pata. Após quatro meses, os animais foram sacrificados e a suspensão bacilar foi preparada.

3.4. Infecção *in vitro*

As SCs dissociadas dos nervos ciáticos foram divididas em dois grupos experimentais e um grupo controle. O primeiro grupo experimental (ML100) recebeu *M. leprae* vivo na multiplicidade de infecção de 100 bacilos por célula (MOI 100:1). O segundo grupo (ML50) recebeu *M. leprae* vivo na MOI 50:1. O terceiro grupo (CTRL) não recebeu *M. leprae*. Todos os grupos foram cultivados com o mesmo meio de cultura suplementado, antes e depois da incubação com *M. leprae*, que foi mantida nos períodos de sete e 14 dias. As amostras coletadas foram divididas e armazenadas apropriadamente para determinação *in situ* de KROX-20, SOX-10, JUN e p75NTR, por microscopia confocal.

3.5. Infecção *in vivo*

A infecção *in vivo* foi realizada por injeção intradérmica com 100 µL de suspensão bacilar em concentração de 1×10^6 BAAR/mL na região posterior das coxas dos animais, na

altura dos linfonodos poplíteos. Adicionalmente, foram inoculados 30 μ L da mesma suspensão de BAAR nos coxins plantares de cada camundongo. Os animais foram mantidos por seis e nove meses (n=06/período). Ao final de cada período, foram mortos e os respectivos nervos ciáticos, coletados para as mesmas avaliações conduzidas nos ensaios *in vitro*. Nervos de camundongos *nude* atímicos não infectados (n=03/período) foram utilizados como controle.

3.6. Morfologia e determinação do índice baciloscópico

Parte das amostras foi destinada à avaliação baciloscópica por coloração de Fite-Faraco, em microscopia óptica comum. O índice baciloscópico foi determinado pela contagem de BAAR em 100 a 200 células infectadas, por amostra. Brevemente, os espécimes foram deixados em óleo mineral por 30 minutos, em estufa a 60°C, o excesso de óleo, no final do período, foi removido com água corrente e as amostras foram secas suavemente com papel filtro. Posteriormente, fucsina filtrada foi adicionada e deixada por 30 minutos, então, as amostras foram lavadas com água corrente, para remoção do excesso de fucsina, depois, foram passadas no diferenciador de duas a três vezes dependendo do tamanho do espécime. Após o diferenciador, as amostras foram lavadas com água corrente, coradas com azul de metileno por 10 a 15 segundos, lavadas com água corrente para retirar o excesso do corante, passadas quatro vezes em álcool absoluto e três vezes no xilol e por fim, as lâminas foram montadas com Permount.

3.7. Imunofluorescência

Os espécimes coletados foram fixados em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich), por 15 minutos em temperatura ambiente (TA) e lavados em PBS. Em seguida, parte das amostras foi permeabilizada com PBS/Triton X-100 0,25%, por 10 minutos. Após lavagem em PBS, foi realizado bloqueio de ligações inespecíficas com albumina de soro bovino 1% (BSA) e glicina 22,52 mg/mL em PBST (PBS/Triton X-100 0,1%). Após 30 minutos, as amostras foram incubadas com anticorpos primários específicos para os alvos, KROX-20 (Convance, PRB-236P), JUN (Abcam, clone E254), SOX-10 (Santa Cruz Biotechnology, clone G-11) e p75NTR (Santa Cruz Biotechnology, clone ME20.4), diluídos em PBST com BSA 1% e soro normal de cabra 10% (NGS), *overnight*, a 4 °C. Seguindo-se o período de incubação, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpos secundários conjugados aos

fluorocromos AlexaFluor® 488 e 594 (Molecular Probes®), diluídos em PBST/BSA 1%, por 60 minutos, em TA e protegidos de luz. Os núcleos celulares foram corados pelo reagente DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindole, dihidroclorídrico. Molecular Probes®). Após 10 minutos, os espécimes foram lavados, montados glicerina tamponada com azul de Evans, vedados e armazenados a -20 °C. A captura de imagens foi realizada em microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 (Leica, Germany), e *software* de processamento de imagem LAS AF (Leica, Germany).

O critério adotado para de análise das imagens foi a obtenção da frequência relativa dos alvos de interesse desse estudo, calculada pela razão do número de células positivas para cada marcador sobre o número total de células DAPI⁺.

3.8. Análise Estatística

A análise dos resultados foi executada no *software* GraphPad Prism 5.01® (GraphPad Inc. USA). Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para comparação em grupos controle e experimentais. Eventualmente, em amostra com menos de três grupos, foi utilizado teste de Mann-Whitney. Os resultados encontram-se expressos em mediana. Valores de $p < 0,05$ são considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia celular e identificação de *M. leprae*

A microscopia em contraste de fase e coloração de Hematoxilina-Eosina confirmaram a morfologia tripolar ou fusiforme das SCs, enquanto que células planas ou poligonais foram reconhecidas como fibroblastos (Pannunzio et al., 2005; Liu et al., 2015) (Figura 1). Parte do cultivo celular foi corada pela técnica de Fite-Faraco e submetida à contagem baciloscóptica (Figura 2).

Após sete dias, o grupo ML50 apresentou média de 13,12 bacilos/célula, indicando 26,24% de multiplicidade de infecção em relação à inicial de 50 bacilos/célula. No grupo ML100, foram observados em média 17,92 bacilos/célula após sete dias, correspondendo a 17,92% da multiplicidade de infecção inicial, 100 bacilos/célula. Após 14 dias, o grupo ML50 apresentou média de 5,50 bacilos/célula, indicando 11% de multiplicidade de infecção, em relação à inicial, enquanto que no grupo ML100 foram contados em média, 8,66 bacilos/célula, correspondendo a 8,66% da multiplicidade de infecção inicial.

Concomitantemente, os nervos ciáticos de camundongos *nude* infectados também foram corados por Hematoxilina-Eosina e Fite-Faraco para investigação de *M. leprae* no interior da estrutura neural (Figura 2). Após seis meses de infecção, as fibras nervosas não apresentaram sinal de degeneração. Nesses espécimes também não se observou bacilos no interior das fibras nervosas. Após nove meses, observou-se invasão bacilar perineural nos ciáticos infectados, embora também não tenham sido encontrados sinais de degeneração neural.

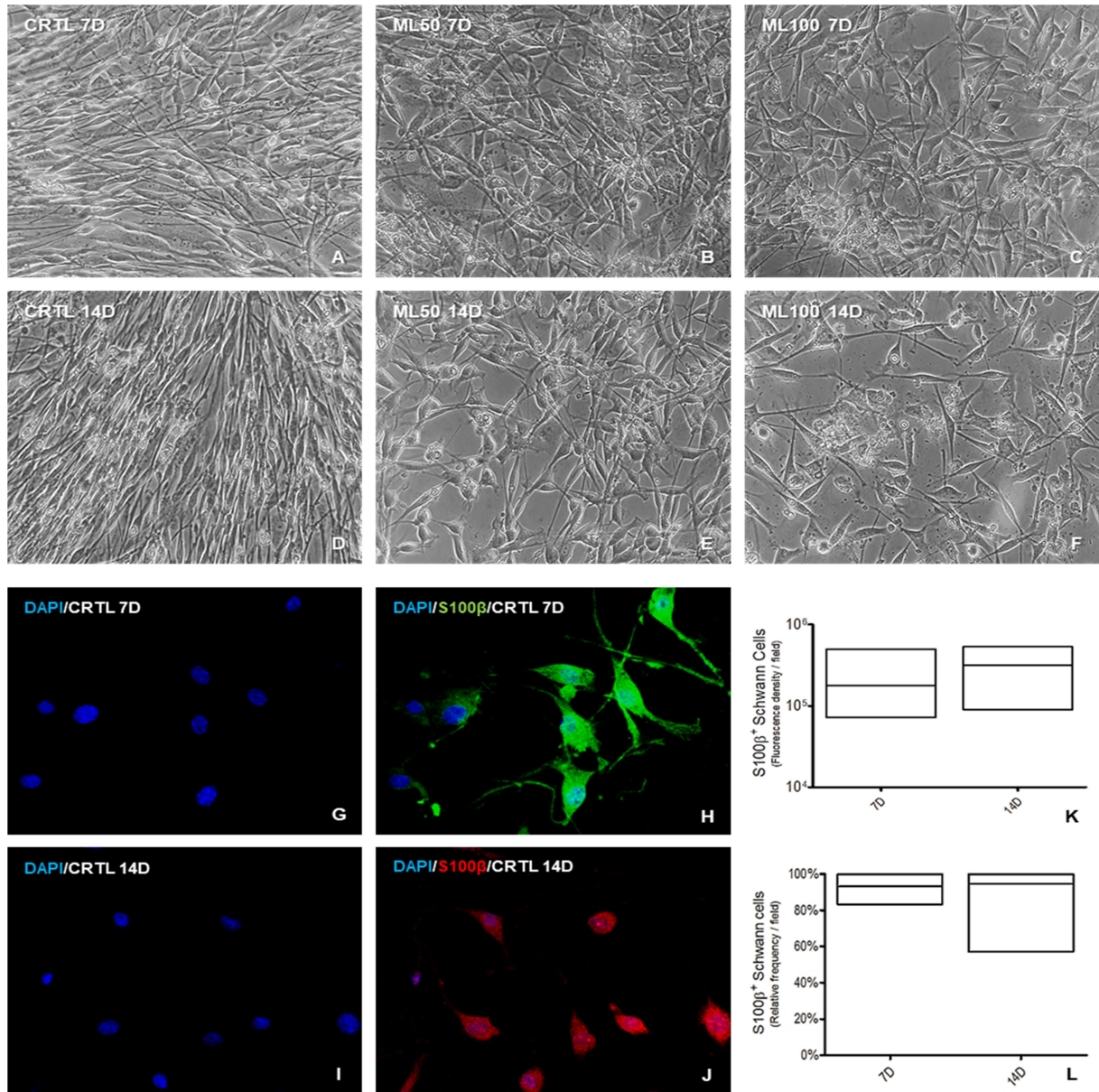


Figura 1. Cultura primária de células de Schwann (SCs). (A-J) Caracterização por contraste de fase e imunofluorescência em SCs obtidas de nervos ciáticos de camundongos Swiss white. Contraste de fase de SCs cultivadas por sete dias (A-C) e 14 dias (D-F). Grupos controle (A, D) e experimentais (B, C, E, F) expostos a *M. leprae* nas multiplicidades de infecção (MOI) de 50 bacilos/célula (B, E) e 100 bacilos/célula (C, F). Microscopia confocal demonstrando imunodeteção da proteína S100β (verde: AlexaFluor 488®; vermelho: AlexaFluor 594®) e marcação nuclear por DAPI (azul) em SCs após sete (G, H) e 14 dias (I, J). Gráficos de barra indicam densidade integral de fluorescência (K) e frequência relativa (L) de SCs marcadas por S100β. Teste estatístico de Mann Whitney com $p > 0,05$. Dados expressos por medianas de dois ensaios independentes, nos quais foram avaliados três a 10 campos microscópicos/ensaio/grupo. Aumento microscópico: 400x (A-F) e 630x (G-J). CTRL = controle; ML50 = *M. leprae*/SC MOI 50:1; ML100 = *M. leprae*/SC MOI 100:1; 7D = sete dias; 14D = quatorze dias

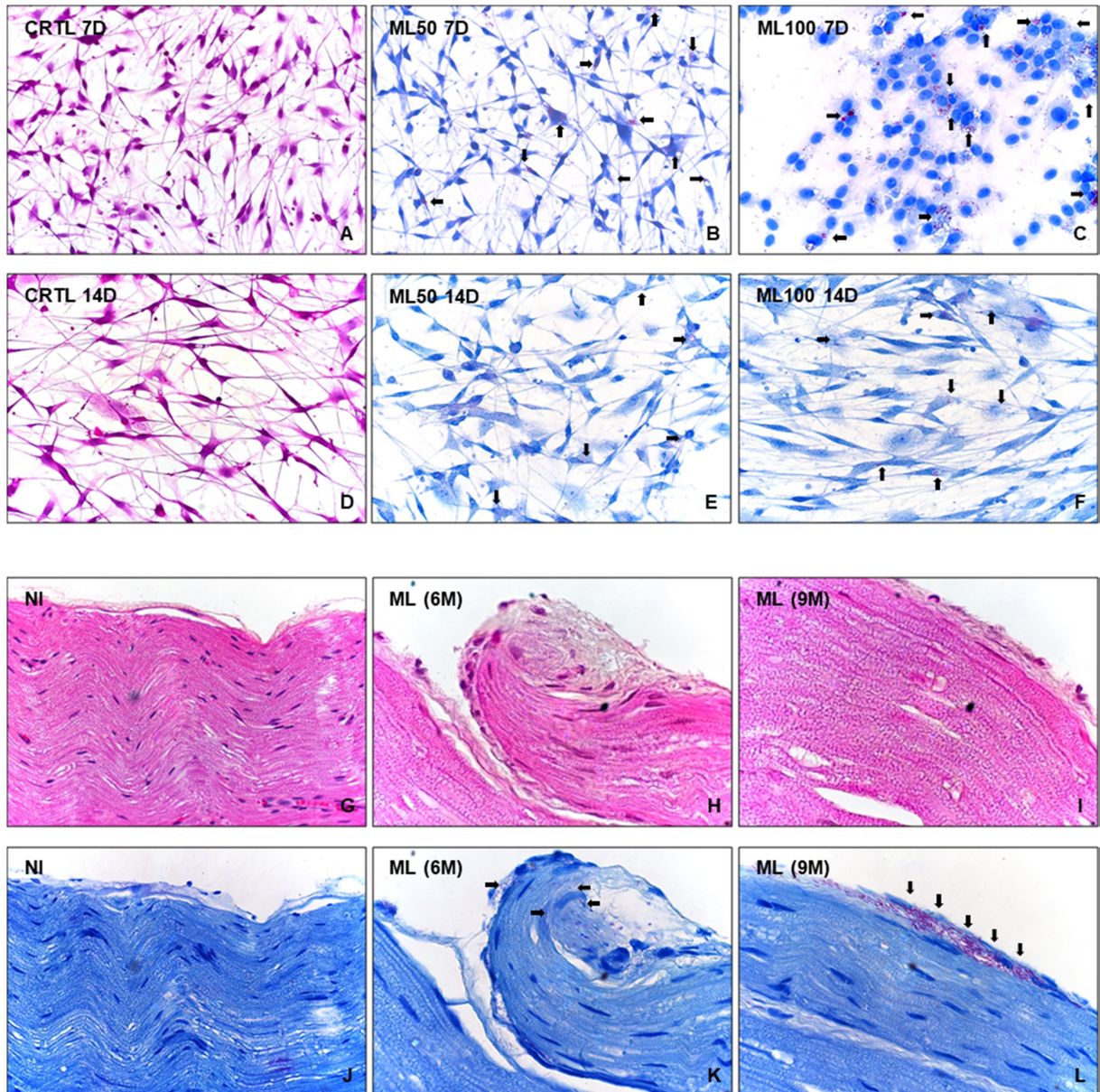


Figura 2. Células de Schwann (SCs) e nervos ciáticos murinos após infecção experimental por *M. leprae*. Avaliação morfológica por coloração de Hematoxilina-Eosina (A, D; G-I) e identificação de bacilos intracelulares por coloração de Fite-Faraco (B, C, E, F; J-L). Cultura primária de SCs de camundongos Swiss white, mantidas de sete (A-C) a 14 dias (D-F) e estimuladas por *M. leprae* (setas) nas multiplicidades de infecção (MOI), 50 bacilos/célula (B, E) e 100 bacilos/célula (C, F). Fragmentos de nervos ciáticos de camundongos atímicos nude não infectados (G, J) e infectados por *M. leprae* (setas) (1×10^6 bacilos/ml) ao longo de seis (H, K) e nove meses (I, L). Imagens celulares selecionadas de dois ensaios independentes/grupo. Imagens de nervos ciáticos selecionadas de cinco espécimes/grupo. Aumento microscópico: 400x. CTRL = controle; ML50 = *M. leprae*/SC MOI 50:1; ML100 = *M. leprae*/SC MOI 100:1; 7D = sete dias; 14D = quatorze dias; NI = não infectado; ML (6M) = *M. leprae* (seis meses); ML (9M) = *M. leprae* (nove meses)

4.2. *M. leprae* modula KROX-20 e SOX-10 em modelo murino de infecção

A avaliação da cultura primária de SCs indicou elevação de KROX-20 no grupo CTRL em relação a ML100 ($p < 0,001$) após 14 dias de incubação com *M. leprae*, enquanto que aos sete dias de infecção KROX-20 não apresentou alterações estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 3). Em nervos ciáticos de camundongos *nude* infectados por *M. leprae*, foi constatada maior expressão de KROX-20 no grupo não infectado em relação aos grupos experimentais de seis ($p < 0,01$) e nove meses ($p < 0,001$) (Figura 4).

Na determinação da expressão de SOX-10 em cultura primária de SCs expostas a *M. leprae*, observou-se redução no grupo ML100 em relação ao CTRL após sete dias ($p < 0,05$). Aos 14 dias de cultivo celular, a expressão de SOX-10 não demonstrou alterações estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 5). Durante infecção experimental em nervos ciáticos de camundongos *nude*, SOX-10 não demonstrou alterações estatisticamente significantes entre os grupos (Figura 6).

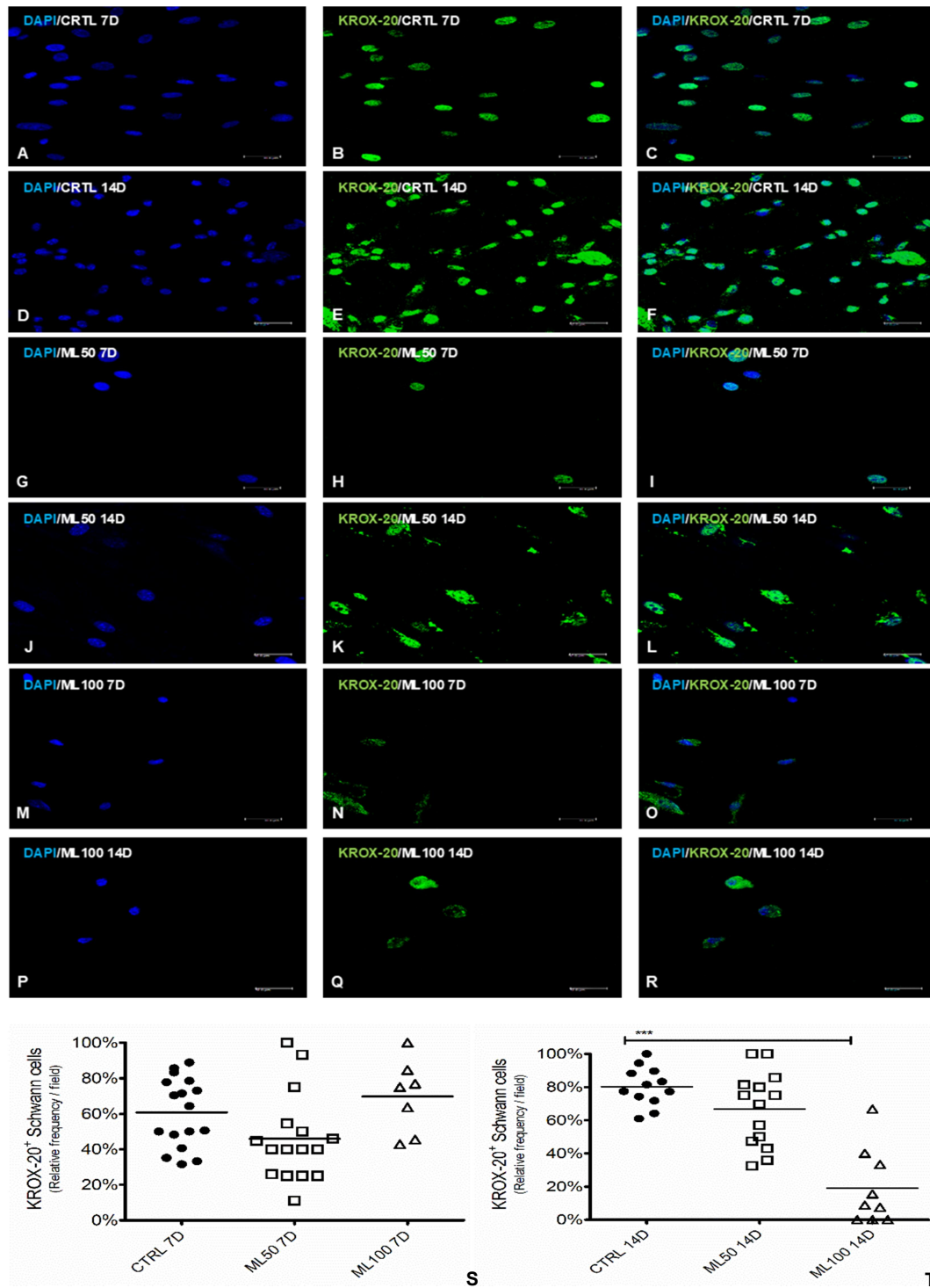


Figura 3. Detecção de KROX-20 em Cultura primária de células de Schwann (SCs). Microscopia confocal demonstra imunodeteção do fator de transcrição KROX-20 (verde: AlexaFluor 488®) e marcação nuclear por DAPI (azul) em SCs, após sete e 14 dias. Grupos controle (A-F), não infectados e experimentais, expostos a *M. leprae* nas multiplicidades de infecção (MOI) de 50 bacilos/célula (G-L) e 100 bacilos/célula (M-R). Gráficos ilustram frequência relativa de SCs marcadas por KROX-20 (S, T). Teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,001$ (***) em 14 dias. Dados expressos por medianas de dois ensaios independentes, nos quais foram avaliados três a 10 campos microscópicos/ensaio/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30 μ m. CTRL = controle; ML50 = *M. leprae*/SC MOI 50:1; ML100 = *M. leprae*/SC MOI 100:1; 7D = sete dias; 14D = quatorze dias

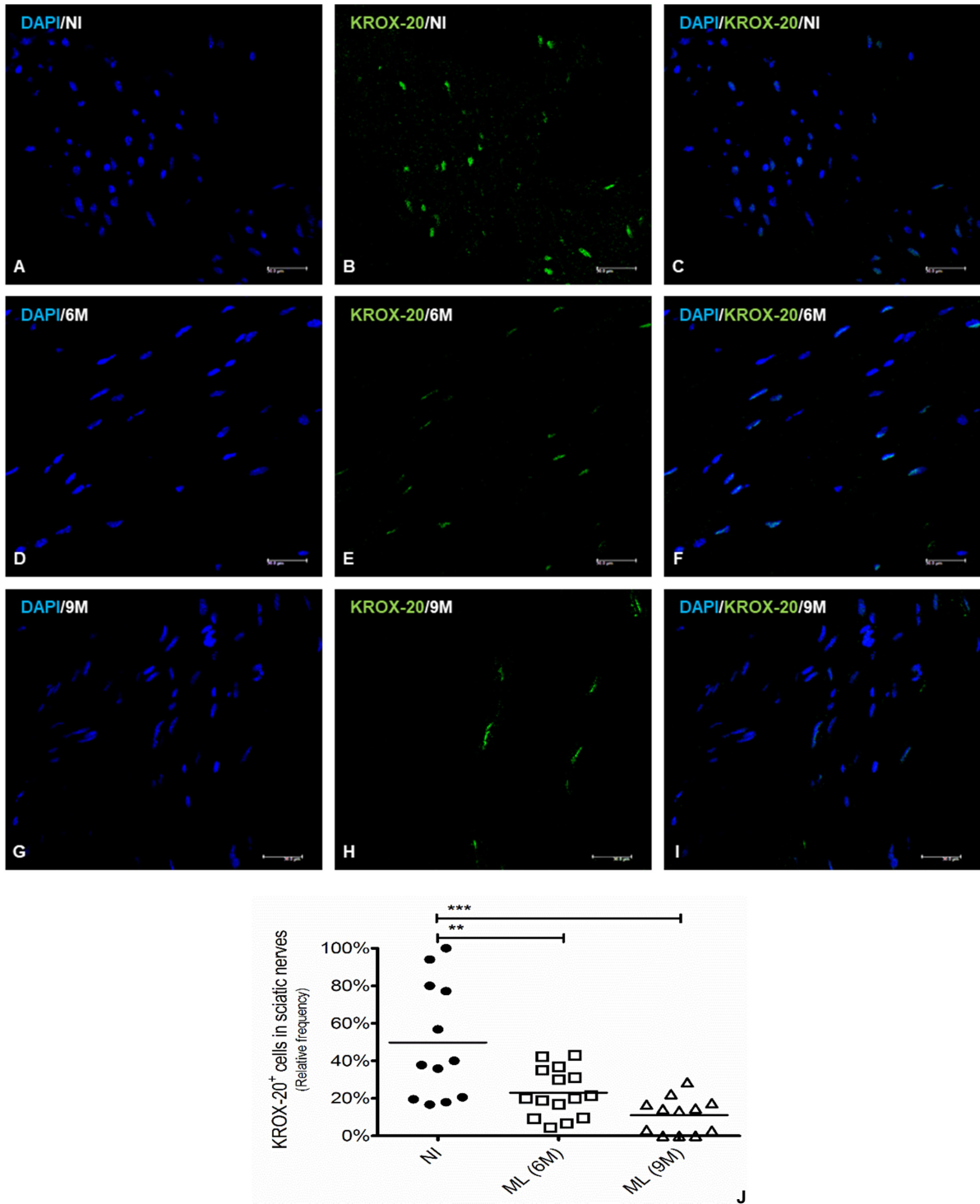


Figura 4. KROX-20 em nervos ciáticos de camundongos nude após infecção experimental por *M. leprae*. Imunodeteção de KROX-20 (verde: AlexaFluor 488®) em fragmentos de nervos ciáticos não infectados (A-C) e infectados por *M. leprae* (1×10^6 bacilos/ml) ao longo de seis (D-F) e nove meses (G-I). Gráfico com frequência relativa de KROX-20 (J) indica maior expressão nos animais não infectados em relação aos grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,01$ (**) em NI x 6M e $p < 0,001$ (***) em NI x 9M. Imagens selecionadas a partir de três campos/cinco espécimes/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30 μ m. NI = não infectado; ML (6M) = *M. leprae* (seis meses); ML (9M) = *M. leprae* (nove meses)

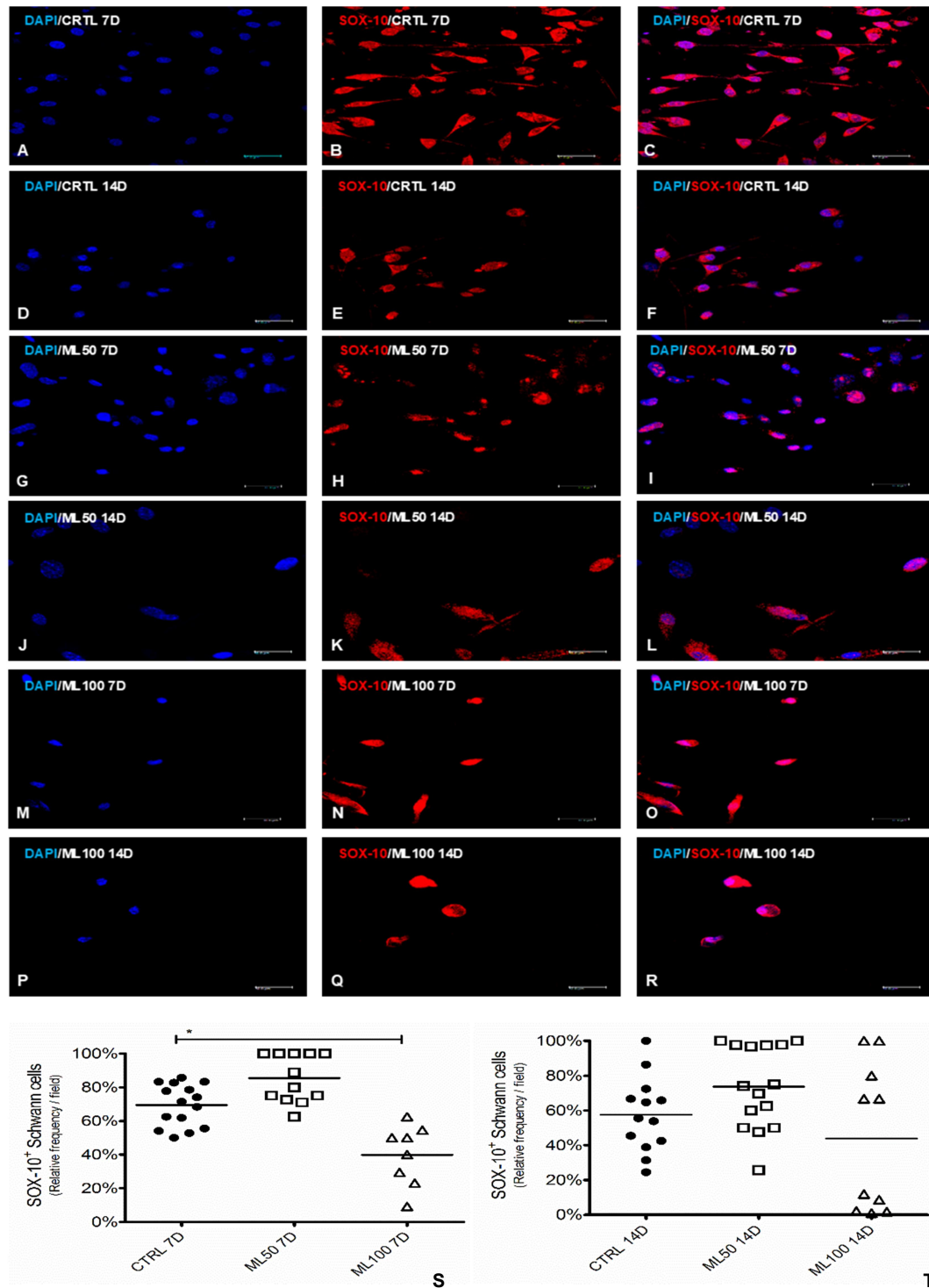


Figura 5. Detecção de SOX-10 em Cultura primária de células de Schwann (SCs). Microscopia confocal demonstra imunodeteção do fator de transcrição SOX-10 (vermelho: AlexaFluor 594®) e marcação nuclear por DAPI (azul) em SCs, após sete e 14 dias. Grupos controle (A-F), não infectados e experimentais, expostos a *M. leprae* nas multiplicidades de infecção (MOI) de 50 bacilos/célula (G-L) e 100 bacilos/célula (M-R). Gráficos ilustram frequência relativa de SCs marcadas por SOX-10 (S, T). Teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$ (*) em sete dias. Dados expressos por medianas de dois ensaios independentes, nos quais foram avaliados três a 10 campos microscópicos/ensaio/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30 μ m. CTRL = controle; ML50 = *M. leprae*/SC MOI 50:1; ML100 = *M. leprae*/SC MOI 100:1; 7D = sete dias; 14D = quatorze dias

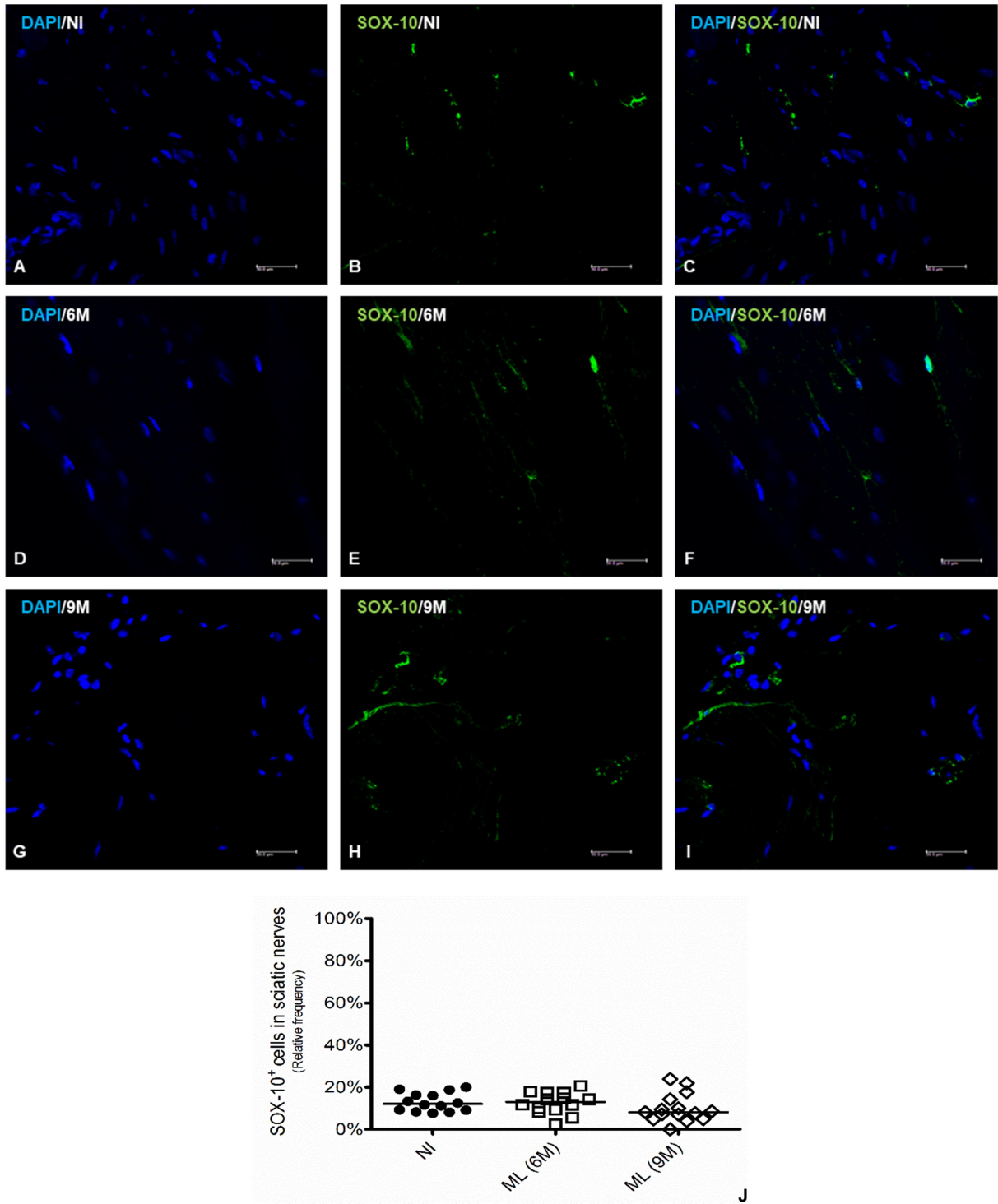


Figura 6. SOX-10 em nervos ciáticos de camundongos nude após infecção experimental por *M. leprae*. Imunodeteção de SOX-10 (vermelho: AlexaFluor 594®) em fragmentos de nervos ciáticos não infectados (A-C) e infectados por *M. leprae* (1×10^6 bacilos/ml) ao longo de seis (D-F) e nove meses (G-I). Gráfico com frequência relativa de SOX-10 (J). Teste de Kruskal-Wallis com $p > 0,05$. Imagens selecionadas a partir de três campos/cinco espécimes/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30 μ m. NI = não infectado; ML (6M) = *M. leprae* (seis meses); ML (9M) = *M. leprae* (nove meses)

4.3. Células e nervos infectados por *M. leprae* demonstram aumento p75NTR

Em cultura primária de SCs expostas a *M. leprae* durante sete e 14 dias, foi observada menor expressão de p75NTR nos grupos CTRL, quando comparada a ML100 (sete dias, $p < 0,001$; 14 dias, $p < 0,05$) (Figura 7). Do mesmo modo, em nervos ciáticos de camundongos *nude* a expressão de p75NTR foi significativamente menor nos animais não infectados em relação aos infectados durante seis ($p < 0,001$) e nove meses ($p < 0,001$) (Figura 8).

A avaliação da expressão de JUN em SCs murinas expostas ao *M. leprae* durante sete e 14 dias, não indicou diferenças significantes entre grupos controle e experimentais (Figura 9). Na avaliação *in vivo* de nervos ciáticos de camundongos *nude*, não houve expressão de JUN suficiente para análise de dados, sendo que após nove meses apenas três campos de um único espécime (N5) apresentaram núcleos marcados por JUN e aos seis meses apenas um campo microscópico (N2) demonstrou imunomarcção para JUN.

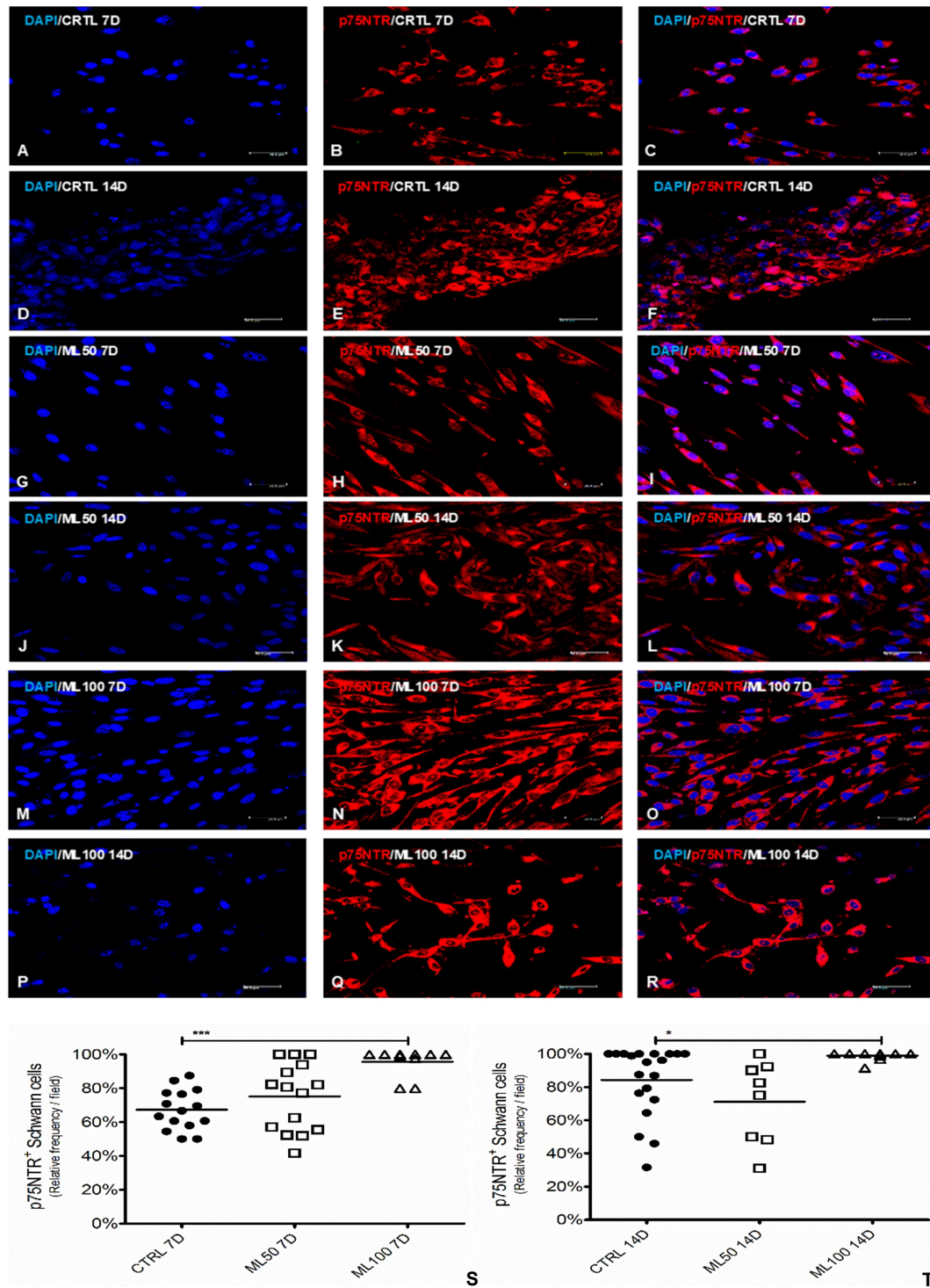


Figura 7 Detecção de p75NTR em Cultura primária de células de Schwann (SCs). Microscopia confocal demonstra imunodeteção do receptor p75NTR (vermelho: AlexaFluor 594®) e marcação nuclear por DAPI (azul) em SCs, após sete e 14 dias. Grupos controle (A-F), não infectados e experimentais, expostos a *M. leprae* nas multiplicidades de infecção (MOI) de 50 bacilos/célula (G-L) e 100 bacilos/célula (M-R). Gráficos ilustram frequência relativa de SCs marcadas por p75NTR (S-T). Teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,001$ (***) em sete dias e $p < 0,05$ (*) em 14 dias. Dados expres sos por medianas de dois ensaios independentes, nos quais foram avaliados três a 10 campos microscópicos/ensaio/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30 μ m. CTRL = controle; ML50 = *M. leprae*/SC MOI 50:1; ML100 = *M. leprae*/SC MOI 100:1; 7D = sete dias; 14D = quatorze dias

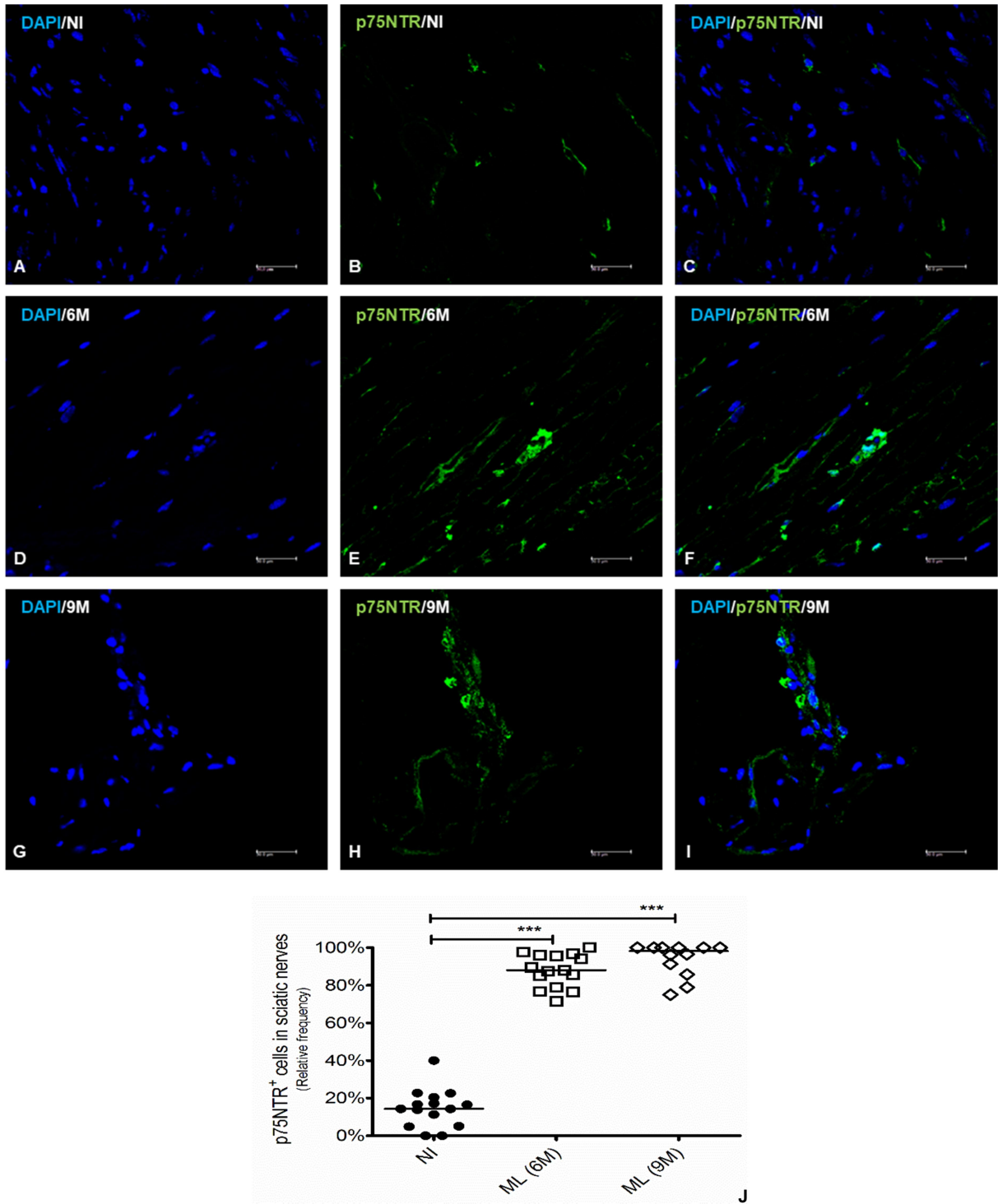


Figura 8. P75NTR em nervos ciáticos de camundongos nude após infecção experimental por *M. leprae*. Imunodeteção de p75NTR (vermelho: AlexaFluor 594®) em fragmentos de nervos ciáticos não infectados (A-C) e infectados por *M. leprae* (1×10^6 bacilos/ml) ao longo de seis (D-F) e nove meses (G-I). Gráfico com frequência relativa de p75NTR (J) indica menor expressão nos animais não infectados em relação aos grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,001$ (***) em NI x 6M e NI x 9M. Imagens selecionadas a partir de três campos/cinco espécimes/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30µm. NI = não infectado; ML (6M) = *M. leprae* (seis meses); ML (9M) = *M. leprae* (nove meses)

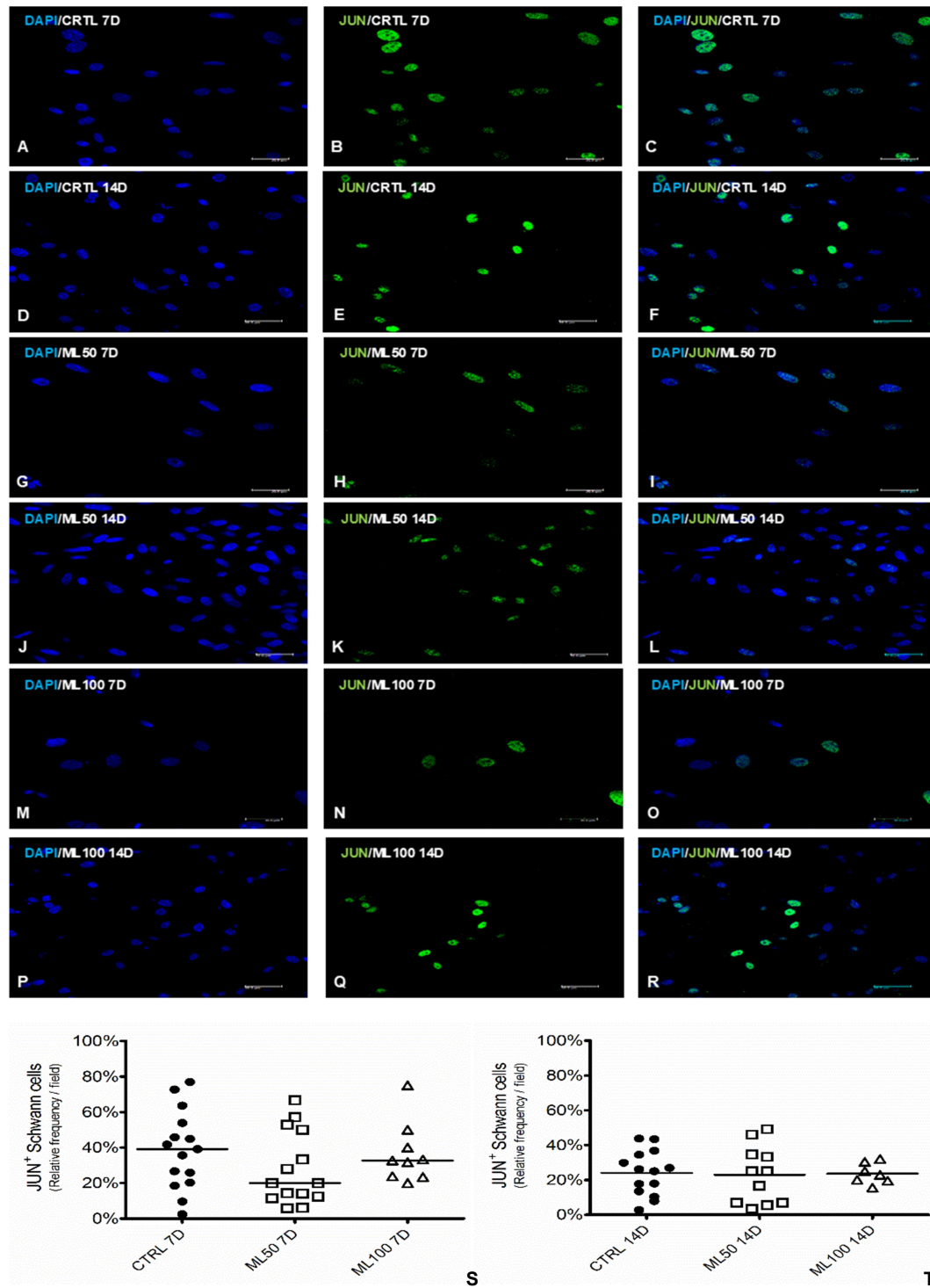


Figura 9. Detecção de JUN em Cultura primária de células de Schwann (SCs). Microscopia confocal demonstra imunodeteção do fator de transcrição JUN (verde: AlexaFluor 488®) e marcação nuclear por DAPI (azul) em SCs, após sete e 14 dias. Grupos controle (A-F), não infectados e experimentais, expostos a *M. leprae* nas multiplicidades de infecção (MOI) de 50 bacilos/célula (G-L) e 100 bacilos/célula (M-R). Gráficos ilustram frequência relativa de SCs marcadas por JUN (S-T). Teste de Kruskal-Wallis com valores de $p > 0,05$. Dados expressos por medianas de dois ensaios independentes, nos quais foram avaliados três a 10 campos microscópicos/ensaio/grupo. Aumento: 630x; Barra: 30 μ m. CTRL = controle; ML50 = *M. leprae*/SC MOI 50:1; ML100 = *M. leprae*/SC MOI 100:1; 7D = sete dias; 14D = quatorze dias

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Esse estudo buscou contribuir com o entendimento sobre mudanças nas células de Schwann após a infecção por *M. leprae*, descrevendo a expressão de marcadores críticos relacionados à diferenciação e maturação glial. Os fatores de transcrição KROX-20, SOX-10, JUN e o receptor p75NTR foram avaliados, *in vitro*, em cultura primária de SCs obtidas de nervos ciáticos de camundongos da linhagem *Swiss white* (SW), bem como *in vivo*, em nervos ciáticos de camundongos *nude* atímicos (NU-*Foxn1^{mut}*) com seis e nove meses de inoculação por *M. leprae*.

O desenvolvimento da linhagem glial e a mielinização de nervos periféricos são regulados centralmente por fatores de transcrição como SOX-10 e KROX-20 (Decker et al., 2006). Em nervos periféricos adultos, SCs mielinizantes podem se desdiferenciar quando removidas do contato axonal ou logo após agressões traumáticas nos nervos (Parkinson et al., 2008, Kim et al., 2013). Nessas células observa-se a reindução de marcadores de SCs imaturas, como JUN e p75NTR, concomitantemente à redução dos níveis de KROX-20 (Webber, Zochodne, 2010).

A relevância de KROX-20 na maturação das SCs é inequivocamente ilustrada em estudos sobre mutações no gene *EGR2* humano associadas à mielinopatias periféricas, incluindo a Síndrome de Charcot-Marie-Tooth e formas mais graves da Síndrome de Dejerine-Sottas (Bellone et al., 1999). A inibição de KROX-20 é também observada em neuropatias desmielinizantes não hereditárias, como a Síndrome de Guillain-Barré (Szigeti et al., 2007). Em linha, nossos resultados demonstram que *M. leprae* regula negativamente a expressão de KROX-20 em SCs de camundongos, *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que o bacilo compromete o fenótipo mielinizante dessas células.

Embora SOX-10 seja exigido em todos os estágios de desenvolvimento da linhagem glial, acredita-se que sua expressão não se altera após lesão traumática de nervos periféricos, ocasião em que SCs modificam-se em células reparadoras de Büngner (Hyung et al., 2015; Balakrishnan et al., 2016). Nossos resultados indicam que *M. leprae* pode molular a expressão de SOX-10 em SCs, após sete dias de cultivo celular. Esses dados corroboram resultados

prévios, de Masaki et al. (2013), que observaram falta de translocação nuclear de SOX-10 aos 10 dias de infecção *in vitro* (Masaki et al., 2013).

Em nosso experimento observamos que a infecção por *M. leprae* em SCs e nervos ciáticos foi capaz de elevar significativamente a frequência de células positivas para p75NTR. Segundo Liu et al. (2015), esse receptor tem maior expressão em nervos ciáticos de camundongos recém-nascidos em relação aos adultos (Liu et al., 2015). Paralelamente, nervos periféricos adultos submetidos a dano neural demonstram uma drástica elevação de p75NTR (Meeker, Williams, 2014). Embora não tenhamos constatado sinais importantes de degeneração neural em nosso experimento *in vivo*, a elevação de p75NTR em nervos ciáticos infectados por *M. leprae* sugere um aumento de células não mielinizantes no ambiente neural adulto, o que cronicamente pode interferir na homeostasia dos nervos periféricos.

A concepção de que p75NTR desempenha papel essencial na proteção e reparo neural se confirma a partir de evidências sobre a deficiência de remielinização em nervos ciáticos de camundongos *knockout* para p75NTR, submetidos a indução de dano neural (Fontana et al., 2012). Adicionalmente, em modelo animal de esclerose lateral amiotrófica (ELA), a expressão de p75NTR foi correlacionada com a extensão do processo degenerativo (Shepherd et al., 2014), do mesmo modo que em modelo animal da Síndrome de Alzheimer, o envolvimento de p75NTR foi correlacionado com a progressão da doença (Yang et al., 2008).

A plasticidade das SCs adultas está entre os pré-requisitos para o retorno à homeostasia após a incidência de dano neural (Kim et al., 2013) e nesse contexto, JUN tem papel crucial no programa de reparo tecidual, fornecendo suporte à regeneração de axônios previamente degenerados. Por outro lado, a deficiência de JUN após uma agressão neural pode acarretar padrões disfuncionais de reparo, resultando em morte neuronal (Arthur-Farraj et al., 2012; Jessen, Mirsky, 2016).

Weiss et al. (2016) demonstraram elegantemente que entre os fatores associados ao programa de reparo, JUN foi fortemente expresso em culturas de SCs humanas e explantes de fascículos neurais periféricos (Weiss et al., 2016). No presente estudo buscamos determinar a expressão desse mesmo fator de transcrição em modelo murino de experimentação animal. No entanto, nossos ensaios *in vitro* não indicaram alterações significativas na expressão de JUN

em SCs dissociadas de nervos ciáticos e expostas a preparações de *M. leprae* em diferentes multiplicidades de infecção. Ainda assim, acreditamos que estudos adicionais possam contribuir para um melhor entendimento sobre a relação entre esse patógeno intracelular e a indução de JUN em suas células-alvo.

Nos nervos de camundongos *nude* inoculados com *M. leprae* por seis e nove meses, a frequência deficiente de JUN não viabilizou uma análise segura de dados. Em nervos adultos a expressão JUN é praticamente inexistente, embora este cenário mude nos processos patológicos quando esse fator é induzido para estimular o reparo neural (Parkinson et al., 2008; Arthur-Farraj et al., 2012). Em nosso estudo a reação neural à infecção por *M. leprae* parece não ter sido suficiente para elevar a expressão de JUN. Concluimos aqui, que a infecção por *M. leprae* via fossa poplítea, em nervos ciáticos de camundongos *nude* parece não ser suficiente para causar alterações degenerativas importantes.

Não obstante, nossos achados indicam a regulação negativa de KROX-20 e SOX-10, juntamente com o aumento de p75NTR em SCs e nervos ciáticos murinos infectados por *M. leprae*. Tais alterações podem estar associadas a um possível déficit de remielinização em nervos afetados pela hanseníase e acreditamos que devam ser foco contínuo de investigação.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Em conjunto e sob as condições ensaiadas, nossos dados corroboram afirmações sobre a interferência de *M. leprae* na expressão de fatores envolvidos na maturação celular, favorecendo manutenção de fenótipo não mielinizante nas SCs, com possíveis implicações na reparação de nervos periféricos adultos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol.* 2012 Jul;98(1):16-37.

Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet.* 2008 Apr;123(3):227-35.

Ang CW, Jacobs BC, Laman JD. The Guillain-Barré syndrome: a true case of molecular mimicry. *Trends Immunol.* 2004 Feb;25(2):61-6.

Antunes DE, Araujo S, Ferreira GP, Cunha AC, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart IM. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013 Nov;108(7):901-8.

Araujo S, Rezende MM, Sousa DC, Rosa MR, Santos DC, Goulart LR, Goulart IM. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Nov Dec;48(6):739-45.

Arroyo EJ, Bermingham JR Jr, Rosenfeld MG, Scherer SS. Promyelinating Schwann cells express Tst-1/SCIP/Oct-6. *J Neurosci.* 1998 Oct 1;18(19):7891-902.

Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, Woodhoo A, Jenkins B, Rahman M, Turmaine M, Wicher GK, Mitter R, Greensmith L, Behrens A, Raivich G, Mirsky R, Jessen KR. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron.* 2012 Aug 23;75(4):633-47.

Balakrishnan A, Stykel MG, Touahri Y, Stratton JA, Biernaskie J, Schuurmans C. Temporal analysis of gene expression in the murine Schwann cell lineage and the acutely injured postnatal nerve. *PLoS One.* 2016 Apr 8; 11(4): e0153256.

Bellone E, Di Maria E, Soriani S, Varese A, Doria LL, Ajmar F, et al. A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat.* 1999; (14): 353–354.

Bermingham JR Jr, Shearin H, Pennington J, O'Moore J, Jaegle M, Driegen S, van Zon A, Darbas A, Ozkaynak E, Ryu EJ, Milbrandt J, Meijer D. The claw paw mutation reveals a role for *Lgi4* in peripheral nerve development. *Nat Neurosci.* 2006 Jan;9(1):76-84.

Bhat RM, Prakash C. Leprosy: an overview of pathophysiology. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012;2012:181089.

Bixby JL, Lilien J, Reichardt LF. Identification of the major proteins that promote neuronal process outgrowth on Schwann cells in vitro. *J Cell Biol.* 1988 Jul;107(1):353-61.

Boku N, Lockwood DN, Balagon MV, Pardillo FE, Maghanoy AA, Mallari IB, Cross H. Impacts of the diagnosis of leprosy and of visible impairments amongst people affected by leprosy in Cebu, the Philippines. *Lepr Rev.* 2010 Jun;81(2):111-20.

Bremer M, Fröb F, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Suter U, Wegner M. *Sox10* is required for Schwann-cell homeostasis and myelin maintenance in the adult peripheral nerve. *Glia.* 2011 Jul;59(7):1022-32.

Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR. Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):545-57.

Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209-19.

Brizzi KT, Lyons JL. Peripheral nervous system manifestations of infectious diseases. *Neurohospitalist.* 2014 Oct;4(4):230-40.

Brushart TM, Aspalter M, Griffin JW, Redett R, Hameed H, Zhou C, Wright M, Vyas A, Höke A. Schwann cell phenotype is regulated by axon modality and central-peripheral location, and persists in vitro. *Exp Neurol.* 2013 Sep;247:272-81.

Chang RB, Stochlic DE, Williams EK, Umans BD, Liberles SD. Vagal Sensory Neuron Subtypes that Differentially Control Breathing. *Cell*. 2015 Apr 23;161(3):622-33.

Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:209-33.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1007-11.

Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci*. 2004 Oct 20;24(42):9250-60.

Crawford AT, Desai D, Gokina P, Basak S, Kim HA. E-cadherin expression in postnatal Schwann cells is regulated by the cAMP-dependent protein kinase a pathway. *Glia*. 2008 Nov 15;56(15):1637-47.

Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat JM, Charnay P. Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci*. 2006 Sep 20;26(38):9771-9.

Ebenezer GJ, Hauer P, Gibbons C, McArthur JC, Polydefkis M. Assessment of epidermal nerve fibers: a new diagnostic and predictive tool for peripheral neuropathies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 Dec;66(12):1059-73.

Fachin LR, Soares CT, Belone AF, Trombone AP, Rosa PS, Guidella CC, Franco MF. Immunohistochemical assessment of cell populations in leprosy-spectrum lesions and reactional forms. *Histol Histopathol*. 2017 Apr;32(4):385-396. doi:10.14670/HH-11-804.

Fancy SP, Harrington EP, Yuen TJ, Silbereis JC, Zhao C, Baranzini SE, Bruce CC, Otero JJ, Huang EJ, Nusse R, Franklin RJ, Rowitch DH. Axin2 as regulatory and therapeutic target in newborn brain injury and remyelination. *Nat Neurosci*. 2011 Jun 26;14(8):1009-16.

Finzsch M, Schreiner S, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Bösl MR, Meijer D, Wegner M. Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *J Cell Biol*. 2010 May 17;189(4):701-12.

Fontana X, Hristova M, Da Costa C, Patodia S, Thei L, Makwana M, et al. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *J Cell Biol*. 2012 Jul 9; 198(1): 127-41.

Franco-Paredes C, Rodriguez-Morales AJ. Unsolved matters in leprosy: a descriptive review and call for further research. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016 May 21;15(1):33.

Garbino JA, Heise CO, Marques W Jr. Assessing nerves in leprosy. *Clin Dermatol*. 2016 Jan-Feb;34(1):51-8.

Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2011 Aug 30;8:110.

Girschick HJ, Huppertz HI, Rüssmann H, Krenn V, Karch H. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol Int*. 1996;16(3):125-32.

Glenn TD, Talbot WS. Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Curr Opin Neurobiol*. 2013 Dec;23(6):1041-8.

Goethals S, Ydens E, Timmerman V, Janssens S. Toll-like receptor expression in the peripheral nerve. *Glia*. 2010 Nov 1;58(14):1701-9.

Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. *Neurosurgery*. 1999 Apr;44(4):825-39; discussion 839-40.

Haines JD, Fragoso G, Hossain S, Mushynski WE, Almazan G. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates myelination. *J Mol Neurosci*. 2008 May;35(1):23-33.

Halperin JJ. Lyme disease and the peripheral nervous system. *Muscle Nerve*. 2003 Aug;28(2):133-43.

Heinen A, Lehmann HC, Küry P. Negative regulators of schwann cell differentiation-novel targets for peripheral nerve therapies? *J Clin Immunol*. 2013 Jan;33 Suppl 1:S18-26.

Honkanen H, Lahti O, Nissinen M, Myllylä RM, Kangas S, Päiväläinen S, Alanne MH, Peltonen S, Peltonen J, Heape AM. Isolation, purification and expansion of myelination-competent, neonatal mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci*. 2007 Aug;26(4):953-64.

Hyung S, Yoon Lee B, Park J-C, Kim J, Hur E-M, Francis Suh J-K. Coculture of primary motor neurons and Schwann cells as a model for *in vitro* myelination. *Scientific Reports*. 2015; (5): 15122.

Jagalur NB, Ghazvini M, Mandemakers W, Driegen S, Maas A, Jones EA, Jaegle M, Grosveld F, Svaren J, Meijer D. Functional dissection of the Oct6 Schwann cell enhancer reveals an essential role for dimeric Sox10 binding. *J Neurosci*. 2011 Jun 8;31(23):8585-94.

Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1861-7.

Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Sep;6(9):671-82.

Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1552-65.

Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 May 8;7(7):a020487.

Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol*. 2016 Jul 1;594(13):3521-31.

Kahawita IP, Lockwood DN. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008 Apr;102(4):329-37.

Kao SC, Wu H, Xie J, Chang CP, Ranish JA, Graef IA, Crabtree GR. Calcineurin/NFAT signaling is required for neuregulin-regulated Schwann cell differentiation. *Science.* 2009 Jan 30;323(5914):651-4.

Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 15;102(7):2596-601.

Lehmann HC, Höke A. Schwann cells as a therapeutic target for peripheral neuropathies. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010 Dec;9(6):801-6.

Liu R, Lin G, Xu H. An efficient method for dorsal root ganglia neurons purification with a one-time anti-mitotic reagent treatment. *PLoS One.* 2013;8(4):e60558.

Liu Z, Jin YQ, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, Wu W, Qi Z, Shen Z. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One.* 2015 Apr 10;10(4):e0123278.

Lutz AB. Purification of schwann cells from the neonatal and injured adult mouse peripheral nerve. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Dec 1;2014(12):1312-9.

Marques MA, Ant nio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani MC. Binding of alpha2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. *J Med Microbiol.* 2001 Jan;50(1):23-8.

Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell.* 2013 Jan 17;152(1-2):51-67.

McCorry LK. Physiology of the Autonomic Nervous System. *American Journal of Pharmaceutical Education*. 2007;71(4):78.

Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regeneration Research*. 2015;10(5):721-725. doi:10.4103/1673-5374.156967.

Monje PV, Soto J, Bacallao K, Wood PM. Schwann cell dedifferentiation is independent of mitogenic signaling and uncoupled to proliferation: role of cAMP and JNK in the maintenance of the differentiated state. *J Biol Chem*. 2010 Oct 1;285(40):31024-36.

Monteiro LD, Alencar CH, Barbosa JC, Novaes CC, da Silva Rde C, Heukelbach J. Limited activity and social participation after hospital discharge from leprosy treatment in a hyperendemic area in North Brazil. *Rev Bras Epidemiol*. 2014 Jan-Mar;17(1):91-104.

Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Sep;51(3):417-26.

Moura ML, Dupnik KM, Sampaio GA. A vigilância ativa da hanseníase (lepra): importância para a detecção de casos entre os contatos extra-domiciliares. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2093.

Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol*. 2006 Oct;16(5):492-500.

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

Nery JA, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira Sde S, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2013 Sep-Oct;88(5):787-92.

Newbern J, Birchmeier C. Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Seminars in cell & developmental biology*. 2010;21(9):922-928.

Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S. Signaling axis in schwann cell proliferation and differentiation. *Mol Neurobiol*. 2006 Feb;33(1):51-62.

Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, Antas PR, Sarno EN. Cytokines and *Mycobacterium leprae* induce apoptosis in human Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Oct;64(10):882-90.

Ordovas-Montanes J, Rakoff-Nahoum S, Huang S, Riol-Blanco L, Barreiro O, von Andrian UH. The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease. *Trends Immunol*. 2015 Oct;36(10):578-604.

Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, Posada S, Cobos EJ, Zhang AX, Wagers AJ, Havton LA, Barres B, Omura T, Woolf CJ. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron*. 2014 Jul 16;83(2):331-43.

Päiväläinen S, Nissinen M, Honkanen H, Lahti O, Kangas SM, Peltonen J, Peltonen S, Heape AM. Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Mar;37(3):568-78.

Pannunzio ME, Jou IM, Long A, Wind TC, Beck G, Balian G. A new method of selecting Schwann cells from adult mouse sciatic nerve. *J Neurosci Methods*. 2005 Nov 30;149(1):74-81.

Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, Dickinson S, D'Antonio M, Mirsky R, Jessen KR. Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol*. 2004 Feb 2;164(3):385-94.

Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon LA, Woodhoo A, Lloyd AC, Feltri ML, Wrabetz L, Behrens A, Mirsky R, Jessen KR. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol*. 2008 May 19;181(4):625-37.

Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, Doddrell RD, Nakayama M, Adams RH, Lloyd AC. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell*. 2010 Oct 1;143(1):145-55.

Pereira JA, Lebrun-Julien F, Suter U. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci*. 2012 Feb;35(2):123-34.

Kim HA, Mindos T, Parkinson DB. Plastic Fantastic: Schwann Cells and Repair of the Peripheral Nervous System. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013;2(8):553-557. doi:10.5966/sctm.2013-0011.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. *Science*. 2002 May 3;296(5569):927-31.

Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science*. 1998 Dec 11;282(5396):2076-9.

Rambukkana A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Curr Opin Immunol*. 2004 Aug;16(4):511-8.

Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog Neurobiol*. 2010 Jun;91(2):102-7.

Raphael AR, Talbot WS. New insights into signaling during myelination in zebrafish. *Curr Top Dev Biol*. 2011;97:1-19.

Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect*. 2015 Sep;45(9):383-93.

Reynolds ML, Woolf CJ. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol*. 1993 Oct;3(5):683-93.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966 Jul-Sep;34(3):255-73.

Rodrigues LC, Lockwood DNj. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis*. 2011 Jun;11(6):464-70.

Salzer JL. Axonal regulation of Schwann cell ensheathment and myelination. *J Peripher Nerv Syst*. 2012 Dec;17 Suppl 3:14-9.

Saxena S, Caroni P. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol*. 2007 Oct;83(3):174-91.

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

Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol*. 2015 Jan-Feb;33(1):46-54.

Shepherd SR, Chataway T, Schultz DW, Rush RA, Rogers ML. The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2014; (9): e87398.

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 17;96(17):9857-62.

Sindic CJ. Infectious neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2013 Oct;26(5):510-5.

Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. 2011 Jan;6(1):57-71.

Soares de Lima C, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, Menozzi FD, Ottenhoff TH, Brennan PJ, Pessolani MC. Mapping the laminin-binding and adhesive

domain of the cell surface-associated Hlp/LBP protein from *Mycobacterium leprae*. *Microbes Infect.* 2005 Jul;7(9-10):1097-109.

Szigeti K, Wiszniewski W, Saifi GM, Sherman DL, Sule N, Adesina AM, et al. Functional, histopathologic and natural history study of neuropathy associated with EGR2 mutations. *Neurogenetics.* 2007; (8): 257–262.

Talhari S, Neves RG. *Dermatologia Tropical: Hanseníase*. Manaus: Editora Tropical, 1997.

Tanaka K, Zhang QL, Webster HD. Myelinated fiber regeneration after sciatic nerve crush: morphometric observations in young adult and aging mice and the effects of macrophage suppression and conditioning lesions. *Exp Neurol.* 1992 Oct;118(1):53-61.

Tao Y. Isolation and culture of Schwann cells. *Methods Mol Biol.* 2013;1018:93-104.

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

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 28;102(26):9188-93.

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron.* 2005 Sep 1;47(5):681-94.

Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999 Jan;194 (Pt 1):1-14.

Trombone AP, Pedrini SC, Diório SM, Belone Ade F, Fachin LR, do Nascimento DC, Rosa PS. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp.* 2014 Mar 23;(85).

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2001 Mar;69(1):1-12.

Ubogu EE. Translational strategies in peripheral neuroinflammation and neurovascular repair. *Transl Neurosci*. 2012 Dec 1;3(4):373-383.

van Brakel WH, Nicholls PG, Wilder-Smith EP, Das L, Barkataki P, Lockwood DN; INFIR Study Group. Early diagnosis of neuropathy in leprosy--comparing diagnostic tests in a large prospective study (the INFIR cohort study). *PLoS Negl Trop Dis*. 2008 Apr 2;2(4):e212.

Vidal PM, Lemmens E, Dooley D, Hendrix S. The role of "anti-inflammatory" cytokines in axon regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Feb;24(1):1-12.

Voorend CG, Post EB. A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Oct 3;7(10):e2440.

Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull*. 2006;77-78:103-21.

Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp. Neurol*. 2010; (223): 51–59.

Wanner IB, Mahoney J, Jessen KR, Wood PM, Bates M, Bunge MB. Invariant mantling of growth cones by Schwann cell precursors characterize growing peripheral nerve fronts. *Glia*. 2006 Oct;54(5):424-38.

Weiss T, Taschner-Mandl S, Bileck A, Slany A, Kromp F, Rifatbegovic F, Frech C, Windhager R, Kitzinger H, Tzou CH, Ambros PF, Gerner C, Ambros IM. Proteomics and transcriptomics of peripheral nerve tissue and cells unravel new aspects of the human Schwann cell repair phenotype. *Glia*. 2016 Dec;64(12):2133-2153.

White FA, Jung H, Miller RJ. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 18;104(51):20151-8.

Wood MD, Mackinnon SE. Pathways regulating modality-specific axonal regeneration in peripheral nerve. *Exp Neurol*. 2015 Mar;265:171-5.

Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci*. 2009 Jul;12(7):839-47.

Woodhoo A, Sommer L. Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1481-90.

Yang DP, Kim J, Syed N, Tung YJ, Bhaskaran A, Mindos T, Mirsky R, Jessen KR, Maurel P, Parkinson DB, Kim HA. p38 MAPK activation promotes denervated Schwann cell phenotype and functions as a negative regulator of Schwann cell differentiation and myelination. *J Neurosci*. 2012 May 23;32(21):7158-68.

Zhu TH, Kamangar F, Silverstein M, Fung MA. Borderline Tuberculoid Leprosy Masquerading as Granuloma Annulare: A Clinical and Histological Pitfall. *Am J Dermatopathol*. 2017 Apr;39(4):296-299.

Ziskind-Conhaim L. Physiological and morphological changes in developing peripheral nerves of rat embryos. *Brain Res*. 1988 Jul 1;470(1):15-28.

ANEXO

Running title: Differentiation Markers in M. leprae-infected SC

REGULATION OF DIFFERENTIATION MARKERS IN MURINE SCHWANN CELLS INFECTED BY *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

Mariane Bertolucci Casalenovo¹; Dejair Caitano do Nascimento²; Patrícia Sammarco Rosa²; Vânia Nieto Brito de Souza²; Maria Renata Sales Nogueira^{2*}

¹Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil; ²Divisão de Pesquisa e Ensino, Instituto Lauro de Souza Lima, Secretaria de Estado da Saúde, Bauru, São Paulo, Brasil

* Corresponding Author: mariare.nog@hotmail.com

Financial support: Foundation for Research Support of the State of São Paulo - FAPESP (# 2010/00146-7)

ABSTRACT

The plasticity of peripheral nervous system is critically maintained by SCs. *Mycobacterium leprae* infection (*M. leprae*), as well as peripheral nerve injury modulate the expression of key factors that determine Schwann cells (SCs) identity. The inability of SCs to properly repair and remyelinate injured peripheral nerves may be involved in the pathogenesis of leprosy neuropathy. To better understand the role of glial factors in nerve damage due to *M. leprae* infection, the present study sought to determine the expression of KROX-20, SOX-10, JUN, p75NTR in SCs culture and mice sciatic nerves. Primary murine SCs culture was stimulated by *M. leprae* for seven and 14 days, with different multiplicities of infection (MOI 100: 1, MOI 50: 1). *In vivo* evaluations were performed on sciatic nerve of nude mice (NU-Foxn1nu), after six and nine months of *M. leprae* infection. SCs results demonstrate significant reduction of KROX-20 and SOX-10 along with the increase of p75NTR-immunolabelled cells. Concurrently, sciatic nerves of infected mice showed decrease in KROX-20 and increase of p75NTR. Our results corroborate previous findings on the interference of *M. leprae* in the expression of factors involved in cell maturation, favoring the maintenance of a non-myelinating phenotype in SCs, with possible implications for the repair of adult peripheral nerves.

Key words: *Mycobacterium leprae*, Schwann cells, Animal experimentation

INTRODUCTION

Peripheral neuropathies affect about 2-8% of the world population (Ubogu, 2012) and systemic infections represent relevant global causes of physical disabilities (Sindic 2013; Brizzi, Lyons, 2014). Most of the microorganisms associated with peripheral neural inflammation do not directly infect the cellular components of the nerves (Neal, Gasque 2016). However, two obligate intracellular pathogens, *Trypanosoma cruzi* and *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) stand out for their ability to interfere in the homeostasis and differentiation of SCs, triggering persistent neural damage (Girschick et al., 1996; Neal, Gasque, 2016). Neural damage in leprosy leads to permanent physical disabilities, responsible for the social, economic and psychosocial suffering of the patients, as well as the reduction of quality of life (Boku et al., 2010; Monteiro et al., 2014). Nerve damage prevention and repair are among the major challenges of the disease management (Moura et al., 2013).

During adult peripheral nerve repair, lineage markers are determinant for the effective redifferentiation of SCs. Dedifferentiated SCs, in response to neural aggression, maintain the expression of lineage markers such as SOX-10 (SRY-box 10), which allow it to return to the initial state of maturation (Le et al., 2005). However, it seems that such plasticity is impaired in SCs chronically infected (Finzsch et al., 2010; Rambukkana 2010). Masaki et al. (2013) reported that SCs infected *in vitro* by *M. leprae* undergo dedifferentiation and reprogramming to the point of neural crest-like cells termed *stem-like* progenitor cells (pSLC) (Masaki et al., 2013). Reprogrammed cells by *M. leprae* present a specific phenotype, SOX-2⁺/SOX-10⁻/p75NTR⁻, and become highly proliferative, migratory and immunomodulatory (Tapinos, Rambukkana 2005; Tapinos et al., 2006).

The proto-oncogene JUN (Jun proto-oncogene/c-Jun; AP-1 transcription factor subunit) is present at high levels in immature SCs, prior to the establishment of myelinating and its expression is suppressed by KROX-20 (early growth response 2/EGR2) during the differentiation process (Parkinson et al., 2004, 2008; Jessen, Mirsky, 2008). Additionally, JUN activity regulate the expression of important neurotrophic factors and its restriction limits peripheral nerve repair (Arthur-Farraj et al., 2012; Painter et al., 2014). Despite of its crucial role in peripheral neural homeostasis, JUN status in SCs infected by *M. leprae* has not been explored yet.

Determination of JUN in those cells could provide additional answers on neural repair capacity in leprosy patients.

This study aims to describe the expression of critical markers (KROX-20, SOX-10, JUN, p75NTR) within the Schwann cell line in cell cultures and sciatic nerves of mice infected with *M. leprae*. The study may be relevant to our understanding of the changes that Schwann cells undergo after infection and reprogramming by *M. leprae*, which is linked to neurodegeneration and demyelination of peripheral nerves.

MATERIALS AND METHODS

Animals - The experiment was conducted in 20 Swiss white mice (SW) and 36 athymic nude mice (NU-*Foxn1^{mu}*), with 30 to 60 days old, from the Lauro de Souza Lima Institute/SES, Bauru/SP. The death of the animals was induced by overdose of ketamine 200 mg/kg (Vetnil) and Rompun® 30 mg/kg (Bayer) intraperitoneally. The handling of the experimental animals was in accordance with the Commission for Ethics in the Use of Animals of the Lauro de Souza Lima Institute rules, based on ethical principles in the animal experimentation, elaborated by the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals (SBCAL).

Tissue isolation and cell culture - Tissue and cell procedures were conducted as previously described (Honkanen et al., 2007; Päiväläinen et al., 2008; Tao, 2013; Lutz, 2014). Briefly, sciatic nerves were carefully detached from each epineurium and fragmented. Specimens were transferred to a conical tube and washed with phosphate buffered saline, for 5 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-High glucose; Gibco®) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich), 10 ng/mL heregulin β 1 (HRG; Sigma-Aldrich), 2 μ M forskolin (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco®). Nerve fragments were kept in explant for seven days, in 5% CO₂ incubator with 95% humidity, at 37°C. The specimens were then centrifuged at 1200rpm for 5 minutes at 4°C, resuspended in DMEM-Hg containing 1% penicillin/streptomycin, 0.5 mg/mL collagenase type I and 2.5 mg/mL dispase II (Gibco®), and maintained in CO₂ incubator for 24 hours. Following enzymatic digestion, nerve tissue was mechanically homogenized on graduated hypodermic needles (18G and 21G). The cell suspension was filtered at 40 μ m membrane, transferred to DMEM-Hg/10% FBS and centrifuged at 1500rpm for 10 min at 4°C. Cell counting and trypan blue viability exclusion has been conducted

afterwards. The cell density was adjusted to 2.5×10^4 cells/cm². Cells were then seeded in polystyrene 24-well plates, coated with 20 µg/mL laminin (Sigma-Aldrich). The culture proceeded with of supplemented medium changes every 48 hours.

M. leprae - The inoculum was obtained from serial passage in the footpads of athymic nude mice (NU-*Foxn1*tm), from the Central Bioterio of the Lauro de Souza Lima Institute/SES/SP/Bauru/SP, according to the previously described technique (Truman & Krahenbuhl 2001, Trombone et al. 2014). Briefly, the animals were inoculated into the plantar surface of the both hind footpads with 30 µl of suspension containing 1×10^8 AFB/mL. After four months, the animals were killed and the bacillary suspension was prepared (Lahiri et al. 2005, Trombone et al. 2014).

In vitro infection - SCs dissociated from the sciatic nerves were divided into two experimental groups and a control group. The first experimental group (ML50) received live *M. leprae* at the multiplicity of infection (MOI) of 50 bacilli/cell. The second group (ML100) received *M. leprae* at MOI 100:1. The third group (CTRL) did not receive *M. leprae*. All groups were cultivated under the same incubation conditions and maintained for 7 and 14 days. Samples were then stored appropriately for *in situ* determination of KROX-20, SOX-10, JUN and p75NTR by scanning laser confocal microscopy.

In vivo infection - Nude mice inoculation was performed by intradermal injection with 100 µL of bacillary suspension at 1×10^6 AFB/mL, near to popliteal lymph nodes of each hind limb. Additionally, 30 µL of the same AFB suspension was inoculated into both hind footpads of each mouse. Mice were maintained for 6 and 9 months (n = 06/period). At the end of each period, mice were killed and their sciatic nerves collected to the same evaluations conducted in the *in vitro* assays. Nerves of non-infected athymic nude mice (n = 03/period) were adopted as controls.

Cell morphology and bacillary index determination - Part SC samples and neural fragments were destined to bacillary index evaluation by Fite-Faraco staining (Fite et al. 1947). The bacillary index (IB) was determined by AFB count at 100 to 200 infected cells per microscopic field. Briefly, the specimens were kept in mineral oil for 30 minutes at 60 °C. Following, tap water was used to remove the excess of oil and the specimens were gently dried. Subsequently, specimens were coated with filtered fuchsine for 30 minutes and washed with tap water. Sections were then dehydrated through alcohol series and mounted with Permount mounting medium.

Immunofluorescence - SCs and neural fragments were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature (RT) and

washed in PBS. Part of the samples was permeabilized with PBS/0.25% Triton X-100, for 10 minutes. After washing in PBS, non-specific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) and 22.5 mg/mL glycine, in PBST (PBS/0.1% Triton X-100). After 30 minutes, samples were incubated overnight with target-specific primary antibodies, JUN (Abcam, clone E254), p75NTR (Santa Cruz Biotechnology, clone ME20.4), KROX-20 (Convance, PRB-236P) and SOX-10 (Santa Cruz Biotechnology, clone G-11). Following the incubation period, the samples were washed in PBS and incubated with secondary antibodies conjugated to AlexaFluor® 488 and AlexaFluor® 594 (Molecular Probes®) for 60 minutes, at RT and protected from light. Cell nuclei were stained by DAPI (Molecular Probes®). After 10 minutes, the specimens were washed, dried and mounted in glass microscopic slides. The image capture was performed in confocal laser scanning microscope TCS SP5 (Leica, Germany), and image processing software LAS AF (Leica, Germany). The criterion adopted for the analysis of the images was to obtain the relative frequency of the targets of interest of this study, calculated by the ratio of the number of positive cells for each marker on the total number of DAPI⁺ cells.

Statistical analysis - Analysis of the results was performed on GraphPad Prism 5.01[®] software (GraphPad Inc. USA). Data were submitted to the Kruskal-Wallis test, with Dunn post-test for comparison in control and experimental groups. The results are expressed by median. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Cell morphology and identification of M. leprae - Phase contrast microscopy and Hematoxylin-Eosin staining confirmed the tripolar or fusiform morphology of SCs, whereas flat or polygonal cells were recognized as fibroblasts (Pannunzio et al., 2005; Liu et al., 2015) (Figure 1). Part of the cell culture was stained by the Fite-Faraco for identification and enumeration of intracellular bacilli (Figure 2). After seven days, the group ML50 presented an average of 13.12 bacilli/cell indicating 26.24% of initial MOI. In the ML100, 17.92 bacilli/cell were observed after seven days of cell culture, corresponding to 17.92% of the initial MOI. After 14 days, the group ML50 presented a 5.50 bacilli/cell, indicating 11% of the initial MOI, while in ML100 an average of 8.66 bacilli/cell were counted, corresponding to 8.66% of the initial MOI. Nude mice-infected sciatic nerves were also stained by Hematoxylin-Eosin and Fite-Faraco for

investigation of *M. leprae* within the neural structure (Figure 2). After six months of infection, no bacilli or any signs of degeneration were shown inside the nerve fibers. After nine months, perineural bacillary invasion was observed in infected sciatic nerves, although no signs of neural degeneration were found as well.

Modulation of KROX-20 and SOX-10 in mice model of M. leprae infection

SCs culture stimulated by *M. leprae* demonstrated elevation of KROX-20 in the CTRL group compared to ML100 ($p < 0.001$) after 14 days, whereas after 7 days there were no statistically significant changes among the groups (Figure 3). In sciatic nerves of nude mice, the expression of KROX-20 was higher in uninfected mice than experimental groups, after six and nine months ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (Figure 4). The determination of SOX-10 in SCs culture exposed to *M. leprae*, presented a decrease in SOX-10⁺ cells in ML100 in relation to CTRL, after seven days ($p < 0.05$). At 14 days of cell culture, SOX-10 did not show statistically significant changes among the groups (Figure 5). During *M. leprae* infection of mice sciatic nerves, it was not observed statistically significant alterations of SOX-10 among the groups (Figure 6).

Increase of p75NTR in cells and nerves infected by M. leprae - Primary SCs culture exposed to *M. leprae* for seven and 14 days demonstrated lower frequency of p75NTR⁺ cells in CTRL compared to ML100 (seven days, $p < 0.001$; 14 days, $p < 0, 05$) (Figure 7). Similarly, in the sciatic nerves of nude mice the expression of p75NTR was significantly lower in uninfected animals than in those infected for six ($p < 0.001$) and nine months ($p < 0.001$) (Figure 8). The evaluation of JUN expression in SCs exposed to *M. leprae* did not indicate significant differences between control and experimental groups (Figure 9). In the *in vivo* evaluation of sciatic nerves there was not JUN⁺ cells sufficient for data analysis.

DISCUSSION

This study sought to contribute to the understanding of changes in Schwann cells after *M. leprae* infection, describing the expression of critical markers related to glial differentiation and maturation. The transcription factors KROX-20, SOX-10, JUN and the receptor p75NTR were evaluated *in vitro* in primary culture of SCs obtained from sciatic nerves of *Swiss white* (SW) mice stimulated by *M. leprae* for seven and 14 days. The same factors were evaluated *in vivo* on sciatic nerves of athymic nude mice (NU-*Foxn1^{mu}*), after six and nine months of *M. leprae* infection.

The development of glial lineage and myelination of peripheral nerves are centrally regulated by transcription factors like SOX-10 and KROX-20 (Decker et al., 2006). In adult peripheral nerves, myelinating SCs may dedifferentiate when removed from axonal contact or soon after nerve injury (Parkinson et al., 2008, Kim et al., 2013). In these cells the re-induction of immature SC markers is observed, including JUN and p75NTR (Webber, Zochodne, 2010).

The relevance of KROX-20 to SC maturation is unequivocally illustrated in studies on mutations in the *EGR2* gene associated with peripheral myelinopathies, including Charcot-Marie-Tooth Syndrome and more severe forms of Dejerine-Sottas Syndrome (Bellone et al., 1999). Inhibition of KROX-20 is also observed in non-hereditary demyelinating neuropathies, such as Guillain-Barré Syndrome (Szigeti et al., 2007). In line, our results demonstrate that *M. leprae* negatively regulates the expression of KROX-20 in mice SCs, *in vivo* and *in vitro*, suggesting that the bacillus hampers the myelinating phenotype in these cells.

Although SOX-10 is required at all stages of glial cell line development, it is believed that its expression does not change following peripheral nerve injury, when SCs turn into Büngner cells (Hyung et al. 2015, Balakrishnan et al., 2016). Our results indicate that *M. leprae* decreases SOX-10 in SCs, after seven days of cell culture. The present data corroborate previous results by Masaki et al. (2013), who observed a lack of SOX-10 nuclear translocation in mice SCs after 10 days of *M. leprae* incubation (Masaki et al., 2013).

Additionally, we observed that *M. leprae* infection in SCs and sciatic nerves is able to significantly elevate frequency of p75NTR⁺ cells. According to Liu et al. (1985), this receptor has greater expression in the sciatic nerves of newborn mice compared to adults (Liu et al., 2015). In parallel, adult peripheral nerves submitted to nerve injury demonstrate a drastic elevation of p75NTR (Meeker, Williams, 2014). Although we did not find significant signs of neural degeneration in our *in vivo* experiment, the elevation of p75NTR in mice sciatic nerves infected by *M. leprae*, suggests an increase of non-myelinating cells in the adult neural environment, which could chronically interfere in the homeostasis of the peripheral nerves.

The concept that p75NTR plays an essential role in neural protection and repair is confirmed by remyelination deficiency evidences in sciatic nerves from p75NTR *knockout* mice submitted to nerve injury (Fontana et al., 2012). In addition, in the animal model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the expression of p75NTR was

correlated with the extension of the degenerative process (Shepherd et al., 2014), as well as in the animal model of Alzheimer's Disease, in which the involvement of p75NTR has been correlated with disease progression (Yang et al., 2008).

The plasticity of adult SCs is among the prerequisites for the return to homeostasis after nerve damage (Kim et al., 2013). In this context, JUN plays a crucial role in the tissue repair program, providing support for axon regeneration. On the other hand, the deficiency of JUN induction after a neural aggression may lead to dysfunctional repair patterns, resulting in neuronal death (Arthur-Farraj et al., 2012; Jessen, Mirsky, 2016).

Weiss et al. (2016) elegantly demonstrated that among the key factors associated with the repair program, JUN was strongly expressed in human SCs cultures and explants from peripheral neural fascicles (Weiss et al., 2016). In the present study we sought to determine the expression of this same transcription factor in murine model. However, our *in vitro* results did not indicate significant changes in JUN expression in SCs dissociated from sciatic nerves and exposed to *M. leprae* preparations. Nevertheless, we believe that additional studies may contribute to a better understanding of the interplay between *M. leprae* and the expression of JUN in its target cells.

In sciatic nerves of nude mice inoculated by *M. leprae* for six and nine months, the deficient frequency of JUN did not allow us to perform data analysis. In adult nerves, there is practically a lack of JUN expression, though this scenario changes in pathological processes when this factor is induced in order to stimulate neural repair (Parkinson et al., 2008; Arthur-Farraj et al., 2012). In the present study, the neural response to *M. leprae* infection did not seem to be enough to elevate JUN expression. We conclude here that, *M. leprae* infection of sciatic nerves via popliteal fossa may not be sufficient to induce major degenerative neural changes.

Notwithstanding, our findings indicate the downregulation of KROX-20 and SOX-10, along with the increase of p75NTR in SCs and murine sciatic nerves infected by *M. leprae*. Such alterations may be associated with possible remyelination deficits in nerves affected by leprosy and we believe that it should be a continuous focus of investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would to thank Yugi Miyamoto for kindly provide the *M. leprae* strain Thai-53 (Leprosy Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Higashimurayama, Tokyo, Japan). We thank Adriana Sierra, Ana Elisa Fusaro, Daniele Bertoluci, Nelci Ana Vieira and Osmar de Abreu Francisco for the technical support (Laboratories of Pathology, Microbiology and Cell Biology, Lauro de Souza Lima Institute, Bauru, SP, Brazil). We also thank Shelly Favorito de Carvalho for confocal images acquisition (Center of Electronic Microscopy, UNESP, Botucatu, Brazil).

REFERENCES

- Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, et al. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron*. 2012 Aug 23; 75(4): 633-47.
- Balakrishnan A, Stykel MG, Touahri Y, Stratton JA, Biernaskie J, Schuurmans C. Temporal analysis of gene expression in the murine Schwann cell lineage and the acutely injured postnatal nerve. *PLoS One*. 2016 Apr 8; 11(4): e0153256.
- Bellone E, Di Maria E, Soriani S, Varese A, Doria LL, Ajmar F, et al. A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat*. 1999; (14): 353–354.
- Boku N, Lockwood DN, Balagon MV, Pardillo FE, Maghanoy AA, Mallari IB, et al. Impacts of the diagnosis of leprosy and of visible impairments amongst people affected by leprosy in Cebu, the Philippines. *Lepr Rev*. 2010 Jun; 81(2): 111-20.
- Brizzi KT, Lyons JL. Peripheral nervous system manifestations of infectious diseases. *The Neurohospitalist*. 2014; 4(4): 230-240.
- Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol*. 2003; 163:889–9.
- Finzsch M, Schreiner S, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Bösl MR, et al. Sox10 is required for Schwann cell identity and progression beyond the immature Schwann cell stage. *The Journal of Cell Biology*. 2010; 189(4): 701–712.
- Fite GL, Cambre FJ, Turner MH. Procedures for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. *Archives of Pathology*. 1947; 43: 624-625.

Fontana X, Hristova M, Da Costa C, Patodia S, Thei L, Makwana M, et al. c-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *J Cell Biol.* 2012 Jul 9; 198(1): 127-41.

Girschick HJ, Huppertz HI, Rüssmann H, Krenn V, Karch H. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. *Rheumatol Int.* 1996; 16(3): 125-32.

Honkanen H, Lahti O, Nissinen M, Myllylä RM, Kangas S, Päiväläinen S, Alanne MH, Peltonen S, Peltonen J, Heape AM. Isolation, purification and expansion of myelination-competent, neonatal mouse Schwann cells. *Eur J Neurosci.* 2007 Aug;26(4):953-64.

Hyung S, Yoon Lee B, Park J-C, Kim J, Hur E-M, Francis Suh J-K. Coculture of primary motor neurons and Schwann cells as a model for in vitro myelination. *Scientific Reports.* 2015; (5): 15122.

Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia.* 2008 Nov; 56(14): 1552-65.

Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol.* 2016 Jul 1;594(13):3521-31.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol.* 2005; 54(3): 235-42.

Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. Analysis of congenital hypomyelinating *Egr2*^{Lo/Lo} nerves identifies *Sox2* as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb; 102(7): 2596-601.

Liu Z, Jin YQ, Chen L, Wang Y, Yang X, Cheng J, et al. Specific marker expression and cell state of Schwann cells during culture in vitro. *PLoS One.* 2015 Apr 10; 10(4): e0123278.

Lutz AB. Purification of schwann cells from the neonatal and injured adult mouse peripheral nerve. *Cold Spring Harb Protoc.* 2014 Dec 1;2014(12):1312-9.

Masaki T, Qu J, Cholewa-Waclaw J, Burr K, Raaum R, Rambukkana A. Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. *Cell.* 2013 Jan; 152(1-2): 51-67.

Meeker RB, Williams KS. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res.* 2015 May; 10(5): 721-5.

Monteiro LD, Alencar CH, Barbosa JC, Novaes CC, da Silva Rde C, Heukelbach J. Limited activity and social participation after hospital discharge from leprosy treatment in a hyperendemic area in North Brazil. *Rev Bras Epidemiol*. 2014 Jan-Mar; 17(1): 91-104.

Moura ML, Dupnik KM, Sampaio GA, Nóbrega PF, Jeronimo AK, do Nascimento-Filho JM, et al. Active surveillance of Hansen's Disease (leprosy): importance for case finding among extra-domiciliary contacts. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(3): e2093.

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

Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, et al. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron*. 2014 Jul 16; 83(2): 331-43.

Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon LA, Woodhoo A, Lloyd AC, et al. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol*. 2008 May 19; 181(4): 625-37.

Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, Dickinson S, D'Antonio M, Mirsky R, et al. Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol*. 2004 Feb; 164(3): 385-94.

Päiväläinen S, Nissinen M, Honkanen H, Lahti O, Kangas SM, Peltonen J, Peltonen S, Heape AM. Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol Cell Neurosci*. 2008 Mar; 37(3): 568-78.

Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. *Prog Neurobiol*. 2010 Jun; 91(2): 102-7.

Shepherd SR, Chataway T, Schultz DW, Rush RA, Rogers ML. The extracellular domain of neurotrophin receptor p75 as a candidate biomarker for amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2014; (9): e87398.

Sindic CJ. Infectious neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2013 Oct; 26(5): 510-5.

Szigeti K, Wiszniewski W, Saifi GM, Sherman DL, Sule N, Adesina AM, et al. Functional, histopathologic and natural history study of neuropathy associated with EGR2 mutations. *Neurogenetics*. 2007; (8): 257-262.

Tao Y. Isolation and culture of Schwann cells. *Methods Mol Biol*. 2013; 1018: 93-104.

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

Tapinos N, Rambukkana A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(26): 9188-9193.

Trombone AP, Pedrini SC, Diório SM, Belone Ade F, Fachin LR, do Nascimento DC, et al. Optimized protocols for *Mycobacterium leprae* strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp*. 2014 Mar 23; (85).

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2001 Mar; 69(1): 1-12.

Ubogu EE. Translational strategies in peripheral neuroinflammation and neurovascular repair. *Translational neuroscience*. 2012; 3(4): 373-383.

Webber C, Zochodne D. The nerve regenerative microenvironment: early behavior and partnership of axons and Schwann cells. *Exp. Neurol*. 2010; (223): 51–59.

Yang T, Knowles JK, Lu Q, Zhang H, Arancio O, Moore LA, et al. Small molecule, non-peptide p75 ligands inhibit A beta-induced neurodegeneration and synaptic impairment. *PLoS One*. 2008; (3): e3604.