

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 16/03/2024.



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

Graziela Aparecida Silva Gonçalves

**Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos
em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e 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 em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira
Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

Botucatu
2023

Graziela Aparecida Silva Gonçalves

**Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos
em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e 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 em
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

Botucatu

2023

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

Gonçalves, Graziela Aparecida Silva.

Efeito da clofazimina sobre a mielinização de nervos isquiáticos em modelo murino de lesão neural traumática e infecção por *Mycobacterium leprae* / Graziela Aparecida Silva Gonçalves. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Maria Renata Sales Nogueira
Coorientador: Dejair Caitano do Nascimento
Capes: 20000006

1. *Mycobacterium leprae*. 2. Clofazimina. 3. Nervo isquiático. 4. Experimentação animal.

Palavras-chave: Clofazimina; Experimentação animal; *Mycobacterium leprae*; Nervo isquiático.

DEDICATÓRIA

À Deus,

Que me presenteia todos os dias com o milagre da vida. Obrigada, Senhor, por preencher meu coração com esperança, amor e fé, por me ajudar a vencer todos os obstáculos durante esses anos, e por todas as bênçãos derramadas sobre minha família e amigos.

“Buscai primeiro o reino de Deus, e todas as outras coisas lhe serão acrescentadas.” Mateus 6:33

Aos meus pais,

Margarida e Walter, obrigada pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Vocês são os pilares da minha formação como ser humano. Gratidão eterna.

“Filhos, obedecem a seus pais no Senhor, pois isso é justo. ‘Honra teu pai e tua mãe’, este é o primeiro mandamento com promessa: para que tudo te corra bem e tenhas longa vida sobre a terra.” Efésios 6:1-3

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde, força e sabedoria para seguir em frente. Obrigada por ser minha luz em todos os momentos. A ti, Senhor, toda honra e toda glória.

Aos meus pais, à tia Val e toda a minha família, por me oferecerem suporte durante todo o percurso desse trabalho, sendo minha fortaleza e motivo de maior alegria na minha vida.

Ao meu noivo Luigi, que é a prova de que Deus coloca anjos em nosso caminho, por apoiar todos os meus sonhos, me motivando todos os dias. Dividir a vida com você é um privilégio.

À minha amiga Mariane, que tem sido uma irmã desde que nos conhecemos, pelo companheirismo diário, por enfrentar comigo todos os desafios dessa jornada. Sua presença tornou esse trabalho possível e torna meus dias mais alegres e abençoados.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Renata Sales Nogueira, por todo apoio, competência e sabedoria dedicados a esse trabalho, bem como pelos sábios conselhos sempre que a procurei para conversar. Será sempre minha referência de professora e orientadora. Jamais esquecerei sua grande contribuição para o meu crescimento.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento, pela confiança em mim depositada, por prontamente me ajudar sempre que o procurei e pelo treinamento na técnica de análise nociceptiva.

Ao professor Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira e à pós-doutoranda Luciana Politti Cartarozzi, pelo treinamento e auxílio no desenvolvimento da técnica de Índice Funcional do Isquiático. Agradeço imensamente.

À Prof^a. Dr^a. Patrícia Sammarco Rosa e à Daniele Bertoluci, por todo apoio e auxílio na experimentação animal e pela linda amizade que levarei sempre comigo.

À Prof^a. Dr^a. Ana Carla Pereira Latini e aos pós-graduandos, Bruna Martins e Jonatas Perico, bem como à Beatriz Sartori, pelas técnicas desenvolvidas no laboratório de biologia molecular. Muito obrigada.

A todos os servidores do Instituto Lauro de Souza Lima, pela agradável convivência, amizade, por todos os conselhos recebidos e ensinamentos compartilhados.

A todos os meus amigos do Instituto Lauro de Souza Lima, Adriana Sierra, Amanda Finardi, Bruna Martins, Bruna Bortolomai, Daniele Bertolucci, Gabriel Fioroni, Maria Izilda Andrade, Jonatas Perico, Priscila Balalai, Nathan Guilherme e Sayuri Mikawa, que estiveram comigo durante o mestrado, por todos os momentos felizes compartilhados e também pelo apoio nos momentos difíceis. Amo vocês.

À Shelly do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, pela realização das análises de microscopia confocal. Pela atenção, gentileza e generosidade.

Ao Sr. João Batista, funcionário do Instituto Lauro de Souza Lima, pela convivência diária, conversas descontraídas, e apoio nesses anos de mestrado.

Às Equipes Técnicas dos Laboratórios de Biologia Celular, Biologia Molecular, Microbiologia, Patologia e Setor de Biotério, cujos esforços e auxílio tornaram possível a concretização deste trabalho.

À Vânia do Amaral Soler, da Seção Técnica de Pós-graduação da FMB, sempre paciente, agradável e atenciosa.

Às minhas queridas amigas, Adriana Baraldi Gaion e Marina de Oliveira Garcia, pelas caronas até o Instituto Lauro de Souza Lima, sempre com um sorriso no rosto e uma conversa alegre e divertida. Sou eternamente grata.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu.

À Seção Técnica de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu.

Ao Instituto Lauro de Souza Lima, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Bauru.

À Fundação Paulista Contra a Hanseníase, São Paulo, pelo auxílio financeiro que viabilizou parte da execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos.

“Agrada-te do Senhor, e ele satisfará os desejos do teu coração. Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele, e o mais ele fará.”

Salmos 37:4-5

RESUMO

GONÇALVES, G. A. S. **Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e Infecção por *Mycobacterium leprae***. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2023.

A hanseníase é uma neuropatia periférica infecciosa, causada por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que acomete predominantemente seres humanos e pode gerar incapacidades físicas irreversíveis. A característica de cronicidade dessa infecção, limita o entendimento sobre mecanismos precoces de interação patógeno-hospedeiro. Sabe-se que, a sobrevivência intracelular de *M. leprae* depende de alterações no metabolismo lipídico das células de Schwann e macrófagos. Tais alterações metabólicas, podem estar entre os fatores de interferência na remielinização dos nos nervos periféricos de pacientes com hanseníase. A biogênese de lipídios também pode ser afetada por um dos quimioterápicos utilizados no tratamento da hanseníase, a clofazimina (CFZ). Considerando que, lipídios são extremamente demandados durante a mielinização, cabe questionar se a CFZ poderia impactar negativamente a regeneração dos nervos periféricos. Os modelos animais no estudo da hanseníase costumam se concentrar em longas janelas tempo, restringindo observações precoces sobre alterações maquinaria celular frente à infecção por *M. leprae*. O objetivo primário do presente estudo foi, portanto, comparar dois modelos murinos de lesão do nervo isquiático, via trauma por esmagamento e inoculação intraneural com *M. leprae*, ao longo de 03, 14, 28 e 90 dias. Propôs-se ainda, investigar o impacto da infecção neural por *M. leprae* e do tratamento com CFZ, sobre a expressão gênica e de proteínas envolvidas na homeostasia lipídica e de mielina, pela técnica de imunofluorescência. Para tanto, foram utilizados camundongos *nude* atímicos (*NU-Foxn1^{nu}*), divididos em cinco grupos e duplicados quanto ao tratamento ou não com CFZ (N = 03/grupo): CSH (lesão por esmagamento); ML (infectado por *M. leprae*); ML/CSH (infecção e esmagamento); NaCl (veículo cloreto de sódio); SHAM (cirurgia simulada). A função motora de cada animal foi avaliada por teste de marcha, empregando-se índice funcional do isquiático. A função nociceptiva foi investigada por estimulação mecânica, via analgesímetro eletrônico Von Frey. Os dados de SFI indicaram lesão neural em 03 dias, exceto nos animais do grupo SHAM. Os grupos mais afetados foram aqueles submetidos ao modelo de esmagamento,

acompanhado ou não de infecção, seguido por reparação tecidual ao longo de 28 dias. A análise de nocicepção à estimulação mecânica também mostrou melhora após 28 dias, e recuperação em 90 dias. No entanto, o grupo infectado por *M. leprae*, sem tratamento, apresentou limiar inferior a quase todos os grupos no período experimental mais tardio, sugerindo a presença de dor associada a processos inflamatórios decorrentes da infecção. A imunodeteção de ADRP foi aumentada em camundongos infectados por *M. leprae*, quando comparado a todos os demais grupos. HSL esteve elevada após 28 dias de administração da droga, nos grupos ML_cfz e ML/CSH_cfz. A produção de MPZ se apresentou diminuída em nervos ciáticos infectados, tratados com CFZ, em 90 dpi. Os resultados desse estudo indicam que, o modelo animal aqui apresentado pode contribuir para a compreensão de fatores precoces associados à neuropatia hansênica. O aumento de ADRP em momentos iniciais de infecção *in vivo* por *M. leprae*, corrobora achados prévios e destaca a precocidade da ação desse patógeno sobre produção lipídica de células-alvo no microambiente neural. O efeito negativo da CFZ sobre a regulação de MPZ pode sugerir uma interferência na remielinização periférica e deve ser alvo de investigações futuras.

Palavras-chave: *M. leprae*; Nervo Isquiático; Experimentação Animal; Clofazimina

ABSTRACT

GONÇALVES, G. A. S. ***Effect of clofazimine on myelination of sciatic nerves in a murine model of traumatic neural injury and infection by Mycobacterium leprae***. Dissertation (Master in Pathology) – São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, Faculty of Medicine of Botucatu, 2023.

Leprosy is an infectious peripheral neuropathy caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), which predominantly affects humans and can cause irreversible physical disabilities. The characteristic of chronicity of this infection limits the understanding of early mechanisms of host-pathogen interaction. It is known that the intracellular survival of *M. leprae* depends on changes in the lipid metabolism of Schwann cells and macrophages. Such metabolic changes may be among the interfering factors in the remyelination of peripheral nerves in patients with leprosy. Lipid biogenesis can also be affected by one of the chemotherapeutic agents used in the treatment of leprosy, clofazimine (CFZ). Considering that lipids are extremely demanded during myelination, it is worth questioning whether CFZ could negatively impact peripheral nerve regeneration. Animal models in the study of leprosy tend to focus on long windows of time, restricting early observations on changes in cellular machinery in the face of *M. leprae* infection. The primary objective of the present study was, therefore, to compare two murine models of sciatic nerve injury, via crushing trauma and intraneural inoculation with *M. leprae*, over 03, 14, 28 and 90 days. It was also proposed to investigate the impact of neural infection by *M. leprae* and treatment with CFZ, on gene expression and proteins involved in lipid and myelin homeostasis, using immunofluorescence technique. For this purpose, athymic nude mice (NU-Foxn1nu) were used, divided into five groups and duplicated according to treatment or not with CFZ (N = 03/group): CSH (crushing injury); ML (infected with *M. leprae*); ML/CSH (infection and crushing); NaCl (sodium chloride vehicle); SHAM (simulated surgery). The motor function of each animal was evaluated by gait test, using the sciatic functional index. Nociceptive function was investigated by mechanical stimulation, via Von Frey electronic analgesimeter. The SFI data indicated neural injury at 3 days, except in the animals of the SHAM group. The most affected groups were those subjected to the crushing model, with or without infection, followed by tissue repair over 28 days. The analysis of nociception in response to mechanical stimulation also showed improvement after 28 days, with complete

recovery at 90 days. However, in the late experimental period, the group infected with *M. leprae*, without treatment, exhibited a lower pain threshold compared to almost all other groups, suggesting the presence of pain associated with inflammatory processes resulting from the infection. Immunodetection of ADRP was increased in mice infected with *M. leprae* compared to all other groups. HSL levels were elevated after 28 days of drug administration in the ML_cfz and ML/CSH_cfz groups. The production of MPZ was decreased in infected sciatic nerves treated with CFZ at 90 dpi. The results of this study indicate that the animal model presented here can contribute to the understanding of early factors associated with leprosy neuropathy. The increase in ADRP at early stages of in vivo *M. leprae* infection corroborates previous findings and highlights the early action of this pathogen on lipid production in target cells within the neural microenvironment. The negative effect of CFZ on MPZ regulation may suggest interference with peripheral remyelination and should be the subject of future investigations.

Key words: *M. leprae*; Sciatic Nerve; Animal Experimentation; Clofazimine

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1R¹. Ação de *M. leprae* sobre o metabolismo lipídico da célula hospedeira. O *M. leprae* é fagocitado pela célula, resultando no acúmulo lipídico intracelular. Durante esse processo, APOC1 promove a formação de LDL-C por lipidação de VLDL e CM, que são importados pelo CD36. O CD36 também importa ácidos graxos, transportados pela FABP4 para organelas intracelulares. O acúmulo de triglicerídeos (TAG) é mediado por vias ativadas pelo PPAR- γ . A FABP4 promove a acilação dos ácidos graxos captados pelo CD36, utilizados pela GPAT3 para sintetizar TAG. O GLUT1/3 captura glicose intracelularmente, que é utilizada pelo GPAT3 na síntese de TAG. Além disso, a expressão aumentada de ADRP também contribui para a produção e acúmulo de lipídios. (Adaptado de Tanigawa et al., 2021).

Figura 1M². Experimentação Animal. Etapas do procedimento cirúrgico realizado em camundongos *nude*. (A) Indução anestésica com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, ip). (B) Posicionamento para intervenções subsequentes. (C) Acesso cirúrgico ao nervo isquiático expostos. (D-E) Lesão por esmagamento. (F) Inoculação intraneural com *Mycobacterium leprae*. (G-H) Inoculação de veículo, NaCl 0,9% estéril. (I) Pós-operatório em placa térmica, após reposicionamento dos tecidos e sutura.

Figura 2M. Experimentação Animal. (A) Administração de clofazimina por gavagem. (B) Análise da função motora; camundongo *nude* em treinamento para caminhar na passarela. (C) Análise de nocicepção, via estimulação mecânica por analgesímetro eletrônico Von Frey.

Figura 3M. Avaliação intergrupos da função motora em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Índice Funcional do Isquiático (SFI, *Sciatic Functional Index*). Períodos de análise: (A) pré-intervenção (pi), (B) 03, (C) 14, (D) 28 e (E) 90 dias pós-intervenção (dpi). (F) Valores agrupados. Grupos experimentais, não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH_cfz); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML_cfz); ML/CSH, ML/CSH_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM_cfz). Teste one-way ANOVA, com pós-teste Šídák. Valores de $p <$

¹ R = Revisão da Literatura

² M = Manuscrito

0,05 indicam significância estatística. Dados de três medições obtidas de em um a seis animais/grupo/período.

Figura 4M. Avaliação intergrupos da resposta nociceptiva em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Limiar de retirada das patas (PWT, *Paw Withdrawal Threshold*). Períodos de análise: (A) pré-intervenção (pi), (B) 03, (C) 14, (D) 28 e (E) 90 dias pós-intervenção (dpi). (F) Valores agrupados. Grupos experimentais, não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH_cfz); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML_cfz); ML/CSH, ML/CSH_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM_cfz). Teste one-way ANOVA, com pós-teste Šidák. Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Dados de três medições obtidas de em um a seis animais/grupo/período.

Figura 5M. Imunodeteção de ADRP em nervos isquiáticos murinos. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03 dias pós-intervenção (dpi); 28 dpi; 90 dpi. (A-O) ADRP marcado em AlexaFluor 488 (verde). (A'-O') Overlay com identificação nuclear, DAPI (azul). Imagens representativas de um animal/grupo/período. Aumento: 40X.

Figura 6M. Imunodeteção de ADRP em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH_cfz); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML_cfz); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH_cfz); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl_cfz); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM_cfz). Grupos receberam tratamento com Clofazimina. Períodos experimentais: 03 dias pós intervenção (dpi); 28 dpi; 90 dpi. (A-O) ADRP marcado em AlexaFluor 488 (verde). (A'-O') Overlay com identificação nuclear, DAPI (azul). Imagens obtidas de um animal/grupo/período. Aumento: 40X.

Figura 7M. Avaliação de ADRP em nervos isquiáticos murinos. Densidade de fluorescência de ADRP, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), em grupos não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH_cfz); Infecção

intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML_cfz); ML/CSH, ML/CSH_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM_cfz). (D) Comparações intragrupos. Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A, B, C) ou Tukey (D). Valores de $p < 0,05$ (*) indicam significância estatística. Dados de três campos microscópicos de um animal/grupo/período.

Figura 8M. Imunodeteção de HSL em nervos isquiáticos murinos. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03 dias pós-intervenção (dpi); 28 dpi; 90 dpi. (A-O) ADRP marcado em AlexaFluor 488 (verde). (A'-O') Overlay com identificação nuclear, DAPI (azul). Imagens representativas de um animal/grupo/período. Aumento: 40X.

Figura 9M. Imunodeteção de HSL em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH_cfz); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML_cfz); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH_cfz); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl_cfz); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM_cfz). Grupos receberam tratamento com Clofazimina. Períodos experimentais: 03 dias pós intervenção (dpi); 28 dpi; 90 dpi. (A-O) ADRP marcado em AlexaFluor 488 (verde). (A'-O') Overlay com identificação nuclear, DAPI (azul). Imagens obtidas de um animal/grupo/período. Aumento: 40X.

Figura 10M. Avaliação de HSL em nervos isquiáticos murinos. Densidade de fluorescência de HSL, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), em grupos não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH_cfz); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML_cfz); ML/CSH, ML/CSH_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM_cfz). (D) Comparações intragrupos. Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A, B, C) ou Tukey (D). Valores de $p < 0,05$ (*) indicam significância estatística. Dados de três campos microscópicos de um animal/grupo/período.

Figura 11M. Imunodeteção de MPZ em nervos isquiáticos murinos. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03 dias pós-intervenção (dpi); 28 dpi; 90 dpi. (A-O) ADRP marcado em AlexaFluor 488 (verde). (A'-O') Overlay com identificação nuclear, DAPI (azul). Imagens representativas de um animal/grupo/período. Aumento: 40X.

Figura 12M. Imunodeteção de MPZ em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH_cfz); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML_cfz); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH_cfz); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl_cfz); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM_cfz). Grupos receberam tratamento com Clofazimina. Períodos experimentais: 03 dias pós intervenção (dpi); 28 dpi; 90 dpi. (A-O) ADRP marcado em AlexaFluor 488 (verde). (A'-O') Overlay com identificação nuclear, DAPI (azul). Imagens obtidas de um animal/grupo/período. Aumento: 40X.

Figura 13M. Avaliação de MPZ em nervos isquiáticos murinos. Densidade de fluorescência de MPZ, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), em grupos não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH_cfz); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML_cfz); ML/CSH, ML/CSH_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM_cfz). (D) Comparações intragrupos. Teste ANOVA, com pós-teste Šidák (A, B, C) ou Tukey (D). Valores de $p < 0,05$ (*) indicam significância estatística. Dados de três campos microscópicos de um animal/grupo/período.

Figura 14M. Identificação molecular de *Mycobacterium leprae* em nervos isquiáticos murinos. Ensaio qPCR para gene-alvo RLEP. Grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Períodos de 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi); Grupos tratados ou não com CFZ. Dados representativos obtidos de espécimes de três a cinco animais/grupo/período.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – Micrograma

µl – Microlitro

ACSL1 – *Acyl-CoA synthetase long chain family member 1*

ADRP – *Adipose differentiation-related protein*

ATGL – *Adipose triglyceride lipase* (Lipase triglicéridica adiposa)

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BB – *Borderline borderline* (Dimorfa-dimorfa)

BL – *Borderline lepromatous* (Dimorfa-virchowiana)

BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina de soro bovino)

BT – *Borderline tuberculoid* (Dimorfa-tuberculóide)

cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)

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

CFZ – Clofazimina

cm – Centímetro

CSH – *Crush* (Esmagamento)

Ct - *cycle threshold*

DAPI – *4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride* (4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dicloridrato)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – *Phosphate Deoxyribonucleotides* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)

dpi – Dias pós-intervenção

DTT – *Dithiothreitol* (Ditiotreitol)

ENL – *Erythema nodosum leprosum* (Eritema nodoso hansênico)

ERK – *Extracellular-signal-regulated kinase*

g – Grama

G2D – *Grade 2 disability* (Grau 2 de incapacidade)

GAPDH – *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

HDL – *High-density lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)

HMGCR – *Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase* (Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase)

HPTLC – *High performance thin layer chromatography* (Cromatografia em camada fina de alto desempenho)

HSL – *Hormone-sensitive lipase*

IFN γ – *Gamma interferon* (Interferon gama)

IL-10 – *Interleukin 10* (Interleucina 10)

IL-1 β – *Interleukin 1 beta* (Interleucina 1 beta)

IL-6 – *Interleukin 6* (Interleucina 6)

ip – Intraperitoneal

LDL – *Low-density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

LDLR – *Low-density lipoprotein receptor* (Receptor de lipoproteína de baixa densidade)

LDs – *Lipid droplets* (corpúsculos lipídicos)

LL – *Lepromatous leprosy* (Hanseníase virchowiana)

M – Molar

M. leprae – *Mycobacterium leprae*

M. tuberculosis – *Mycobacterium tuberculosis*

MBP – *Myelin basic protein* (Proteína básica de mielina)

mg/kg – Miligramas por quilo

MHC II – *Major histocompatibility complex* (Complexo principal de histocompatibilidade)

ML – *M. leprae*

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MPZ – *Myelin protein zero* (Proteína zero da de mielina)

mRNA – *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

NaCl – Cloreto de sódio

°C – Graus Celsius

OCT – *Optimal cutting temperature* (Temperatura de corte ideal)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline* (Salina tamponada com fosfato)

PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PD-L1 – *Programmed death-ligand 1* (Ligante de morte programada 1)

PD-L2 – *Programmed death-ligand 2* (Ligante de morte programada 2)

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

PL – *Print length* (Comprimento de impressão)

PQT – Poliquimioterapia

RKIP – *Raf1 kinase inhibitory protein*

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

RR – *Reversal reaction* (Reação reversa)

qPCR – *Quantitative PCR* (PCR quantitativa)

s – Segundos

SC – *Schwann cells* (Células de Schwann)

SES – Secretaria de Estado da Saúde

SFI – *Sciatic functional index* (Índice funcional do isquiático)

SW – *Swiss white*

T1R – *Type 1 reaction* (Reação tipo 1)

T2R – *Type 2 reaction* (Reação tipo 2)

TA – Temperatura ambiente

TAG – *Triacylglycerol* (Triacilglicerol)

TBS – *Tris buffered saline* (Salina tamponada com Tris)

TBST – *Tris Buffered Saline/Triton X-100* (Salina tamponada com Tris/Triton X-100)

THP-1 – *Human leukemia monocytic cell line* (linhagem celular monocítica derivada de leucemia humana)

TNF α – *Tumor necrosis fator alpha* (Fator de necrose tumoral alfa)

TS – *Toe spreading* (Espalhamento do dedo)

TT – *Tuberculoid leprosy* (Hanseníase tuberculóide)

U – Unidades

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA	23
REVISÃO DA LITERATURA	24
Aspectos Gerais e Epidemiológicos da Hanseníase	24
Características Clínicas e Patogênese da Hanseníase.....	24
Tratamento da Hanseníase	26
Clofazimina	26
Interação de <i>M. leprae</i> com Células de Schwann	27
Bioacumulação Lipídica	29
Mielinização	31
Experimentação Animal na Hanseníase	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO II – OBJETIVOS	47
OBJETIVO GERAL	48
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
CAPÍTULO III – MANUSCRITO	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	55
Experimentação Animal	55
Obtenção de <i>M. leprae</i>	56
Infecção do Nervo Isquiático	56
Lesão por Esmagamento do Nervo Isquiático	56
Administração de Clofazimina.....	57
Avaliação de Função Motora	57
Avaliação de Nocicepção	57
Perfusão e Imunofluorescência em Espécimes Criopreservados	58
Detecção Molecular de <i>M. leprae</i> por qPCR RLEP.....	59
Análise Estatística	60
RESULTADOS	61
Resposta Motora	61
Resposta Nociceptiva	62
Regulação de Proteínas do Metabolismo Lipídico – ADRP	62
Regulação de Proteínas do Metabolismo Lipídico – HSL.....	63
Regulação de Proteína de Mielina – MPZ	64
Detecção Molecular de <i>M. leprae</i> por qPCR RLEP.....	64

DISCUSSÃO	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
FIGURAS	76
<i>Figura 1M. Experimentação Animal.</i>	76
<i>Figura 2M. Experimentação Animal.</i>	76
<i>Figura 3M. Avaliação da função motora em nervos isquiáticos de camundongos nude.</i>	77
<i>Figura 4M. Avaliação da resposta nociceptiva em nervos isquiáticos de camundongos nude.</i>	78
<i>Figura 5M. Imunodeteção de ADRP em nervos isquiáticos murinos.</i>	79
<i>Figura 6M. Imunodeteção de ADRP em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina.</i>	80
<i>Figura 7M. Avaliação de ADRP em nervos isquiáticos murinos.</i>	81
<i>Figura 8M. Imunodeteção de HSL em nervos isquiáticos murinos.</i>	82
<i>Figura 9M. Imunodeteção de HSL em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina.</i> ...	83
<i>Figura 10M. Avaliação de HSL em nervos isquiáticos murinos.</i>	84
<i>Figura 11M. Imunodeteção de MPZ em nervos isquiáticos murinos.</i>	85
<i>Figura 12M. Imunodeteção de MPZ em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina.</i>	86
<i>Figura 13M. Avaliação de MPZ em nervos isquiáticos murinos.</i>	87
<i>Figura 14M. Identificação molecular de M. leprae em nervos isquiáticos murinos.</i>	88
CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO	89
CONCLUSÃO	90
ANEXOS	91
ANEXO I	92
Carta de Aprovação CEUA	92

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Aspectos Gerais e Epidemiológicos da Hanseníase

A hanseníase é uma neuropatia periférica infecciosa, considerada uma das mais antigas doenças humanas registradas (Schuenemann et al., 2018). A infecção é causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), que foi identificado em 1873, por Gerhard Henrick Armauer Hansen (Alter et al., 2008). A doença evolui em parte da população durante exposição contínua e íntima entre indivíduos suscetíveis e pacientes portadores de altas cargas bacilares (Araujo et al., 2015; Scollard et al., 2006). É uma neuropatia severamente debilitante e estigmatizante, capaz de comprometer a capacidade sensitiva e motora dos indivíduos, podendo evoluir para incapacidades físicas permanentes (Lockwood, 2019).

O Brasil está entre os países mais afetados pela doença, com cerca de 13% dos novos casos registrados no mundo em 2021, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2022). No ano de 2020, a incidência de hanseníase no Brasil caiu 41,4% comparada aos cinco anos anteriores (da Paz, 2022), o que reflete o efeito da pandemia de COVID-19, que levou o país a implementar medidas de saúde pública sem precedentes, causando impacto negativo no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes (da Paz, 2022).

Apesar dessa redução, em 2021 o país reportou número expressivo de indivíduos com grau máximo de incapacidade (G2D, *grade 2 disability*) no momento do diagnóstico, 1.737, ficando atrás apenas da Índia (1.863) (WHO, 2022). O envolvimento neural é responsável por deformidades físicas em 20% a 30% dos pacientes com hanseníase, e geram grande impacto psicossocial. A detecção precoce e intervenções eficientes são as principais estratégias para reduzir os impactos da neuropatia hansênica (Lasry-Levy et al., 2011; Monteiro et al., 2014).

Características Clínicas e Patogênese da Hanseníase

A hanseníase se manifesta em um amplo espectro clínico, com dois polos bem definidos. No polo tuberculóide (TT), predomina responsividade celular específica contra o *M. leprae* e imunovigilância (Reibel et al., 2015). No extremo oposto do espectro, está a hanseníase

virchowiana (LL), com predominância de resposta imune humoral, resposta celular pouco eficiente e proliferação bacilar (Van der Wel et al., 2007). Na patogênese da doença, também se desenvolvem formas clínicas intermediárias não polares, denominadas dimorfas. Tais formas se subdividem em dimorfa-tuberculóide (BT), dimorfa-dimorfa (BB) e dimorfa-virchowiana (BL) (Ridley, Jopling, 1966). Parte dos pacientes manifesta a forma neural primária da hanseníase, com comprometimento de troncos nervosos e ausência de lesões cutâneas, um aspecto que dificulta o diagnóstico (Nascimento, 2013).

A neuropatia hansênica é frequentemente agravada por episódios inflamatórios agudos, capazes de causar lesões cutâneas inflamatórias e edematosas (Nery et al., 2013; Antunes et al., 2013). Tais eventos podem ocorrer antes, durante ou até mesmo após o regime de tratamento, caracterizando as reações hansênicas, que são divididas em reação tipo 1 (T1R, *type 1 reaction*), ou reação reversa (RR, *reversal reaction*) e reação tipo 2 (T2R, *type 2 reaction*), ou eritema nodoso hansênico (ENL, *erythema nodosum leprosum*) (Lockwood et al., 2019).

A RR é caracterizada por inflamação aguda da pele e nervos, causada pela exacerbação da imunidade mediada por células e hipersensibilidade tardia à antígenos de *M. leprae* (Raffe et al., 2013; Scollard et al., 2022). Esse tipo de reação é apontado como principal causa de dano neural na hanseníase e há relatos de pacientes com RR ocorrendo anos após o tratamento bem sucedido (Kamath et al., 2014). O ENL está ligado à produção e deposição de imunocomplexos, bem como a ativação do Sistema Complemento (Naafs, 2006; Kahawita, Lockwood, 2019). Essa reação se caracteriza pela presença de nódulos dolorosos, superficiais e profundos, com surgimento de úlceras e liberação de conteúdo purulento (Scollard et al., 2022).

Pacientes TT, BT e BB, frequentemente são acometidos pela RR, enquanto que o ENL incide sobre BL e LL (Voorend, Post, 2013; Scollard et al., 2015). Os mecanismos que fundamentam e modulam o início das reações hansênicas não são bem esclarecidos (Scollard et al., 2015), e embora biomarcadores promissores tenham sido testados, até o momento não há testes laboratoriais recomendados para prever estados reacionais (Devides et al., 2018; Scollard et al., 2022).

Os diferentes padrões de resposta imune, característicos de cada uma das manifestações clínicas da doença, estão diretamente associados ao agravamento do dano neural e desenvolvimento de incapacidades físicas (Spierings et al., 2000; Scollard et al., 2015). Além

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alter A, Alcaïs A, Abel L, Schurr E. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Hum Genet.* 2008;123(3):227–35. doi: 10.1007/s00439-008-0474-z.

Lockwood DNJ. Chronic aspects of leprosy—neglected but important. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019;113(12):813–7. doi: 10.1093/trstmh/try131.

World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. *Weekly Epidemiol Rec.* 2022;97(36):429-50.

Lasry-Levy E, Hietaharju A, Pai V, Ganapati R, Rice ASC, Haanpää M, et al. Neuropathic pain and psychological morbidity in patients with treated leprosy: a cross-sectional prevalence study in mumbai. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3): e981. doi: 10.1371/journal.pntd.0000981.

Monteiro LD, Alencar CH, Barbosa JC, Novaes CCBS, Silva RCP, Heukelbach J. Limited activity and social participation after hospital discharge from leprosy treatment in a hyperendemic area in north Brazil. *Rev Bras Epidemiol.* 2014;17(1):91–104. doi: 10.1590/1415-790x201400010008eng.

Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015;45(9):383–93. doi: 10.1016/j.medmal.2015.09.002.

Van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, Van Zon M, Pierson J, et al. M tuberculosis and M leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell.* 2007;129(7):1287–98. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.059.

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

Nascimento OJM. Leprosy neuropathy: clinical presentations. *Arq Neuro-Psiquiatr.* 2013;71(9B):661–6. doi: 10.1590/0004-282X20130146.

Nery JAC, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira SSC, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2013;88(5):787-92. doi: 10.1590/abd1806-4841.20132004.

Antunes DE, Araujo S, Ferreira GP, Cunha ACSR, Costa AV, Gonçalves MA, et al. Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(7):901–8. doi: 10.1590/0074-0276130222.

Raffe SF, Thapa M, Khadge S, Tamang K, Hagge D, Lockwood DNJ. Diagnosis and treatment of leprosy reactions in integrated services - the patients' perspective in nepal. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(3): e2089. doi: 10.1371/journal.pntd.0002089.

Scollard, D, Stryjewska B, Dacso M. Leprosy: epidemiology, microbiology, clinical manifestations, and diagnosis [Internet]. UpToDate; 21 Out 2022 [citado 23 maio 2023]. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/leprosy-epidemiology-microbiology-clinical-manifestations-and-diagnosis>

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71(4):795–803. doi: 10.1016/j.jaad.2014.03.034.

Devides AC, Rosa PS, Belone AFF, Coelho NMB, Ura S, Silva EA. Can anti-PGL-1 and anti-NDO-LID-1 antibody titers be used to predict the risk of reactions in leprosy patients? *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91(3):260–5. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.002.

Medeiros RCA, Girardi KCV, Cardoso FKL, Mietto BS, Pinto TGT, Gomez LS, et al. Subversion of schwann cell glucose metabolism by mycobacterium leprae. *J Biol Chem*. 2016;291(41):21375–87. doi: 10.1074/jbc.M116.725283.

Mattos KA, Oliveira VCG, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected

macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* 2014;16(6):797–815. doi: 10.1111/cmi.12279.

Lemes RMR, Silva CAM, Marques MAM, Atella GC, Nery JAC, Nogueira MRS, et al. Altered composition and functional profile of high-density lipoprotein in leprosy patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(3):e0008138. doi: 10.1371/journal.pntd.0008138.

Pereira-Dutra FS, Teixeira L, Costa MFS, Bozza PT. Fat, fight, and beyond: the multiple roles of lipid droplets in infections and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2019;106(3):563–80. doi: 10.1002/JLB.4MR0119-035R.

Tanigawa K, Hayashi Y, Hama K, Yamashita A, Yokoyama K, Luo Y, et al. *Mycobacterium leprae* promotes triacylglycerol de novo synthesis through induction of GPAT3 expression in human premonocytic THP-1 cells. *PLoS One.* 2021;16(3): e0249184. doi: 10.1371/journal.pone.0249184.

Tanigawa K, Luo Y, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Karasawa K, et al. Essential roles of PPARs in lipid metabolism during mycobacterial infection. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7597. doi: 10.3390/ijms22147597.

Kaur G, Kaur J. Multifaceted role of lipids in mycobacterium leprae. *Future Microbiol.* 2017;12(4):315–35. doi: 10.2217/fmb-2016-0173.

Degang Y, Akama T, Hara T, Tanigawa K, Ishido Y, Gidoh M, et al. Clofazimine modulates the expression of lipid metabolism proteins in mycobacterium leprae-infected macrophages. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(12): e1936. doi: 10.1371/journal.pntd.0001936.

Chrast R, Saher G, Nave K-A, Verheijen MHG. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res.* 2011; 52(3):419–34. doi: 10.1194/jlr. R009761.

Revin VV, Pinyaev SI, Parchaykina MV, Revina ES, Maksimov GV, Kuzmenko TP. The effect of resveratrol on the composition and state of lipids and the activity of phospholipase A2 during

the excitation and regeneration of somatic nerves. *Front Physiol.* 2019; 10:384. doi: 10.3389/fphys.2019.00384.

Lenz SM, Collins JH, Lahiri R, Adams LB. “Rodent Models in Leprosy Research”. *International Textbook of Leprosy*. Eds. Scollard and Gillis D. M. (Greenville: American Leprosy Missions). 2020. [citado 5 Jun 2023].

Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech.* 2013;6(1):19-24. doi: 10.1242/dmm.010215.

Truman RW, Ebenezer G, Pena MT, Sharma R, Balamayooran G, Gillingwater TH, et al. The armadillo as a model for peripheral neuropathy in leprosy. *Ilar J.* 2014;54(3):304–14. doi: 10.1093/ilar/ilt050.

Shetty VP, Antia NH. Light and ultrastructural study of sciatic nerve lesions induced using intraneural injection of viable mycobacterium leprae in normal and immunosuppressed swiss white mice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2002;70(1):25-33.

Shepard C, Mcrae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1968;36(1):78-82.

Birdi TJ, Antia NH. Mechanisms involved in peripheral nerve damage in leprosy with special reference to insights obtained from in vitro studies and the experimental mouse model. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2003 Dec;71(4):345-54.

Shetty VP, Matharu PS, Antia NH. Sciatic nerve of normal and T200x5R swiss white mice fails to support multiplication of intraneurally injected *M. leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999;67(4):446-52.

Save MP, Shetty VP, Shetty KT. Hypophosphorylation of NF-H and NF-M subunits of neurofilaments and the associated decrease in KSPXK kinase activity in the sciatic nerves of swiss white mice inoculated in the foot pad with mycobacterium leprae. *Leprosy Rev.* 2009 Dec;80(4):388-401.

Trombone APF, Pedrini SCB, Diório SM, Belone AFF, Fachin LRV, Nascimento DC, et al. Optimized protocols for mycobacterium leprae strain management: frozen stock preservation and maintenance in athymic nude mice. *J Vis Exp*. 2014;(85):50620. doi: 10.3791/50620.

Casalenovo MB, Rosa PS, Bertoluci DFF, Barbosa ASAA, Nascimento DC, Souza VNB, et al. Myelination key factor krox-20 is downregulated in Schwann cells and murine sciatic nerves infected by mycobacterium leprae. *Int J Exp Pathol*. 2019;100(2):83–93. doi: 10.1111/iep.12309.

Campos AS, Diaz BL, Rivera EAB, Granjeiro JM, Braga LMGM, Marcel F, et al. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: introdução geral. In: Brasil. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Gabinete do Ministro. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica: fascículo 1: introdução geral [Internet]. Brasília: CONCEA; 2016 [citado 22 maio 2023]. p. 7-39. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/publicacoes/Fasciculo1.pdf>

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. Effects of purification and fluorescent staining on viability of Mycobacterium leprae. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2005;73(3):194-202.

Bombeiro AL, Pereira BTN, Bonfanti AP, Oliveira ALR. Immunomodulation by dimethyl fumarate treatment improves mouse sciatic nerve regeneration. *Brain Res Bull*. 2020; 160:24–32. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.04.005.

Cardoso FSS, Cardoso R, Ramalho BS, Taboada TB, Nogueira ACS, Blanco Martinez AM, et al. Inosine accelerates the regeneration and anticipates the functional recovery after sciatic nerve crush injury in mice. *Neuroscience*. 2019; 423:206–15. doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.09.023.

Inserra MM, Bloch DA, Terris DJ. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. *Microsurgery*. 1998;18(2):119-24. doi: 10.1002/(sici)1098-2752(1998)18:2<119: aid-micr10>3.0.co;2-0.

Van Neerven SG, Bozkurt A, O'Dey DM, Scheffel J, Boecker AH, Stromps JP, et al. Retrograde tracing and toe spreading after experimental autologous nerve transplantation and crush injury of the sciatic nerve: a descriptive methodological study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj*. 2012;7(1):5. doi: 10.1186/1749-7221-7-5.

Cunha TM, Verri WA Jr., Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, Cunha FQ and Ferreira SH et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. 2004 Mar 1; 37(3):391–9. Fontinele LL, Heimfarth L, Pereira EWM, Rezende MM, Lima NT, Carvalho YMBG, et al. Anti-hyperalgesic effect of (-) - α -bisabolol and (-) - α -bisabolol/ β -Cyclodextrin complex in a chronic inflammatory pain model is associated with reduced reactive gliosis and cytokine modulation. *Neurochem Int*. 2019; 131:104530. doi: 10.1016/j.neuint.2019.104530.

Oliveira MA, Heimfarth L, Passos FRS, Santos RM, Mingori MR, Moreira JCF, et al. Naringenin complexed with hydroxypropyl- β -cyclodextrin improves the sciatic nerve regeneration through inhibition of p75NTR and JNK pathway. *Life Sci*. 2020; 241:117102. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117102.

Collins JH, Lenz SM, Ray NA, Balagon MF, Hagge DA, Lahiri R, et al. A sensitive and quantitative assay to enumerate and measure mycobacterium leprae viability in clinical and experimental specimens. *Curr Protoc*. 2022;2(2):e359. doi: 10.1002/cpz1.359.

Rambukkana A, Zanazzi G, Tapinos N, Salzer JL. Contact-dependent demyelination by mycobacterium leprae in the absence of immune cells. *Science*. 2002;296(5569):927–31. doi: 10.1126/science.1067631.

El Idrissi NB, Das PK, Fluiter K, Rosa PS, Vreijling J, Troost D, et al. *M. leprae* components induce nerve damage by complement activation: identification of lipoarabinomannan as the dominant complement activator. *Acta Neuropathol*. 2015;129(5):653–67. doi: 10.1007/s00401-015-1404-5.

Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research. *J Neurosci Methods*. 2015; 243:39–46. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.01.021.

Byun YH, Lee MH, Kim SS, et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005;45(2):222-228.

Dinh P, Hazel A, Palispis W, Suryadevara S, Gupta R. Functional assessment after sciatic nerve injury in a rat model. *Microsurgery*. 2009;29(8):644–9. doi: 10.1002/micr.20685.

Haidar MK, Timur SS, Kazanci A, et al. Composite nanofibers incorporating alpha lipoic acid and atorvastatin provide neuroprotection after peripheral nerve injury in rats. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020; 153:1-13.

Wei J, Su W, Zhao Y, Wei Z, Hua Y, Xue P, et al. Maresin 1 promotes nerve regeneration and alleviates neuropathic pain after nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2022;19(1):32. doi: 10.1186/s12974-022-02405-1.