UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Mariane Bertolucci Casalenovo

Verificação do Papel de *Mycobacterium leprae* na Ativação de MAPKs em Nervos Periféricos Humanos e Murinos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu

2023

Mariane Bertolucci Casalenovo

Verificação do Papel de *Mycobacterium leprae* na Ativação de MAPKs em Nervos Periféricos Humanos e Murinos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Botucatu

2023

C334v

Casalenovo, Mariane Bertolucci
Verificação do papel de Mycobacterium leprae na ativação de mapks em nervos periféricos humanos e murinos / Mariane Bertolucci Casalenovo. -- Botucatu, 2023
167 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Maria Renata Sales Nogueira

1. Imunopatogênese da hanseníase. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DA PESQUISA

Título da Tese: "Verificação do papel do *Mycobacterium leprae* na ativação de MAPKs em nervos periféricos humanos e murinos"

Impacto científico esperado: A identificação de proteínas-chave associadas à neuropatia hansênica representa um avanço significativo no entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes à infecção pelo *Mycobacterium leprae*. A ativação diferencial das MAPKs e c-Jun sugere potenciais alvos terapêuticos no controle da degeneração dos nervos periféricos na hanseníase. Os modelos murinos empregados neste estudo possibilitam uma análise detalhada dos processos de lesão e regeneração neural, reforçando a relevância dessa abordagem experimental para a investigação da neuropatia hansênica.

Impacto social: A hanseníase permanece uma doença negligenciada, tornando essencial a realização de pesquisas que contribuam para a redução do estigma, a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e o fortalecimento de políticas públicas voltadas à equidade no acesso ao diagnóstico e tratamento. Este estudo fornece dados científicos e epidemiológicos relevantes, evidenciando a urgência de ações voltadas à conscientização e educação da população. O diagnóstico tardio da doença, frequentemente associado a incapacidades físicas avançadas, reforça a importância de estratégias preventivas e de intervenções precoces para reduzir os impactos sociais e de saúde pública da hanseníase.

Impacto econômico: No Brasil, onde a hanseníase ainda é endêmica em algumas regiões, o impacto econômico das neuropatias periféricas associadas à doença é significativo. A exclusão social e o estigma enfrentados pelos pacientes frequentemente limitam suas oportunidades de emprego e comprometem sua qualidade de vida, perpetuando um ciclo de pobreza e dependência econômica. Políticas públicas focadas no diagnóstico precoce, no tratamento eficaz e na reabilitação podem atenuar esses custos de forma considerável, promovendo uma reintegração mais eficaz dos indivíduos afetados pela neuropatia hansênica no mercado de trabalho e na sociedade, além de melhorar sua autonomia e inclusão social.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 13 dias do mês de julho do ano de 2023, às 14:00 horas, no(a) Sala 1 de Reuniões do Prédio da Administração da FMB/Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO, intitulada **VERIFICAÇÃO DO PAPEL DE MYCOBACTERIUM LEPRAE NA ATIVAÇÃO DE MAPKS EM NERVOS PERIFÉRICOS HUMANOS E MURINOS** . A Comissão Examinadora foi constituida pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARIA RENATA SALES NOGUEIRA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru/SP, Profa. Dra. ROBERTHA MARIANA RODRIGUES LEMES (Participação Virtual) do(a) FM/Ribeirão Preto - Usp, Profa. Dra. CRISTIANA SANTOS DE MACEDO (Participação Virtual) do(a) Fundação Oswaldo Cruz, Profa. Dra. LUCIANA RAQUEL VINCENZI FACHIN (Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru, Prof. Dr. DEJAIR CAITANO DO NASCIMENTO (Participação Presencial) do(a) Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru/SP. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARIA RENATA SALES NOGUEIRA

DEDICATÓRIA

À Deus, pela presença, amor e cuidado em cada instante. Por me fortalecer diante das contradições e me conduzir com sabedoria e coragem em mais essa missão. Tua fidelidade é maior que qualquer obstáculo. Com todo meu amor, Te agradeço por dar sentido à minha vida, por ser meu melhor amigo, razão do meu sorriso e esperança, e me abençoar com pessoas e oportunidades maravilhosas.

À Nossa Senhora das Graças, por me agraciar com serenidade e perseverança. Pelos inúmeros milagres alcançados por meio da sua intercessão. Agradeço por me guiar em direção aos meus sonhos e cuidar de mim, com o mais puro amor, como cuidou de seu Filho Jesus. Meu coração é pequeno demais para todo o amor que sinto por ti. Toda minha devoção, querida Mãe.

À Keren Bastos Valezi *(in memoriam)*, pelo incrível exemplo de vida, por me encorajar na realização dos meus objetivos acadêmicos, e acima de tudo, pela amizade. Com muito carinho guardo você em meu coração. Que do céu, ao lado de Deus, continue olhando por mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro Francisco Casalenovo e Fátima Bertolucci Casalenovo, por todo o apoio e dedicação em todos os aspectos da minha formação. Agradeço o empenho constante em proporcionar o melhor desta vida para mim e meu irmão e por compartilharem conosco a fé, os princípios e os valores que nos moldaram em pessoas fortes e compassivas.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira, pelas oportunidades oferecidas, suporte e orientação ao longo do meu mestrado e doutorado. Sua expertise, dedicação e encorajamento foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional. Agradeço a amizade que cultivamos, por sempre estar disposta a me ouvir e aconselhar com carinho. Obrigada por acreditar em mim. Foi uma honra ser orientada por você.

À minha amiga Graziela Aparecida Silva Gonçalves, por todo amor e incentivo que não cabem em palavras. Sua amizade, colaboração e entusiasmo foram verdadeiros pilares durante todo o meu percurso. Sou imensamente grata por ter em minha vida alguém que me inspira e motiva a ser melhor a cada dia.

Aos meus queridos amigos Amanda Finardi, Bruna Martins, Eloise Brasil, e Jônatas Perico, pela agradável convivência, pelas incansáveis

conversas e conselhos, choros e gargalhadas, cafés, almoços e comemorações. Sem dúvidas, vocês foram essenciais para recarregar minhas energias e seguir em frente. Aos demais amigos, Florença Sayuri Mikawa dos Santos, Bruna Bortolomai, Gabriel Fioroni, Lavínia Batista, Marcos Sobral, Maria Izilda Andrade, Nathan Guilherme de Oliveira, Priscila Ballalai, Raissa Rotelli e Silas Matheus pelos ensinamentos e sorrisos compartilhados.

Aos pesquisadores do Instituto Lauro de Souza Lima, Profa. Dra. Ana Carla Pereira Latini, Profa. Ana Carolina Vilas Bôas Weckerth, Profa. Dra. Andrea Belone, Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento, Profa. Dra. Fabiana Covolo Souza Santana, Profa. Dra. Ida Maria Foschiani, Profa. Dra. Patrícia Sammarco, Profa. Dra. Renata Bilion Ruiz Prado, Profa. Dra. Sônia Usó, Profa. Suzana Madeira e Profa. Dra. Vânia Brito de Souza, pelo carinho e conselhos que serão lembrados por toda a vida. Obrigada por tornarem minha jornada uma experiência enriquecedora e significativa.

À Daniele Ferreira Bertolucci, da Equipe Técnica de Microbiologia do Instituto Lauro de Souza Lima, pela amizade, pelas longas conversas, pelo constante incentivo, pelo suporte técnico em experimentação animal, disposição em servir e compartilhar conhecimento. Obrigada por ser tão presente.

À Débora Regina Fernandes Degand, da Equipe Técnica de Patologia do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo carinho, boas risadas e suporte na aquisição de cortes congelados para a técnica de imunofluorescência.

À Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa e Beatriz Gomes Carreira Sartori, da Equipe Técnica de Biologia do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo afeto, atenção e suporte laboratorial nos imunoensaios e técnicas moleculares.

À Vânia do Amaral Soler, da Seção Técnica de Pós-Graduação da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu, pela gentileza e atenção com os alunos.

À Shelly Favorito de Carvalho, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu, pelo suporte na aquisição de imagens em microscopia confocal, e pelas palavras carinhosas e enaltecedoras.

Aos demais colaboradores deste estudo, especialmente à Profa. Dra. Robertha Mariana Rodrigues Lemes, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) e à Profa. Dra. Cristiana Santos de Macedo, do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo suporte científico e discussões inspiradoras.

Aos servidores do Instituto Lauro de Souza Lima, sobretudo aos queridos Sr. João Batista e Sr. Aroldo, às adoráveis meninas da Califórnia, e aos funcionários do Biotério, SAME, CPD e Diretoria e Ensino, sempre muito gentis e prestativos. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

À Seção Técnica de Pós-Graduação e Laboratório de Microscopia Eletrônica 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.

"Senhor, ajuda-me a derramar Tua fragrância onde quer que eu vá" (Santa Teresa de Calcutá)

RESUMO

CASALENOVO, M. B**. Verificação do Papel de *Mycobacterium leprae* na Ativação de MAPKs em Nervos Periféricos Humanos e Murinos**. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu, 2023.

As neuropatias periféricas podem ter várias causas, incluindo a hanseníase, e afetam significativamente a qualidade de vida dos indivíduos. Este estudo verificou o papel das principais MAPKs (ERK1/2, p38α MAPK, JNK) e do fator de transcrição c-Jun na infecção experimental por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e nas neuropatias periféricas em indivíduos com e sem hanseníase. Foram coletados fragmentos de nervos de indivíduos com neuropatia periférica, realizada uma avaliação epidemiológica e comparados dois modelos de lesão neural em camundongos. As funções motoras e nociceptivas foram avaliadas, e a expressão proteica das MAPKs e c-Jun foi analisada por ensaios celulares, buscando compreender os mecanismos subjacentes à neuropatia hansênica. A caracterização sociodemográfica e clínica revelou que o grupo de indivíduos com neuropatia hansênica (LepN) apresentava maior prevalência de indivíduos mais jovens (73,59% com menos de 60 anos) e do sexo masculino (73,59%). A maioria dos casos era de indivíduos brancos (86,79%) com educação primária incompleta (22,64%). No grupo de outras formas de neuropatia periférica (oPN), observaram-se características semelhantes, mas com uma proporção ligeiramente maior de indivíduos com 60 anos ou mais (46,67 %). A caracterização clínica revelou que os indivíduos com LepN apresentavam incapacidades mais graves, maior espessamento neural e uma maior prevalência de mononeuropatia múltipla em comparação com o grupo oPN. Os fatores de risco associados à LepN incluíam diabetes, HIV com tratamento quimioterápico e exposição prolongada a pesticidas. O modelo murino de lesão do nervo isquiático demonstrou impactos significativos na função motora e nociceptiva, com diferenças na resposta à estimulação mecânica ao

longo do tempo. Na análise da expressão proteica das MAPKs e c-Jun, observaram-se níveis elevados de ERK1/2 em camundongos infectados com *M. leprae*, indicando seu papel nas fases iniciais da infecção. Em amostras humanas, os nervos oPN apresentaram níveis mais altos de ERK1/2 em comparação com os nervos LepN. Houve ativação da via de sinalização p38α MAPK no grupo de lesão por esmagamento, e a expressão de c-Jun foi significativamente maior no grupo infectado por *M. leprae*. Esses resultados sugerem uma regulação temporal da expressão de ERK1/2 durante a infecção por *M. leprae* e a importância de p38α MAPK e c-Jun na neuropatia hansênica. Em conclusão, este estudo fornece informações relevantes sobre o perfil sociodemográfico e clínico da neuropatia associada à hanseníase, e indica uma regulação diferencial das vias de sinalização intracelular, ERK1/2, p38α MAPK, JNK, e do fator de transcrição c-Jun, em modelo murino de trauma por esmagamento e infecção por *M. leprae*. Compreender esses mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de terapias direcionadas para o tratamento da neuropatia hansênica, melhorando a qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Palavras-chave: *M. leprae;* Células de Schwann, Proteínas quinases ativadas por mitógenos

ABSTRACT

CASALENOVO, M. B. ***Verification of the Role of Mycobacterium leprae in the Activation of MAPKs in Human and Murine Peripheral Nerves.*** *Thesis (Doctorate in Pathology) – São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", Faculty of Medicine of Botucatu, 2023.*

Peripheral neuropathies can have several causes, including leprosy, and significantly affect the quality of life of individuals. This study verified the role of the main MAPKs (ERK1/2, p38α MAPK, JNK) and the c-Jun transcription factor in experimental infection by Mycobacterium leprae (M. leprae) and in peripheral neuropathies in individuals with and without leprosy. Nerve fragments from individuals with peripheral neuropathy were collected, an epidemiological evaluation was performed and two models of neural injury in mice were compared. Motor and nociceptive functions were assessed, and the protein expression of MAPKs and c-Jun was analyzed by cellular assays, seeking to understand the underlying mechanisms of leprosy neuropathy. The sociodemographic and clinical characterization revealed that the group of individuals with leprosy neuropathy (LepN) had a higher prevalence of younger individuals (73.59% aged less than 60 years) and males (73.59%). Most cases were white individuals (86.79%) with incomplete primary education (22.64%). In the group of other forms of peripheral neuropathy (oPN), similar characteristics were observed, but with a slightly higher proportion of individuals aged 60 years or older (46.67%). Clinical characterization revealed that individuals with LepN had more severe disabilities, greater neural thickening and a higher prevalence of multiplex mononeuropathy compared to the oPN group. Risk factors associated with LepN included diabetes, HIV with chemotherapy treatment, and prolonged exposure to pesticides. The murine model of sciatic nerve injury demonstrated significant impacts on motor and nociceptive function, with differences in response to mechanical stimulation over time. In the analysis of MAPKs and c-Jun protein expression, high levels of ERK1/2 were observed in mice infected with M. leprae, indicating its role in the initial stages of

the infection. In human samples, oPN nerves showed higher levels of ERK1/2 compared to LepN nerves. There was activation of the p38α MAPK signaling pathway in the crush injury group, and c-Jun expression was significantly higher in the M. leprae infected group. These results suggest a temporal regulation of ERK1/2 expression during M. leprae infection and the importance of p38α MAPK and c-Jun in leprosy neuropathy. In conclusion, this study provides relevant information on the sociodemographic and clinical profile of leprosy-associated neuropathy, and indicates a differential regulation of the intracellular signaling pathways, ERK1/2, p38α MAPK, JNK, and the c-Jun transcription factor, in murine model of crush injury and M. leprae infection. Understanding these mechanisms can contribute to the development of targeted therapies for the treatment of leprosy neuropathy, improving the quality of life of affected individuals.

Keywords: *M. leprae; Schwann cells, Mitogen-activated protein kinase*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1R[1]. Três Vias Principais de MAP quinase. ERK, JNK, p38 são ilustrados por ativos BioRender dinâmicos (ícones, linhas, formas e/ou texto) (Iwasaki, A, 2020)

Figura 2R. Interação entre *Mycobacterium leprae* e os receptores presentes na membrana das células de Schwann**.** (A) Fotomicrografia ilustrando interação patógeno-hospedeiro. (B, C) Moléculas na membrana das células de Schwann, α/β-distroglicana e ErbB2, identificadas como receptores para *M. leprae*. A interação molecular envolve a ativação do domínio quinase de ErbB2, que desencadeia cascatas de sinalização, como a fosforilação da via MAPK, Erk1/2 (Hess, Rambukkana, 2019)

Figura 1M[2]. Experimentação Animal: Etapas do procedimento cirúrgico realizado em camundongos *nude*. Os animais são anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, ip) (A) e, devidamente posicionados para as intervenções subsequentes (B). Nervos isquiáticos expostos (C); submetidos a esmagamento (D-E); inoculados com *M. leprae* viável (F); inoculados com NaCl 0,9% estéril (G-H); a pele é suturada e os animais são mantidos em placas térmicas até o fim do efeito anestésico (I)

Figura 2M. Avaliação da função motora em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Índice Funcional do Isquiático (SFI) avaliado nos tempos experimentais, (A) pré-intervenção (pi), (B) 03, (C) 14, (D) 28 e (E) 90 dias pós-intervenção (dpi). (F) Valores agrupados. Grupos experimentais: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação com *M. leprae* (ML); ML/CSH; Inoculação controle com Cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A-E) e Dunnett (F). Valores de p

[1] R = Revisão da Literatura
[2] M = Manuscrito

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

Figura 3M. Resposta nociceptiva em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Limiar de retirada de pata (PWT), avaliado nos tempos experimentais, (A) pré-intervenção (pi), (B) 03, (C) 14, (D) 28 e (E) 90 dias pós-intervenção (dpi). (F) Valores agrupados. Grupos experimentais: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação com *M. leprae* (ML); ML/CSH; Inoculação controle com Cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A-E) e Dunnett (F). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Dados de três medições obtidas de um a seis animais/grupo/período

Figura 4M. Caracterização por imunofluorescência de nervos isquiáticos de camundongos *nude*, controle SHAM. Em (A), identificação nuclear por DAPI (azul). Em (B), axônios marcados por tubulina βIII, à esquerda, e bainha de mielina identificada por MPZ, à direita (ambos, AlexaFluor 488, verde). Em (C), células de Schwann identificadas pela proteína de citoesqueleto, S100β, à esquerda, e tubulina βIII à direita (ambos, AlexaFluor 594, vermelho). (D) ilustra imagens sobrepostas (esquerda e direita). Barras de escala: 15 µm (A: 630x)

Figura 5M. Determinação da via ERK1/2 em ensaio InstantOne ELISA™. A avaliação foi realizada em dois períodos experimentais: (A) 03 e (B) 28 dias após a intervenção, nos seguintes grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Também foi realizada uma avaliação comparativa entre os espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias periféricas (oPN) (C). O teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A, B) ou Tukey (C), foram utilizados. Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto SHAM

Figura 6M. Imunodetecção de ERK1/2 em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (G-I') ML/CSH; (J-L') Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

Figura 7M. Avaliação de ERK1/2 em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de ERK1/2, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (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 dois a três animais/grupo/período

Figura 8M. Determinação de p38α MAPK em ensaio InstantOne ELISA™. A avaliação foi realizada nos seguintes períodos experimentais: (A) 03 e (B) 28 dias após a intervenção (dpi), considerando os grupos: Lesão por esmagamento (CSH), Inoculação endoneural por *M. leprae*. (ML), ML/CSH, Injeção de cloreto de sódio (NaCl) e Cirurgia simulada (SHAM). Além disso, foi feita uma avaliação comparativa entre espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias periféricas (oPN) (C). O teste ANOVA foi utilizado, seguido do pós-teste Šídák (A, B) ou Tukey (C). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto SHAM

Figura 9M. Imunodetecção de p38α MAPK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (G-I') ML/CSH; (J-L') Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada

(SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

Figura 10M. Avaliação de p38α MAPK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de p38α MAPK, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (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 dois a três animais/grupo/período

Figura 11M. Determinação de JNK em ensaio InstantOne ELISA™. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03 e (B) 28 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (C) Avaliação entre espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias periféricas (oPN). Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A, B, D, E) ou Tukey (C). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto as do grupo SHAM

Figura 12M. Imunodetecção de JNK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (G-I') ML/CSH; (J-L') Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

Figura 13M. Avaliação de JNK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de JNK, normalizada pelo respectivo número de núcleos

DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (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 dois a três animais/grupo/período

Figura 14M. Imunodetecção de c-Jun em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (G-I') ML/CSH; (J-L') Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (M-O') Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

Figura 15M. Avaliação de c-Jun em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de c-Jun, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (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 dois a três animais/grupo/período

LISTA DE TABELAS

Tabela 1M. Caracterização sociodemográfica de indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), entre 2009 e 2019

Tabela 2M. Caracterização clínica de indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), entre 2009 e 2019

Tabela 3M. Fatores de risco em indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), entre 2009 e 2019

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µl – Microlitro

µm – Micrometro

ARTN – *Artemin*

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BB – *Borderline-borderline leprosy*

BDNF – *Brain derived neurotrophic factor*

BL – *Borderline-lepromatous leprosy*

BSA – *Bovine serum albumine*

BT – *Borderline-tuberculoid*

cDNA – *Complementary DNA*

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

CMT – Charcot-Marie-Tooth

CMT1A – Charcot-Marie-Tooth 1A

CMT4C – Charcot-Marie-Tooth 4C

CMV – *Citomegalovirus*

CSH – *Crush*

Ct – *Cycle threshold*

CXCL10 – *C-X-C motif chemokine ligand 10*

DAPI – 4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dicloridrato

dpi – Dias pós-intervenção

EBV – *Epstein-Barr virus*

EGR2 – *Early growth response 2 (alias Krox-20)*

EMT – *Epithelial-mesenchymal transition*

ENL – *Erythema nodosum leprosum*

EPO – *Erythropoietin*

ERBB2 – *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

ERK1/2 – *Extracellular signal-regulated kinase1/2*

G2D – *Grade 2 disability*

GBS – Guillain-Barré syndrome

GDNF – *Glial cell derived neurotrophic factor*

HCV – *Hepatitis C virus*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HLA – *Human leukocyte antigen*

HLP – *Histone-like protein*

HSV – *Herpes simplex virus*

IFN-γ – *Interferon-γ*

IL-10 – *Interleukin 10*

IL-1α – *Interleukin 1 alpha*

IL-1β – *Interleukin 1 beta*

IL-2 – *Interleukin 2*

IL-4 – *Interleukin 4*

IL-6 – *Interleukin 6*

IL-7 – *Interleukin 7*

ip – Intraperitoneal

JNK – *c-Jun N-terminal Kinase*

KIR – *Killer cell immunoglobulin-like receptors*

LIF – *Leukemia inhibitory factor*

LL – *Lepromatous leprosy*

LRRK2 – *Leucine-rich repeat kinase 2*

M. leprae – Mycobacterium leprae

M. lepromatosis – Mycobacterium lepromatosis

M. tuberculosis – Mycobacterium tuberculosis

MAG – *Myelin-associated glycoprotein*

MAPKs – *Mitogen-activated protein kinases*

MCP-1 – *Monocyte chemoattractant protein-1*

mg/kg – Miligramas por quilograma

MHC – *Major histocompatibility complex*

ML – *M. leprae*

MOG – *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*

MR – *Mannose receptor*

MRC1 – *Mannose receptor C-type 1*

NaCl – Cloreto de sódio

NGF – *Nerve growth fator*

NOD2 – *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*

Notch-1 – *Neurogenic locus notch homolog protein 1*

NRG1 – *Neuregulin-1*

NT-3 – *Neurotrophin 3*

NT-4 – *Neurotroph*in 4

p75NTR – *p75 Neurotrophin receptor*

PDGF-BB – *Platelet-derived growth factor-BB*

PFA – Paraformaldeído

PGL-1 – *Phenolic glycolipid 1*

PQT – Poliquimioterapia

PRRs – *Pattern recognition receptors*

pSLC – *Progenitor stem-like cells*

PTN – *Pleiotrophin*

PTX3 – *Pentraxin 3*

PWT – Paw *withdrawal threshold*

rpm – Rotações por minuto

RR – *Reversal reaction*

SARS-CoV-2 – *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

SC – *Schwann cell*

SCP – *Schwann cell precursor*

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNPA – Sistema Nervoso Periférico Autônomo

SNPM – Sistema Nervoso Periférico Motor

SNPs – *Single nucleotide polymorphisms*

SOX-10 – *SRY-box 10*

T1D – *Type 1 diabetes*

T1R – *Type 1 reaction*

T2D – *Type 2 diabetes*

T2R – *Type 2 reaction*

TA – Temperatura ambiente

TLR – *Toll-like receptors*

TNF-α – *Tumor necrosis factor-alpha*

Treg – *Regulatory T cell*

TRK – *Tropomyosin receptor kinase*

TT – *Tuberculoid leprosy*

VEGF – *Vascular endothelial growth factor*

vs. – *Versus*

VZV – *Varicella zoster virus*

WHO – *Word Health Organization*

YY1a – *Yin-Yang 1a*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA 27

REVISÃO DA LITERATURA 28

O Sistema Nervoso Periférico 28

Regulação da Plasticidade Neural 31

Etiologia e Classificação das Neuropatias Periféricas 38

Neuroinfecção e Micobactérias 41

Considerações Gerais sobre a Hanseníase 43

Envolvimento dos Nervos Periféricos na Hanseníase 46

Adaptação Intracelular de *M. leprae* aos Nervos Periféricos 49

Modelos Experimentais de Infecção Neural na Hanseníase 54

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

CAPÍTULO II – OBJETIVOS 87

OBJETIVO GERAL 88

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 88

CAPÍTULO III – MANUSCRITO 89

INTRODUÇÃO 90

MATERIAL E MÉTODOS 95

Nervos Periféricos Humanos 95

Experimentação Animal 96

Obtenção de *M. leprae* 98

Infecção do Nervo Isquiático 99

Lesão por Esmagamento do Nervo Isquiático 99

Análise da Função Motora 100

Análise de Nocicepção 100

Obtenção de Extrato Proteico 101

Ensaio Imunoenzimático 102

Perfusão Intracardíaca 102

Imunofluorescência em Cortes Congelados 103

Análise Estatística 104

RESULTADOS 104

Aspectos Sociodemográficos e Clínicos de Indivíduos com Neuropatia Periférica Atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima entre 2009 e 2019 104
Função Motora em Modelo Murino de Lesão Neural 110
Resposta Nociceptiva em Modelo Murino de Lesão Neural 112
Caracterização Imunofenotípica de Nervos Isquiáticos Murinos 113
Regulação de ERK1/2 em Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural 114
Regulação de p38α MAPK Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural 118
Regulação de JNK Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural 122
Regulação de c-Jun Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural 126
DISCUSSÃO 130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 141
CAPÍTULO III – CONCLUSÃO 158
CONCLUSÃO 159
ANEXOS 160
ANEXO I 161
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 161
ANEXO II 163
Parecer Consubstanciado - CEP 163
ANEXO III 166
Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais - ILSL 166

CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

O Sistema Nervoso Periférico

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) organiza eficientemente uma rede de comunicação que garante ao Sistema Nervoso Central (SNC) o controle preciso sobre órgãos e processos em todo o corpo humano (Grant et al., 1999). Os gânglios, juntamente com os nervos e tecido conjuntivo associado, integram estruturalmente as unidades neurais periféricas. Os gânglios nervosos são formados pelo agrupamento de corpos celulares de neurônios, enquanto os nervos se arranjam em feixes paralelos e são classificados como sensitivos, motores e mistos (Goldstein, 2001).

Os nervos que são compostos por fibras aferentes recebem informações do ambiente externo e interno e as enviam para o SNC. Por sua vez, os nervos formados por fibras eferentes permitem que os impulsos gerados no SNC alcancem os órgãos efetores (Catala, Kubis, 2013). Com base em características anatômicas e funções específicas, o SNP é dividido em SNP motor (SNPM), e SNP autônomo (SNPA). As fibras nervosas motoras do SNPM inervam os músculos estriados esqueléticos, transmitindo os impulsos do SNC para os mesmos. Já as fibras nervosas motoras do SNPA permitem a comunicação do SNC com os músculos lisos viscerais e cardíacos (Sternini, 1997; Karemaker, 2017).

Os nervos periféricos são revestidos por camadas distintas de tecido conjuntivo, denominadas endoneuro, perineuro e epineuro (Peltonen et al., 2013). Esses compartimentos possuem uma organização estrutural e funcional intimamente relacionada às funções de proteção e sustentação (Mizisin, Weerasuriya, 2011). Internamente, cada fibra nervosa, composta pelo axônio e pela célula glial, é envolvida pelo endoneuro, uma delicada camada de tecido conjuntivo frouxo rica em fibras reticulares, fibrilas colágenas, glicosaminoglicanos e fibroblastos dispersos

(Mackinnon, 2015). O perineuro organiza grupos de fibras nervosas em feixes - ou fascículos - e estabelece uma barreira metabolicamente ativa (Allt, Lawrenson, 2000; Peltonen et al., 2013). A disposição das camadas concêntricas de células perineurais e uma matriz extracelular composta principalmente de fibras colágenas e fibronectina, conferem resistência mecânica a essa estrutura. O epineuro é composto por tecido conjuntivo denso, tecido adiposo e vasos sanguíneos e constitui o revestimento mais externo envolvendo grupos de feixes nervosos (Filler et al., 2004).

A glia periférica é formada pelas células de Schwann (SCs) (Reed et al., 2022), originadas de células-tronco da crista neural (Jessen et al., 1994). O desenvolvimento das SCs no SNP envolve uma sequência de eventos moleculares e celulares. Durante o período embrionário, as células precursoras das SCs (SCPs) surgem como uma população de células migratórias e proliferativas (Wanner et al., 2006), que geram diferentes tipos celulares residentes em vários locais anatômicos, incluindo outras linhagens gliais (Jessen et al., 1994; Woodhoo et al., 2009), fibroblastos endoneurais (Joseph et al., 2004), neurônios parassimpáticos e entéricos (Uesaka et al., 2015), células do sistema simpático-adrenal - como as células cromafins e neurônios simpáticos (Kameneva et al., 2021) - entre outros (Woodhoo et al., 2009; Aquino, Sierra, 2018).

Sinais axonais, especialmente do fator de crescimento NRG1 (neuregulina 1) e do receptor NOTCH1, são fundamentais para que as SCPs avancem para o estágio seguinte de desenvolvimento e se tornem SCs imaturas (Newbern, Birchmeier, 2010; Raphael, Talbot, 2011), que, por sua vez, geram SCs mielinizantes e não mielinizantes, conhecidas como SCs de Remak (Liu et al., 2015). A maturação das SCs está diretamente relacionada ao diâmetro do axônio e ao repertório de proteínas (Feltri et al., 2016; Taveggia et al., 2005). As SCs mielinizantes formam camadas de mielina ao redor de axônios de maior diâmetro, expressando níveis elevados de NRG1, enquanto as SCs de Remak envolvem múltiplos axônios de pequeno diâmetro que produzem NRG1 de forma restrita (Taveggia et al., 2005). A mielinização dos nervos periféricos

aumenta a velocidade de propagação do impulso nervoso em fibras A e B, que consistem em axônios motores e certos axônios sensoriais mais grossos. As fibras nervosas do tipo C, por sua vez, estão associadas às SCs de Remak e compreendem os axônios sensoriais e autônomos pós-ganglionares (Griffin, Thompson, 2008).

Outras populações de células gliais incluem as células satélites, *boundary cap cells*, células perineurais, SCs perissinápticas, SCs da pele, células embainhantes olfatórias e a glia entérica (Reed et al., 2022). As células satélites envolvem os gânglios sensoriais, simpáticos e parassimpáticos e desempenham um papel importante no desenvolvimento da dor crônica (revisado por Hanani, Spray, 2020). As células de limite superior derivadas da crista neural (CBs, *boundary cap cells*), são um grupo de células transitórias com papéis importantes na orientação e revestimento dos axônios das raízes nervosas espinhais (Golding, Cohen, 1997; Radomska, Topilko, 2017). As células perineurais desempenham um papel na barreira hematoneural (Sharghi-Namini et al., 2006), no desenvolvimento (Clark et al., 2014) e na regeneração dos nervos periféricos (Lewis, Kucenas, 2014).

As SCs perissinápticas que envolvem as junções neuromusculares desempenham um papel na manutenção da sinapse e na reinervação após lesão, enquanto as SCs da pele estão associadas a mecanorreceptores que transmitem informações sobre toque, pressão, vibração e força para o SNC (Alhindi et al., 2021; revisado por Cobo et al., 2021). As células embainhantes olfatórias são indispensáveis para a sobrevivência e crescimento dos axônios olfatórios (revisado por Barnett, 2004), e a glia entérica, em conjunto com os neurônios da parede intestinal, desempenha um papel na modulação da atividade sináptica, regulação da motilidade intestinal, neurotransmissão e processos inflamatórios (Lavoie et al., 2011; Howard et al., 2021).

O trauma mecânico tem sido amplamente estudado no SNP e sabe-se que, logo após uma lesão traumática os segmentos nervosos distais sofrem alterações

morfológicas e bioquímicas por meio de um processo dinâmico chamado degeneração Walleriana (Jessen, Mirsky, 2008). Nesse processo, as primeiras manifestações incluem a interrupção dos fluxos retrógrado e anterógrado nos axônios lesionados (Menorca et al., 2013; Scheib, Hoke, 2013). Em seguida, a ruptura da membrana plasmática axonal leva a um rápido influxo de íons, como cálcio e sódio, que ativam as calpaínas, uma família de proteases de cisteína dependentes de cálcio (Touma et al., 2007), além do proteassoma (Zhai et al., 2003). Esse grupo de proteases inicia a degradação do citoesqueleto axonal e, distalmente, fragmentos axonais e ovoides de mielina estimulam a migração de diferentes tipos celulares (Brosius Lutz et al., 2017), incluindo células inflamatórias e as próprias SCs, que buscam restabelecer a homeostase por meio de sua extraordinária plasticidade (Mahar, Cavalli, 2018; Hopf et al., 2020; Nocera, Jacob, 2020).

Regulação da Plasticidade Neural

A plasticidade permite que determinados tecidos e células alterem seus padrões fenotípicos e respondam a sinais intrínsecos e extrínsecos, tanto em condições homeostáticas quanto patológicas (Phelps, 1990). A desdiferenciação, transdiferenciação e reprogramação celular são processos biológicos que têm recebido considerável destaque nas últimas décadas devido à sua importância na recuperação funcional de nervos periféricos (Balakrishnan et al., 2021). Durante a desdiferenciação, uma célula terminalmente diferenciada retorna para um estágio anterior de sua própria linhagem, enquanto que a transdiferenciação é definida pela conversão direta entre células maduras distintas, geralmente de mesma origem embrionária. A reprogramação celular ocorre quando células diferenciadas recuperam o potencial pluripotente e podem, portanto, diferenciar-se em diversos tipos celulares (Jopling et al., 2011; Guo et al., 2022).

Diferentemente do SNC, nervos lesionados do SNP têm uma capacidade robusta de regeneração e proporcionam resultados funcionais, principalmente devido à alta plasticidade das SCs (Scheib, Höke, 2016; Boerboom et al., 2017; Jessen, Arthur-Farraj, 2019). Nesse cenário, as SCs terminalmente diferenciadas residentes do tecido agredido passam por modificações bruscas em sua linhagem para estabelecer um fenótipo de reparo (revisado em Jessen, Mirsky, 2005, 2008), em um processo designado como reprogramação celular adaptativa (Jessen, Arthur-Farraj, 2019).

Além da reprogramação celular, a resposta inflamatória também visa inicialmente a reestruturação dos tecidos após uma agressão neural. A inflamação é estimulada precocemente pelas SCs pela regulação positiva de mediadores pró-inflamatórios, como MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), TNF-α (tumor necrosis factor-alpha), IL-1β (interleukin 1 beta), IL-1α (interleukin 1 alpha) e LIF (leukemia inhibitory factor), induzidos em parte pelos receptores do tipo Toll 2 e 4 (Toll-Like Receptors; TLR) (Lee et al., 2006). O papel central desses mediadores envolve ativação e migração de células imunes, especialmente macrófagos pró-inflamatórios no coto distal do nervo periférico lesionado, que coordenam juntamente com as SCs, eventos reparadores subsequentes (revisado por Martini et al., 2008; Rotshenker, 2011).

As SCs participam diretamente da remoção de detritos no microambiente neural lesado por meio da mielinofagia (Stratton et al., 2018; Zigmond, Echevarria, 2019; Jessen, Mirsky, 2019a). As SCs iniciam a degradação de seus componentes celulares intrínsecos, em particular proteínas e lipídios da bainha de mielina, com a formação de autofagossomos que se unem aos lisossomos para que as enzimas hidrolíticas possam digerir completamente esses *debris* (Jang et al., 2016; Gomez-Sanchez et al., 2015). A mielina remanescente prejudica qualquer tentativa de recuperação, portanto, essa primeira fase de depuração é de extrema importância para que ocorra a regeneração axonal. Os resquícios axonais e mielínicos extrínsecos são subsequentemente

eliminados pelo processo de fagocitose, realizado por SCs e macrófagos previamente atraídos por fatores quimiotáticos (Nocera, Jacob, 2020; Nazareth et al., 2021).

A reprogramação de gliais adultas quiescentes para um fenótipo proliferativo e reparador está intimamente associada a adaptações em sua expressão gênica, sendo que imediatamente após o início desse processo, ocorre diminuição na expressão dos genes que definem o perfil mielinizante (Yang et al., 2012; Jessen, Mirsky, 2019b). No SNC, a supressão rápida e eficiente do perfil mielinizante não é observada em sequência a uma lesão devido a moléculas como Nogo/RTN4 (*neurite outgrowth inhibitor, reticulon-4*), MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) e MAG (*myelin-associated glycoprotein*). Essas moléculas potencialmente inibem o crescimento dos neuritos, induzindo apoptose ou um estado quiescente em oligodendrócitos, o que compromete a eliminação de *debris* de mielina e expressão dos genes envolvidos na mielinização (Antonios et al., 2019). O comportamento diferencial das células gliais periféricas e centrais em resposta às agressões parece ser um dos principais determinantes da superioridade regenerativa do SNP em relação ao SNC (Nocera, Jacob, 2020; Jessen, Mirsky, 2019b).

Durante a reparação dos nervos periféricos, as SCs se reorganizam estruturalmente e formam estruturas celulares compactas, as bandas de Büngner, que orientam os axônios na direção dos órgãos-alvo (Gomez-Sanchez et al., 2017; Stassart, Woodhoo, 2021). As SCs produzem fatores de crescimento que fornecem suporte estrutural e metabólico aos axônios em regeneração (Eggers et al., 2010; McGregor, English, 2019). Os primeiros desses fatores de crescimento foram isolados e agrupados na família das neurotrofinas, que incluem o fator de crescimento neural (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), a neurotrofina 3 (NT-3) e a neurotrofina 4 (NT-4); além de seus receptores de baixa e alta afinidade, o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) e os receptores quinase de tropomiosina A, B e C (Trk A, B, C) (Amatu et al., 2019; Nogueira et al, 2020). Outros fatores neurotróficos que desempenham papéis

importantes no neurodesenvolvimento e na regeneração incluem o fator neurotrófico derivado de células da glia (GDNF) e a artemina (ARTN), que são ligantes da mesma família (Ilieva et al., 2019), a pleiotrofina (PTN) (Wang, 2019) e a eritropoietina (EPO) (Mirzaie et al., 2020; Talukder et al., 2021; Govindappa, Elfar, 2022). Mediadores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), também contribuem para a neuroregeneração (Nogueira et al., 2016; Meng et al., 2022).

O fator de transcrição c-Jun é crucial na indução e manutenção do fenótipo reparador das SCs após uma lesão neural (Parkinson et al., 2004, 2008; Arthur-Farraj et al., 2012; revisado por Jessen, Mirsky, 2016, 2019b). A atividade do c-Jun varia durante o desenvolvimento neural (Boerboom et al., 2017; Jessen, Arthur-Farraj, 2019; Nocera, Jacob, 2020). Em nervos periféricos não lesionados, o c-Jun é normalmente expresso em níveis muito baixos (Hantke et al., 2014; Klein et al., 2014), mas sua expressão aumenta rapidamente em diferentes condições neuropatológicas e lesões agudas (Fontana et al., 2012; Hutton et al., 2011; Wilcox et al., 2020, 2021). Estudos prévios mostram, que a ausência de c-Jun resulta em uma série de anormalidades regenerativas (Arthur-Farraj et al., 2012; Fontana et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2015; revisado por Jessen, Mirsky, 2016, 2019b).

Em lesões crônicas, as SCs diminuem gradualmente a expressão de c-Jun e de outros genes implicados no suporte ao reparo (Eggers et al., 2010; revisado em Boyd, Gordon, 2003; Höke, Brushart, 2010; Wagstaff et al., 2021). Tanto em roedores quanto em humanos, c-Jun não consegue ser mantido em níveis adequados durante a desnervação crônica experimental, tornando a regeneração axonal lenta (Wilcox et al., 2020, 2021; Wagstaff et al., 2021). Durante o envelhecimento o fenótipo reparador também tende a regredir, como demonstrado pela queda de expressão de c-Jun após lesão neural periférica induzida em animais senis, quando comparados a animais jovens (Jessen, Mirsky, 2022). O fator de transcrição c-Jun está envolvido na sinalização das três vias clássicas de MAPKs (revisado por Boerboom et al., 2017; Jessen, Arthur-

Farraj, 2019; Norrmén et al., 2018; Nocera, Jacob, 2020). Essas vias incluem a ERK1/2, p38α MAPK e JNK (Parkinson et al., 2004; Yang et al., 2012) (**Figura 1R**).

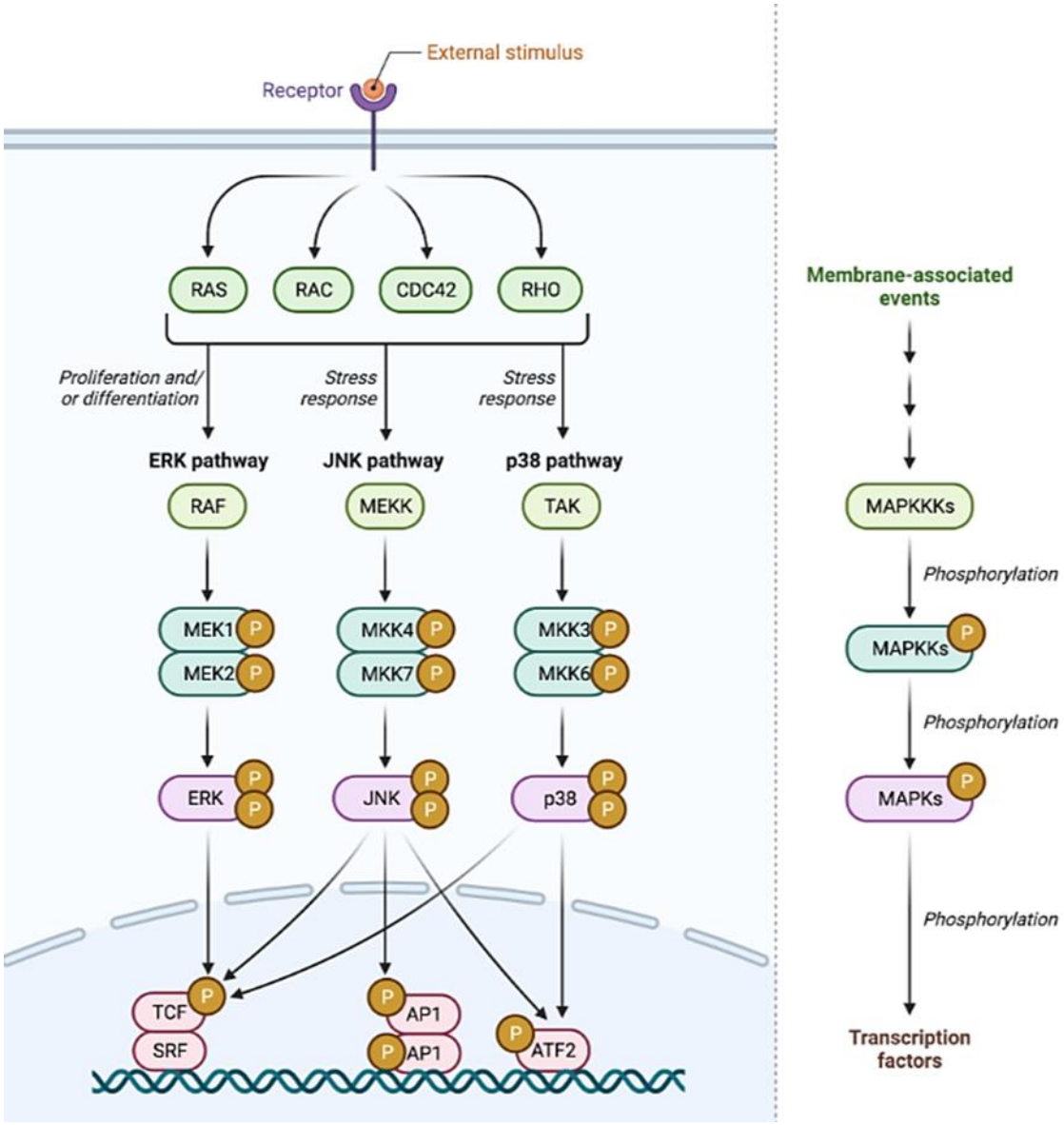


Figura 1R. Três Vias Principais de MAP quinase. ERK, JNK, p38 são ilustrados por ativos BioRender dinâmicos (ícones, linhas, formas e/ou texto) (Iwasaki, A, 2020)

As MAPKs estão envolvidas em processos celulares como expressão gênica, metabolismo, sobrevivência, proliferação e diferenciação (Pearson et al., 2001; revisado por Cargnello, Roux, 2011). A primeira via de MAPK descrita foi a ERK1/2 (Seger, Krebs, 1995). Vários aspectos da mielinização tanto no SNC (Ishii et al., 2012; Ishii et al., 2014; revisado por Gaesser, Fyffe-Maricich, 2016) quanto no SNP (Newbern, Birchmeier,

2010; Ishii et al., 2014) são regulados pela via da ERK1/2. No SNP, a atividade da via da ERK1/2 é absolutamente necessária para o desenvolvimento neural normal (revisado por Grigoryan, Birchmeier, 2015; revisado por Newbern, 2015). Um estudo *in vivo* revelou que a inativação da ERK1/2 em SCs embrionárias compromete os processos de diferenciação e mielinização (Newbern et al., 2011). Ainda, a ativação da ERK1/2 é necessária para a indução do fator de transcrição pró-mielinizante YY1a (Newbern et al., 2011; Sheean et al., 2014).

Embora a ativação transitória da ERK1/2 durante os estágios iniciais do desenvolvimento promova a mielinização, sua ativação em nervos adultos após lesão neural pode ter um efeito oposto (revisado por Glenn, Talbot, 2013; Kim et al., 2013). Seu envolvimento durante a reparação de nervos periféricos foi demonstrado em estudos como o de Napoli et al. (2012), no qual a ativação contínua da ERK1/2 em SCs resultou em desmielinização e desdiferenciação celular (Napoli et al., 2012), além do recrutamento de células inflamatórias (Woodhoo et al., 2009; Napoli et al., 2012). Por outro lado, a inibição da ERK1/2 resultou em comprometimento da reprogramação das SCs (Harrisingh et al., 2004; Napoli et al., 2012).

A manutenção da ativação da ERK1/2 durante a regeneração interfere negativamente na reparação dos nervos periféricos, afetando os fenótipos mielinizante e não mielinizante das células gliais, bem como a regeneração axonal e a recuperação funcional. Os autores destacaram os papéis distintos da ERK1/2 nos processos que coordenam a mielinização e a reparação dos tecidos neurais periféricos (Cervellini et al., 2018). A ativação aberrante da ERK1/2 antes da manifestação do dano axonal também foi comprovada em modelos animais de neuropatias hereditárias, como CMT1A e CMT4C (Houlden et al., 2009; Kohl et al., 2010; Fledrich et al., 2014).

O papel da p38α MAPK no processo de mielinização tem se revelado contraditório. Evidências apontam para sua participação na mielinização (Fragoso et

al., 2003; Hossain et al., 2012), enquanto o aumento de sua atividade também foi associado à inibição da mielinização em SCs (Yang et al., 2012). Fragoso et al. (2003), argumentam que a p38α MAPK desempenha uma função pró-mielinizante, uma vez que a sua inibição nos estágios iniciais da mielinização bloqueou a formação da bainha de mielina (Fragoso et al., 2003). Por outro lado, a indução da p38α MAPK nas SCs pode afetar a expressão de genes relacionados à mielinização, tanto durante o desenvolvimento (Syed et al., 2010; Yang et al., 2012), quanto no processo de remielinização após lesão axonal (Roberts et al., 2017). Segundo Jessen e Mirsky (2005), o bloqueio da p38α MAPK em estágios precoces do desenvolvimento compromete a formação da lâmina basal (revisado por Jessen, Mirsky, 2005).

Yang et al. (2012), demonstraram que a indução da p38α MAPK foi suficiente para desencadear desmielinização após lesão neural periférica, além de levar à desdiferenciação das SCs *in vitro* (Yang et al., 2012), reforçando o papel da p38α MAPK na formação de células de reparo. Os autores também relacionam a ativação da p38α MAPK com a expressão de c-Jun (revisado por Lee et al., 2014; Arthur-Farraj et al., 2012). A ativação da via p38α MAPK também foi demonstrada na micróglia espinal, desempenhando um papel importante na dor neuropática (revisado por Ji, Suter, 2007). Inúmeros estudos descrevem que a administração de inibidores específicos da p38α MAPK é capaz de reverter a dor neuropática em diferentes modelos animais (Wen et al., 2007; Hains, Waxman, 2006; Sweitzer et al., 2004).

A via JNK é ativada por vários estímulos extracelulares, principalmente em condições de estresse, e desempenha um papel crucial no desenvolvimento e regeneração neural do SNP (Waetzig et al., 2006; revisado por Antoniou et al., 2011). Lesões nos nervos periféricos são acompanhadas pela ativação rápida e persistente da JNK, juntamente com a fosforilação de c-Jun (revisado por Eminel et al., 2008; revisado por Jessen et al., 2015; Nocera, Jacob, 2020). A ativação da JNK tem sido fortemente implicada nos processos inflamatórios e apoptóticos (revisado por Dhanasekaran,

Reddy, 2008; Ahn et al., 2016; Zhong et al., 2017). A via JNK estimula a autofagia em vários tipos celulares (Pattingre et al., 2009), regulando positivamente a mielinofagia nas SCs (revisado por Jessen, Mirsky, 2016).

A inibição da via JNK resulta em atraso na remoção dos detritos de mielina (Mirsky et al., 2008; Arthur-Farraj et al., 2012). Manassero et al. (2012), demonstraram que a ativação da via JNK induz e mantém a dor neuropática em nervos periféricos lesionados (Manassero et al., 2012). A regulação da proliferação das SCs está relacionada à ativação da JNK e ao aumento da expressão de c-Jun, uma vez que o inibidor específico dessa via, SP600125, é capaz de reduzir a proliferação celular após lesão neural periférica em modelos animais (Blom et al., 2014).

Etiologia e Classificação das Neuropatias Periféricas

Agressões aos nervos periféricos foram descritas a princípio por Seddon, em 1943, como neuropraxia, axonotmese e neurotmese (Seddon et al., 1943). A neuropraxia caracteriza a lesão por compressão, onde observa-se desmielinização segmentar, acompanhada da interrupção temporária da condução nervosa local, na ausência de prejuízo à integridade axonal. Lesões definidas como axonotmese levam a ruptura do axônio com subsequente degeneração Walleriana no coto distal à lesão, repercutindo na redução da velocidade de condução nervosa. Em tais circunstâncias, tanto as células gliais como as camadas de tecido conjuntivo do nervo são preservadas. Na neurotmese, há transecção completa do nervo, incluindo o tecido conjuntivo que forma seu arcabouço de sustentação (Seddon et al., 1943). Este sistema de classificação foi aprimorado por Sunderland, em 1951, e cinco padrões de lesão foram estabelecidos, apoiados na extensão do dano neural (Sunderland, 1951).

O envolvimento neural pode assumir distintos padrões de distribuição e extensão anatômica (Hanewinckel et al., 2016; Stassart, Woodhoo, 2021). O

comprometimento isolado de um único nervo periférico caracteriza as mononeuropatias, ocasionadas por compressão, aprisionamento ou trauma. Sinais clínicos como dormência, sensação de formigamento e dor são compartilhados pela maioria dos indivíduos acometidos. Além de alterações sensoriais, determinadas mononeuropatias levam também à fraqueza muscular. A integridade do nervo mediano é gravemente ameaçada na síndrome do túnel do carpo, mononeuropatia de maior prevalência e importante causa de incapacidade (Gelfman et al., 2009; Ibrahim et al., 2012). Entre as mononeuropatias de extremidade superior, destaca-se também a síndrome do túnel cubital (Assmus et al., 2011), onde há envolvimento crítico do nervo ulnar, enquanto as extremidades inferiores frequentemente sofrem com a síndrome de compressão do nervo fibular superficial, seguida pela compressão do nervo cutâneo femoral lateral (Barohn, Amato, 2013; Hanewinckel et al., 2016).

Na mononeuropatia múltipla, dois ou mais nervos são afetados de forma assimétrica, e de modo geral apresentam mecanismos subjacentes autoimunes e inflamatórios associados (Watson, Dyck, 2015). Os indivíduos usualmente desenvolvem dor disestésica intensa com déficits sensoriais irregulares e disfunção motora associada. À medida que a condição progride, torna-se menos multifocal e aproxima de uma distribuição simétrica, semelhante a maioria das polineuropatias (England, Asbury, 2004). Informações epidemiológicas sobre as mononeuropatias múltiplas são relativamente escassas, possivelmente devido à heterogeneidade de causas relacionadas. Com frequência estão associadas à vasculite sistêmica, condição que reúne uma diversidade de doenças de etiologia autoimune caracterizadas pela inflamação dos vasos sanguíneos. Demais agentes indutores de mononeuropatia múltipla incluem as reações de hipersensibilidade a medicamentos, além da infecção direta dos nervos, como na hanseníase (Serrano-Coll et al., 2018).

As polineuropatias são definidas pelo comprometimento simétrico e simultâneo de numerosos nervos periféricos (Poitras, Zochodne, 2022). Entre os aspectos clínicos

predominam fraqueza e atrofia muscular, parestesia, dor, hipoestesia e sintomas autonômicos (Hanewinckel et al., 2016; Pasnoor et al., 2013). As polineuropatias exibem grande heterogeneidade de causas, as quais determinam a evolução das manifestações no nervo. A Síndrome de Guillain-Barré (GBS) provavelmente representa a melhor e mais frequente referência de polineuropatia aguda, com início súbito e evolução rápida, enquanto na polineuropatia crônica, frequentemente observada na diabetes mellitus, os sintomas se desenvolvem gradual e lentamente (England, Asbury, 2004; Watson, Dyck, 2015).

A estrutura complexa do SNP é exposta a inúmeros fatores de risco para o desenvolvimento de condições patológicas (Barrell, Smith, 2019; Hammi, Yeung, 2021). As neuropatias periféricas, como designadas em conjunto, apresentam etiopatogenias heterogêneas e desafiadoras. Estima-se que cerca de 20 a 40% das neuropatias periféricas permanecem sem causa definida (Wilcox et al., 2020; Kollmer, Bendszus, 2021). Nas últimas décadas, sua incidência sofreu um aumento significativo (Kubiak et al., 2018), alcançando mais de um milhão de novos casos por ano, no mundo (Katona, Weis, 2017; Mao et al., 2021).

As causas mais comuns de neuropatias periféricas nos Estados Unidos e na Europa são pré-diabetes e diabetes tipo 2 (T2D). Em torno de 50% dos indivíduos acometidos, tanto de diabetes tipo 1 (T1D) quanto T2D, desenvolve alguma forma de neuropatia durante a vida (Feldman et al., 2017). Demais distúrbios metabólicos associados ao desenvolvimento das neuropatias periféricas incluem a insuficiência renal crônica, amiloidose e dislipidemias (Jasti et al., 2017; O'Brien et al., 2014). Condições inflamatórias de caráter autoimune, como vasculite e GBS (Kanda, 2013; Soliven, 2013) também afetam significativamente o SNP.

Quimioterápicos e antirretrovirais, etilismo crônico e exposição à metais pesados compõe a lista de agentes neurotóxicos relacionados às neuropatias

periféricas (Staff, Windebank, 2014; Zajączkowska et al., 2019). O trauma mecânico é um fator etiológico frequentemente associado ao dano neural e dor neuropática (Taylor et al., 2008; Wildgaard et al., 2009). Deficiências nutricionais (Tefferi, Pruthi, 1994; Rao et al., 2014) e fatores hereditários, como a Síndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT), se somam a gama de agentes etiológicos responsáveis por lesões, muitas vezes irreversíveis, no SNP (Jennings et al., 2022).

Neuroinfecção e Micobactérias

Somando-se ao conjunto de fatores que determinam a destruição dos tecidos neurais, estão as infecções e a eventual resposta imune exacerbada, que agrava danos previamente estabelecidos (de Freitas, 2007; Collins, 2012). Agentes infecciosos correlacionados ao desenvolvimento de neuropatias periféricas incluem, o vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (HCV), citomegalovírus (CMV), vírus varicela-zoster (VZV), vírus herpes simples (HSV-1 e HSV-2), e bactérias patogênicas, como *Campylobacter jejuni, Borrelia burgdorferi, Treponema pallidum* (Brizzi, Lyons, 2014), *Orientia tsutsugamushi* (Basu, Chakravarty, 2022), *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*) (Serrano-Coll, Cardona-Castro, 2022). Recentemente, durante a pandemia de COVID-19, foi demonstrada uma associação importante entre a infecção por SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)* e o comprometimento de nervos periféricos (Ftiha et al., 2020; Saif et al., 2022).

Alguns patógenos não virais, como *M. leprae* e *M. lepromatosis*, se destacam por infectar diretamente as células gliais do SNP; um tropismo exclusivo que não se reproduz no SNC (Serrano-Coll et al., 2018; Hess, Rambukkana, 2019). Identificado em 1873, por Gerhard Henrick Armauer Hansen, *M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) que se apresenta na forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, com extremidades arredondadas, medindo de 1 a 8 µm de comprimento e

0,3 a 0,5 µm de diâmetro (Alter et al., 2008). A maioria das micobactérias compartilham as propriedades estruturais e os principais elementos químicos da parede celular, basicamente composta por peptideoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídeas que servem de suporte para os ácidos micólicos (Vissa, Brennan, 2001). Em determinadas espécies patogênicas, externamente à parede celular observa-se a formação de uma cápsula enriquecida de compostos lipídicos. O glicolipídio fenólico 1 (PGL-1), em particular, é o integrante capsular mais importante de *M. leprae* e peça fundamental na patogênese dos nervos periféricos (Rambukkana et al., 1997; Scollard et al., 2006; Chavarro-Portillo et al., 2023).

A extensa evolução redutiva que sofreu o genoma de *M. leprae*, ao longo dos séculos, repercutiu na perda maciça de importantes genes funcionais (Cole et al., 2001). Diante do predomínio de pseudogenes, o *M. leprae* eficientemente adequou-se ao parasitismo intracelular (Cole et al., 2001; Monot et al., 2009), para a sua sobrevivência e propagação. As vias metabólicas das células hospedeiras são operadas pelo bacilo para a realização de inúmeros processos, como aqueles relacionados a síntese lipídica da parede celular. Quando confrontado com o conjunto genômico de *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis)*, metade dos genes associados ao metabolismo mostraram-se ausentes no *M. leprae* (Scollard et al., 2006), o que possivelmente justifica seus requisitos de crescimento muito específicos. Enquanto a maioria dos patógenos cresce idealmente em 37°C, o *M. leprae* requer temperaturas inferiores, conforme opta inclusive por alojar-se nas áreas mais frias do corpo humano (Truman, Krahenbuhl, 2001). Ainda, o tempo de multiplicação excepcionalmente longo e limitação de cultivo *in vitro* integram suas peculiaridades (Oliveira et al., 2005).

Descrito mais recentemente, o *M. lepromatosis* apresenta perfil microbiológico muito próximo ao do *M. leprae* (Levis et al., 2012). Uma análise prévia do genoma de *M. lepromatosis*, revelou evidências de uma estreita relação filogenética e ampla similaridade entre os genes funcionais de ambas as espécies (Han et al., 2008; Singh et

al., 2015). A compreensão dos aspectos patogênicos do *M. lepromatosis* é limitada (Han et al., 2008), contudo os genes que codificam as adesinas necessárias para a invasão nos alvos neurais são altamente conservados nessa espécie e quadros neuropatológicos semelhantes aos estabelecidos por *M. leprae* são esperados (Singh et al., 2015; Deps, Collin, 2021).

Considerações Gerais sobre a Hanseníase

A hanseníase é uma das doenças infecciosas mais antigas, com descrições há mais de 2.000 anos. A grande campanha de tratamento com a poliquimioterapia (PQT) (Smith et al., 2017) durante décadas, foi primordial para avanços significativos na redução da carga global da doença, no entanto, mais de 100 países, particularmente subdesenvolvidos, se mantem endêmicos (WHO, 2022; Taal et al., 2021). Em 2021, 143 países somaram 140.594 novos casos da doença em todo o mundo, sendo Brasil, Índia e Indonésia responsáveis pela notificação de mais de 10.000 novos casos cada, correspondendo a 74,5% da carga total. O Brasil representa 93,6% de todos os novos diagnósticos das Américas e ocupa o segundo lugar com maior número de casos no mundo, atrás apenas da Índia (WHO, 2022). Apesar das estratégias globais em aprimorar a vigilância e os sistemas de informação, obstáculos ainda não solucionados contribuem para que milhares de indivíduos permaneçam não diagnosticados e não tratados em todo o mundo (Deps, Cruz, 2020; WHO, 2022).

Seu diagnóstico é extremamente desafiador devido, entre muitos aspectos, ao caráter espectral de sua patogênese, o que resulta em formas clínicas diferentes e variações em relação ao seu desfecho e severidade das sequelas que se apresentam (Bhandari et al., 2022). A soma de parâmetros clínicos, baciloscópicos, imunológicos e histopatológicos estabelece duas apresentações clínicas polares na hanseníase (Ridley, Jopling, 1966). Em uma extremidade do espectro, a hanseníase tuberculóide (TT, *tuberculoid*) caracteriza-se pela robusta resposta imune pró-inflamatória Th1 e Th17

com produção das citocinas IL-2 *(interleukin-2)* e IFN-γ *(interferon-γ)*, que eficientemente limitam a multiplicação de *M. leprae* (Abdallah et al., 2014). Nesses indivíduos as lesões cutâneas são hipopigmentadas ou eritematosas, com bordas externas elevadas e centro hipocrômico, apresentando importante alteração de sensibilidade. Alopecia parcial ou total e anidrose podem estar presentes em razão da desnervação dos apêndices cutâneos (Lastória, Abreu, 2014). Comumente, as lesões são únicas ou quando ocorrem em pequeno número, se distribuem de forma assimétrica. Os bacilos são raros e os granulomas bem delimitados, formados por macrófagos epitelióides, células gigantes do tipo Langhans e halo linfocitário, frequentemente agridem a epiderme e os ramos neurais próximos. O envolvimento precoce e intenso de um único nervo periférico está presente na maior parte desses indivíduos (Ridley, Jopling, 1966; Froes et al., 2022; Maymone et al., 2020).

Os indivíduos com hanseníase virchowiana (LL, *lepromatous*), no extremo oposto do espectro, exibem um aumento de células T reguladoras (Tregs) e altos títulos de anticorpos específicos. Essa intensa resposta imune humoral, com predominante expressão das citocinas IL-10 *(interleukin-10)* e IL-4 *(interleukin-4),* é incapaz de conter a proliferação de *M. leprae*, e acumulam-se, portanto, altas cargas bacilíferas nas múltiplas lesões desses indivíduos (Misch et al., 2010; Froes et al., 2022). As lesões cutâneas são descritas como manchas hipocrômicas, eritematosas ou acastanhadas com bordas indefinidas, disposta na maioria das vezes de maneira simétrica e difusa. As lesões cronicamente persistentes apresentam-se como pápulas, nódulos e máculas. Nesses indivíduos, o extenso infiltrado celular dérmico causa a destruição dos apêndices (Fischer et al., 2017). Os macrófagos envolvidos exibem citoplasma bastante eosinofílico abarrotado de bacilos. À medida que as lesões persistem, esses macrófagos tornam-se vacuolizados com acúmulo lipídico proeminente associado à fragmentação de *M. leprae*. O comprometimento de múltiplos nervos na hanseníase virchowiana tende a ser lento e simétrico, com redução da percepção térmica a

princípio, seguida do prejuízo da sensibilidade ao toque e à dor (Ridley, Jopling, 1966; Bhat, Prakash, 2012).

No centro do espectro estão as formas clínica intermediárias não polares - dimorfa-tuberculóide (BT, *borderline-tuberculoid*), dimorfa-dimorfa (BB, *borderline-borderline*) e dimorfa-virchowiana (BL, *borderline-lepromatous*). A maioria dos indivíduos é classificada como BT, BB e BL, e exibem notável instabilidade celular e humoral associada às apresentações clínicas que se assemelham a uma das formas polares, ou ambas (Ridley, Jopling, 1966). A interação patógeno-hospedeiro na hanseníase é amplamente influenciada pelos aspectos genéticos dos indivíduos (Zhang et al., 2009; Liu et al., 2015). O complexo MHC *(major histocompatibility complex)*/HLA *(human leukocyte antigen)* atua no reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos durante a resposta imune do hospedeiro. Na hanseníase, a vasta investigação nessa região genômica levou a descrição de conjuntos de genes determinantes na suscetibilidade à doença, tanto no controle da infecção *per se* quanto na definição do quadro clínico (Sauer et al., 2016; Jarduli et al., 2014). A maior frequência dos genes *KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors),* em particular *KIR2DS1*, *KIR2DS2 e KIR3DS1* na presença de seus ligantes HLA, foi associada à hanseníase em uma população brasileira (Jarduli et al., 2014; Franceschi et al., 2008). Também foram descritos alelos protetores e de risco relacionados a doença na região HLA-DRB1 da molécula de MHC de classe II (Geluk, Ottenhoff, 2006).

SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em genes clássicos da resposta imune inata do hospedeiro com frequência são associados à hanseníase. O SNP G396S na região 10p13 do gene *MRC1 (Mannose Receptor C-Type 1)* representa um fator de risco para a suscetibilidade à hanseníase *per se* em grupos populacionais endêmicos (Moraes et al., 2004; Alter et al., 2010). O gene *MRC1* codifica o receptor de manose (MR, *mannose receptor*), uma proteína de superfície celular que pertence a uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). SNPs na família dos TLR,

particularmente TLR1 e TLR2, também são associados à hanseníase e suas manifestações clínicas (Sales-Marques et al., 2013; Wong et al., 2010). As citocinas que regulam as respostas imunes do hospedeiro também são alvos comuns dos estudos de associação. A IL-10 *(interleukin-10)* é crucial na patogênese da hanseníase e especialmente o SNP -819C>T (rs1800871) representa maior risco de desenvolver a doença (Alvarado-Arnez et al., 2015). Por outro lado, o alelo -308A no gene de TNF-α, principalmente na população brasileira, está relacionado a resistência da hanseníase *per se* (Cardoso et al., 2011).

Apesar do progresso na compreensão de fatores que ditam os diferentes desfechos da infecção por *M. leprae*, a hanseníase requer grande atenção em saúde pública devido as graves disfunções sensitivas e motoras e as deformidades e incapacidades que causa (Smith, 2014; Smith et al., 2015). Há uma necessidade urgente de ferramentas que contribuam para a prevenção dessas complicações neurais, entretanto, os gatilhos específicos associados à neuropatia hansênica, até o momento, permanecem pouco compreendidos.

Envolvimento dos Nervos Periféricos na Hanseníase

Acredita-se que a hanseníase seja a neuropatia periférica infecciosa de maior prevalência global, com mais de quatro milhões de indivíduos apresentando alguma forma de deficiência relacionada a doença em todo o mundo (Deps, Cruz, 2020). Além dos obstáculos historicamente interpostos ao controle da hanseníase, os programas de saúde pública foram impactados nos últimos anos pela crise da COVID-19, resultando no decréscimo substancial na detecção de casos novos (WHO, 2021). No Brasil, os registros atuais infelizmente continuam a garantir sua segunda posição no *ranking* mundial, com destaque para o número de novos casos com grau máximo de incapacidade física (G2D, *grade-2 disability*) (WHO, 2022). Cerca de 25% dos indivíduos recém-diagnosticados desenvolvem deformidades e incapacidades associadas à

progressão da doença. Na busca de indicadores mais favoráveis, a Organização Mundial de Saúde (WHO, *Word Health Organization*) estabeleceu como estratégia global de combate à hanseníase, a redução de 90% na incidência de novos casos com G2D entre 2021-2030 (WHO, 2022).

O tratamento pela PQT foi determinante na redução da prevalência de hanseníase, embora a progressão do dano neural e incapacidades físicas não puderem ter sido prevenidos (Haefner et al., 2017; Serrano-Coll et al., 2018; Raposo et al., 2018), mesmo em indivíduos com tratamento já finalizado (Penna et al., 2017). Inúmeros estudos buscam compreender a progressão do dano neural periférico na hanseníase, mesmo após a conclusão da PQT. Raposo et al. (2018), registraram em uma área endêmica do Brasil deficiências graves em 17,1% dos indivíduos que concluíram a PQT, destacando o impacto das reações hansênicas nesses casos (Raposo et al., 2018). Por outro lado, a classificação operacional da hanseníase (multibacilar e paucibacilar) e a presença de reações, avaliadas no estudo de Lugão et al. (2016), não apresentaram correlação direta com a evolução de alterações anatômicas em nervos examinados por ultrassonografia, em indivíduos tratados pela PQT (Lugão et a., 2016). Apesar dos achados em estudos anteriores eventualmente divergirem quanto às reações hansênicas como agravantes de dano neural após a PQT, o comprometimento da função neural no momento do diagnóstico, é sem dúvida determinante para o agravamento de incapacidades após a conclusão da PQT (Gonçalves et al., 2009; Sales et al., 2013).

As reações hansênicas são episódios dinâmicos e abruptos de exacerbada inflamação com graves repercussões neurais, frequentemente irreversíveis (Polycarpou et al., 2017; Lockwood et al., 2017). Ao longo do curso da infecção por *M. leprae*, mas sobretudo durante a PQT, dois tipos de reações hansênicas com patogênese e características clínicas relativamente distintas podem ocorrer: reação tipo 1 (T1R, *type 1 reaction*) ou reação reversa (RR, *reversal reaction*), e reação tipo 2 (T2R, *type 2*

reaction), também conhecida como eritema nodoso hansênico (ENL, *erythema nodosum leprosum*) (Costa et al., 2018). A RR se expressa clinicamente por reações de hipersensibilidade tipo IV ou tardia em lesões pré-existentes na pele e nervos periféricos, resultando em edema com desorganização do granuloma e infiltração generalizada de células inflamatórias (Nery, Bernardes Filho, 2013). Por outro lado, vários sistemas e órgãos estão envolvidos na ENL, uma complicação inflamatória dolorosa (Polycarpou et al., 2017) com ativação do sistema complemento e deposição extravascular dos imunocomplexos nos tecidos, além de intensa secreção de citocinas pró-inflamatórias. As lesões eritematosas nesses indivíduos podem ulcerar e tornarem-se necróticas. Edema periférico de membros e infiltrado perivascular de neutrófilos na derme e tecidos subcutâneos são frequentes (Negera et al., 2017; Walker et al., 2017).

Como na hanseníase *per se,* a genética do hospedeiro está entre os fatores que contribuem para a etiologia dos estados reacionais na hanseníase. O desenvolvimento de RR, bem como o padrão de comprometimento neural revelado, está associado a polimorfismos no receptor TLR2 (Bochud et al., 2008; Oliveira et al., 2003). O receptor TLR-9, por sua vez, tem potencial envolvimento na patogênese e evolução da ENL (Dias et al., 2016). Variações nos genes do receptor NOD2 (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2*) e IL-6 *(interleukin-6)* também estão associadas à ocorrência de eventos reacionais (Sales-Marques et al., 2017). Na RR, em particular, sua maior predisposição está associada às alterações no gene LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*), que codifica uma proteína multifatorial capaz de modular as respostas pró-inflamatórias (Fava et al., 2016).

A PQT, mediante sua ação bactericida, gera um enorme reservatório de determinantes antigênicos capaz de desencadear potente resposta inflamatória contra os nervos periféricos (Spierings et al., 2001). A busca por mediadores químicos como fatores de risco desses eventos reacionais mostra que nos indivíduos, o início da RR está correlacionado com elevados níveis da quimiocina CXCL10 (*C-X-C motif*

chemokine ligand 10) (Corstjens et al., 2016; Khadge et al., 2015), em contrapartida PTX3 (*Pentraxin 3*) está especificamente aumentado na ENL (Mendes et al. 2017). Também são demonstrados dados contrastantes a respeito dos fatores inflamatórios específicos de cada episódio reacional, uma vez que IL-7 *(interleukin-7)* e PDGF-BB (*Platelet-derived growth factor-BB*) apresentaram sugestiva associação com a ENL no Brasil (Stefani et al., 2009), e RR em indivíduos indianos (Chaitanya et al., 2013).

A neuropatia hansênica se inicia precocemente com a perda de percepção térmica e sensibilidade à dor, seguidas pela elevação do limiar de detecção tátil e pressão (revisado em Scollard et al., 2015; Laverdet et al., 2015). Os padrões de progressão de dano neural variam conforme a forma clínica da doença (Naafs et al., 2022; Ebenezer, Scollard, 2021). Na hanseníase TT, observa-se comprometimento neural agudo e focal (Serrano-Coll et al., 2018), em contrapartida, na forma LL a neuropatia é mais insidiosa e disseminada (Reibel et al., 2015). Nas formas intermediárias, BT, BB e BL, as alterações neuropáticas geralmente se sobrepõem (Sugawara-Mikami et al., 2022). Os padrões de acometimento dos nervos periféricos na hanseníase podem ser classificados quanto ao seu modo de distribuição pelos dermátomos. Clinicamente se apresentam em lesões únicas (mononeuropatia) ou múltiplas (mononeuropatia múltipla), à montante das terminações nervosas, na direção dos ramos cutâneos e troncos periféricos (Garbino et al., 2016). A presença extensiva de mononeuropatia múltipla na hanseníase ocorre de modo similar ao de polineuropatia (Jardim et al., 2015; revisado em Raicher et al., 2016), embora não seja primariamente uma polineuropatia. Na hanseníase, assim como em outras enfermidades dos nervos periféricos, os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nos processos de dano e reparo são extensivamente investigados (Boerboom et al., 2017; Jessen, Mirsky, 2019b; Jessen, Arthur-Farraj, 2019; Vela et al., 2020).

Adaptação Intracelular de *M. leprae* aos Nervos Periféricos

As principais vias moleculares relacionadas ao tropismo neural de *M. leprae* são iniciadas por sua ligação aos componentes da lâmina basal das SCs, particularmente ao complexo formado pelo domínio G da cadeia α de laminina-2 e pela molécula α-distroglicana na superfície dessas células (Rambukkana et al., 1998; Hess, Rambukkana, 2019) (**Figura 2R**). A colonização dos nervos periféricos pode ainda, ser mediada pela ligação de *M. leprae* ao receptor ErbB2 de neuregulina (Tapinos et al., 2006; Hess, Rambukkana, 2019), além de adesinas de superfície, como a Hlp (*histone-like protein*) da classe das proteínas de ligação à laminina (Marques et al., 2001; Soares et al., 2005). Os componentes celulares do bacilo, responsáveis por sua adesão e internalização às SCs são, a proteína de superfície ML-LBP21 (Shimoji et al., 1999) e o glicolipídio PGL-1 (Ng et al., 2000). Uma rota alternativa elaborada por PGL-1 em momentos precoces de infecção envolve a indução expressiva do MR, CD206 nas SCs infectadas, como uma estratégia de aperfeiçoar o reconhecimento e internalização do *M. leprae* (Díaz Acosta et al., 2018).

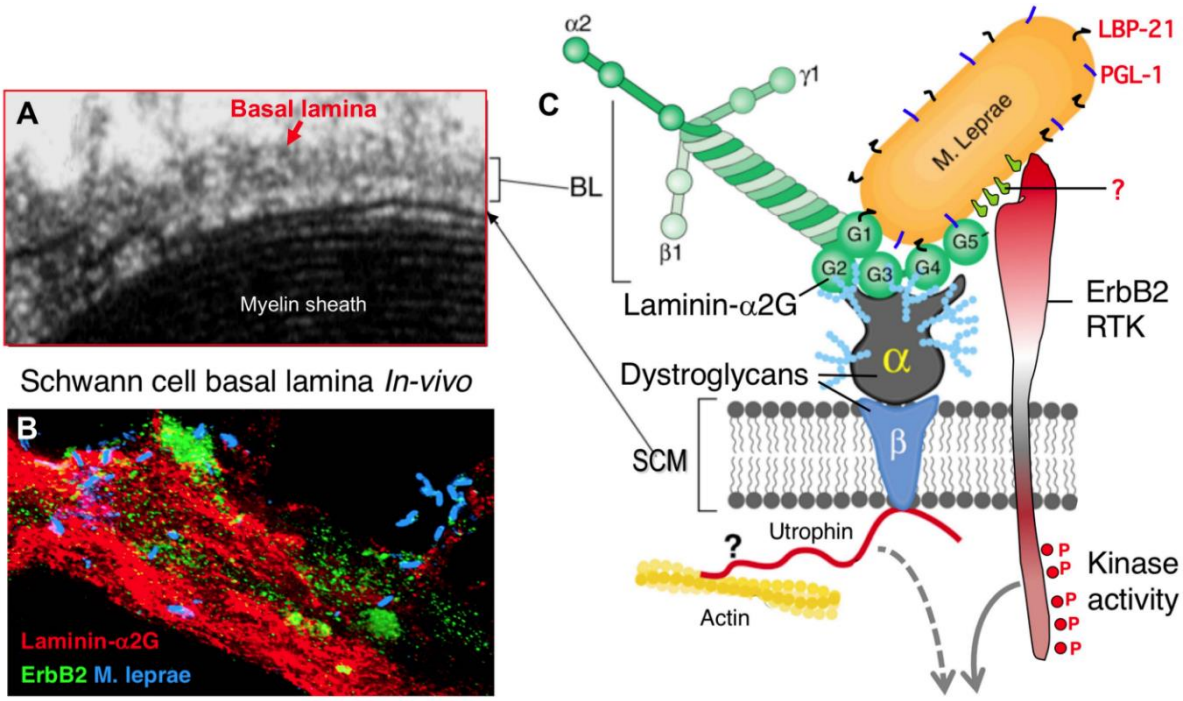


Figura 2R. Interação entre *Mycobacterium leprae* e os receptores presentes na membrana das células de Schwann. (A) Fotomicrografia ilustrando interação patógeno-hospedeiro. (B, C) Moléculas na membrana das células de Schwann, α/β-distroglicana e ErbB2, identificadas como receptores para *M.*

leprae. A interação molecular envolve a ativação do domínio quinase de ErbB2, que desencadeia cascatas de sinalização, como a fosforilação da via MAPK, Erk1/2 (Hess, Rambukkana, 2019)

Garantir a integridade das células hospedeiras é fundamental para a infecção bem-sucedida por patógenos intracelulares obrigatórios (Kellermann et al., 2021). Fatores de crescimento secretados pelas SCs em resposta à *M. leprae* estão envolvidos na patogênese da doença nos nervos periféricos. Dentre os diversos participantes dessa interação, IGF-1 *(Insulin-like growth factor 1)* assegura a sobrevivência de SCs humanas *in vitro* nos estágios precoces de infecção (Rodrigues et al., 2010), garantindo, desse modo, nichos hospedeiros suficientes para a residência, sobrevivência e replicação de *M. leprae*. Os níveis séricos de IGF-1 e IGFBP-3, sua principal proteína de ligação, também foram investigados em todo o espectro da hanseníase. De acordo com Rodrigues et al., 2011, diferentes perfis de resposta do hospedeiro ao *M. leprae* estão associados a alterações significativas nesses fatores, sobretudo durante a manifestação inicial de quadros reacionais de ENH em indivíduos LL (Rodrigues et al., 2011).

M. leprae manipula estrategicamente o potencial reparador das SCs para se estabelecer e disseminar no organismo hospedeiro (Tapinos et al., 2006; Rambukkana, 2010). Masaki et al. (2013) demonstraram que SCs são reprogramadas por *M. leprae* e assumem padrões de expressão semelhantes às células da crista neural, sendo denominadas células progenitoras *stem-like* (pSLC), e apresentando alta capacidade proliferativa, migratória e imunomodulatória. Segundo os autores, a configuração desse novo fenótipo nas SCs se dá pela regulação negativa de genes de linhagem celular e pela regulação positiva de genes envolvidos na transição epitélio-mesenquimal (*Epithelial-mesenchymal transition*, EMT), similarmente ao que se observa em muitos tecidos durante a resposta a agressões diversas (Arthur-Farraj et al., 2017; Clements et al., 2017). Durante a infecção por *M. leprae*, as pSLC efetivamente

promovem sua disseminação via transdiferenciação direta das SCs em tipos celulares de tecidos mesenquimais (Masaki et al., 2013).

As alterações de diferenciações induzidas na glia de nervos infectados poderiam comprometer seu potencial mielinizante? Essa questão foi endereçada por Casalenovo et al. (2019), que investigaram se Krox20 (*early growth response 2/EGR2*), um fator de transcrição que rege a mielinização, poderia ser impactado durante a infecção experimental por *M. leprae* em SCs primárias e nervos isquiáticos de camundongos atímicos (NU-*Foxn1*^{nu}) (Casalenovo et al., 2019). Os autores evidenciaram uma queda significativa na expressão de Krox20 e Sox10 (*SRY-box 10*), em contraste com o aumento do receptor de neurotrofinas, p75NTR, sugerindo que o perfil pró-mielinizante das SCs e, consequentemente, seu potencial reparador poderia de fato ser impactado pela infecção por *M. leprae* (Casalenovo et al., 2019). Esses dados corroboram achados anteriores do mesmo grupo de pesquisa, nos quais a expressão proteica de Krox20 foi significativamente reduzida *in vitro*, em SCs humanas infectadas por *M. leprae* (Costa et al., 2012).

O período longo de incubação de *M. leprae* permite transformar o comportamento das SCs em seu benefício (Masaki et al., 2014; Van Brakel et al., 2017). As alterações metabólicas induzidas nas células hospedeiras fazem parte das estratégias bem sucedidas de perpetuação de *M. leprae* (Medeiros et al., 2016; Borah et al., 2019; Cabral et al., 2022). Foi observado que *M. leprae* é capaz de aumentar a captação e o consumo de glicose das SCs (Medeiros et al., 2016; Oliveira et al., 2021), e potencialmente utilizá-la como fonte de carbono para sintetizar a maioria de seus aminoácidos (Borah et al., 2019). Mietto et al., (2020) revelaram também que a infecção acelera a taxa de degradação de mielina por meio da mielinofagia, ampliando a parcela de gotículas lipídicas intracelulares (Mietto et al., 2020).

A fosforilação de ErbB2/B3 desencadeia diversas cascatas intracelulares, incluindo as MAPKs clássicas (Pereira et al., 2012; Taveggia, 2016). *M. leprae* contorna a clássica heterodimerização desse complexo receptor e se liga diretamente a ErbB2 (Tapinos, Rambukkana, 2005), ativando-o. Em sequência, *M. leprae* exacerba o desempenho da via de sinalização ERK1/2, através de uma via não canônica independente de MEK e dependente de PKCε *(protein kinase C)* e de Lck *(lymphocyte kinase),* seu substrato (Tapinos, Rambukkana, 2005). A hiperativação de ERK1/2 perpetua em SCs adultas de roedores e humanos um fenótipo desdiferenciado e proliferativo (Masaki et al., 2013; Tapinos, Rambukkana, 2005; Tapinos et al., 2006), suscetível à disseminação micobacteriana. Recentemente, Souza et al., (2022), buscando esclarecer as alterações precoces nos padrões de expressão gênica relacionados à neuropatia hansênica, demonstraram a regulação positiva da via p38α MAPK em nervos periféricos de indivíduos com hanseníase neural pura e em SCs humanas infectadas experimentalmente por *M. leprae*. No entanto, trata-se de uma interação ainda pouco compreendida na hanseníase (De Souza et al., 2022), da mesma forma que estudos que abordem o papel da via JNK nesse contexto mostram-se escassos até o momento.

Considerando que *M. leprae* trata-se de um patógeno capaz de subverter em seu favor vias centrais envolvidas na diferenciação das SCs, com consequências negativas para o processo de reparo neural, é importante destacar que as principais MAPKs, p38α, ERK1/2 e JNK ativadas após lesão neural, podem estar relacionadas à patogênese da hanseníase e demais neuropatias periféricas crônicas (Parkinson et al., 2004; Yang et al., 2012). O melhor entendimento sobre alterações precoces em fatores-chave e vias intracelulares responsáveis pela homeostasia e reparo dos nervos periféricos, pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias que favoreçam a reabilitação de indivíduos com hanseníase. Desse modo, nos propomos a estudar o efeito de *M. leprae* sobre a ativação das vias JNK, p38α MAPK e ERK1/2, e do fator de transcrição c-Jun.

Modelos Experimentais de Infecção Neural na Hanseníase

A pesquisa sobre a neuropatia hansênica em nervos humanos enfrenta limitações significativas devido à impossibilidade de cultivar o bacilo *M. leprae in vitro*, bem como às restrições éticas e práticas relacionadas ao uso de tecidos neurais humanos (Scollard et al., 2015). Como resultado, modelos animais têm sido empregados para a experimentação da hanseníase (Lenz et al., 2020), como o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) que é reconhecido como o único reservatório natural de *M. leprae*, e reproduz características da doença observadas em humanos (Sharma et al., 2013). Contudo, o uso de tatus apresenta limitações que incluem, a escassez de reagentes e anticorpos específicos, dificuldade de acesso e heterogeneidade na espécie (Truman et al., 2014).

Foram realizadas tentativas prévias de inocular nervos isquiáticos de camundongos com *M. leprae* (Birdi, Antia, 2003). Diferentes linhagens de camundongos apresentaram progressão neuropática semelhante à observada nas diferentes formas da doença em humanos (Shetty, Antia, 2002). A utilização de camundongos imunodeficientes possibilitou a manutenção de cepas de *M. leprae*, a despeito do tempo prolongado para a propagação do bacilo (Shetty et al., 1999). Casalenovo et al., (2019) exploraram uma via alternativa de infecção neural murina, por inoculação na fossa poplítea, a fim se observar disseminação bacilar ascendente e suas consequências. Os autores constataram que a infecção induzida desse modo não ultrapassou a estrutura perineural dos isquiáticos, embora tenha sido possível demonstrar alterações fenotípicas, como a redução de Krox-20, nas células gliais subjacentes, provavelmente induzidas por via parácrina (Casalenovo et al., 2019).

A despeito dos modelos animais disponíveis, a natureza crônica da hanseníase e a impossibilidade de cultivar o bacilo *in vitro*, continuam a dificultar a investigação dos estágios iniciais da infecção. Em estudo recente, Gonçalves (2023) comparou dois

modelos murinos de lesão do nervo isquiático: o modelo de trauma por esmagamento e de inoculação endoneural por *M. leprae*. Essa comparação foi feita por meio de teste de marcha e resposta nociceptiva à estimulação mecânica. A autora demonstrou que a dinâmica de indução de lesão neural via infecção por *M. leprae*, foi semelhante ao modelo bem estabelecido de esmagamento de nervo isquiático, sugerindo que esse modelo de infecção poderia contribuir para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos precoces da neuropatia hansênica (Gonçalves, 2023).

Com o propósito de revalidar o estudo de Gonçalves (2023), também comparamos dois modelos murinos de dano neural, por trauma de esmagamento e infecção por *M. leprae*, utilizando o índice funcional do nervo isquiático para avaliar a função motora e o analgesímetro eletrônico Von Frey para avaliar a função nociceptiva em resposta a estímulos mecânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah M, Attia EA, Saad AA, El-Khateeb EA, Lotfi RA, Abdallah M, et al. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-regs cells. Exp Dermatol. 2014 Oct;23(10):742-7. doi: 10.1111/exd.12529.
- Ahn JH, So SP, Kim NY, Kim HJ, Yoon SY, Kim DH. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) induces phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Thr668, in okadaic acid-induced neurodegeneration. BMB Rep. 2016 Jul;49(7):376-81. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.7.246.
- Alhindi A, Boehm I, Forsythe RO, Miller J, Skipworth RJE, Simpson H, Jones RA, Gillingwater TH. Terminal Schwann cells at the human neuromuscular junction. Brain Commun. 2021 Apr 15;3(2): fcab081. doi: 10.1093/braincomms/fcab081.
- Allt G, Lawrenson JG. The blood-nerve barrier: enzymes, transporters and receptors--a comparison with the blood-brain barrier. Brain Res Bull. 2000 May 1;52(1):1-12. doi: 10.1016/s0361-9230(00)00230-6.
- 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. doi: 10.1007/s00439-008-0474-z.
- Alter A, De Léséleuc L, Van Thuc N, Thai VH, Huong NT, Ba NN, et al. Genetic and functional analysis of common MRC1 exon 7 polymorphisms in leprosy susceptibility. Hum Genet. 2010 Mar;127(3):337-48. doi: 10.1007/s00439-009-0775-x.
- Alvarado-Arnez LE, Amaral EP, Sales-Marques C, Durães SM, Cardoso CC, Nunes Sarno E, et al. Association of IL10 Polymorphisms and Leprosy: A Meta-Analysis. PLoS One. 2015 Sep 4;10(9): e0136282. doi: 10.1371/journal.pone.0136282.
- Amatu A, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Pizzutilo EG, Tosi F, Siena S. Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. Ann Oncol. 2019 Nov 1;30(Suppl_8): viii5-viii15. doi: 10.1093/annonc/mdz383.

- Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. J Alzheimers Dis. 2011;24(4):633-42. doi: 10.3233/JAD-2011-091567.
- Antonios JP, Farah GJ, Cleary DR, Martin JR, Ciacci JD, Pham MH. Immunosuppressive mechanisms for stem cell transplant survival in spinal cord injury. Neurosurg Focus. 2019 Mar 1;46(3): E9. doi: 10.3171/2018.12. FOCUS18589.
- Aquino JB, Sierra R. Schwann cell precursors in health and disease. Glia. 2018 Mar;66(3):465-476. doi: 10.1002/glia.23262.
- 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. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.021.
- Arthur-Farraj PJ, Morgan CC, Adamowicz M, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Beucher A, et al. Changes in the Coding and Non-coding Transcriptome and DNA Methylome that Define the Schwann Cell Repair Phenotype after Nerve Injury. Cell Rep. 2017 Sep 12;20(11):2719-2734. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.064.
- Assmus H, Antoniadis G, Bischoff C, Hoffmann R, Martini AK, Preissler P, et al. Cubital tunnel syndrome – a review and management guidelines. Cent Eur Neurosurg. 2011 May;72(2):90-98. doi: 10.1055/s-0031-1271800.
- Balakrishnan A, Belfiore L, Chu TH, Fleming T, Midha R, Biernaskie J, et al. Insights into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair from Studies of Development and Injury. Front Mol Neurosci. 2021 Jan 25; 13:608442. doi: 10.3389/fnmol.2020.608442.
- Barnett SC. Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? J Neurotrauma. 2004 Apr;21(4):375-82. doi: 10.1089/089771504323004520.
- Barohn RJ, Amato AA. Pattern-recognition approach to neuropathy and neuronopathy. Neurol Clin. 2013 May;31(2):343-61. doi: 10.1016/j.ncl.2013.02.001.
- Barrell K, Smith AG. Peripheral Neuropathy. Med Clin North Am. 2019 Mar;103(2):383-397. doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.006.

- Basu S, Chakravarty A. Neurological Manifestations of Scrub Typhus. Curr Neurol Neurosci Rep. 2022 Aug;22(8):491-498. doi: 10.1007/s11910-022-01215-5.
- Bhandari J, Awais M, Robbins BA, Gupta V. Leprosy. 2022 Aug 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32644733.
- Bhat RM, Prakash C. Leprosy: an overview of pathophysiology. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2012;2012:181089. doi: 10.1155/2012/181089.
- Birchmeier C, Nave KA. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. Glia. 2008 Nov 1;56(14):1491-1497. doi: 10.1002/glia.20753.
- 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. doi: 10.1489/1544581X (2003)071<0345: MIIPND>2.0.CO;2.
- Blom CL, Mårtensson LB, Dahlin LB. Nerve injury-induced c-Jun activation in Schwann cells is JNK independent. Biomed Res Int. 2014; 2014:392971. doi: 10.1155/2014/392971.
- Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. J Infect Dis. 2008 Jan 15;197(2):253-61. doi: 10.1086/524688.
- Boerboom A, Dion V, Chariot A, Franzen R. Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. Front Mol Neurosci. 2017 Feb 17; 10:38. doi: 10.3389/fnmol.2017.00038.
- Borah K, Girardi KDCV, Mendum TA, Lery LMS, Beste DJV, Lara FA, et al. Intracellular Mycobacterium leprae Utilizes Host Glucose as a Carbon Source in Schwann Cells. mBio. 2019 Dec 17;10(6):e02351-19. doi: 10.1128/mBio.02351-19.
- Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. Mol Neurobiol. 2003 Jun;27(3):277-324. doi: 10.1385/MN:27:3:277.

- Brennan PJ, Vissa VD. Genomic evidence for the retention of the essential mycobacterial cell wall in the otherwise defective Mycobacterium leprae. Lepr Rev. 2001 Dec;72(4):415-28. doi: 10.5935/0305-7518.20010050.
- Brizzi KT, Lyons JL. Peripheral nervous system manifestations of infectious diseases. Neurohospitalist. 2014 Oct;4(4):230-40. doi: 10.1177/1941874414535215.
- Brosius Lutz A, Chung WS, Sloan SA, Carson GA, Zhou L, Lovelett E, et al. Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Sep 19;114(38):E8072-E8080. doi: 10.1073/pnas.1710566114.
- Cabral N, de Figueiredo V, Gandini M, de Souza CF, Medeiros RA, Lery LMS, et al. Modulation of the Response to Mycobacterium leprae and Pathogenesis of Leprosy. Front Microbiol. 2022 Jun 2; 13:918009. doi: 10.3389/fmicb.2022.918009.
- Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, Nery JAC, et al. TNF -308G>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians: a genetic epidemiology assessment, meta-analysis, and functional study. J Infect Dis. 2011 Oct 15;204(8):1256-63. doi: 10.1093/infdis/jir521.
- Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev. 2011 Mar;75(1):50-83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- Casalenovo MB, Rosa PS, de Faria Bertoluci DF, Barbosa ASAA, Nascimento DCD, de 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 Apr;100(2):83-93. doi: 10.1111/iep.12309.
- Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. Handb Clin Neurol. 2013; 115:29-41. doi: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00003-5.
- Cervellini I, Galino J, Zhu N, Allen S, Birchmeier C, Bennett DL. Sustained MAPK/ERK Activation in Adult Schwann Cells Impairs Nerve Repair. J Neurosci. 2018 Jan 17;38(3):679-690. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2255-17.

- Chaitanya VS, Lavania M, Nigam A, Turankar RP, Singh I, Horo I, et al. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. Immunol Lett. 2013 Nov-Dec;156(1-2):159-67. doi: 10.1016/j.imlet.2013.10.008.
- Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. Mycobacterium leprae's Infective Capacity Is Associated with Activation of Genes Involved in PGL-I Biosynthesis in a Schwann Cells Infection Model. Int J Mol Sci. 2023 May 13;24(10):8727. doi: 10.3390/ijms24108727.
- Clark JK, O'keefe A, Mastracci TL, Sussel L, Matise MP, Kucenas S. Mammalian Nkx2.2+ perineurial glia are essential for motor nerve development. Dev Dyn. 2014 Sep;243(9):1116-29. doi: 10.1002/dvdy.24158.
- Clements MP, Byrne E, Camarillo Guerrero LF, Cattin AL, Zakka L, Ashraf A, et al. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. Neuron. 2017 Sep 27;96(1):98-114.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.008.
- Cobo R, García-Piqueras J, Cobo J, Vega JA. The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. J Clin Med. 2021 Jan 10;10(2):227. doi: 10.3390/jcm10020227.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature. 2001 Feb 22;409(6823):1007-11. doi: 10.1038/35059006.
- Collins MP. The vasculitic neuropathies: an update. Curr Opin Neurol. 2012 Oct;25(5):573-85. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283580432.
- Corstjens PLAM, van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, van den Eeden SJF, Wilson L, Geluk A. Field-Friendly Test for Monitoring Multiple Immune Response Markers during Onset and Treatment of Exacerbated Immunity in Leprosy. Clin Vaccine Immunol. 2016 Jun 6;23(6):515-519. doi: 10.1128/CVI.00033-16.
- Costa PDSS, Fraga LR, Kowalski TW, Daxbacher ELR, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. Erythema Nodosum Leprosum: Update and challenges on the treatment of a

neglected condition. Acta Trop. 2018 Jul; 183:134-141. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.02.026.

- de Freitas MR. Infectious neuropathy. Curr Opin Neurol. 2007 Oct;20(5):548-52. doi: 10.1097/WCO.0b013e32826fbca6.
- de Souza BJ, Mendes MA, Sperandio da Silva GM, Sammarco-Rosa P, de Moraes MO, Jardim MR, et al. Gene Expression Profile of Mycobacterium leprae Contribution in the Pathology of Leprosy Neuropathy. Front Med (Lausanne). 2022 Apr 15; 9:861586. doi: 10.3389/fmed.2022.861586.
- Deps P, Collin SM. Mycobacterium lepromatosis as a Second Agent of Hansen's Disease. Front Microbiol. 2021 Sep 10; 12:698588. doi: 10.3389/fmicb.2021.698588.
- Deps P, Cruz A. Why we should stop using the word leprosy. Lancet Infect Dis. 2020 Apr;20(4):e75-e78. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30061-X.
- Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. Oncogene. 2008 Oct 20;27(48):6245-51. doi: 10.1038/onc.2008.301.
- Dias AA, Silva CO, Santos JP, Batista-Silva LR, Acosta CC, Fontes AN, et al. DNA Sensing via TLR-9 Constitutes a Major Innate Immunity Pathway Activated during Erythema Nodosum Leprosum. J Immunol. 2016 Sep 1;197(5):1905-13. doi: 10.4049/jimmunol.1600042.
- Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TLSA, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, et al. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPARγ cross-talk that may contribute to successful Mycobacterium leprae colonization of peripheral nerves. PLoS Pathog. 2018 Jul 6;14(7): e1007151. doi: 10.1371/journal.ppat.1007151.
- Ebenezer GJ, Scollard DM. Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy. Neurotherapeutics. 2021 Oct;18(4):2337-2350. doi: 10.1007/s13311-021-01153-z.
- Eggers R, Tannemaat MR, Ehlert EM, Verhaagen J. A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. Exp Neurol. 2010 May;223(1):207-20. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.07.021.

- Eminel S, Roemer L, Waetzig V, Herdegen T. c-Jun N-terminal kinases trigger both degeneration and neurite outgrowth in primary hippocampal and cortical neurons. J Neurochem. 2008 Feb;104(4):957-69. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05101. x.
- England JD, Asbury AK. Peripheral neuropathy. Lancet. 2004 Jun 26;363(9427):2151-61. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16508-2.
- Fava VM, Manry J, Cobat A, Orlova M, Van Thuc N, Ba NN, et al. A Missense LRRK2 Variant Is a Risk Factor for Excessive Inflammatory Responses in Leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Feb 4;10(2):e0004412. doi: 10.1371/journal.pntd.0004412.
- Feldman EL, Nave KA, Jensen TS, Bennett DLH. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. Neuron. 2017 Mar 22;93(6):1296-1313. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.005.
- Feltri ML, Poitelon Y, Previtali SC. How Schwann Cells Sort Axons: New Concepts. Neuroscientist. 2016 Jun;22(3):252-65. doi: 10.1177/1073858415572361.
- Filler AG, Maravilla KR, Tsuruda JS. MR neurography and muscle MR imaging for image diagnosis of disorders affecting the peripheral nerves and musculature. Neurol Clin. 2004 Aug;22(3):643-82, vi-vii. doi: 10.1016/j.ncl.2004.03.005.
- Fischer M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. J Dtsch Dermatol Ges. 2017 Aug;15(8):801-827. doi: 10.1111/ddg.13301.
- Fledrich R, Stassart RM, Klink A, Rasch LM, Prukop T, Haag L, et al. Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. Nat Med. 2014 Sep;20(9):1055-61. doi: 10.1038/nm.3664.
- 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. doi: 10.1083/jcb.201205025.
- Fragoso G, Robertson J, Athlan E, Tam E, Almazan G, Mushynski WE. Inhibition of p38α mitogen-activated protein kinase interferes with cell shape changes and gene expression associated with Schwann cell myelination. Exp Neurol. 2003 Sep;183(1):34-46. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00101-8.

- Franceschi DS, Mazini PS, Rudnick CC, Sell AM, Tsuneto LT, de Melo FC, et al. Association between killer-cell immunoglobulin-like receptor genotypes and leprosy in Brazil. Tissue Antigens. 2008 Nov;72(5):478-82. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01127. x.
- Froes LAR Jr, Trindade MAB, Sotto MN. Immunology of leprosy. Int Rev Immunol. 2022;41(2):72-83. doi: 10.1080/08830185.2020.1851370.
- Froes LAR Junior, Sotto MN, Trindade MAB. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. An Bras Dermatol. 2022 May-Jun;97(3):338-347. doi: 10.1016/j.abd.2021.08.006.
- Ftiha F, Shalom M, Jradeh H. Neurological symptoms due to Coronavirus disease 2019. Neurol Int. 2020 Jul 29;12(1):8639. doi: 10.4081/ni.2020.8639.
- Gaesser JM, Fyffe-Maricich SL. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS. Exp Neurol. 2016 Sep;283(Pt B):501-11. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.03.008.
- Garbino JA, Heise CO, Marques W Jr. Assessing nerves in leprosy. Clin Dermatol. 2016 Jan-Feb;34(1):51-8. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.018.
- Gelfman R, Melton LJ 3rd, Yawn BP, Wollan PC, Amadio PC, Stevens JC. Long-term trends in carpal tunnel syndrome. Neurology. 2009 Jan 6;72(1):33-41. doi: 10.1212/01.wnl.0000338533. 88960.b9.
- Geluk A, Ottenhoff TH. HLA and leprosy in the pre and postgenomic eras. Hum Immunol. 2006 Jun;67(6):439-45. doi: 10.1016/j.humimm.2006.03.009.
- 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. doi: 10.1016/j.conb.2013.06.010.
- Golding JP, Cohen J. Border controls at the mammalian spinal cord: late-surviving neural crest boundary cap cells at dorsal root entry sites may regulate sensory afferent ingrowth and entry zone morphogenesis. Mol Cell Neurosci. 1997;9(5-6):381-96. doi: 10.1006/mcne.1997.0647.

- Goldstein B. Anatomy of the peripheral nervous system. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2001 May;12(2):207-36. doi: 10.1016/S1047-9651(18)30066-4.
- Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarrizaga-Lejarreta M, Palomo-Irigoyen M, Varela-Rey M, Griffith M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. J Cell Biol. 2015 Jul 6;210(1):153-68. doi: 10.1083/jcb.201503019.
- Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, et al. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. J Neurosci. 2017 Sep 13;37(37):9086-9099. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1453-17.2017.
- Gonçalves GAS. Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e Infecção por Mycobacterium leprae [Dissertação de Mestrado]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2023. 92 p.
- Gonçalves SD, Sampaio RF, Antunes CM. Fatores preditivos de incapacidades em pacientes com hanseníase [Predictive factors of disability in patients with leprosy]. Rev Saude Publica. 2009 Apr;43(2):267-74. Portuguese. doi: 10.1590/s0034-89102009000200007.
- Govindappa PK, Elfar JC. Erythropoietin promotes M2 macrophage phagocytosis of Schwann cells in peripheral nerve injury. Cell Death Dis. 2022 Mar 16;13(3):245. doi: 10.1038/s41419-022-04671-6.
- Grant GA, Goodkin R, Kliot M. Evaluation and surgical management of peripheral nerve problems. Neurosurgery. 1999 Apr;44(4):825-39; discussion 839-40. doi: 10.1097/00006123-199904000-00077.
- Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. Glia. 2008 Nov 1;56(14):1518-1531. doi: 10.1002/glia.20778.

- Grigoryan T, Birchmeier W. Molecular signaling mechanisms of axon-glia communication in the peripheral nervous system. Bioessays. 2015 May;37(5):502-13. doi: 10.1002/bies.201400172.
- Guo Y, Wu W, Yang X, Fu X. Dedifferentiation and in vivo reprogramming of committed cells in wound repair (Review). Mol Med Rep. 2022 Dec;26(6):369. doi: 10.3892/mmr.2022.12886.
- Haefner K, Walther F, Chichava OA, Ariza L, Alencar CH, de Alencar MJF, et al. High occurrence of disabilities caused by leprosy: census from a hyperendemic area in Brazil's savannah region. Leprosy Review. 2017; 88(4): 520-532. doi: 10.47276/lr.88.4.520.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. J Neurosci. 2006 Apr 19;26(16):4308-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006.
- Hammi C, Yeung B. Neuropathy. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; October 15, 2022.
- Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. Am J Clin Pathol. 2008 Dec;130(6):856-64. doi: 10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM.
- Hanani M, Spray DC. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. Nat Rev Neurosci. 2020 Sep;21(9):485-498. doi: 10.1038/s41583-020-0333-z.
- Hanewinckel R, Ikram MA, Van Doorn PA. Peripheral neuropathies. Handb Clin Neurol. 2016; 138:263-82. doi: 10.1016/B978-0-12-802973-2.00015-X.
- Hantke J, Carty L, Wagstaff LJ, Turmaine M, Wilton DK, Quintes S, et al. c-Jun activation in Schwann cells protects against loss of sensory axons in inherited neuropathy. Brain. 2014 Nov;137(Pt 11):2922-37. doi: 10.1093/brain/awu257. Epub 2014 Sep 12.

- Harrisingh MC, Perez-Nadales E, Parkinson DB, Malcolm DS, Mudge AW, Lloyd AC. The Ras/Raf/ERK signalling pathway drives Schwann cell dedifferentiation. EMBO J. 2004 Aug 4;23(15):3061-71. doi: 10.1038/sj.emboj.7600309.
- Hess S, Rambukkana A. Cell Biology of Intracellular Adaptation of Mycobacterium leprae in the Peripheral Nervous System. Microbiol Spectr. 2019 Jul;7(4): 10.1128/microbiolspec.BAI-0020-2019. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0020-2019.
- Höke A, Brushart T. Introduction to special issue: Challenges and opportunities for regeneration in the peripheral nervous system. Exp Neurol. 2010 May;223(1):1-4. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.12.001.
- Hopf A, Schaefer DJ, Kalbermatten DF, Guzman R, Madduri S. Schwann Cell-Like Cells: Origin and Usability for Repair and Regeneration of the Peripheral and Central Nervous System. Cells. 2020 Aug 29;9(9):1990. doi: 10.3390/cells9091990.
- Hossain S, de la Cruz-Morcillo MA, Sanchez-Prieto R, Almazan G. Mitogen-activated protein kinase p38α regulates Krox-20 to direct Schwann cell differentiation and peripheral myelination. Glia. 2012 Jul;60(7):1130-44. doi: 10.1002/glia.22340.
- Houlden H, Laura M, Ginsberg L, Jungbluth H, Robb SA, Blake J, et al. The phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease type 4C due to SH3TC2 mutations and possible predisposition to an inflammatory neuropathy. Neuromuscul Disord. 2009 Apr;19(4):264-9. doi: 10.1016/j.nmd.2009.01.006.
- Howard AG 4th, Baker PA, Ibarra-García-Padilla R, Moore JA, Rivas LJ, et al. An atlas of neural crest lineages along the posterior developing zebrafish at single-cell resolution. Elife. 2021 Feb 16;10: e60005. doi: 10.7554/eLife.60005.
- Huang L, Xia B, Shi X, Gao J, Yang Y, Xu F, et al. Time-restricted release of multiple neurotrophic factors promotes axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. FASEB J. 2019 Jul;33(7):8600-8613. doi: 10.1096/fj.201802065RR.
- Hutton EJ, Carty L, Laura M, Houlden H, Lunn MP, Brandner S, et al. c-Jun expression in human neuropathies: a pilot study. J Peripher Nerv Syst. 2011 Dec;16(4):295-303. doi: 10.1111/j.1529-8027.2011.00360. x.

- Ibrahim I, Khan WS, Goddard N, Smitham P. Carpal tunnel syndrome: a review of the recent literature. Open Orthop J. 2012; 6:69-76. doi: 10.2174/1874325001206010069.
- Ilieva M, Nielsen J, Korshunova I, Gotfryd K, Bock E, Pankratova S, Michel TM. Artemin and an Artemin-Derived Peptide, Artefin, Induce Neuronal Survival, and Differentiation Through Ret and NCAM. Front Mol Neurosci. 2019 Feb 22; 12:47. doi: 10.3389/fnmol.2019.00047.
- 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.
- Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R. Role of ERK1/2 MAPK signaling in the maintenance of myelin and axonal integrity in the adult CNS. J Neurosci. 2014 Nov 26;34(48):16031-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3360-14.2014.
- Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. J Neurosci. 2012 Jun 27;32(26):8855-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0137-12.2012.
- Iwasaki, A. (2020). Three Major MAP Kinase Pathways: ERK, JNK, p38. https://app.biorender.com/biorender-templates/t-5f6165506968d600b2d01325-three-major-map-kinase-pathways-erk-jnk-p38
- Jang SY, Shin YK, Park SY, Park JY, Lee HJ, Yoo YH, et al. Autophagic myelin destruction by Schwann cells during Wallerian degeneration and segmental demyelination. Glia. 2016 May;64(5):730-42. doi: 10.1002/glia.22957.
- Jardim MR, Vital R, Hacker MA, Nascimento M, Balassiano SL, Sarno EN, et al. Leprosy neuropathy evaluated by NCS is independent of the patient's infectious state. Clin Neurol Neurosurg. 2015 Apr; 131:5-10. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.01.008.
- Jarduli L, Alves H, de Souza-Santana F, Marcos EV, Pereira A, Dias-Baptista IM, et al. Influence of KIR genes and their HLA ligands in the pathogenesis of leprosy in a

hyperendemic population of Rondonópolis, Southern Brazil. BMC Infect Dis (2014) 14(1):438. doi: 10.1186/1471-2334-14-438.

- Jasti DB, Mallipeddi S, Apparao A, Vengamma B, Sivakumar V, Kolli S. A Clinical and Electrophysiological Study of Peripheral Neuropathies in Predialysis Chronic Kidney Disease Patients and Relation of Severity of Peripheral Neuropathy with Degree of Renal Failure. J Neurosci Rural Pract. 2017 Oct-Dec;8(4):516-524. doi: 10.4103/jnrp.jnrp_186_17.
- Jennings MJ, Kagiava A, Vendredy L, Spaulding EL, Stavrou M, Hathazi D, et al. NCAM1 and GDF15 are biomarkers of Charcot-Marie-Tooth disease in patients and mice. Brain. 2022 Nov 21;145(11):3999-4015. doi: 10.1093/brain/awac055.
- Jessen KR, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. Glia. 2019 Mar;67(3):421-437. doi: 10.1002/glia.23532.
- Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, et al. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. Neuron. 1994 Mar;12(3):509-27. doi: 10.1016/0896-6273(94)90209-7.
- 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. doi: 10.1101/cshperspect. a020487.
- Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. Glia. 2008 Nov 1;56(14):1552-1565. doi: 10.1002/glia.20761.
- Jessen KR, Mirsky R. Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. Front Mol Neurosci. 2019 Mar 26; 12:69. doi: 10.3389/fnmol.2019.00069.
- Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. Nat Rev Neurosci. 2005 Sep;6(9):671-82. doi: 10.1038/nrn1746.
- Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. J Physiol. 2016 Jul 1;594(13):3521-31. doi: 10.1113/JP270874.

- Jessen KR, Mirsky R. The Role of c-Jun and Autocrine Signaling Loops in the Control of Repair Schwann Cells and Regeneration. Front Cell Neurosci. 2022 Feb 9; 15:820216. doi: 10.3389/fncel.2021.820216.
- Jessen KR, Mirsky R. The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. Front Cell Neurosci. 2019 Feb 11; 13:33. doi: 10.3389/fncel.2019.00033.
- Ji RR, Suter MR. p38α MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. Mol Pain. 2007 Nov 1; 3:33. doi: 10.1186/1744-8069-3-33.
- Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Feb;12(2):79-89. doi: 10.1038/nrm3043.
- Joseph NM, Mukouyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, et al. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. Development. 2004 Nov;131(22):5599-612. doi: 10.1242/dev.01429.
- Kameneva P, Artemov AV, Kastriti ME, Faure L, Olsen TK, Otte J, et al. Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin. Nat Genet. 2021 May;53(5):694-706. doi: 10.1038/s41588-021-00818-x.
- Kanda, T. Biology of the blood–nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013 Feb;84(2):208-12. doi: 10.1136/jnnp-2012-302312.
- Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. Physiol Meas. 2017 May;38(5): R89-R118. doi: 10.1088/1361-6579/aa6782.
- Katona I, Weis J. Diseases of the peripheral nerves. Handb Clin Neurol. 2017; 145:453-474. doi: 10.1016/B978-0-12-802395-2.00031-6.
- Khadge S, Banu S, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Goulart IM, Thapa P, et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. BMC Infect Dis. 2015 Oct 28; 15:477. doi: 10.1186/s12879-015-1128-0.

- Kim J, Yang M, Kim SH, Kim JC, Wang H, Shin T, et al. Possible role of the glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration in mice. PLoS One. 2013 Aug 5;8(8): e70356. doi: 10.1371/journal.pone.0070356.
- Klein D, Groh J, Wettmarshausen J, Martini R. Nonuniform molecular features of myelinating Schwann cells in models for CMT1: distinct disease patterns are associated with NCAM and c-Jun upregulation. Glia. 2014; 62:736–50. doi: 10.1002/glia.22638.
- Kobayashi-Sun J, Suzuki N, Hattori A, Yamaguchi M, Kobayashi I. Melatonin suppresses both osteoblast and osteoclast differentiation through repression of epidermal Erk signaling in the zebrafish scale. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Oct 1;530(4):644-650. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.07.075.
- Kohl B, Fischer S, Groh J, Wessig C, Martini R. MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy. Am J Pathol. 2010 Mar;176(3):1390-9. doi: 10.2353/ajpath.2010.090694.
- Kollmer J, Bendszus M. Magnetic Resonance Neurography: Improved Diagnosis of Peripheral Neuropathies. Neurotherapeutics. 2021 Oct;18(4):2368-2383. doi: 10.1007/s13311-021-01166-8.
- Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-the-Art Techniques in Treating Peripheral Nerve Injury. Plast Reconstr Surg. 2018 Mar;141(3):702-710. doi: 10.1097/PRS.0000000000004121.
- 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.
- Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – part1. An Bras Dermatol (2014) 89(2):205–18. doi: 10.1590/abd1806-4841.20142450.

- Laverdet B, Danigo A, Girard D, Magy L, Demiot C, Desmoulière A. Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. Histol Histopathol. 2015 Aug;30(8):875-92. doi: 10.14670/HH-11-610.
- Lavoie EG, Gulbransen BD, Martín-Satué M, Aliagas E, Sharkey KA, Sévigny J. Ectonucleotidases in the digestive system: focus on NTPDase3 localization. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011 Apr;300(4): G608-20. doi: 10.1152/ajpgi.00207.2010.
- Lee H, Jo EK, Choi SY, Oh SB, Park K, Kim JS, Lee SJ. Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Nov 24;350(3):742-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.108.
- Lee HJ, Shin YK, Park HT. Mitogen Activated Protein Kinase Family Proteins and c-jun Signaling in Injury-induced Schwann Cell Plasticity. Exp Neurobiol. 2014 Jun;23(2):130-7. doi: 10.5607/en.2014.23.2.130.
- Lenz S, Collins JH, Lahiri R, Adams LB. 14 June 2020, posting date. Rodent models in leprosy research, Chapter 10.3. In Scollard DM, Gallis TP (ed), International textbook of leprosy. www.internationaltextbookofleprosy.org.
- Levis WR, Zhang S, Martiniuk F. Mycobacterium lepromatosis: emerging strain or species? J Drugs Dermatol. 2012 Feb;11(2):158.
- Lewis GM, Kucenas S. Perineurial glia are essential for motor axon regrowth following nerve injury. J Neurosci. 2014 Sep 17;34(38):12762-77. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1906-14.2014.
- Liu H, Irwanto A, Fu X, Yu G, Yu Y, Sun Y, et al. Discovery of six new susceptibility loci and analysis of pleiotropic effects in leprosy. Nat Genet. 2015 Mar;47(3):267-71. doi: 10.1038/ng.3212.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0123278.

- Lockwood DN, Darlong J, Govindharaj P, Kurian R, Sundarrao P, John AS. AZALEP a randomized controlled trial of azathioprine to treat leprosy nerve damage and Type 1 reactions in India: main findings. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Mar 30;11(3):e0005348. doi: 10.1371/journal.pntd.0005348.
- Lugão HB, Frade MA, Marques W Jr, Foss NT, Nogueira-Barbosa MH. Ultrasonography of Leprosy Neuropathy: A Longitudinal Prospective Study. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Nov 16;10(11):e0005111. doi: 10.1371/journal.pntd.0005111.
- MacKinnon SE. Nerve Surgery. 1st ed. New York, NY: Thieme; 2015.
- Mahar M, Cavalli V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. Nat Rev Neurosci. 2018;19(6):323–337. doi: 10.1038/s41583-018-0001-8.
- Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, Valsecchi V, Bonny C, Rossi F, Vercelli A. Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. Mol Pain. 2012 May 22; 8:39. doi: 10.1186/1744-8069-8-39.
- Mao R, Wei Z, Li W, Zhu X, Du D, Xu W. Analysis of Influencing Factors of Repair Effect after Peripheral Nerve Injury. Comput Math Methods Med. 2021 Nov 23; 2021:8294267. doi: 10.1155/2021/8294267.
- Marques MA, Antonio 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. doi: 10.1099/0022-1317-50-1-23.
- Martini R, Fischer S, López-Vales R, David S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. Glia. 2008 Nov 1;56(14):1566-1577. doi: 10.1002/glia.20766.
- Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate immune response precedes Mycobacterium leprae-induced reprogramming of adult Schwann cells. Cell Reprogram. 2014 Feb;16(1):9-17. doi: 10.1089/cell.2013.0064.

- Masaki T, McGlinchey A, Tomlinson SR, Qu J, Rambukkana A. Reprogramming diminishes retention of Mycobacterium leprae in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. F1000Res. 2013 Sep 25; 2:198. doi: 10.12688/f1000research.2-198.v3.
- Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, Dacso MM, Rao PN, Stryjewska BM, et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. J Am Acad Dermatol. 2020 Jul;83(1):1-14. doi: 10.1016/j.jaad.2019.12.080.
- McGregor CE, English AW. The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. Front Cell Neurosci. 2019 Jan 11; 12:522. doi: 10.3389/fncel.2018.00522.
- Medeiros RC, Girardi KD, Cardoso FK, Mietto BS, Pinto TG, Gomez LS, et al. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by Mycobacterium leprae. J Biol Chem. 2016 Oct 7;291(41):21375-21387. doi: 10.1074/jbc.M116.725283.
- Mendes MA, de Carvalho DS, Amadeu TP, Silva BJA, Prata RBDS, da Silva CO, et al. Elevated Pentraxin-3 Concentrations in Patients With Leprosy: Potential Biomarker of Erythema Nodosum Leprosum. J Infect Dis. 2017 Dec 19;216(12):1635-1643. doi: 10.1093/infdis/jix267.
- Meng DH, Zou JP, Xu QT, Wang JY, Yu JQ, Yuan Y, et al. Endothelial cells promote the proliferation and migration of Schwann cells. Ann Transl Med. 2022 Jan;10(2):78. doi: 10.21037/atm-22-81.
- Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. Hand Clin. 2013 Aug;29(3):317-30. doi: 10.1016/j.hcl.2013.04.002.
- Mietto BS, de Souza BJ, Rosa PS, Pessolani MCV, Lara FA, Sarno EN. Myelin breakdown favours Mycobacterium leprae survival in Schwann cells. Cell Microbiol. 2020 Jan;22(1):e13128. doi: 10.1111/cmi.13128.
- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. J Peripher Nerv Syst. 2008 Jun;13(2):122-35. doi: 10.1111/j.1529-8027.2008.00168. x.

- Mirzaie J, Raoofi A, Jamalpoor Z, Nezhadi A, Golmohammadi R. Protective impacts of erythropoietin on myelinization of oligodendrocytes and schwann cells in CNS and PNS following cuprizone-induced multiple sclerosis- histology, molecular, and functional studies. J Chem Neuroanat. 2020 Jan 16; 104:101750. doi: 10.1016/j.jchemneu.2020.101750.
- Misch EA, Berrington WR, Vary JC Jr, Hawn TR. Leprosy and the human genome. Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Dec;74(4):589-620. doi: 10.1128/MMBR.00025-10.
- Mizisin AP, Weerasuriya A. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. Acta Neuropathol. 2011 Mar;121(3):291-312. doi: 10.1007/s00401-010-0783-x.
- Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. Nat Genet. 2009 Dec;41(12):1282-9. doi: 10.1038/ng.477. Epub 2009 Nov 1. Erratum in: Nat Genet. 2010 Apr;42(4):361.
- Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJM, Vanderborght PR, Nery JAC, Santos AR, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. Genes Immun. 2004 Nov;5(7):592-5. doi: 10.1038/sj.gene.6364122.
- Naafs B, Nogueira MRS, Garbino JA. (2022). Peripheral Nerves in Leprosy. In: Nunzi, E., Massone, C., Portaels, F. (eds) Leprosy and Buruli Ulcer. Springer, Cham.
- Napoli I, Noon LA, Ribeiro S, Kerai AP, Parrinello S, Rosenberg LH, et al. A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. Neuron. 2012 Feb 23;73(4):729-42. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.031.
- Negera E, Walker SL, Girma S, Doni SN, Tsegaye D, Lambert SM, et al. Clinico-pathological features of erythema nodosum leprosum: A case-control study at ALERT hospital, Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Oct 13;11(10):e0006011. doi: 10.1371/journal.pntd.0006011.

- 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. doi: 10.1590/abd1806-4841.20132004.
- Newbern J, Birchmeier C. Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. Semin Cell Dev Biol. 2010 Dec;21(9):922-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.08.008.
- Newbern JM, Li X, Shoemaker SE, Zhou J, Zhong J, Wu Y, et al. Specific functions for ERK/MAPK signaling during PNS development. Neuron. 2011 Jan 13;69(1):91-105. doi: 10.1016/j.neuron.2010.12.003.
- Newbern JM. Molecular control of the neural crest and peripheral nervous system development. Curr Top Dev Biol. 2015; 111:201-31. doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.007.
- Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae. Cell. 2000 Oct 27;103(3):511-24. doi: 10.1016/s0092-8674(00)00142-2.
- Nocera G, Jacob C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. Cell Mol Life Sci. 2020 Oct;77(20):3977-3989. doi:10.1007/s00018-020-03516-9.
- Nogueira MRS, Amôr NG, Michellin LB, Cury Filho M, Rosa PS, Latini ACP, Rodrigues LS, Lemes RMR, Lara FA, Pessolani MCV. Effect of *Mycobacterium leprae* on neurotrophins expression in human Schwann cells and mouse sciatic nerves. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020;115:e200075. doi: 10.1590/0074-02760200075.
- Nogueira MR, Latini AC, Nogueira ME. The involvement of endothelial mediators in leprosy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016 Oct;111(10):635-641. doi: 10.1590/0074-02760160122.
- Norrmén C, Figlia G, Pfistner P, Pereira JA, Bachofner S, Suter U. mTORC1 Is Transiently Reactivated in Injured Nerves to Promote c-Jun Elevation and Schwann

Cell Dedifferentiation. J Neurosci. 2018 May 16;38(20):4811-4828. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3619-17.2018.

- O'Brien PD, Sakowski SA, Feldman EL. Mouse models of diabetic neuropathy. ILAR J. 2014;54(3):259-72. doi: 10.1093/ilar/ilt052.
- Oliveira MA, Heimfarth L, Passos FRS, Miguel-Dos-Santos R, Mingori MR, Moreira JCF, et al. Naringenin complexed with hydroxypropyl-β-cyclodextrin improves the sciatic nerve regeneration through inhibition of $p75^{NTR}$ and JNK pathway. Life Sci. 2020 Jan 15; 241:117102. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117102.
- Oliveira MF, Medeiros RCA, Mietto BS, Calvo TL, Mendonça APM, Rosa TLSA, et al. Reduction of host cell mitochondrial activity as Mycobacterium leprae's strategy to evade host innate immunity. Immunol Rev. 2021 May;301(1):193-208. doi: 10.1111/imr.12962.
- Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN, et al. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. Infect Immun. 2003 Mar;71(3):1427-33. doi: 10.1128/IAI.71.3.1427-1433.2003.
- Oliveira RB, Sampaio EP, Aarestrup F, Teles RM, Silva TP, Oliveira AL, et al. Cytokines and Mycobacterium leprae induce apoptosis in human Schwann cells. J Neuropathol Exp Neurol. 2005 Oct;64(10):882-90. doi: 10.1097/01.jnen.0000182982.09978.66.
- 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. doi: 10.1083/jcb.200803013.
- 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. doi: 10.1083/jcb.200307132.

- Pasnoor M, Nascimento OJM, Trivedi J, Wolfe GI, Nations S, Herbelin L, et al. North America and South America (NA-SA) neuropathy project. Int J Neurosci. 2013 Aug;123(8):563-7. doi: 10.3109/00207454.2013.782026.
- Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. J Biol Chem. 2009 Jan 30;284(5):2719-2728. doi: 10.1074/jbc.M805920200.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev. 2001 Apr;22(2):153-83. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.
- Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. Tissue Barriers. 2013 Jul 1;1(3): e24956. doi: 10.4161/tisb.24956.
- Penna GO, Bührer-Sékula S, Kerr LRS, Stefani MMA, Rodrigues LC, de Araújo MG, et al. Uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): Results of an open label, randomized and controlled clinical trial, among multibacillary patients. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jul 13;11(7):e0005725. doi: 10.1371/journal.pntd.0005725.
- Phelps CH. Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease: some selected comments. Prog Brain Res. 1990; 86:3-9. doi: 10.1016/s0079-6123(08)63162-3.
- Poitras T, Zochodne DW. Unleashing Intrinsic Growth Pathways in Regenerating Peripheral Neurons. Int J Mol Sci. 2022 Nov 5;23(21):13566. doi: 10.3390/ijms232113566.
- Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. Front Immunol. 2017 Mar 13; 8:233. doi: 10.3389/fimmu.2017.00233.
- Radomska KJ, Topilko P. Boundary cap cells in development and disease. Curr Opin Neurobiol. 2017 Dec; 47:209-215. doi: 10.1016/j.conb.2017.11.003.
- Raicher I, Stump PR, Baccarelli R, Marciano LH, Ura S, Virmond MC, et al. Neuropathic pain in leprosy. Clin Dermatol. 2016 Jan-Feb;34(1):59-65. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.012.

- Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of Mycobacterium leprae mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. Cell. 1997 Mar 21;88(6):811-21. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81927-3.
- Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, et al. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae. Science. 1998 Dec 11;282(5396):2076-9. doi: 10.1126/science.282.5396.2076.
- Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. Prog Neurobiol. 2010 Jun;91(2):102-7. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.002.
- Rao DB, Jortner BS, Sills RC. Animal models of peripheral neuropathy due to environmental toxicants. ILAR J. 2014;54(3):315-23. doi: 10.1093/ilar/ilt058.
- Raphael AR, Talbot WS. New insights into signaling during myelination in zebrafish. Curr Top Dev Biol. 2011; 97:1-19. doi: 10.1016/B978-0-12-385975-4.00007-3.
- Raposo MT, Reis MC, Caminha AVQ, Heukelbach J, Parker LA, Pastor-Valero M, et al. Grade 2 disabilities in leprosy patients from Brazil: Need for follow-up after completion of multidrug therapy. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Jul 16;12(7): e0006645. doi: 10.1371/journal.pntd.0006645.
- Reed CB, Feltri ML, Wilson ER. Peripheral glia diversity. J Anat. 2022 Nov;241(5):1219-1234. doi: 10.1111/joa.13484.
- Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. Med Mal Infect. 2015 Sep;45(9):383-93. doi: 10.1016/j.medmal.2015.09.002.
- 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.
- Roberts SL, Dun XP, Dee G, Gray B, Mindos T, Parkinson DB. The role of p38 alpha in Schwann cells in regulating peripheral nerve myelination and repair. J Neurochem. 2017 Apr;141(1):37-47. doi: 10.1111/jnc.13929.

- Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. J Neuroinflammation. 2011 Aug 30; 8:109. doi: 10.1186/1742-2094-8-109.
- Saif DS, Ibrahem RA, Eltabl MA. Prevalence of peripheral neuropathy and myopathy in patients post-COVID-19 infection. Int J Rheum Dis. 2022 Nov;25(11):1246-1253. doi: 10.1111/1756-185X.14409.
- Sales AM, Campos DP, Hacker MA, da Costa Nery JA, Düppre NC, Rangel E, Sarno EN, Penna MLF. Progression of leprosy disability after discharge: is multidrug therapy enough? Trop Med Int Health. 2013 Sep;18(9):1145-1153. doi: 10.1111/tmi.12156.
- Sales-Marques C, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LT, Martins JH, Amaral EP, Cardoso CC, et al. Toll-like receptor 1 N248S single-nucleotide polymorphism is associated with leprosy risk and regulates immune activation during mycobacterial infection. J Infect Dis. 2013 Jul;208(1):120-9. doi: 10.1093/infdis/jit133.
- Sales-Marques C, Cardoso CC, Alvarado-Arnez LE, Illaramendi X, Sales AM, Hacker MA, et al. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jul 17;11(7): e0005754. doi: 10.1371/journal.pntd.0005754.
- Sauer ME, Salomão H, Ramos GB, D'Espindula HR, Rodrigues RS, Macedo WC, et al. Genetics of leprosy: expected and unexpected developments and perspectives. Clin Dermatol. 2015 Jan-Feb;33(1):99-107. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.10.001.
- Scheib J, Höke A. Advances in peripheral nerve regeneration. Nat Rev Neurol. 2013 Dec;9(12):668-76. doi: 10.1038/nrneurol.2013.227.
- Scheib JL, Höke A. An attenuated immune response by Schwann cells and macrophages inhibits nerve regeneration in aged rats. Neurobiol Aging. 2016 Sep; 45:1-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.004.
- 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. doi: 10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.

- Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. Clin Dermatol. 2015 Jan-Feb;33(1):46-54. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.008.
- Seddon HJ, Medawar PB, Smith H. Rate of regeneration of peripheral nerves in man. J Physiol. 1943 Sep 30;102(2):191-215. doi: 10.1113/jphysiol. 1943.sp004027.
- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. FASEB J. 1995 Jun;9(9):726-35.
- Serrano-Coll H, Cardona-Castro N. Neuropathic ulcers in leprosy: clinical features, diagnosis and treatment. J Wound Care. 2022 Jun 1;31(Sup6): S32-S40. doi: 10.12968/jowc.2022.31.Sup6.S32.
- Serrano-Coll H, Salazar-Peláez L, Acevedo-Saenz L, Cardona-Castro N. Mycobacterium leprae-induced nerve damage: direct and indirect mechanisms. Pathog Dis. 2018 Aug 1;76(6). doi: 10.1093/femspd/fty062.
- Sharghi-Namini S, Turmaine M, Meier C, Sahni V, Umehara F, Jessen KR, et al. The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog. J Neurosci. 2006 Jun 7;26(23):6364-76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0157-06.2006.
- Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, Pena M, Williams DL, Adams LB, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. Dis Model Mech. 2013 Jan; 6(1): 19-24. doi: 10.1242/dmm.010215.
- Sheean ME, McShane E, Cheret C, Walcher J, Müller T, Wulf-Goldenberg A, et al. Activation of MAPK overrides the termination of myelin growth and replaces Nrg1/ErbB3 signals during Schwann cell development and myelination. Genes Dev. 2014 Feb 1;28(3):290-303. doi: 10.1101/gad.230045.113.
- 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.
- 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.

- 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. doi: 10.1073/pnas.96.17.9857.
- Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, Nieselt K, Krause J, Vera-Cabrera L, Cole ST. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of Mycobacterium lepromatosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 7;112(14):4459-64. doi: 10.1073/pnas.1421504112.
- Smith CS, Aerts A, Saunderson P, Kawuma J, Kita E, Virmond M. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. Lancet Infect Dis. 2017 Sep;17(9):e293-e297. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30418-8.
- Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. Lepr Rev. 2014 Mar;85(1):2-17.
- Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Apr 23;9(4):e0003658. doi: 10.1371/journal.pntd.0003658.
- Soares de Lima C, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, et al. 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. doi: 10.1016/j.micinf.2005.02.013.
- Soliven B. Animal models of autoimmune neuropathy. ILAR J. 2014;54(3):282-90. doi: 10.1093/ilar/ilt054.
- Spierings E, de Boer T, Wieles B, Adams LB, Marani E, Ottenhoff TH. Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy. J Immunol. 2001 May 15;166(10):5883-8. doi: 10.4049/jimmunol.166.10.5883.
- Staff NP, Windebank AJ. Peripheral neuropathy due to vitamin deficiency, toxins, and medications. Continuum (Minneap Minn). 2014 Oct;20(5 Peripheral Nervous System Disorders):1293-306. doi: 10.1212/01.CON.0000455880.06675.5a.

- Stassart RM, Woodhoo A. Axo-glial interaction in the injured PNS. Dev Neurobiol. 2021 Jul;81(5):490-506. doi: 10.1002/dneu.22771.
- Stefani MM, Guerra JG, Sousa AL, Costa MB, Oliveira ML, Martelli CT, et al. Potential plasma markers of Type 1 and Type 2 leprosy reactions: a preliminary report. BMC Infect Dis. 2009 May 27; 9:75. doi: 10.1186/1471-2334-9-75.
- Sternini C. Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. J Investig Dermatol Symp Proc. 1997 Aug;2(1):1-7. doi: 10.1038/jidsymp.1997.2.
- Stratton JA, Holmes A, Rosin NL, Sinha S, Vohra M, Burma NE, et al. Macrophages Regulate Schwann Cell Maturation after Nerve Injury. Cell Rep. 2018 Sep 4;24(10):2561-2572.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.004.
- Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, Suzuki K. Pathogenicity and virulence of Mycobacterium leprae. Virulence. 2022 Dec;13(1):1985-2011. doi: 10.1080/21505594.2022.2141987.
- Sunderland S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. Brain. 1951 Dec;74(4):491-516. doi: 10.1093/brain/74.4.491.
- Sweitzer SM, Medicherla S, Almirez R, Dugar S, Chakravarty S, Shumilla JA, et al. Antinociceptive action of a p38 alpha MAPK inhibitor, SD-282, in a diabetic neuropathy model. Pain. 2004 Jun;109(3):409-419. doi: 10.1016/j.pain.2004.02.016.
- Syed N, Reddy K, Yang DP, Taveggia C, Salzer JL, Maurel P, et al. Soluble neuregulin-1 has bifunctional, concentration-dependent effects on Schwann cell myelination. J Neurosci. 2010; 30:6122–6131. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1681-09.2010.
- Taal AT, Blok DJ, van Brakel WH, de Vlas SJ, Richardus JH. Number of people requiring post-exposure prophylaxis to end leprosy: A modeling study. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Feb 25;15(2): e0009146. doi: 10.1371/journal.pntd.0009146.
- Talukder MAH, Lee JI, Hegarty JP, Gurjar AA, O'Brien M, Karuman Z, et al. Obligatory role of Schwann cell-specific erythropoietin receptors in erythropoietin-induced functional recovery and neurogenic muscle atrophy after nerve injury. Muscle Nerve. 2021 Feb;63(2):268-272. doi: 10.1002/mus.27121.

- 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. doi: 10.1038/nm1433.
- 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, et al. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. Neuron. 2005 Sep 1;47(5):681-94. doi: 10.1016/j.neuron.2005.08.017.
- Taylor CA, Braza D, Rice JB, Dillingham T. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. Am J Phys Med Rehabil. 2008 May;87(5):381-5. doi: 10.1097/PHM.0b013e31815e6370.
- Tefferi A, Pruthi RK. The biochemical basis of cobalamin deficiency. Mayo Clin Proc. 1994 Feb;69(2):181-6. doi: 10.1016/s0025-6196(12)61046-5.
- Touma E, Kato S, Fukui K, Koike T. Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein (CRMP)-2 during neurite degeneration in mice. Eur J Neurosci. 2007; 26:3368–3381. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05943. x.
- 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.
- Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable M. leprae as a research reagent. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 2001 Mar;69(1):1-12.
- 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.
- Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. J Neurosci. 2015 Jul 8;35(27):9879-88. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1239-15.2015.

- van Brakel WH, Post E, Saunderson PR, Gopal PK. 2017. Leprosy, p 391–401. In Quah SR (ed), International Encyclopedia of Public Health, 2nd ed Academic Press, New York, NY.
- 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.
- Vela FJ, Martínez-Chacón G, Ballestín A, Campos JL, Sánchez-Margallo FM, Abellán E. Animal models used to study direct peripheral nerve repair: a systematic review. Neural Regen Res. 2020 Mar;15(3):491-502. doi: 10.4103/1673-5374.266068.
- Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T. The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. Prog Neurobiol. 2006 Oct;80(2):84-97. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.002.
- Wagstaff LJ, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Otto GW, Kilpatrick AM, Michael K, et al. Failures of nerve regeneration caused by aging or chronic denervation are rescued by restoring Schwann cell c-Jun. Elife. 2021 Jan 21;10:e62232.
- Walker SL, Sales AM, Butlin CR, Shah M, Maghanoy A, Lambert SM, et al. A leprosy clinical severity scale for erythema nodosum leprosum: an international, multicentre validation study of the ENLIST ENL severity scale. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jul 3;11(7):e0005716. doi: 10.1371/journal.pntd.0005716.
- Wang ML, Rivlin M, Graham JG, Beredjiklian PK. Peripheral nerve injury, scarring, and recovery. Connect Tissue Res. 2019 Jan;60(1):3-9. doi: 10.1080/03008207.2018.1489381.
- Wanner IB, Mahoney J, Jessen KR, Wood PM, Bates M, Bunge MB. Invariant mantling of growth cones by Schwann cell precursors characterizes growing peripheral nerve fronts. Glia. 2006 Oct;54(5):424-38. doi: 10.1002/glia.20389.
- Watson JC, Dyck PJB. Peripheral neuropathy: a practical approach to diagnosis and symptom management. Mayo Clin Proc. 2015 Jul 1;90(7): P940-51. doi: 10.1016/j.mayocp.2015.05.004.

- Wen YR, Suter MR, Kawasaki Y, Huang J, Pertin M, Kohno T, et al. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38α mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. Anesthesiology. 2007 Aug;107(2):312-21. doi: 10.1097/01.anes.0000270759.
- Wilcox MB, Jessen KR, Quick TJ, Phillips JB. The molecular profile of nerve repair: humans mirror rodents. Neural Regen Res. 2021 Jul;16(7):1440-1441. doi: 10.4103/1673-5374.301014.
- Wilcox MB, Laranjeira SG, Eriksson TM, et al. Characterising cellular and molecular features of human peripheral nerve degeneration. Acta Neuropathol Commun. 2020 Apr 17;8(1):51. doi: 10.1186/s40478-020-00921-w.
- Wildgaard K, Ravn J, Kehlet H. Chronic post-thoracotomy pain: a critical review of pathogenic mechanisms and strategies for prevention. Eur J Cardiothorac Surg. 2009 Jul;36(1):170-80. doi: 10.1016/j.ejcts.2009.02.005.
- Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, Khor CC, et al. Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. PLoS Pathog. 2010 Jul 1;6(7):e1000979. doi: 10.1371/journal.ppat.1000979.
- Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, et al. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. Nat Neurosci. 2009 Jul;12(7):839-47. doi: 10.1038/nn.2323.
- World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. Weekly Epidemiol Rec. 2022;97(36):429-50.
- World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. Weekly Epidemiol Rec. 2021;96(36): 421-44.
- Yang DP, Kim J, Syed N, Tung YJ, Bhaskaran A, Mindos T, et al. p38α 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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5812-11.2012.

- Zajączkowska R, Kocot-Kępska M, Leppert W, Wrzosek A, Mika J, Wordliczek J. Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Int J Mol Sci. 2019 Mar 22;20(6):1451. doi: 10.3390/ijms20061451.
- Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, Mitchison T, Luo L, He Z. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration. Neuron. 2003 Jul 17;39(2):217-25. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00429-x.
- Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. N Engl J Med. 2009 Dec 31;361(27):2609-18. doi: 10.1056/NEJMoa0903753.
- Zhong L, Zhang ZL, Li X, Liao C, Mou P, Wang T, et al. TREM2/DAP12 Complex Regulates Inflammatory Responses in Microglia via the JNK Signaling Pathway. Front Aging Neurosci. 2017 Jun 21; 9:204. doi: 10.3389/fnagi.2017.00204.
- Zigmond RE, Echevarria FD. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. Prog Neurobiol. 2019 Feb; 173:102-121. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.12.001.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar, em nervos periféricos humanos e murinos, o papel das principais proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator de transcrição c-Jun, a fim de compreender melhor seu papel na infecção experimental por *M. leprae* e no desenvolvimento da neuropatia hansênica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar levantamento epidemiológico e coleta de fragmentos cirúrgicos de nervos periféricos em indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima.
2. Comparar em camundongos *nude* atímicos (NU-*Foxn1*^{nu}), dois modelos de dano neural: por trauma de esmagamento e infecção por *M. leprae*, empregando-se o índice funcional do isquiático para avaliar a função motora e analgesímetro eletrônico Von Frey, para avaliar a função nociceptiva por estimulação mecânica.
3. Determinar a expressão proteica das MAPKs (JNK, p38α e ERK1/2) e do fator de transcrição c-Jun, em modelo murino de infecção endoneural por *M. leprae* e em modelo de lesão por esmagamento do nervo isquiático, por meio de ensaio imunoenzimático e imunofluorescência.
4. Determinar a expressão proteica das MAPKs (JNK, p38α e ERK1/2) e c-Jun em nervos periféricos obtidos prospectivamente de pacientes com e sem hanseníase, por meio de ensaio imunoenzimático e imunofluorescência.

CAPÍTULO III – MANUSCRITO

INTRODUÇÃO

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é responsável por coordenar a comunicação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e os órgãos do corpo humano (Grant et al., 1999). Os gânglios nervosos e os nervos são componentes estruturais do SNP. Os nervos sensitivos enviam informações do ambiente interno e externo para o SNC, enquanto os nervos motores permitem que os impulsos do SNC cheguem aos órgãos (Goldstein, 2001). O SNP é dividido em SNP motor, que inerva os músculos esqueléticos, e SNP autônomo, que controla os músculos lisos viscerais e cardíacos (Sternini, 1997; Karemaker, 2017).

Os nervos periféricos são revestidos por camadas de tecido conjuntivo (endoneuro, perineuro e epineuro) que fornecem proteção e sustentação (Peltonen et al., 2013). A glia periférica inclui células de Schwann (SCs) e desempenha várias funções no SNP (Reed et al., 2022). As células satélites, as células perineurais, as células perissinápticas, as células da pele, as células embainhantes olfatórias e a glia entérica são outras populações de células gliais presentes no SNP (revisado por Barnett, 2004; revisado por Hanani, Spray, 2020; Alhindi et al., 2021; Howard et al., 2021). O trauma mecânico pode causar degeneração Walleriana, que envolve alterações morfológicas e bioquímicas nos segmentos nervosos distais após uma lesão (Jessen, Mirsky, 2008).

Plasticidade celular refere-se à capacidade de tecidos e células de modificar seus padrões fenotípicos em resposta a sinais internos e externos (Phelps, 1990). Isso ocorre tanto em condições normais quanto na recuperação de nervos periféricos lesionados, quando a desdiferenciação, transdiferenciação e reprogramação celular desempenham papéis importantes (Balakrishnan et al., 2021). Durante a desdiferenciação, uma célula diferenciada retorna a um estágio anterior de sua linhagem, enquanto a transdiferenciação envolve a conversão direta entre diferentes tipos celulares. A

reprogramação celular ocorre quando células diferenciadas recuperam a capacidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares (Jopling et al., 2011; Guo et al., 2022).

Os nervos periféricos possuem uma capacidade robusta de regeneração devido à alta plasticidade das SCs, em comparação com o SNC (Scheib, Höke, 2016; Boerboom et al., 2017; Jessen, Arthur-Farraj, 2019). Após uma lesão, as SCs sofrem modificações em sua linhagem para estabelecer um fenótipo de reparo (revisado em Jessen, Mirsky, 2005, 2008), em um processo chamado de reprogramação celular adaptativa (Jessen, Arthur-Farraj, 2019). Além da reprogramação celular, a resposta inflamatória desempenha um papel importante na reestruturação dos tecidos após uma lesão neural (revisado por Martini et al., 2008; Rotshenker, 2011). As SCs participam da remoção de detritos no ambiente lesado através da mielinofagia, que envolve a degradação da mielina remanescente (Gomez-Sanchez et al., 2015; Zigmond, Echevarria, 2019; Jessen, Mirsky, 2019a).

Durante a reparação dos nervos periféricos, as SCs se reorganizam e formam bandas de Büngner, que guiam os axônios em regeneração em direção aos órgãos-alvo, além de produzir fatores de crescimento que fornecem suporte aos axônios em regeneração, como neurotrofinas, GDNF, artemina, pleiotrofina e eritropoietina (Eggers et al., 2010; Gomez-Sanchez et al., 2017; McGregor, English, 2019; Stassart, Woodhoo, 2021). O fator de transcrição c-Jun é crucial na indução e manutenção do fenótipo reparador das SCs após uma lesão neural (Parkinson et al., 2004, 2008; Arthur-Farraj et al., 2012; revisado por Jessen, Mirsky, 2016, 2019b). Sua expressão aumenta em resposta a lesões e condições neuropatológicas, e a ausência de c-Jun resulta em anormalidades regenerativas (Fontana et al., 2012; Hutton et al., 2011; Wilcox et al., 2020, 2021; Arthur-Farraj et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2015; revisado por Jessen, Mirsky, 2016, 2019b). O c-Jun está envolvido na sinalização de três vias de MAPKs: ERK1/2, p38α MAPK e JNK (revisado por Boerboom et al., 2017; Jessen, Arthur-Farraj, 2019; Norrmén et al., 2018; Nocera, Jacob, 2020). Essas vias estão relacionadas a

processos celulares como expressão gênica, metabolismo, sobrevivência, proliferação e diferenciação (Pearson et al., 2001; revisado por Cargnello, Roux, 2011).

A via ERK1/2 desempenha um papel na mielinização tanto no SNC (Ishii et al., 2012; Ishii et al., 2014; revisado por Gaesser, Fyffe-Maricich, 2016) quanto no SNP (Newbern, Birchmeier, 2010; Ishii et al., 2014), sendo essencial para o desenvolvimento neural normal (revisado por Grigoryan, Birchmeier, 2015; revisado por Newbern, 2015). Sua ativação também está envolvida na reparação de nervos periféricos, mas uma ativação contínua pode ter efeitos negativos, comprometendo a regeneração axonal e a recuperação funcional (Woodhoo et al., 2009; Napoli et al., 2012; Cervellini et al., 2018). A via p38α MAPK tem um papel contraditório na mielinização, podendo promovê-la ou inibi-la, dependendo do contexto (Fragoso et al., 2003; Syed et al., 2010; Hossain et al., 2012; Yang et al., 2012; Roberts et al., 2017). A via JNK está relacionada ao desenvolvimento e regeneração neural, com papel crucial na resposta a lesões (Waetzig et al., 2006; revisado por Antoniou et al., 2011; revisado por Jessen et al., 2015; Nocera, Jacob, 2020). A ativação da via JNK está envolvida na inflamação, apoptose e mielinofagia nas SCs (revisado por Dhanasekaran, Reddy, 2008; Ahn et al., 2016; revisado por Jessen, Mirsky, 2016). A inibição da via JNK pode atrasar a remoção da mielina (Mirsky et al., 2008; Arthur-Farraj et al., 2012), enquanto que a ativação da via JNK está associada à dor neuropática (Manassero et al., 2012).

Neuropatias periféricas são lesões nos nervos periféricos que podem ocorrer devido a causas heterogêneas, e muitas vezes desconhecidas (Wilcox et al., 2020; Kollmer, Bendszus, 2021), podendo afetar um único nervo periférico (mononeuropatias), vários nervos de forma assimétrica (mononeuropatias múltiplas) ou vários nervos de forma simétrica (polineuropatias) (Hanewinckel et al., 2016; Stassart, Woodhoo, 2021). A incidência global de neuropatias periféricas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, com mais de um milhão de novos casos por ano (Kubiak et al., 2018; Mao et al., 2021). Os fatores de desenvolvimento do

dano neural são diversos, incluindo infecções e resposta imune exacerbada (de Freitas, 2007; Collins, 2012).

Alguns agentes infecciosos estão correlacionados com o desenvolvimento de neuropatias periféricas, como agentes virais (EBV, HIV, HCV, CMV, VZV, HSV) (Brizzi, Lyons, 2014) e algumas bactérias patogênicas, como *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e *Micobacterium lepromatosis* (Serrano-Coll, Cardona-Castro, 2022), que têm a capacidade de infectar diretamente as células gliais do SNP, mas não o SNC (Serrano-Coll et al., 2018; Hess, Rambukkana, 2019). *M. leprae* é o agente etiológico da hanseníase, descrito como um bacilo álcool-ácido resistente (Alter et al., 2008) com tropismo quase exclusivo por SCs. Na parede celular dessa micobactéria, presença do glicolipídio fenólico 1 (PGL-1) é crucial para a patogênese do dano neural (Rambukkana et al., 1997; Scollard et al., 2006).

Cerca de 25% dos casos novos de hanseníase desenvolvem deformidades e incapacidades, como sequelas da doença (WHO, 2021). A Organização Mundial da Saúde determinou a estratégia de reduzir em 90% a incidência de novos casos com incapacidade grave até 2030 (WHO, 2022). O tratamento com a poliquimioterapia (PQT) foi eficaz na redução da prevalência da doença (WHO, 2022; Taal et al., 2021), mas não conseguiu prevenir a progressão do dano neural e as incapacidades físicas em alguns casos (Penna et al., 2017; Haefner et al., 2017; Serrano-Coll et al., 2018; Raposo et al., 2018). Reações hansênicas, episódios de inflamação intensa, têm um impacto significativo no agravamento das incapacidades (Polycarpou et al., 2017; Lockwood et al., 2017). A neuropatia hansênica se manifesta inicialmente com perda de percepção térmica e sensibilidade à dor e progride para a perda de sensibilidade tátil e pressão (revisado em Scollard et al., 2015; Laverdet et al., 2015). Os padrões de dano neural variam de acordo com a forma clínica da doença (Naafs et al., 2022; Ebenezer, Scollard, 2021). Na forma tuberculóide (TT), há um comprometimento neural agudo e focal, enquanto na forma virchowiana (LL) a neuropatia é mais insidiosa e

disseminada. Nas formas *borderline* (BT, BB, BL) as alterações neuropáticas geralmente se sobrepõem (Serrano-Coll et al., 2018; Sugawara-Mikami et al., 2022).

As principais vias moleculares relacionadas ao tropismo neural de *M. leprae* envolvem a ligação do patógeno aos componentes da lâmina basal das SCs (Rambukkana et al., 1998; Hess, Rambukkana, 2019). A colonização dos nervos periféricos é mediada pela ligação de *M. leprae* ao receptor ErbB2 de neuregulina, além de outras adesinas de superfície (Marques et al., 2001; Soares et al., 2005; Tapinos et al., 2006; Hess, Rambukkana, 2019). *M. leprae* manipula as SCs para estabelecer nichos hospedeiros e disseminar no organismo (Tapinos et al., 2006; Rambukkana, 2010). Durante a infecção, as SCs são reprogramadas e assumem um fenótipo similar às células da crista neural, promovendo a disseminação do patógeno (Masaki et al., 2013).

A infecção por *M. leprae* pode afetar o potencial mielinizante das SCs (Costa et al., 2012; Casalenovo et al., 2019) reduzindo a expressão de fatores pró-mielinizantes. Além disso, o patógeno induz alterações metabólicas nas SCs (Medeiros et al., 2016; Borah et al., 2019; Cabral et al., 2022), aumentando o consumo de glicose e promovendo a degradação da mielina. *M. leprae* ativa a via de sinalização ERK1/2 de forma hiperativa nas SCs, levando a um fenótipo proliferativo e desdiferenciado (Masaki et al., 2013; Tapinos, Rambukkana, 2005; Tapinos et al., 2006). Adicionalmente, estudos relatam a regulação positiva da via p38α MAPK em nervos periféricos de indivíduos com hanseníase neural primária e SCs humanas infectadas por *M. leprae* (De Souza et al., 2022). As consequências dessas interações na hanseníase ainda são pouco compreendidas, assim como o papel da via JNK. Este estudo se propões a estudar o efeito de *M. leprae* sobre a ativação das vias JNK, p38α MAPK e ERK1/2, e do fator de transcrição c-Jun, por meio de ensaio imunoenzimático e imunofluorescência.

Apesar dos modelos animais disponíveis, a natureza crônica da hanseníase e a impossibilidade de cultivar o bacilo *in vitro* continuam dificultando a investigação dos

estágios iniciais da infecção. Um estudo recente comparou dois modelos murinos de lesão do nervo isquiático, o modelo de trauma por esmagamento e o modelo de inoculação endoneural por *M. leprae*. Foi demonstrado que a dinâmica de indução de lesão neural por infecção foi semelhante ao modelo estabelecido de esmagamento de nervo isquiático, sugerindo que esse modelo de infecção pode contribuir para uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos precoces da neuropatia hansênica (Gonçalves, 2023). Com o objetivo de revalidar o estudo anterior, o presente estudo também comparou dois modelos murinos de dano neural, por trauma de esmagamento e infecção por *M. leprae*, utilizando índices de função motora e resposta nociceptiva a estímulos mecânicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nervos Periféricos Humanos

Inicialmente, foi realizado levantamento retrospectivo sobre casos com diagnóstico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, no período de 2009 a 2019. Os dados foram obtidos a partir de informações colhidas nos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) ILSL. Foram registradas as seguintes informações sociodemográficas: idade (<60 e ≥60 anos); sexo (feminino ou masculino); raça/cor (branca, preta, amarela, parda e indígena); escolaridade (analfabeto, fundamental incompleto, fundamental completo, médio incompleto, médio completo, superior incompleto e superior completo).

Variáveis clínico-epidemiológicas foram classificadas quanto aos seguintes critérios: grau de incapacidade física (grau 0, 1, 2); espessamento neural (presença ou ausência); envolvimento funcional (mononeuropatia, mononeuropatia múltipla, polineuropatia); tipo de fibra nervosa acometida (neuropatia sensitiva, motora, mista);

estrutura neural comprometida (neuropatia axonal, desmielinizante e mista). Dados de 98 indivíduos foram inseridos em planilhas Microsoft Excel® (Microsoft Inc. USA) e exportados para o *software* GraphPad Prism 9.0® (GraphPad Inc. USA), para análise estatística.

O estudo foi conduzido prospectivamente em seis fragmentos de nervos humanos, sendo três nervos biopsiados, um coletado durante cirurgia de transferência tendinosa e dois, em cirurgia de neurolise, nos membros superiores ou inferiores, em indivíduos de ambos os sexos, com 18 a 70 anos de idade. A obtenção dos espécimes foi realizada com consentimento prévio de cada paciente envolvido (**Anexo I**). Fragmentos cirúrgicos de indivíduos com neuropatias periféricas não hansênicas foram considerados na amostragem, para fins comparativos. O estudo foi desenvolvido após aprovação junto às Comissões Científicas das Instituições envolvidas (parecer nº 336/17) e ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), via Plataforma Brasil (parecer nº 2.968.270) (**Anexo II**).

Experimentação Animal

Este estudo foi realizado utilizando camundongos *nude* atímicos (60 dias), obtidos do Biotério Central do Instituto Lauro de Souza Lima/SES, em Bauru, SP, BR. Os camundongos foram mantidos em um ciclo claro-escuro (12 h/12 h), em temperatura e umidade controladas, com água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados sob aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto Lauro de Souza Lima (CEUA, ILSL001/22) (**Anexo III**). Todos os protocolos estão de acordo com Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Antes de cada procedimento cirúrgico (**Figura 1M**), os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, ip) e receberam analgesia com paracetamol administrado na água no pós-operatório. No final de cada tempo experimental, após

a confirmação do status anestésico, grupos de camundongos foram sacrificados por perfusão intracardíaca, com solução de paraformaldeído a 4% (PFA. Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos: ML (infectado por *M. leprae*); CSH (lesão por esmagamento); ML/CSH (infecção e esmagamento); NaCl (veículo cloreto de sódio); SHAM (cirurgia placebo). Nos tempos experimentais 03-28 dias foram utilizados 03 animais/grupo/tempo, sendo que nos grupos NaCl e SHAM, foram utilizados nervos contralaterais de um mesmo animal. No tempo experimental de 90 dias, apenas o nervo isquiático direito foi utilizado, a fim de reduzir quaisquer interferências na avaliação funcional. Em 03-28-90 dias após a indução (dpi), os camundongos foram sacrificados e os nervos isquiáticos coletados. Os fragmentos foram então divididos para a determinação da expressão de proteínas de interesse.

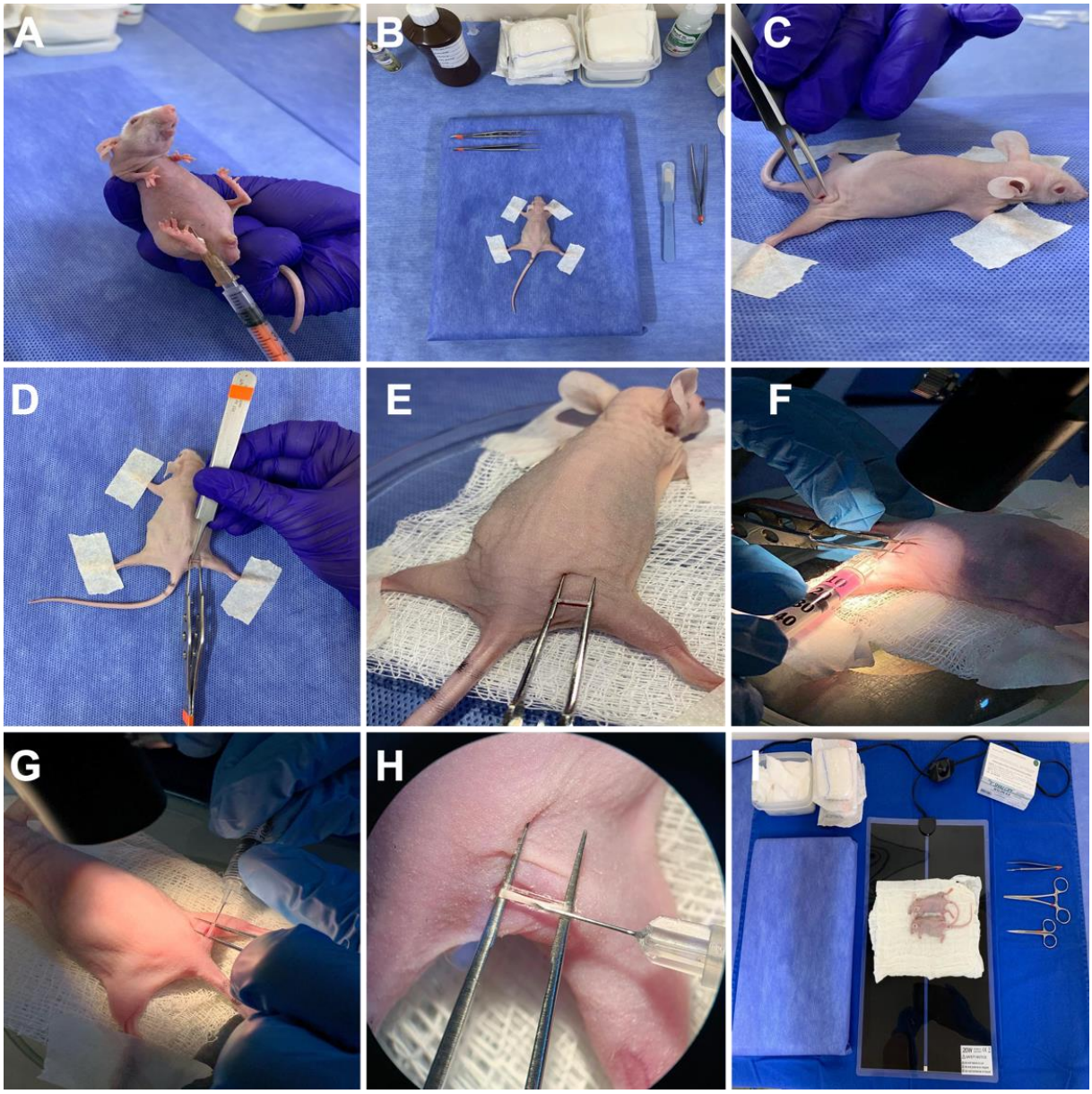


Figura 1M. Experimentação Animal: Etapas do procedimento cirúrgico realizado em camundongos *nude*. Os animais são anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, ip) (**A**) e, devidamente posicionados para as intervenções subsequentes (**B**). Nervos isquiáticos expostos (**C**); submetidos a esmagamento (**D-E**); inoculados com *M. leprae* viável (**F**); inoculados com NaCl 0,9% estéril (**G-H**); a pele é suturada e os animais são mantidos em placas térmicas até o fim do efeito anestésico (**I**)

Obtenção de *M. leprae*

A cepa Thai-53 de *M. leprae* foi propagada a partir de passagens seriadas em coxins plantares de camundongos nude, conforme protocolos estabelecidos

previamente (Trombone et al., 2014; Lahiri et al., 2005). Em resumo, os animais foram inoculados nos coxins plantares traseiros com 30 µl de 10^7 bacilos viáveis/mL/pata.

Após cinco meses, com aumento volumétrico considerável dos coxins, os animais foram sacrificados e as patas coletadas para obtenção de *M. leprae*. A suspensão bacilar foi preparada após dissecção, isolamento e digestão de tecidos, quantificação e identificação bacilar, bem como controle de microrganismos contaminantes e avaliação de viabilidade de *M. leprae* (Lahiri et al., 2005). A viabilidade bacilar foi estimada pelo kit LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability (Thermo Fisher Scientific), no Laboratório de Microbiologia do Instituto Lauro de Souza Lima, e retornou aproximadamente 80% de viabilidade bacilar.

Infecção do Nervo Isquiático

Após o procedimento anestésico e antissepsia, os camundongos foram colocados em uma placa de Petri e o nervo isquiático foi exposto no nível do entalhe isquiático (Bombeiro et al., 2020). A seguir, 10^7 bacilos viáveis/mL de NaCl 0,9% estéril foram inoculados na camada endoneural com uma seringa e agulha 30G (Ultra-Fine™ II, BD), em um volume final de 2 µl. Após a inoculação, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de nylon 4-0. Os animais do grupo controle foram inoculados com 2 µl de NaCl 0,9% estéril.

Lesão por Esmagamento do Nervo Isquiático

A lesão por esmagamento foi induzida após o mesmo protocolo de anestesia e acesso cirúrgico adotado para a inoculação de *M. leprae*. O nervo isquiático foi comprimido a 0,5 cm da trifurcação isquiática, por um minuto, com uma pinça Dumont #5 (WPI). A musculatura foi reposicionada e a pele suturada conforme descrito

anteriormente (Cardoso et al., 2019). No grupo SHAM, foi realizada cirurgia placebo, sem manipulação do nervo.

Análise da Função Motora

As avaliações funcionais foram realizadas um dia antes e três dias após os procedimentos cirúrgicos e em cada tempo experimental pré-determinado. A função motora foi avaliada pelo Índice Funcional do Isquiático (SFI, *sciatic functional index*). Inicialmente, os animais foram treinados para caminhar em uma passarela de acrílico, fechada nas laterais, com um abrigo ao final. Em seguida, as patas traseiras direita e esquerda de cada animal foram pintadas. Os animais foram então posicionados para atravessar a passarela, deixando suas pegadas em um papel no assoalho da passarela. As pegadas foram avaliadas pelos seguintes parâmetros: (I) Comprimento de impressão (PL, *print lenta*), fornecido pela ativação do músculo gastrocnêmico; (II) Espalhamento do dedo (TS, *toe spreading*), dado pela abertura total dos cinco dedos. Os valores obtidos forneceram o índice funcional do isquiático pela fórmula: SFI = 118,9 x (ETS - NTS / NTS) 51,2 x (EPL - NPL / NPL) - 7,5; onde "E" representa locais experimentais e "N", locais normais (Inserra et al., 1998; van Neerven et al., 2012).

Análise de Nocicepção

A sensibilidade dos camundongos à estimulação mecânica foi avaliada pelo aumento gradual da pressão no analgesímetro eletrônico Von Frey (modelo EFF-301, Insight®). O contato do transdutor de força com a pata de cada animal foi realizado por uma ponta descartável de polipropileno de 0,5 mm. Os animais foram colocados em caixas de acrílico apropriadas e aclimatados por aproximadamente 30 minutos antes do teste. Em seguida, uma força foi aplicada entre as patas traseiras dos camundongos e a base da caixa, evocando uma resposta de flexão característica, com a retirada da pata (Oliveira et al., 2020). A pressão suportada pelos animais foi

registrada. Este procedimento continuou até que três valores fossem obtidos. A intensidade da nocicepção foi determinada pelo parâmetro de limiar de retirada de pata (PWT – *Paw withdrawal threshold*) em todos os grupos, em cada tempo experimental.

Obtenção de Extrato Proteico

As proteínas das amostras de nervos periféricos humanos e murinos foram isoladas utilizando o reagente Trizol®, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram homogeneizadas com Trizol®, e em seguida o clorofórmio foi adicionado para a separação de uma camada aquosa superior contendo RNA, interfase e uma camada orgânica inferior contendo DNA e proteínas. O RNA foi armazenado adequadamente a -80 °C e as proteínas foram submetidas às etapas de precipitação, lavagem e solubilização para posteriores aplicações.

Os remanescentes da fase aquosa, quando presentes, foram removidos. Para cada 1 mL de TRIzol™ empregado na lise das amostras, foram adicionados 0,3 mL de etanol 100%. Depois de homogeneizadas várias vezes por inversão, permaneceram por 2–3 minutos em incubação e foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 × g, 4 °C para a sedimentação do DNA. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, e 1,5 mL de isopropanol foram adicionados. As amostras ficaram incubadas por 10 minutos, e em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 × g, 4° C para a sedimentação das proteínas. Os sobrenadantes foram descartados e cada amostra sedimentada foi ressuspendida em 2 mL de solução de lavagem composta por cloridrato de guanidina 0,3 M em etanol a 95%. Após 20 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 7500 × g, 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e o processo de lavagem foi realizado mais duas vezes. Logo após, foram adicionados 2 mL de etanol 100%, misturados brevemente em vórtex e incubados por 20 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas por 5

minutos a 7500 × g, 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os pellets de proteínas secaram ao ar por 5 a 10 minutos. Transcorrido esse tempo, cada sedimento foi ressuspendido em 0,2 mL de SDS 1% e homogeneizado. A imediata incubação em banho-maria a 50°C garante a ressuspensão completa do pellet. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 × g, 4°C para a remoção de materiais insolúveis e os sobrenadantes transferidos para novos tubos. A quantificação das proteínas foi determinada usando o kit Qubit® Protein Assay (Invitrogen™).

Ensaio Imunoenzimático

A determinação das proteínas fosforiladas JNK, p38α e ERK1/2 foi realizada pelo InstantOne ELISA™ Kit (Thermo Scientific, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, foram adicionados 50 µL de cada padrão e amostra em poços apropriados. Foram incorporados 50 µL do coquetel de anticorpos em cada poço, e incubados por 1 hora em temperatura ambiente (TA) com agitação a 300 rpm. A solução foi descartada e os poços foram lavados três vezes com tampão de lavagem. Após a lavagem final, qualquer solução restante foi removida completamente. Em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente de detecção em cada poço e incubados por 10 a 30 minutos em TA com agitação a 300 rpm. Finalmente, 100 µL de solução de parada foram adicionados a cada poço. De imediato, um leitor de placa colorimétrico (espectrofotométrico), ajustado para 450 nm, foi utilizado para medir a absorbância das amostras. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto as do grupo SHAM.

Perfusão Intracardíaca

Após a confirmação do *status* anestésico, parte dos camundongos foi sacrificada por perfusão intracardíaca, com solução de PFA 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). O procedimento se iniciou com uma incisão ao nível do processo xifoide, utilizando-se

tesoura cirúrgica média de ponta fina. O diafragma foi seccionado e o gradil costal aberto, sendo devidamente rebatido para a exposição do coração na caixa torácica. Em seguida, foi introduzida agulha na extremidade do ventrículo esquerdo para carreação da solução de perfusão via aorta, para todo o organismo. O transfusato foi retirado através de um picote (1mm) no átrio direito. A quantidade de solução fixadora utilizada na perfusão foi de 20 mL por animal. Parte dos espécimes de nervos isquiáticos foi fixada em PFA 4%, *overnight*, a 4°C, lavados em PBS e submetidas a criopreservação. As amostras, então, foram mantidas de 1 a 3 dias em sacarose 30%. Os fragmentos neurais foram incluídos individualmente em meio Tissue-Tek OCT Compound (Sakura), congelados no nitrogênio líquido e estocados a -80°C, até processamento em criostato (5 µm). Os grupos de animais destinados a ensaios moleculares não foram transfundidos.

Imunofluorescência em Cortes Congelados

As amostras foram submetidas à imunofluorescência para localização *in situ* dos mesmos alvos celulares investigados pelas demais técnicas desse estudo. Os espécimes foram fixados por imersão em PFA 4% durante 10 minutos em TA, desidratados em TA e reidratados em TBS/glicina 0,1 mM, por 10 minutos. Em seguida, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com albumina de soro bovino 3% (BSA) em TBST (TBS/Triton X-100 0,3%), por 120 minutos. Os espécimes foram então incubados *overnight*, a 4 °C, com anticorpos primários específicos para ERK1/2 fosforilada (1:200. clone B.742.5. Thermo Scientific), p38α fosforilada (1:100. clone F.52.8. Thermo Scientific), JNK fosforilada (1:250. Thermo Scientific), e c-Jun fosforilado (1:250. Termo Scientific), diluídos em TBS/BSA 2%. Seguindo-se o período de incubação, os espécimes foram lavados em TBS e incubados com anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo AlexaFluor® 488 (Molecular Probes®), diluídos em TBS/BSA 2%, por 120 minutos, em TA e protegidos de luz. Os núcleos celulares foram corados pelo reagente VECTASHIELD *Antifade Mounting Medium* (Vector Laboratories, Burlingame,

CA) e os espécimes vedados e armazenados a -20 °C. A captura das imagens foi realizada em microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 (Leica Microsystems), com *software* de processamento de imagens LAS AF (Leica Microsystems). A densidade de fluorescência de cada espécime - três campos/espécime/grupo - foi calculada por meio do *software* ImageJ 1.53v *(*National Institutes of Health, USA*)*.

Análise Estatística

Os dados foram analisados no *software* GraphPad Prism 9.0® (GraphPad Inc. USA). As variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk, para verificação de distribuição de normal e ao teste de Grubbs, para avaliação de *outliers*. Em comparações acima de três grupos, foi realizada análise de variância (ANOVA), com pós-testes de comparações múltiplas de Šídák, Tukey ou Dunnett. Valores de $p < 0,05$ foram estabelecidos como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Aspectos Sociodemográficos e Clínicos de Indivíduos com Neuropatia Periférica Atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima entre 2009 e 2019

Entre os anos de 2009 e 2019, o ambulatório de Dermatologia do Instituto Lauro de Souza Lima diagnosticou 98 indivíduos com neuropatia periférica. Ao examinar os fatores determinantes para o diagnóstico, constatou-se que a neuropatia periférica estava associada à hanseníase em 53 indivíduos (54,08%), enquanto outras neuropatias foram identificadas em 45 indivíduos (45,92%). Para fins de análise descritiva e estatística, foram estabelecidos dois grupos distintos, denominados neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias (oPN).

Os dados sociodemográficos dos indivíduos com neuropatia hansênica indicaram maior incidência em idade inferior a 60 anos, somando 39 (73,59%) casos, em comparação com àqueles que apresentam 60 anos ou mais, 14 (26,41%) no total. Quanto ao gênero, prevaleceu o sexo masculino, com 39 (73,59%) casos, em oposição a 14 (26,41%) do sexo feminino. Ao verificar a variável raça/cor, 46 (86,79%) dos casos correspondem a raça/cor branca, seguidos de preta, 5 (9,43%), e parda, 2 (3,77%). Quanto à escolaridade, o ensino fundamental incompleto foi mencionado por 12 (22,64%) indivíduos, representando a maioria, entre os que devidamente notificaram essa informação (**Tabela 1M**).

As mesmas variáveis sociodemográficas foram determinadas entre os indivíduos com neuropatias não relacionadas à hanseníase. Desse modo, ao consultar a faixa etária, constatou-se que 24 (53,33%) indivíduos tinham menos de 60 anos, enquanto 21 (46,67%) deles, 60 anos ou mais. No que diz respeito ao gênero, também foi observada uma dominância do sexo masculino sobre o feminino entre os casos de neuropatias não relacionadas à hanseníase. Foram registrados 32 casos masculinos (71,11%) e 13 casos femininos (28,89%). Na categoria raça/cor branca, foram registrados 39 (86,66%) casos, enquanto nas categorias preta e amarela, houve 1 (2,22%) notificação em cada uma delas. As informações sobre grau de escolaridade foram cedidas somente por 14 (31,10%) indivíduos. Dentre esses, o ensino fundamental incompleto foi o mais prevalente, com 9 (20,00%) indivíduos (**Tabela 1M**).

A caracterização clínica dos casos de neuropatia periférica, relacionada ou não à hanseníase, indicou que nos indivíduos com neuropatia hansênica, foram observadas incapacidades de grau 2 em 40 (75,47%) indivíduos, incapacidades de grau 1 em 12 (22,64%), e apenas 1 indivíduo apresentou incapacidade de grau 0 (1,88%). Para as demais classes de neuropatias, foram registradas incapacidades de grau 2 em 23 (51,11%) indivíduos, incapacidades de grau 1 em 13 (28,88%), e incapacidade de grau 0 em 5 (11,11%) indivíduos. Foi verificada associação estatisticamente significante entre

o grau de incapacidade nos casos de neuropatia hansênica e outras causas (p = 0,0389).

Cerca de 42 (79,24%) indivíduos com diagnostico de neuropatia hansênica apresentaram espessamento neural, ao passo que essa característica foi manifestada em 23 (51,11%) casos com neuropatia devido a outras causas (p = 0,0080). No que diz respeito ao envolvimento funcional em indivíduos com neuropatia hansênica, observou-se que 6 (11,32%) apresentaram mononeuropatia, 42 (79,24%) receberam o diagnóstico de mononeuropatia múltipla e 5 (9,43%), o de polineuropatia. No grupo de indivíduos com outras neuropatias, 15 (33,33%) tiveram mononeuropatia, 15 (33,33%) mononeuropatia múltipla, e 13 (28,88%), polineuropatia. Foi verificada associação significativa entre o envolvimento funcional nos casos de neuropatia hansênica e outras causas (p = 0,0002).

Quanto ao tipo de fibra nervosa acometida na neuropatia hansênica, foram identificados 3 (5,66%) casos com neuropatia sensitiva, outros 3 (5,66%) com neuropatia motora, e a maioria dos indivíduos apresentou neuropatia mista, totalizando 46 (86,80%) casos. No que diz respeito as demais neuropatias, foram registrados 6 (13,33%) casos com neuropatia sensitiva, 1 (2,22%) caso com neuropatia motora e 32 (71,11%) casos com neuropatia mista, representando a maior parte dos casos. Ao confrontar tais desfechos, também foi observada uma associação significativa nessa categoria (p = 0,0478). A pesquisa acerca da estrutura neural comprometida na neuropatia hansênica identificou 7 (13,20%) casos com padrão axonal, 9 (16,98%) casos com padrão desmielinizante e, uma predominância do padrão misto, associado a 26 (49,05%) casos. Entre as outras neuropatias, no entanto, destacou-se o padrão axonal, com 14 (31,11%) casos, seguidos dos padrões desmielinizante e misto com 8 (17,77%) e 10 (22,22%) casos, respectivamente. Uma associação significativa também foi observada ao comparar determinado panorama entre os dois grupos de neuropatias periféricas (p = 0,0266) **(Tabela 2M).**

Os fatores de risco para desenvolvimento de neuropatia periférica hansênica foram descriminados e observou-se que, 9 (16,98%) indivíduos apresentavam diabetes, 2 (3,77%) eram portadores do HIV e estavam em uso de quimioterápicos, enquanto 1 (1,88%) indivíduo relatou exposição prolongada a agrotóxicos. Nas outras neuropatias, os fatores de risco se manifestaram da seguinte forma: 5 (11,11%) indivíduos tinham diagnóstico de diabetes, 2 (4,44%) declararam consumo excessivo de álcool, 1 (2,22%) apresentou polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica, 1 (2,22%) foi identificado com lúpus eritematoso sistêmico, e 1 (2,22%) com Charcot Marie Tooth. Em 29 (64,44%) indivíduos nenhum fator de risco foi especificado (**Tabela 3M**).

Após realizar a caracterização do perfil de pacientes com neuropatias periféricas na Instituição, conduzimos um estudo prospectivo no qual coletamos amostras de nervos frescos de pacientes com neuropatia hansênica e não hansênica. O objetivo foi analisar o perfil dos marcadores-alvo nessas amostras, que também serão investigados no modelo animal. Através da comparação desses resultados, poderemos identificar se existem reflexos clínicos relevantes associados a esses marcadores.

Tabela 1. Caracterização sociodemográfica de indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), entre 2009 e 2019

Categoria	**Neuropatia hansênica (LepN) N (%)**	**Outras neuropatias (oPN) N (%)**
Total de casos	53 (54,08)	45 (45,92)
Idade (anos)		
< 60	39 (73,59)	24 (53,33)
≥ 60	14 (26,41)	21 (46,67)
Sexo N		
Feminino	14 (26,41)	13 (28,89)
Masculino	39 (73,59)	32 (71,11)
Raça/Cor		
Branca	46 (86,79)	39 (86,66)

Preta	5 (9,43)	1 (2,22)
Amarela	-	1 (2,22)
Parda	2 (3,77)	-
Indígena	-	-
Ignorado	-	4 (8,88)
Educação		
Analfabeto	1 (1,88)	-
Ensino Fundamental incompleto	12 (22,64)	9 (20,00)
Ensino Fundamental completo	1 (1,88)	2 (4,44)
Ensino Médio incompleto	1 (1,88)	-
Ensino Médio completo	8 (15,09)	3 (6,66)
Ensino Superior incompleto	1 (1,88)	-
Ensino Superior completo	3 (5,66)	-
Ignorado	26 (49,05)	31 (68,88)

Tabela 2. Caracterização clínica de indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), entre 2009 e 2019

Categoria	Neuropatia hansênica (LepN) N (%)	Outras neuropatias (oPN) N (%)	P-valor*
Total de casos	53 (54,08)	45 (45,92)	
Grau de incapacidade			
0	1 (1,88)	5 (11,11)	**0,0389**
1	12 (22,64)	13 (28,88)	
2	40 (75,47)	23 (51,11)	
S/D	-	4 (8,88)	
Espessamento neural			
Sim	42 (79,24)	23 (51,11)	**0,0080**
Não	10 (18,86)	19 (42,22)	
S/D	1 (1,88)	3 (6,66)	
Envolvimento funcional			
Mononeuropatia	6 (11,32)	15 (33,33)	**0,0002**
Mononeuropatia múltipla	42 (79,24)	15 (33,33)	
Polineuropatia	5 (9,43)	13 (28,88)	
S/D	-	2 (4,44)	

Tipo de fibra nervosa			
Sensitivo	3 (5,66)	6 (13,33)	**0,0478**
Motor	3 (5,66)	1 (2,22)	
Misto	46 (86,80)	32 (71,11)	
S/D	1 (1,88)	6 (13,33)	
Estrutura comprometida			
Axonal	7 (13,20)	14 (31,11)	**0,0266**
Desmielinizante	9 (16,98)	8 (17,77)	
Mista	26 (49,05)	10 (22,22)	
S/D	11 (20,75)	13 (28,89)	
**Chi-square test for trend*			

Tabela 3. Fatores de risco em indivíduos com diagnóstico clínico de neuropatia periférica, atendidos no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), entre 2009 e 2019

Categoria	**Neuropatia hansênica (LepN) N (%)**	**Outras neuropatias (oPN) N (%)**
Total de casos	53 (54,08)	45 (45,92)
Fatores de Risco		
1. Diabetes (metabólica)	9 (16,98)	5 (11,11)
2. HIV/quimioterápicos (induzido por drogas)	2 (3,77)	-
3. Etilismo (tóxica)	-	2 (4,44)
4. Exposição a Agrotóxicos (tóxica)	1 (1,88)	-
6. Polineuropatia Inflamatória Desmielinizante Crônica (autoimune)	-	1 (2,22)
7. Lúpus eritematoso sistêmico (autoimune)	-	1 (2,22)
8. Charcot-Marie-Tooth (hereditária)	-	1 (2,22)
9. Causa não determinada	-	29 (64,44)

Função Motora em Modelo Murino de Lesão Neural

O Índice Funcional do Isquiático (SFI), que é obtido por meio do teste de marcha em animais experimentais, fornece uma medida do déficit funcional e do grau de comprometimento da função motora. Na literatura relevante, valores de SFI entre 10 e -10 são considerados normais. Valores abaixo de -100 indicam perda completa da função motora, enquanto valores entre -100 e -10 são indicativos de comprometimento parcial da função motora. Neste estudo, o déficit funcional foi avaliado em todos os grupos experimentais antes da intervenção (pi) e nos dias 3, 14, 28 e 90 após a intervenção (dpi). Os dados foram comparados entre os grupos e cada grupo com seu respectivo controle (CSH vs. ML; CSH vs. ML/CSH; CSH vs. SHAM; ML vs. ML/CSH; ML/CSH vs. NaCl; ML/CSH vs. SHAM; NaCl vs. SHAM) (**Figura 2M**).

Na avaliação da função motora anteriormente aos procedimentos experimentais (pi), os animais apresentaram valores médios de SFI entre -7,42 (ML/CSH) e -3,20 (ML), sem diferenças significativas entre os grupos (**Figura 2M_A**). Em 3 dpi, os valores médios de SFI oscilaram entre -91,639 (CSH) e -3,195 (SHAM), com diferenças estatisticamente significantes entre CSH vs. ML e SHAM ($p = 0,0008$ e $< 0,0001$), ML/CSH vs. NaCl e SHAM (ambos, $p < 0,0001$), além de NaCl vs. SHAM ($p < 0,0001$) (**Figura 2M_B**). Em 14 dpi, as médias de SFI foram de -35,307 (CSH) a -3,785 (SHAM); os dados revelaram diferenças significantes entre, CSH vs. SHAM ($p < 0,0001$) e ML/CSH vs. SHAM ($p = 0,0034$) (**Figura 2M_C**). Em 28 dpi, as médias SFI variaram entre -10,337 (NaCl) e -1,325 (ML), sem diferenças estatísticas entre os grupos (**Figura 2M_D**). O último tempo experimental, 90 dpi, demonstrou valores registrados entre -16,263 (ML) a 2,523 (SHAM), com diferenças significantes entre ML vs. NaCl ($p = 0,0375$) e ML/CSH vs. SHAM (0,0279) (**Figura 2M_E**).

Na avaliação individual, em cada grupo os tempos experimentais foram comparados com o momento prévio aos procedimentos (pi). CSH exibiu diferenças

estatisticamente significantes nas comparações de pi vs. 3 dpi e 14 dpi (<0,0001). O grupo ML também foram observadas diferenças entre pi vs. 3 dpi e 14 dpi (<0,0001 e 0,0002). Em ML/CSH diferenças entre pi vs. 3 dpi e 14 dpi (<0,0001 e 0,0048). O controle NaCl apresentou diferenças entre pi vs. 3 dpi (<0,0001 e 0,0048) (**Figura 2M_F**).

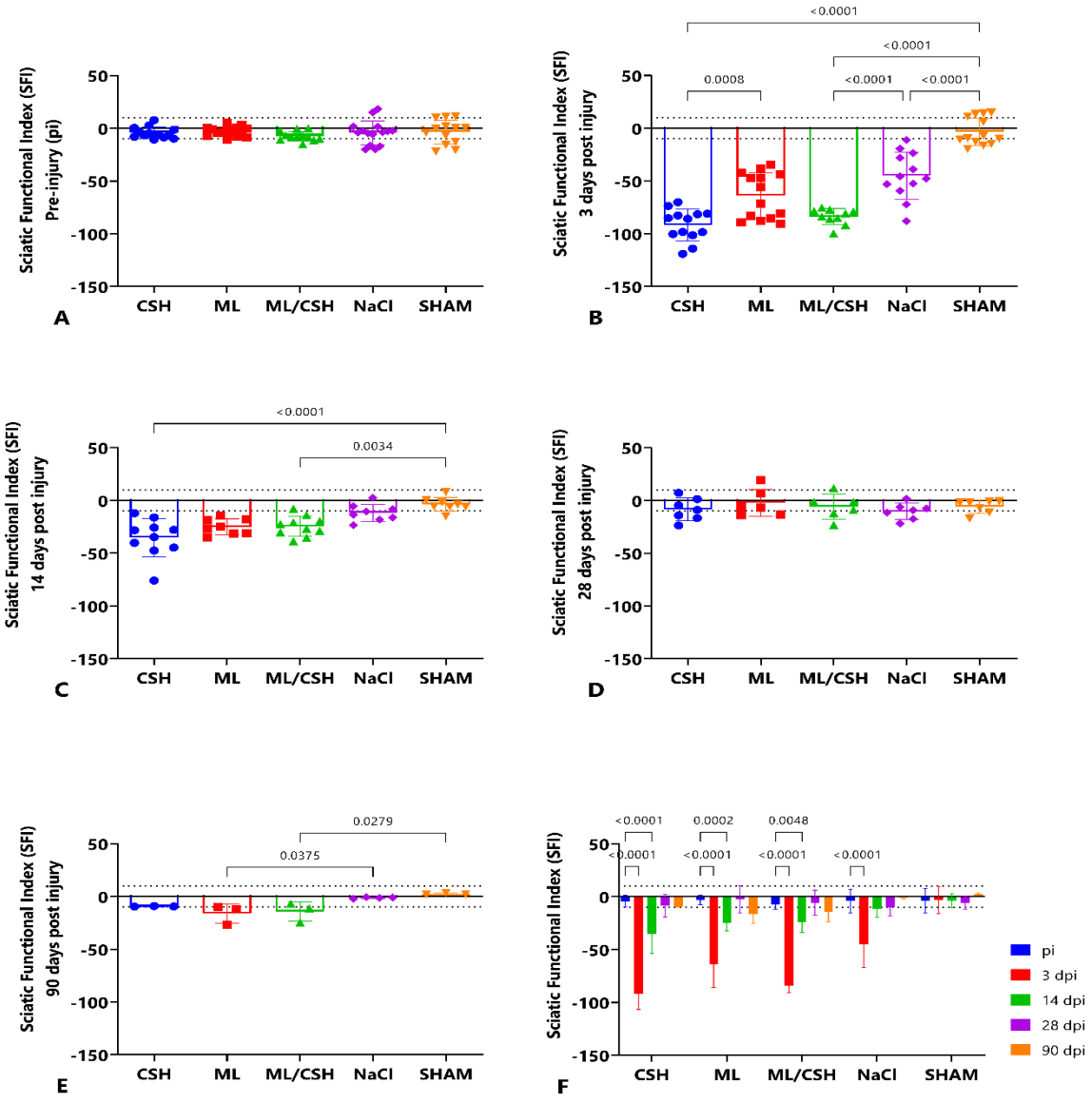


Figura 2M. Avaliação da função motora em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Índice Funcional do Isquiático (SFI) avaliado nos tempos experimentais, **(A)** pré-intervenção (pi), **(B)** 03, **(C)** 14, **(D)** 28 e **(E)** 90 dias pós-intervenção (dpi). **(F)** Valores agrupados. Grupos experimentais: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação com *M. leprae* (ML); ML/CSH; Inoculação controle com Cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Teste ANOVA, com pós-teste Šídák **(A-E)** e Dunnett **(F)**. Valores de p

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

Resposta Nociceptiva em Modelo Murino de Lesão Neural

A nocicepção à estimulação mecânica foi avaliada com sensor de força (g), pelo aumento gradual da pressão em analgesímetro eletrônico de Von Frey. Valores de limiar de retirada de pata (PWT) foram determinados em todos os grupos experimentais, nos períodos, pi, 3, 14, 28 e 90 dpi (**Figura 3M**).

No período pi, antes dos experimentos, os valores médios foram de 1,055 g (ML) a 1,531 g (CSH). Em contraste, no período 3 dpi, variaram entre 0,388 g (ML) e 0,586 g (SHAM). Os animais testados após 14 dpi apresentaram médias de PWT entre 0,886 g (ML) e 1,023 g (SHAM). Em 28 e 90 dpi, as médias foram respectivamente, de 0,925 g (SHAM) a 1,281 g (ML/CSH) e, 0,543 g (ML/CSH) a 2,036 g (NaCl). A despeito das diferenças discretas de PWT entre os grupos, foram observados valores significativamente menores no grupo ML/CSH em relação a NaCl ($p = 0,0235$), no período 90 dpi (**Figura 3M_E**).

Em avaliações individuais, intragrupos, foi possível verificar que todos os grupos experimentais demonstraram limiar bastante inferior em 3dpi, comparado a pi (<0,0001). Adicionalmente, o grupo ML/CSH exibiu limiar reduzido em pi vs.14 dpi e 90 dpi ($p = 0,025$ e 0,0006), assim como NaCl em pi vs. 90 dpi (0,0002) (**Figura 3M_F**).

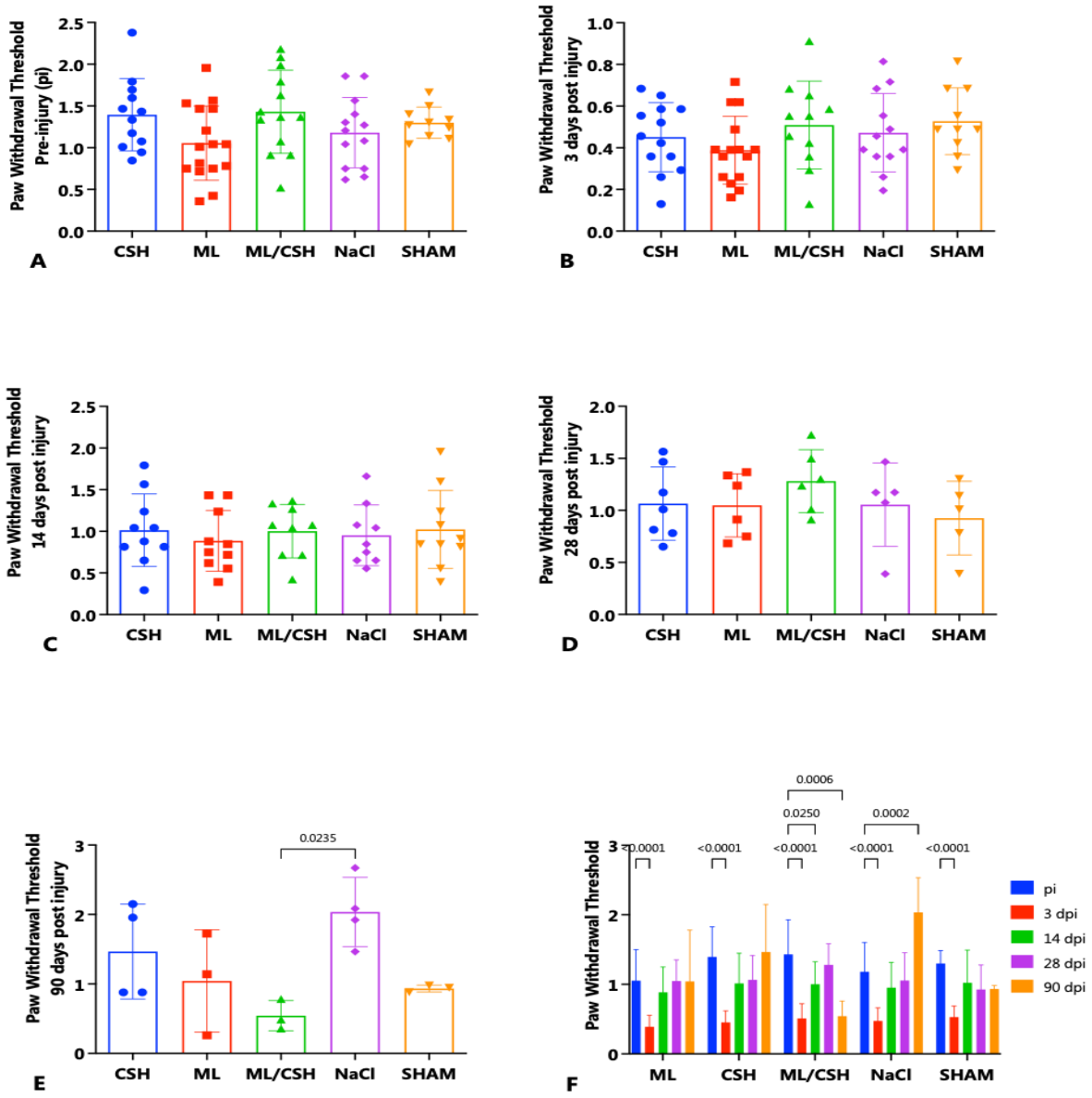


Figura 3M. Resposta nociceptiva em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Limiar de retirada de pata (PWT), avaliado nos tempos experimentais, **(A)** pré-intervenção (pi), **(B)** 03, **(C)** 14, **(D)** 28 e **(E)** 90 dias pós-intervenção (dpi). **(F)** Valores agrupados. Grupos experimentais: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação com *M. leprae* (ML); ML/CSH; Inoculação controle com Cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Teste ANOVA, com pós-teste Šídák **(A-E)** e Dunnett **(F)**. Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Dados de três medições obtidas de um a seis animais/grupo/período

Caracterização Imunofenotípica de Nervos Isquiáticos Murinos

A expressão de marcadores de fenótipo nos nervos isquiáticos dos camundongos *nude* submetidos aos procedimentos experimentais, foi demonstrada

pela imunodetecção das proteínas, S100β (SCs), tubulina βIII (neurônios) e MPZ (mielina) (Invitrogen™, USA) (**Figura 4M**).

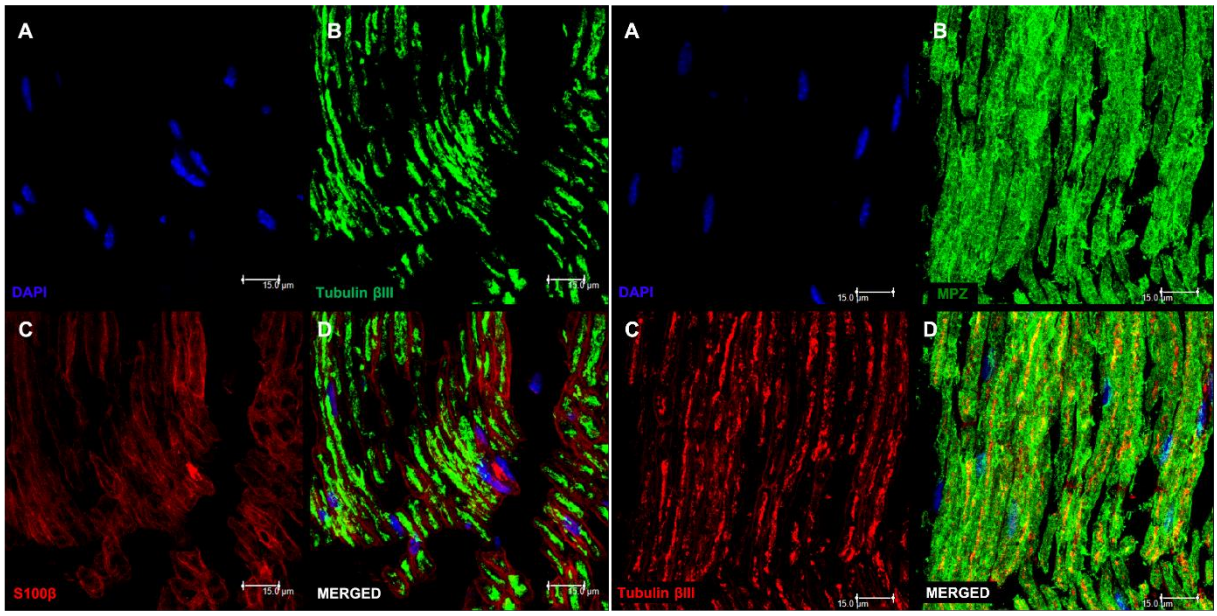


Figura 4M. **Caracterização por imunofluorescência de nervos isquiáticos de camundongos *nude*, controle SHAM.** Em **(A)**, identificação nuclear por DAPI (azul). Em **(B),** axônios marcados por tubulina βIII, à esquerda, e bainha de mielina identificada por MPZ, à direita (ambos, AlexaFluor 488, verde). Em **(C)**, células de Schwann identificadas pela proteína de citoesqueleto, S100β, à esquerda, e tubulina βIII à direita (ambos, AlexaFluor 594, vermelho). **(D)** ilustra imagens sobrepostas (esquerda e direita). Barras de escala: 15 µm (A: 630x)

Regulação de ERK1/2 em Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural

ERK1/2 foi investigada pelo ensaio InstantOne ELISA™, em amostras de nervos humanos, com e sem hanseníase, bem como nos nervos isquiáticos de camundongos *nude* (**Figura 5M**). Na avaliação de nervos isquiáticos de camundongos *nude*, em 3 dpi, todos os grupos experimentais exibiram absorbância (A450) inferior ao controle positivo fornecido pelo kit (CTRL+) (para todos os grupos, $p < 0,0001$). Na comparação entre os grupos, CSH foi inferior a ML e, contraditoriamente, a SHAM ($p = 0,0004$ e 0,0048). Ainda, ML apresentou valores de ERK1/2 superiores em relação a ML/CSH e o

controle NaCl (p = 0,0004 e 0,0011). ML/CSH e NaCl exibiram valores inferiores a SHAM (p = 0,0052 e 0,0251) (**Figura 5M_A**). Assim como em 03 dpi, todos os grupos experimentais em 28 dpi foram estatisticamente inferiores ao controle positivo do kit (CTRL+) [CSH (p = 0,0001), ML (p = 0,0008), ML/CSH, NaCl e SHAM (p <0,0001)]. O grupo CSH demonstrou valores superiores a ML/CSH (p = 0,0282). O grupo ML foi superior a ML/CSH, além do controle NaCl (p = 0,0018 e 0,0026) (**Figura 5M_B**). Os espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) não demonstraram diferenças estatisticamente significantes, quando comparados a outras neuropatias periféricas (oPN) (**Figura 5M_C**).

A detecção de ERK1/2 nos nervos isquiáticos de camundongos *nude*, também foi realizada por técnica de imunofluorescência, seguida de captura de imagens microscópicas e análise quantitativa pelo *software* ImageJ 1.53v (National Institutes of Health, USA). A densidade integrada de fluorescência foi obtida após normalização pelo número de núcleos DAPI+ de cada campo microscópico, em três campos/espécime/grupo (**Figura 6M**). O perfil de expressão de ERK1/2 foi comparado entre os grupos (CSH, ML, ML/CSH, NaCl, SHAM) e individualmente, em cada grupo, nos diferentes períodos experimentais (3 dpi, 28 dpi, 90 dpi) (**Figura 7M**).

Em 3 dpi, a expressão de ERK1/2 foi superior no grupo CSH em relação a SHAM (p = 0,0140), bem como ML/CSH x NaCl (p < 0,0001) e ML/CSH x SHAM (p < 0,0001) (**Figura 7M_A**). Em 28 dpi e 90 dpi, não foram observadas alterações estatisticamente significantes entre os grupos (**Figura 7M_B e 7M_C**). Quanto a diferenças entre tempos experimentais em cada grupo, em ML/CSH foi observada maior expressão de ERK1/2 em 3 dpi, quando comparada a 28 dpi e 90 dpi (p = 0,0002; p = 0,0050). No grupo NaCl, alterações significantes foram verificadas em 28 dpi, em comparação a 3 dpi e 90 dpi (p = 0,0414; p = 0,0247). A expressão de ERK no grupo SHAM foi maior em 28 dpi, comparada a 3 dpi (p = 0,0469) (**Figura 7M_D**).

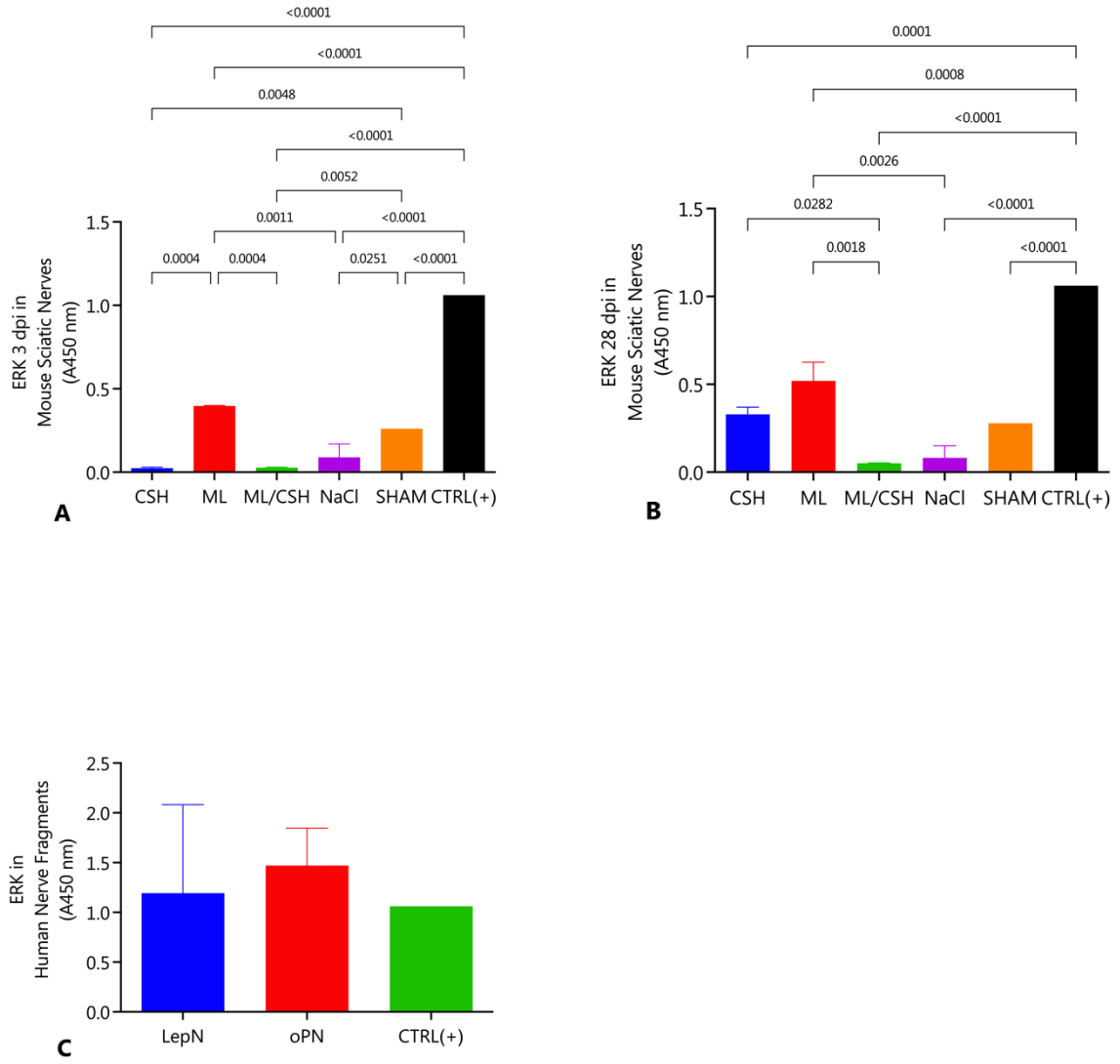


Figura 5M. Determinação da via ERK1/2 em ensaio InstantOne ELISA™. A avaliação foi realizada em dois períodos experimentais: (**A**) 03 e (**B**) 28 dias após a intervenção, nos seguintes grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). Também foi realizada uma avaliação comparativa entre os espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias periféricas (oPN) (**C**). O teste ANOVA, com pós-teste Šídák (**A, B**) ou Tukey (**C**), foram utilizados. Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto SHAM.

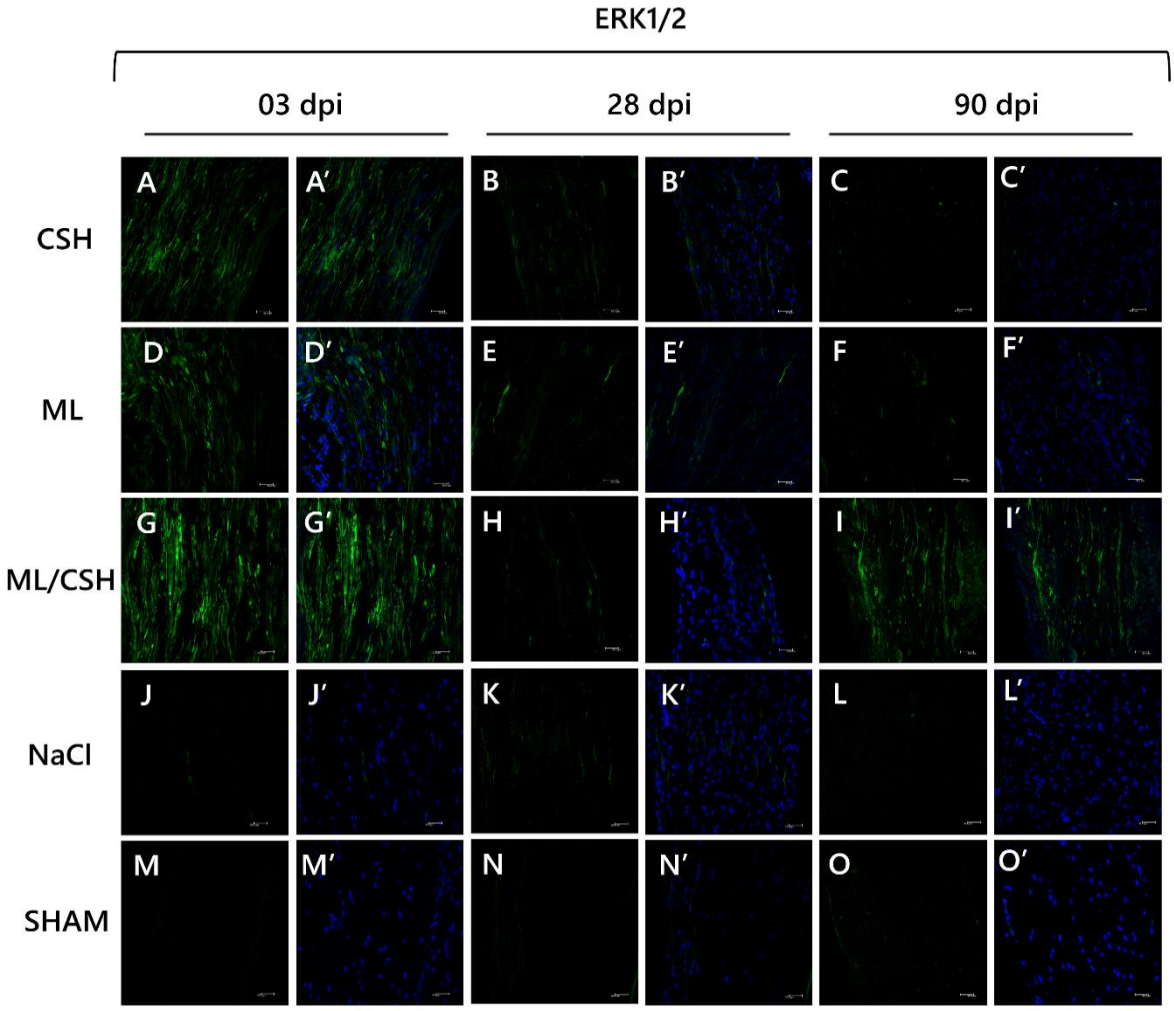


Figura 6M. Imunodetecção de ERK1/2 em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (**A-C'**) Lesão por esmagamento (CSH); (**D-F'**) Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (**G-I'**) ML/CSH; (**J-L'**) Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (**M-O'**) Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

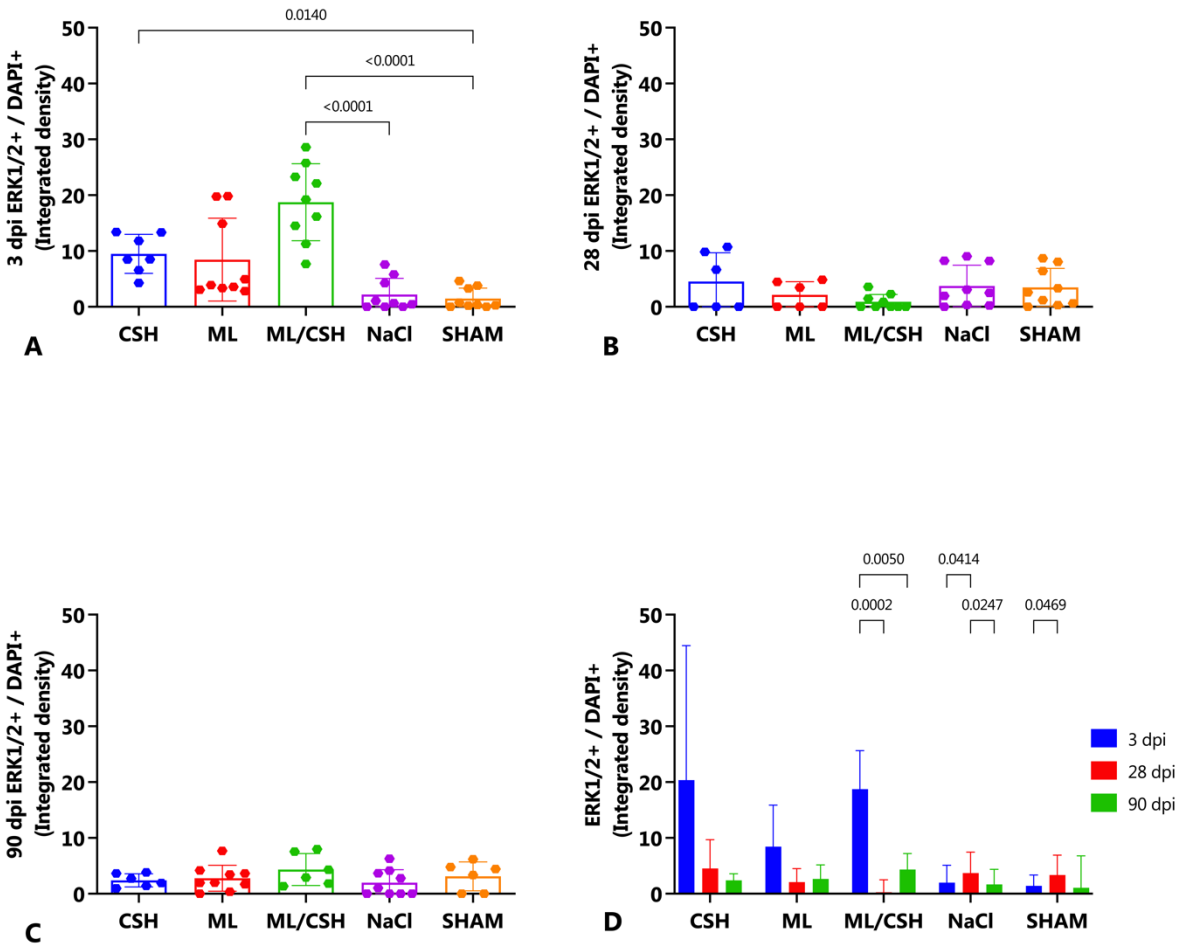


Figura 7M. Avaliação de ERK1/2 em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de ERK1/2, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (**A**) 03, (**B**) 28 e (**C**) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (**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 dois a três animais/grupo/período

Regulação de p38α MAPK Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural

A via p38α MAPK também foi avaliada através do ensaio InstantOne ELISA™ em amostras de nervos humanos, tanto com quanto sem hanseníase, e em espécimes de nervos isquiáticos de camundongos nude (**Figura 8M**). Aos 3 dpi, todos os grupos

experimentais apresentaram valores estatisticamente inferiores ao controle positivo do kit (CTRL+) (p <0,0001), exceto pelo grupo ML, que mostrou valores superiores de p38α MAPK (p = 0,0018). Na comparação entre os grupos, o grupo ML apresentou valores superiores aos grupos CSH, ML/CSH e NaCl (p <0,0001) (**Figura 8M_A**).

Aos 28 dpi, todos os grupos experimentais apresentaram valores estatisticamente inferiores ao controle positivo do kit (CTRL+) (para todos os grupos, p < 0,0001). O grupo CSH demonstrou valores superiores de p38α MAPK em comparação com os grupos ML e ML/CSH (p < 0,0001), além do grupo SHAM (p = 0,0003). Os grupos ML/CSH e NaCl apresentaram valores inferiores ao grupo SHAM (p < 0,0001) (**Figura 8M_B**). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e aqueles com outras formas de neuropatias periféricas (oPN) (**Figura 8M_C**).

A detecção de p38α MAPK por imunofluorescência foi comparada entre os grupos e individualmente dentro de cada grupo, em todos os períodos experimentais (**Figuras 9M e 10M**). Aos 3 dpi, p38α MAPK mostrou elevação no grupo ML/CSH em comparação com o grupo NaCl (p = 0,0469) (**Figura 10M_A**). Nos demais períodos, p38α MAPK não apresentou diferenças estatisticamente significantes (**Figura 10M_B e C**). Nas comparações individuais por grupo, somente ML demonstrou elevação de p38α MAPK aos 3 dpi, em relação aos 28 dpi (p = 0,0443), bem como em 90 dpi, comparado a 28 dpi (p = 0,0004) (**Figura 10M_D**).

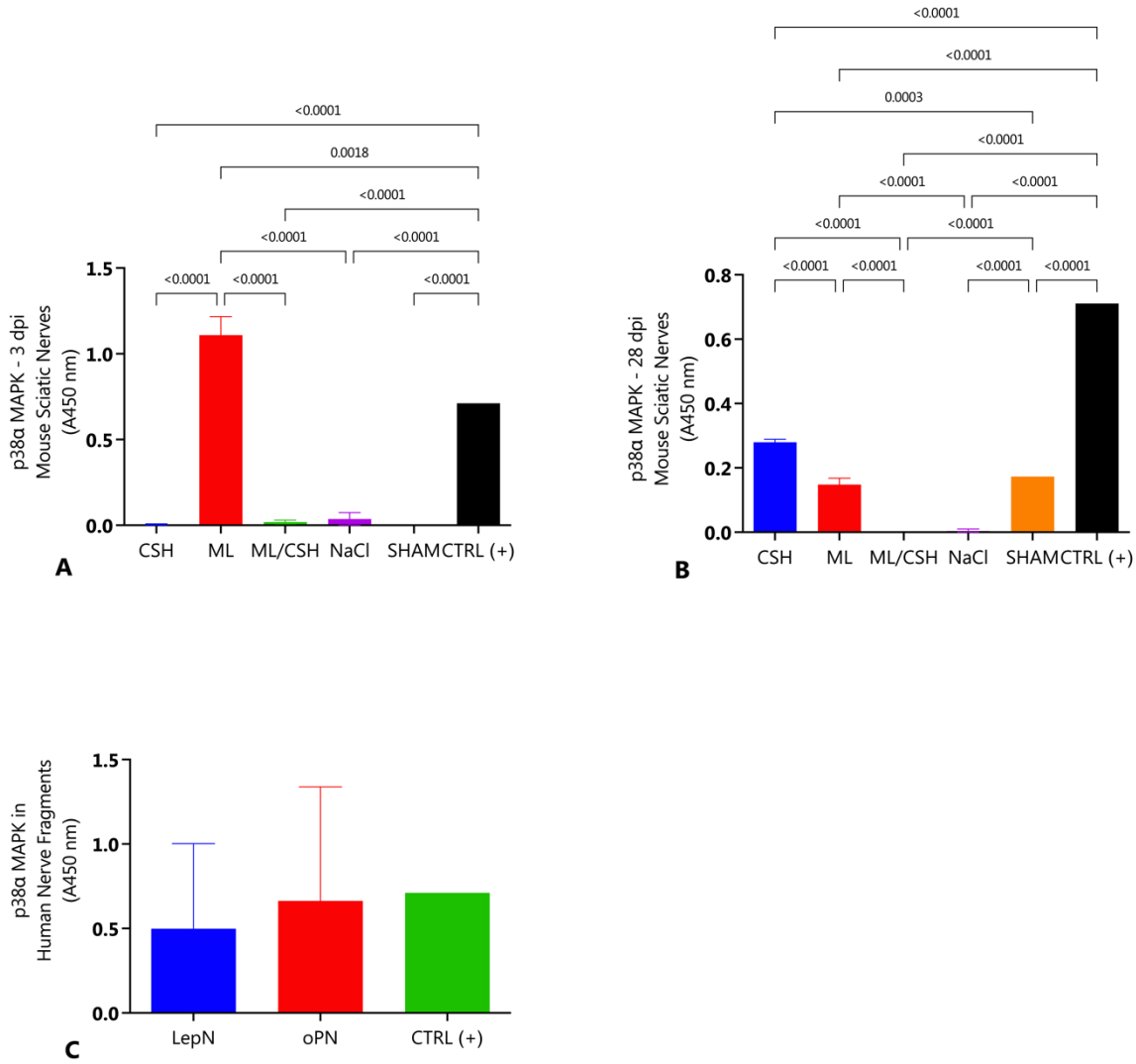


Figura 8M. Determinação de p38α MAPK em ensaio InstantOne ELISA™. A avaliação foi realizada nos seguintes períodos experimentais: (**A**) 03 e (**B**) 28 dias após a intervenção (dpi), considerando os grupos: Lesão por esmagamento (CSH), Inoculação endoneural por *M. leprae*. (ML), ML/CSH, Injeção de cloreto de sódio (NaCl) e Cirurgia simulada (SHAM). Além disso, foi feita uma avaliação comparativa entre espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias periféricas (oPN) (**C**). O teste ANOVA foi utilizado, seguido do pós-teste Šídák (**A, B**) ou Tukey (**C**). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto SHAM.

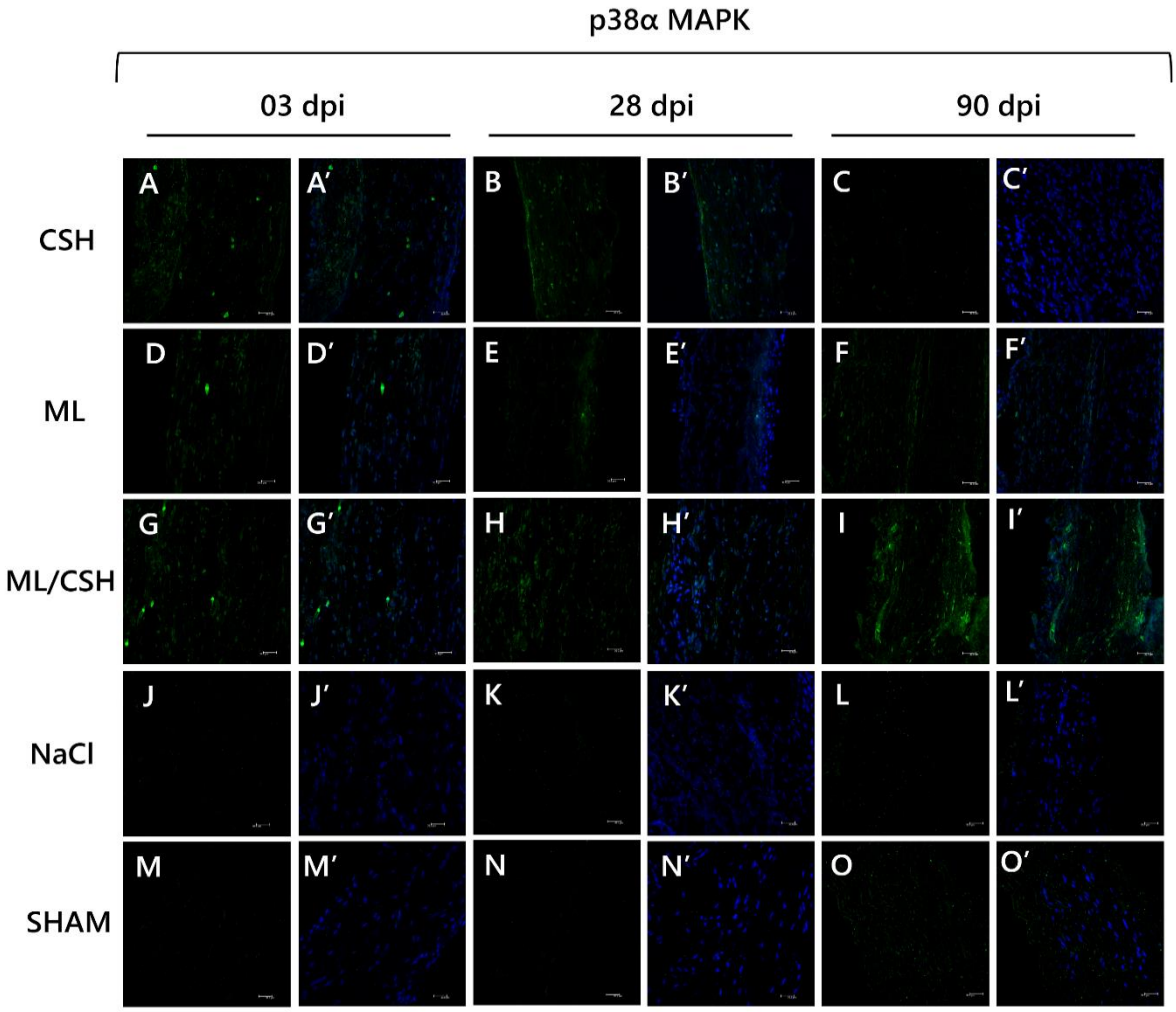


Figura 9M. Imunodetecção de p38α MAPK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (**A-C'**) Lesão por esmagamento (CSH); (**D-F'**) Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (**G-I'**) ML/CSH; (**J-L'**) Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (**M-O'**) Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

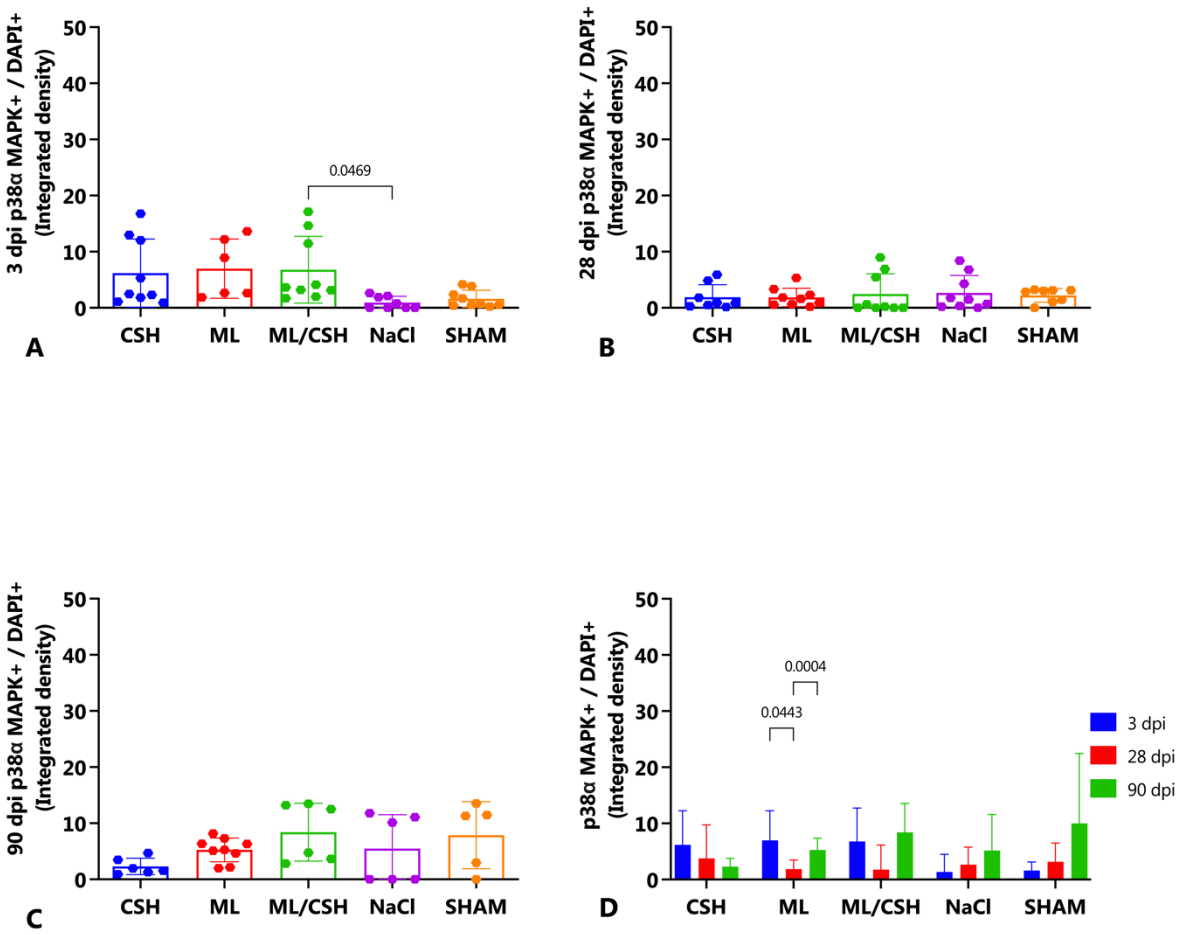


Figura 10M. Avaliação de p38α MAPK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de p38α MAPK, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (**A**) 03, (**B**) 28 e (**C**) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (**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 dois a três animais/grupo/período

Regulação de JNK Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural

Assim como ERK1/2 e p38α MAPK, a via JNK foi avaliada no ensaio InstantOne ELISA™ em nervos humanos e murinos (**Figura 11M**). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos nervos isquiáticos de camundongos *nude* em 3 dpi, ao comparar os grupos experimentais com o controle positivo do kit (CTRL+), nem ao comparar os próprios grupos entre si (**Figura 11M_A**). Em 28 dpi, todos os

grupos experimentais apresentaram diferenças estatisticamente inferiores ao controle positivo do kit (CTRL+) [CSH (p = 0,0088), ML (p = 0,0030), ML/CSH (p = 0,0003) e NaCl (p = 0,0004)], com exceção do grupo SHAM. Na comparação entre os grupos, CSH foi superior ao grupo ML/CSH (p = 0,0252) e SHAM apresentou valores de JNK superiores aos grupos ML/CSH e NaCl (p = 0,0028 e 0,0033) (**Figura 11M_B**). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os espécimes de nervos com hanseníase (LepN) e aqueles com outras formas de neuropatias periféricas (oPN) (**Figura 11M_C**).

A expressão proteica de JNK também foi investigada por imunofluorescência nos nervos murinos (**Figuras 12M e 13M**). Nas comparações entre os grupos, observou-se que, em 3 dpi JNK foi superior no grupo CSH em relação ao grupo SHAM (p = 0,0014). No mesmo período, o grupo ML/CSH mostrou uma elevação de JNK em comparação com NaCl e SHAM (em ambos, p < 0,0001) (**Figura 13M_A**). A expressão de JNK não apresentou alterações estatisticamente significativas entre os grupos avaliados em 28 dpi (**Figura 13M_B**). No entanto, em 90 dpi foi verificada maior expressão de JNK no grupo ML em relação a NaCl (p= 0,0221) (**Figura 13M_C**).

Na avaliação intragrupos, em diferentes pontos de tempo experimental, no grupo CSH notou-se maior expressão de JNK em 3 dpi em comparação a 28 dpi (p = 0,0119). No grupo ML, a expressão de JNK foi significantemente superior em 90 dpi em relação a 28 dpi (p = 0,0123). O grupo ML/CSH em 3 dpi, exibiu valores de JNK superiores aos demais tempos experimentais, 28 dpi e 90 dpi (p = 0,0004; p < 0,0001). No grupo SHAM, a expressão de JNK foi inferior em 3 dpi, quando comparada a 28 dpi e 90 dpi (p = 0,0004; p = 0,0339) (**Figura 13M_D**).

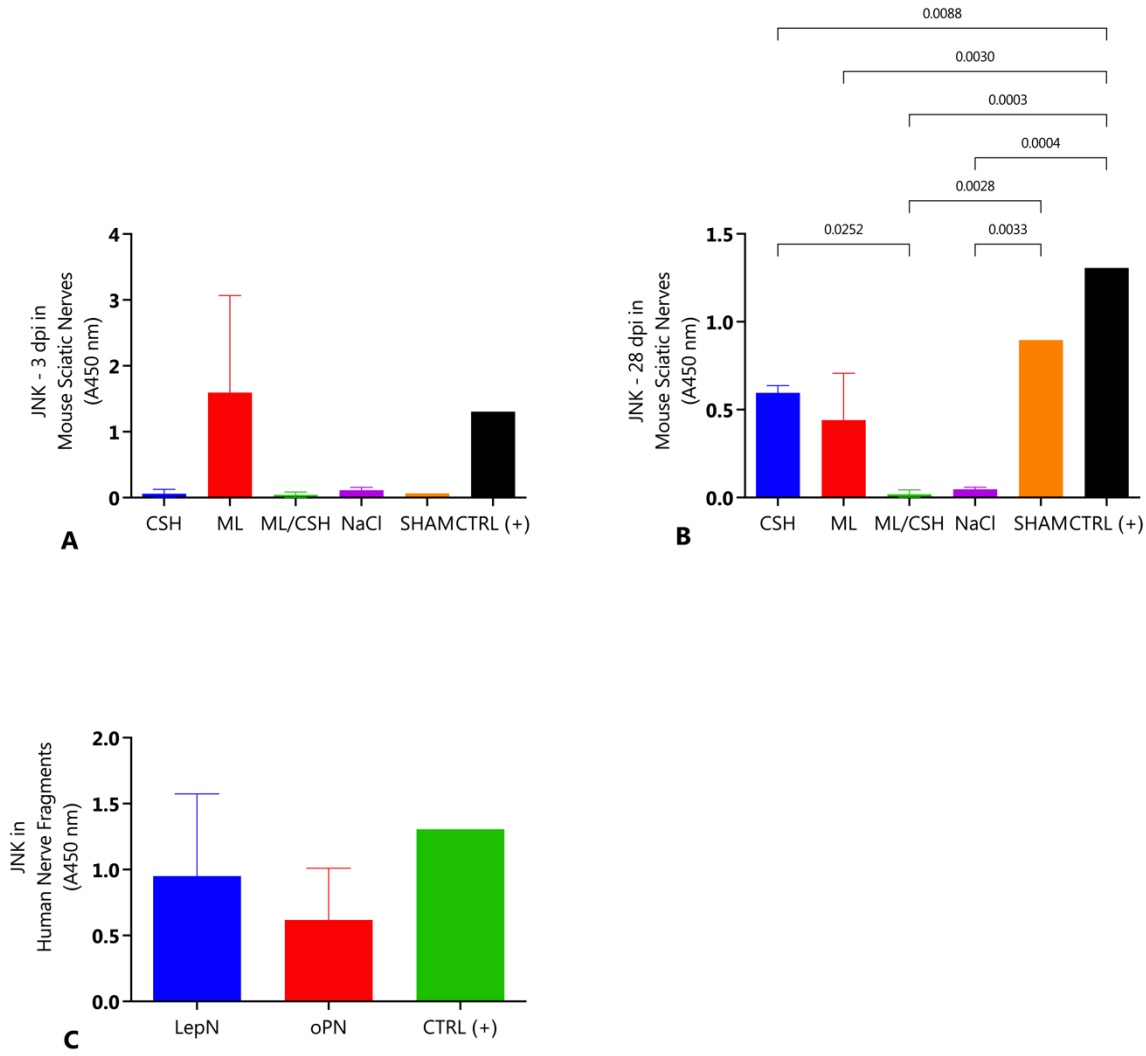


Figura 11M. Determinação de JNK em ensaio InstantOne ELISA™. Avaliação conforme períodos experimentais de, (**A**) 03 e (**B**) 28 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (**C**) Avaliação entre espécimes humanos com neuropatia hansênica (LepN) e outras neuropatias periféricas (oPN). Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (**A, B**) ou Tukey (**C**). Valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, exceto as do grupo SHAM

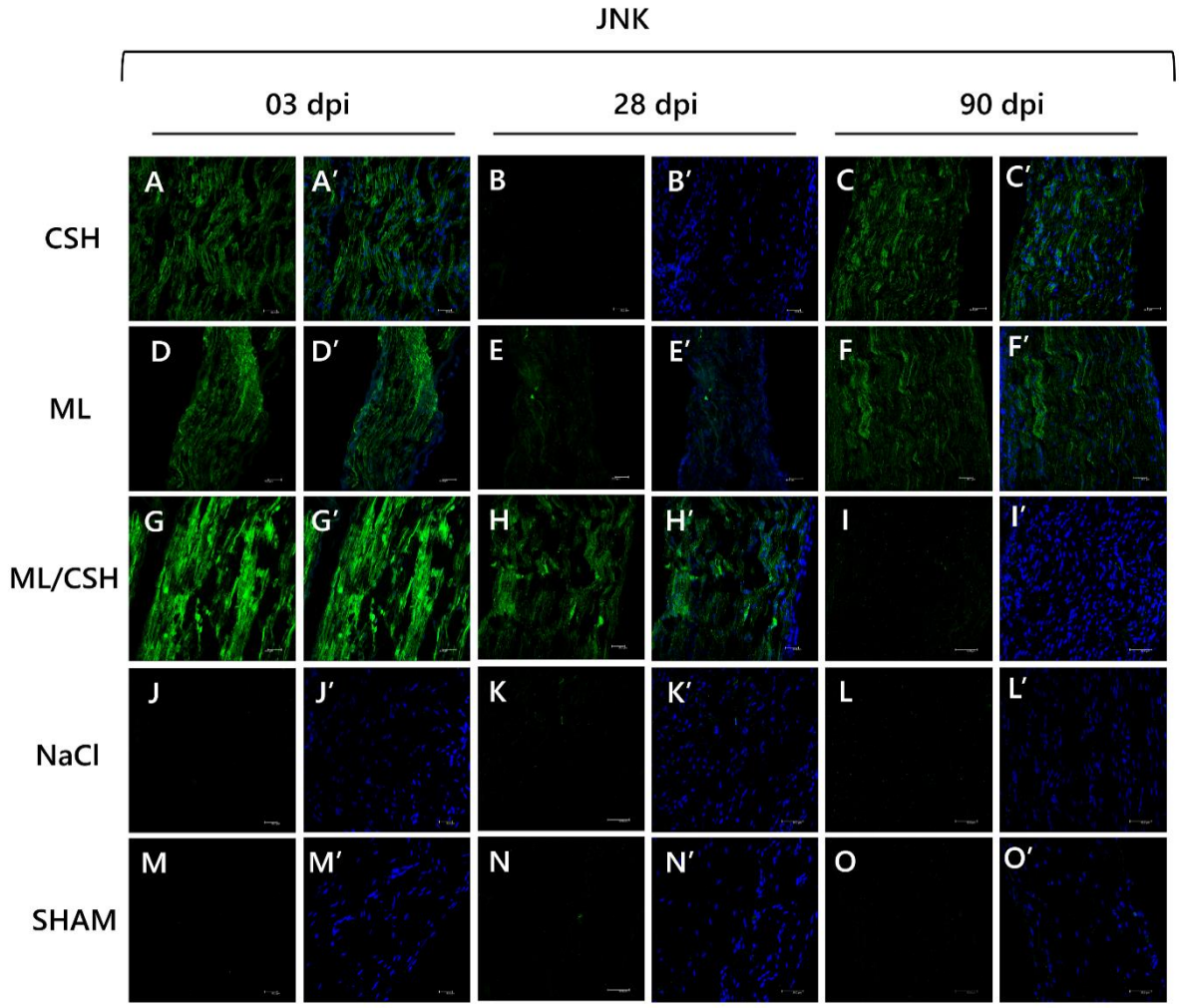


Figura 12M. Imunodetecção de JNK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (**A-C'**) Lesão por esmagamento (CSH); (**D-F'**) Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (**G-I'**) ML/CSH; (**J-L'**) Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (**M-O'**) Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

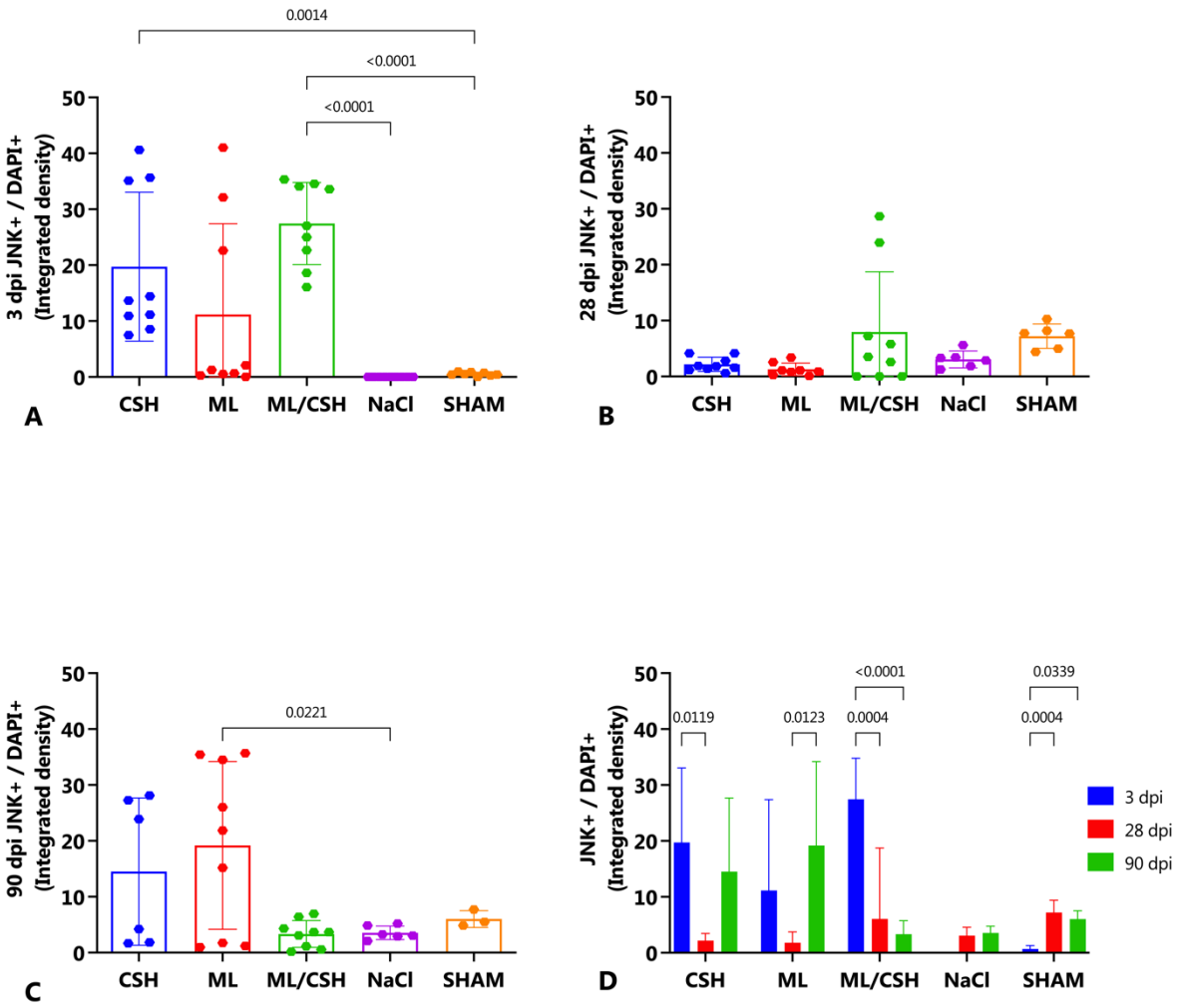


Figura 13M. Avaliação de JNK em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de JNK, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (**A**) 03, (**B**) 28 e (**C**) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (**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 dois a três animais/grupo/período

Regulação de c-Jun Nervos Periféricos Humanos e Modelo Murino de Dano Neural

O fator de transcrição c-Jun, associado à via JNK, foi investigado nos camundongos *nude* por técnica de imunofluorescência (**Figuras 14M e 15M**). A análise

da densidade integrada de fluorescência nos camundongos *nude* indicou que, em 3 dpi a expressão de c-Jun foi significativamente maior no grupo CSH comparado a SHAM ($p = 0,0008$), da mesma foram que alterações entre os grupos ML e NaCl ($p = 0,0002$) foram observadas. Ainda em 3 dpi, notou-se maior expressão de c-Jun no grupo ML/CSH em relação a NaCl ($p < 0,0001$) e a SHAM ($p < 0,0001$) (**Figura 15M_A**).

Em 28 dpi, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na detecção de c-Jun entre os grupos experimentais (**Figura 15M_B**). Aos 90 dpi, observou-se novamente alterações de c-Jun entre os grupos ML e NaCl ($p = 0,0283$) (**Figura 15M_C**). Individualmente, o grupo CSH apresentou maior expressão de c-Jun em 3 dpi em comparação a 28 dpi ($p = 0,0014$) e a 90 dpi ($p = 0,0309$). No grupo ML, a expressão de c-Jun foi significativamente maior em 90 dpi em relação a 28 dpi ($p = 0,0223$). O perfil de expressão de c-Jun no grupo ML/CSH mostrou ser mais alto em 3 dpi, comparado a 90 dpi ($p = 0,0008$) (**Figura 15M_D**).

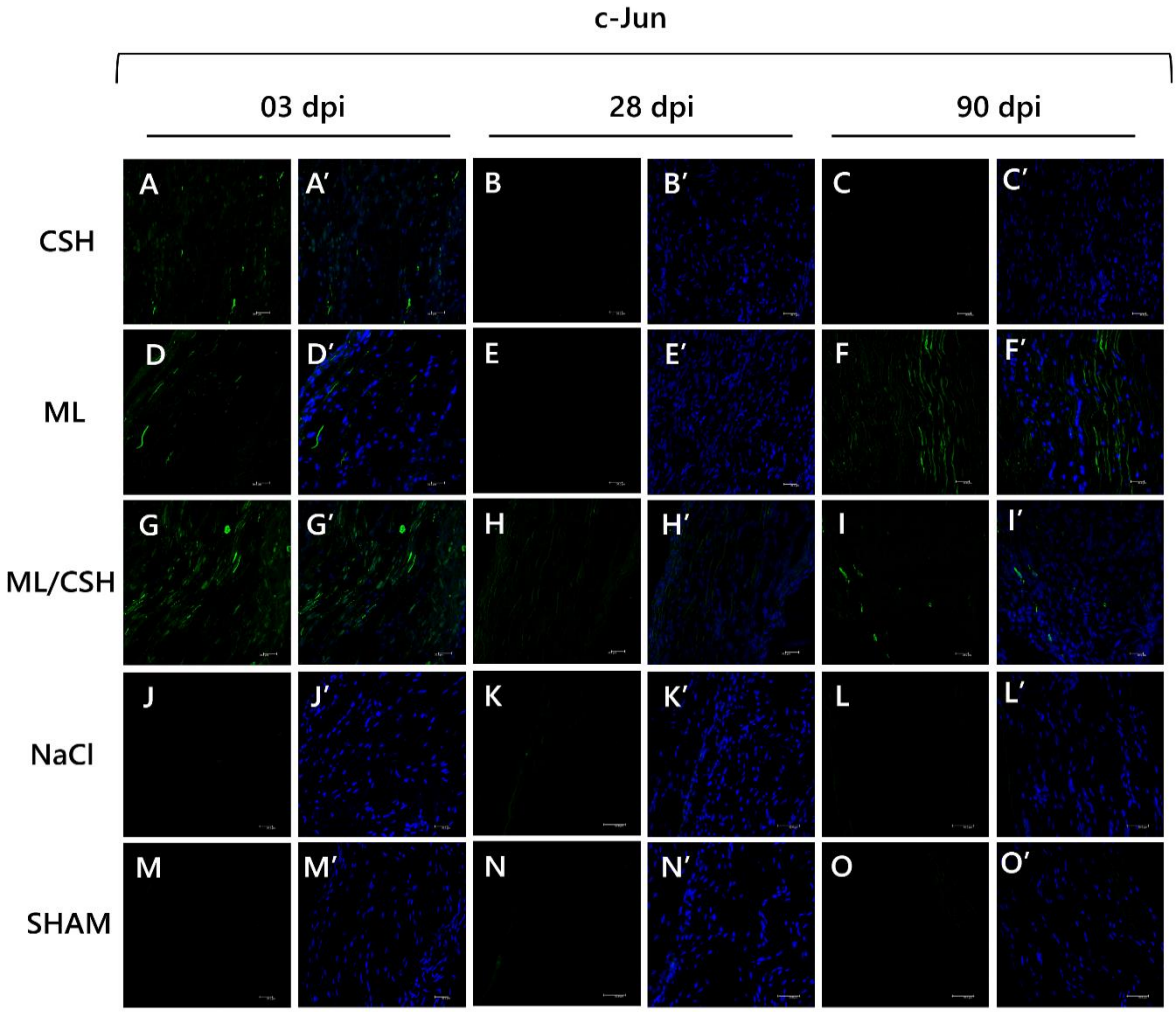


Figura 14M. Imunodetecção de c-Jun em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. (**A-C'**) Lesão por esmagamento (CSH); (**D-F'**) Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); (**G-I'**) ML/CSH; (**J-L'**) Injeção de cloreto de sódio (NaCl); (**M-O'**) Cirurgia simulada (SHAM). Períodos experimentais: 03, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi). Imagens representativas de dois a três animais/grupo/período. Barras de escala: 15 µm (A: 400x)

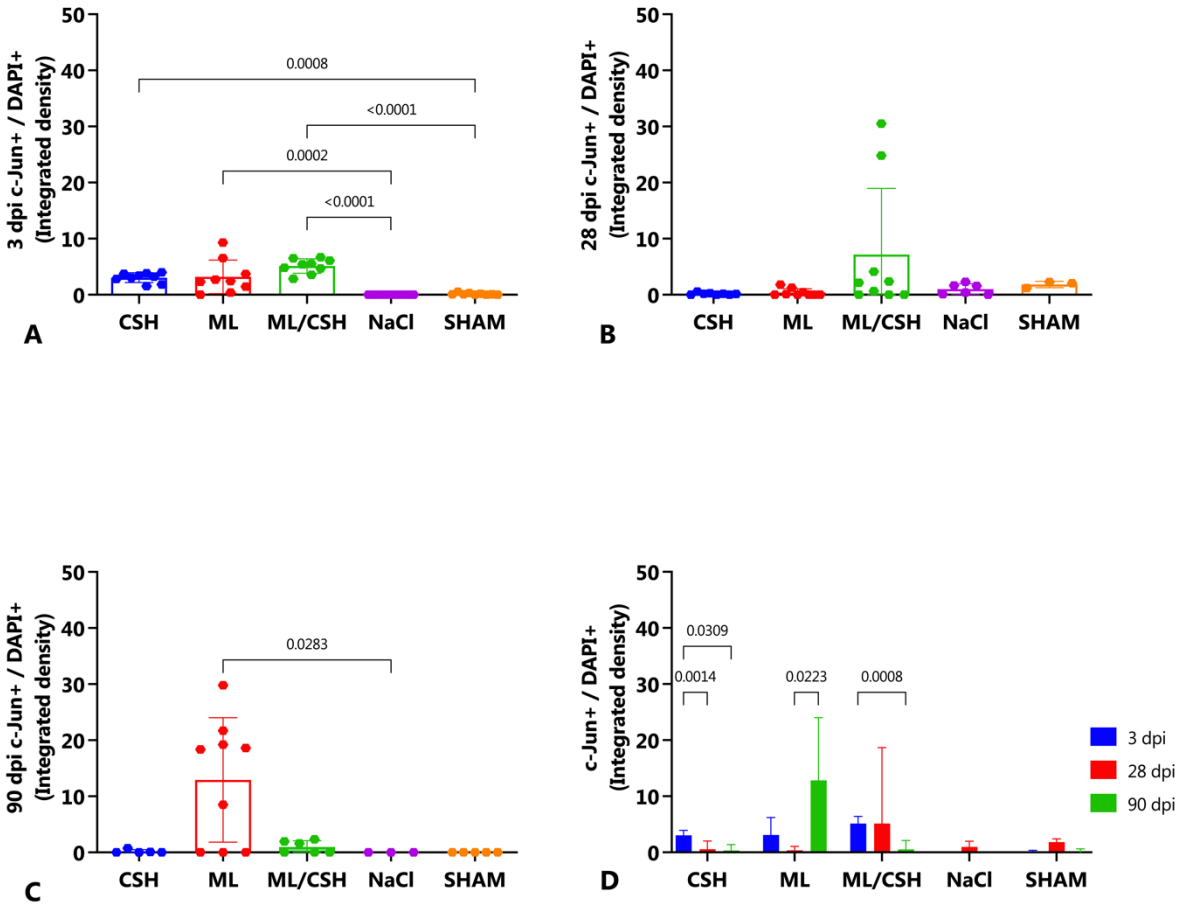


Figura 15M. Avaliação de c-Jun em nervos isquiáticos de camundongos *nude*. Densidade de fluorescência de c-Jun, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (**A**) 03, (**B**) 28 e (**C**) 90 dias pós-intervenção (dpi), nos grupos: Lesão por esmagamento (CSH); Inoculação endoneural por *M. leprae* (ML); ML/CSH; Injeção de cloreto de sódio (NaCl); Cirurgia simulada (SHAM). (**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 dois a três animais/grupo/período

DISCUSSÃO

As neuropatias periféricas, podem ter diversas causas e impactar significativamente a qualidade de vida dos indivíduos. Este estudo teve como objetivo investigar o papel das MAPKs e do fator de transcrição c-Jun na infecção por *M. leprae* e na neuropatia hansênica, analisando seus perfis de expressão proteica em nervos periféricos humanos e murinos. O estudo incluiu levantamento epidemiológico e a coleta de fragmentos de nervos de indivíduos com neuropatia periférica em um centro de referência em dermatologia sanitária do Estado de São Paulo. Foram comparados dois modelos de lesão neural em camundongos e foram avaliadas as funções, motora e nociceptiva. A expressão proteica das principais MAPKs (ERK1/2, p38α MAPK, JNK) e do c-Jun foi examinada por meio de diferentes abordagens, em modelos murinos e em nervos periféricos de pacientes com hanseníase. Buscamos neste estudo, obter uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à neuropatia hansênica.

Nos concentramos inicialmente na caracterização do perfil sociodemográfico e clínico de pessoas diagnosticadas com neuropatia periférica associada à hanseníase (LepN) e outras formas de neuropatia periférica (oPN). Investigamos também a expressão proteica de marcadores-alvo em amostras de nervos, obtidas de pacientes e de um modelo murino de lesão do nervo isquiático a fim de identificar potenciais implicações clínicas associadas a esses marcadores.

A análise dos dados sociodemográficos revelou padrões interessantes dentro do grupo LepN. A maioria das pessoas com neuropatia periférica associada à hanseníase tinha menos de 60 anos, representando 73,59% dos casos, em comparação com apenas 26,41% de pessoas com 60 anos ou mais. No grupo de LepN, observou-se maior prevalência do sexo masculino (73,59%) em relação ao sexo feminino (26,41%). Em relação à raça/cor, indivíduos de raça/cor branca representaram a maioria, correspondendo a 86,79% dos casos. Em termos de educação formal, a

maioria das pessoas com LepN relatou educação primária incompleta, representando 22,64% dos casos.

Tais achados se alinham com o estudo transversal conduzido por Silva et al. (2023) em uma área endêmica do Nordeste do Brasil (Silva et al., 2023). Os autores investigaram a prevalência de dor neuropática em uma casuística composta por 122 indivíduos com hanseníase. A análise dos dados sociodemográficos desses participantes revelou idade mediana de 51 anos, sendo 50,8% do sexo masculino. Quanto à escolaridade, a maioria havia concluído o ensino fundamental, o que diverge dos nossos resultados, provavelmente devido à ausência em nosso estudo de informações adicionais, em praticamente 50% dos indivíduos. Também observamos discrepâncias em relação à etnia, ao verificarmos que 62,20% da casuística de Silva et al. (2023), correspondeu a indivíduos autodeclarados pardos (Silva et al., 2023). Nossos resultados sobre a prevalência de neuropatia hansênica em indivíduos com idade inferior a 60 anos, e do sexo masculino, também corroboram um estudo descritivo conduzido por Trujillo-Ramirez et al. (2021), que avaliaram retrospectivamente uma população com hanseníase em um centro de referência de Bogotá, Colômbia (Trujillo-Ramirez et al., 2021). Essa convergência de dados sociodemográficos em estudos de diferentes regiões, reforça nossos achados.

No grupo com oPN, as características sociodemográficas diferiram um pouco. Embora a maioria também tivesse menos de 60 anos (53,33%), observou-se uma proporção maior de pessoas com 60 anos ou mais em comparação com o grupo de LepN (46,67%). Da mesma forma, houve uma maior prevalência de homens (71,11%) em comparação com mulheres (28,89%). Em termos de raça/cor, a maioria das pessoas era branca (86,66%), do mesmo modo que nos casos LepN. Os dados sobre educação não mostraram distribuição diversa, sendo a proporção maior de indivíduos com educação primária incompleta (20%). Sabe-se que as neuropatias periféricas apresentam prevalência de 1 a 12% em todas as faixas etárias, podendo alcançar até

30% entre os idosos (Hanewinckel et al., 2016). No entanto, os indicativos reais de neuropatia em idosos podem ser significativamente maiores do que sugerido na literatura (Beghi, Monticelli, 1998; Bouche et al., 2020). De fato, é importante ressaltar a escassez de estudos que abordem de maneira específica os perfis sociodemográficos de indivíduos acometidos por neuropatias periféricas.

A caracterização clínica de nossa casuística revelou diferenças quanto aos graus de incapacidade física entre os grupos de LepN e oPN. Em pessoas com LepN, um percentual maior apresentava grau 2 de incapacidade (G2D, 75,47%), seguido por grau 1 de incapacidade (G1D, 22,64%) e apenas uma pessoa (1,88%) não apresentava incapacidade. No grupo de oPN, G2D também predominou (51,11%), seguido por G1D (28,88%), e uma proporção menor não apresentou incapacidade (11,11%). Foi encontrada uma associação estatisticamente significante entre o grau de incapacidade física e o tipo de neuropatia (LepN vs. oPN), indicando que a neuropatia associada à hanseníase pode levar a incapacidades mais graves (WHO, 2022). O grau de incapacidade representa um indicador epidemiológico e operacional chave no controle da hanseníase. Particularmente no Brasil, foi constatada alta proporção de indivíduos com G2D, tanto no momento do diagnóstico (Souza et al., 2019; de Oliveira et al., 2021), quanto após a conclusão da PQT (Haefner et al., 2017; Serrano-Coll et al., 2018; Raposo et al., 2018). Os altos índices de G2D aqui apresentados possivelmente decorrem do atraso no diagnostico em regiões onde a hanseníase é frequentemente subnotificada (de Oliveira et al., 2021). Isso reforça a necessidade de uma vigilância mais abrangente e ações efetivas de conscientização para garantir que a hanseníase seja prontamente identificada e tratada, evitando assim o agravamento das incapacidades associadas à doença.

Casos de neuropatia periférica com sinais clínicos evidentes de espessamento neural sugerem diagnóstico de hanseníase (Santos et al., 2017). Em nossa casuística, investigamos a frequência de espessamento neural e verificamos maior associação nos

indivíduos do grupo LepN (79,24%) do que no grupo oPN (51,11%). Embora esse sinal clínico esteja presente nas demais categorias de neuropatia periférica, sabe-se que indivíduos com neuropatia hansênica exibem padrões específicos de espessamento, particularmente no nervo ulnar (Frade et al., 2013; Bathala et al., 2017). Estudos prévios verificaram que o espessamento neural na hanseníase está presente entre 45,5% e 90% dos casos em regiões de alta endemicidade (Lugão et al., 2015; Bathala et al., 2017; Raposo et al., 2018). A fibrose costuma ser um achado frequente nos indivíduos com hanseníase e nossos achados corroboram esse entendimento (Zhao et al., 2021; Naafs et al., 2022; Voltan et al., 2022).

Nossos resultados sobre a frequência de envolvimento funcional revelaram que a mononeuropatia múltipla prevaleceu no grupo LepN (79,24%). Em relação ao tipo de fibra nervosa afetada no grupo LepN, a neuropatia mista foi mais comum (86,80%), seguida pela neuropatia sensitiva (5,66%) e neuropatia motora (5,66%). A literatura confirma que o padrão de envolvimento funcional mais observado em indivíduos com hanseníase é caracterizado por alterações axonais sensitivo-motoras em múltiplos nervos, manifestando-se de maneira assimétrica (Smith et al., 2015; Jardim et al., 2015; Vijayan et al., 2021). A neuropatia hansênica também apresenta a característica de áreas corporais mais frias serem mais afetadas, provavelmente devido à predileção de *M. leprae* por essas áreas (Garbino et al., 2016).

No grupo oPN, a mononeuropatia (33,33%) e a mononeuropatia múltipla (33,33%) foram igualmente representadas, seguidas pela polineuropatia (28,88%). No grupo oPN a neuropatia mista também foi predominante (71,11%), enquanto a neuropatia sensitiva (13,33%) e a neuropatia motora (2,22%) foram menos comuns. Embora tenha sido possível estimarmos a frequência dos padrões de envolvimento neural nos casos estudados, as etiologias do grupo oPN permaneceram, em sua maioria, pouco esclarecidas. Nossos dados indicam que a frequência relativa (%) de

mononeuropatia múltipla associada à hanseníase foi superior às demais formas de neuropatia periférica estudadas.

Identificar fatores de risco associados à neuropatia periférica é crucial para entender suas características subjacentes. Em nosso estudo, no grupo LepN 16,98% dos casos também apresentaram comorbidades como diabetes, 3,77% estavam em tratamento para HIV e 1,88% dos casos foram relacionados a exposição prolongada a pesticidas. No grupo oPN, o diabetes representou 11,11% dos casos, o consumo excessivo de álcool 4,44% e outras condições, como Polineuropatia Inflamatória Desmielinizante Crônica, Lúpus Eritematoso Sistêmico e Síndrome de Charcot-Marie-Tooth, somavam 6,66% dos casos. É importante ressaltar que 64,44% dos casos oPN apresentava fatores de risco não especificados, indicando a necessidade de investigação adicional. Estudos prévios indicam que, de fato a prevalência de neuropatia idiopática pode exceder 50% (Singer et al., 2012; Farhad et al., 2016).

Após a caracterização do perfil sociodemográfico de indivíduos com e sem neuropatia hansênica (LepN e oPN), buscamos revalidar o estudo de Gonçalves (2023), comparando dois modelos murinos de dano neural, por trauma de esmagamento e infecção por *M. leprae*, utilizando o índice funcional do nervo isquiático (SFI) para avaliar a função motora e analgesímetro eletrônico Von Frey, para avaliar a função nociceptiva em resposta a estímulos mecânicos.

O SFI é comumente utilizado para avaliar déficits funcionais e o grau de comprometimento motor. Valores de SFI entre 10 e -10 são considerados normais, enquanto valores abaixo de -100 indicam perda completa da função motora, e valores entre -100 e -10 indicam comprometimento parcial da função motora (Sarikcioglu et al., 2009; Amniattalab, Mohammadi, 2017). Em nosso estudo, os déficits funcionais foram avaliados em todos os grupos experimentais antes da intervenção (pré-intervenção, pi) e nos dias 3, 14, 28 e 90 após a intervenção (dpi).

Em 3 dpi, os valores médios de SFI variaram de -91,639 (CSH) a -3,195 (SHAM), com diferenças estatisticamente significantes nos grupos CSH e ML/CSH em comparação ao controle SHAM, indicando principalmente o impacto sobre a função motora após indução de trauma. Em 14 dpi, observou-se diminuição dos valores de SFI em relação a 3 dpi, que variaram de -35,307 (CSH) a -3,785 (SHAM). Assim como o período anterior, em 14 dpi os grupos CSH e ML/CSH mostraram diferenças estatisticamente significantes, comparados a SHAM.

Em 28 dpi, os valores médios de SFI variaram de -10,337 (NaCl) a -1,325 (ML), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No último tempo experimental, 90 dpi, os valores de SFI se mantiveram entre -16,263 (ML) e 2,523 (SHAM); com diferenças significativas entre o grupo ML e NaCl, bem como entre ML/CSH e SHAM. Esses achados sobre SFI são coerentes com o perfil de recuperação funcional verificado em estudos anteriores, adotando modelo murino de lesão neural por esmagamento (Dinh et al., 2009; van Neerven et al., 2012; Haidar et al., 2020; Wei et al., 2022).

Paralelamente à avaliação de função motora, esse estudo investigou a função nociceptiva dos animais por meio da determinação do limiar de retirada de pata (PWT), utilizando analgesímetro eletrônico Von Frey. No início do experimento (período pi), os valores médios variaram de 1,055 g (ML) a 1,531 g (CSH). Em 3 dpi, os valores médios diminuíram para uma faixa entre 0,388 g (ML) e 0,586 g (SHAM). Em 14 dpi, observou-se indicativos de recuperação nociceptiva, com PWT entre 0,886 g (ML) e 1,023 g (SHAM); uma tendência também observada em 28 dpi, com PWT entre 0,925 g (SHAM) a 1,281 g (ML/CSH). Alguns resultados declinaram em 90 dpi, particularmente no grupo ML/CSH, que apresentou médias de PWT na faixa de 0,543 g, com valores menores do que o controle NaCl, o que poderia ser atribuído à maior sensibilidade associada ao aumento da carga bacilar e resposta inflamatória, durante a evolução da infecção.

Nossos dados funcionais corroboram resultados previamente apresentados por Gonçalves (2023), sugerindo que a dinâmica temporal da lesão neural via infecção direta por *M. leprae* evolui de modo semelhante ao modelo de esmagamento de nervo isquiático, ao menos nos primeiros 28 dias (Gonçalves, 2023). Esse paralelo entre os dois modelos de dano neural, pode contribuir para a compreensão de eventos precoces no desenvolvimento da neuropatia hansênica.

Seguindo-se à avaliação funcional, investigamos a expressão proteica das principais MAPKs (ERK1/2, p38α MAPK, JNK) e do fator de transcrição c-Jun, nos nervos isquiáticos de camundongos *nude* e em amostras frescas de nervos de pacientes com neuropatia periférica associada ou não à hanseníase. Apesar das alterações nas MAPKs ocorrerem em várias doenças humanas, os fatores que regulam a expressão dessas proteínas foram pouco explorados no contexto da hanseníase. Entre as diversas vias de sinalização celular, ERK1/2 desempenha um papel de extrema importância em uma variedade de processos biológicos (Pearson et al., 2001; revisado por Cargnello, Roux, 2011). Sabe-se que a ativação dessa cascata em resposta a estímulos extracelulares requer fosforilação mediada pela via canônica, Ras/Raf/MEK (McKay, Morrison, 2007; Jain et al., 2018).

Em nosso estudo, utilizamos inicialmente o ensaio ELISA InstantOne™ para comparar a expressão de ERK1/2, p38α MAPK, JNK frente à infecção por *M. leprae*. Nossas observações indicaram que em 3 dias pós-infecção (dpi), os camundongos infectados com *M. leprae* (ML) apresentaram níveis significativamente elevados de ERK1/2 em comparação com os grupos CSH, ML/CSH, e com o controle tratado com NaCl. Ao estender a análise para 28 dpi, o grupo ML/CSH mostrou níveis mais altos de ERK1/2 em comparação com ML e NaCl. Esses resultados foram parcialmente corroborados pela técnica de imunofluorescência para detecção *in situ* de ERK1/2. Em 3 dpi, observamos maior expressão de ERK1/2 no grupo ML/CSH em comparação ao

controle NaCl. No entanto, em 28 dpi e 90 dpi, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Esse perfil de ativação precoce de ERK1/2, em espécimes infectados por *M. leprae* e/ou com lesão por esmagamento, também foi observado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Tapinos et al., 2006; Rambukkana et al., 2010; Cervellini et al., 2018).

Tapinos e Rambukkana (2005) afirmam que *M. leprae* ativa uma rota de sinalização não canônica da via ERK1/2 para promover sua sobrevivência e disseminação (Tapinos, Rambukkana, 2005). Os autores demonstraram esse mecanismo alternativo de ativação de ERK1/2 em células de Schwann (SCs) primárias humanas, após 30 dias de infecção. Nossos dados *in vivo*, demonstraram a ativação de ERK1/2 apenas no período experimental subagudo (3 dpi) de infecção intraneural por *M. leprae*. Adicionalmente, observamos em espécimes humanos com outras formas de neuropatia periférica (oPN) que os níveis de ERK1/2 foram elevados em comparação com as amostras de neuropatia hansênica (LepN). A despeito de nossos achados em experimentação animal não corroborarem Tapinos e Rambukkana (2005), não descartamos a possibilidade de *M. leprae* continuar impactando funcionalmente os nervos periféricos por meio da ativação das demais MAPKs clássicas, visto que observamos diferenças significativas no índice funcional dos animais infectados em 14 dpi.

O papel das demais MAPKs também foi explorado em modelos animais de neuropatia periférica (Notterpek, Tolwani, 1999; Höke, 2012). Em um estudo realizado por Li et al. (2015), a ativação de ERK1/2 e p38 MAPK foi investigada em gânglios de raiz dorsal e medula espinhal em um modelo murino de neuropatia periférica induzida por quimioterapia (NPIQ). Os achados de Li et al. (2015) revelaram aumento na expressão das vias ERK1/2 e p38 MAPK e corroboram com pesquisas anteriores (Boyette-Davis et al., 2015; Janes et al., 2014; Zhang, Dougherty, 2014; Li et al., 2015).

A regulação positiva de p38α MAPK em nervos periféricos infectados por *M. leprae* ainda é muito pouco explorada e nossos resultados, indicaram elevação estatisticamente significante de p38α MAPK no grupo ML em relação ao NaCl, em 28 dpi, corroborando parcialmente os achados de Souza et al. (2022). Os autores em questão investigaram o perfil de expressão gênica associado ao dano neural nos estágios iniciais de infeção por *M. leprae*, verificando elevação de p38α MAPK em fragmentos de nervos humanos de indivíduos com hanseníase neural primária, e em SCs humanas infectadas (de Souza et al., 2022).

Em nosso estudo, apesar do ensaio ELISA InstantOne™ ter indicado que p38α MAPK se elevou no grupo ML em relação a NaCl, esse mesmo marcador quando avaliado no grupo CSH, foi superior a todos os demais (ML, ML/CSH e SHAM). A detecção de p38α MAPK por imunofluorescência no período 3 dpi, foi somente maior no grupo ML/CSH comparado a NaCl. Esses achados sugerem que uma lesão traumática pode desencadear uma ativação mais pronunciada dessa via de sinalização quando comparada à infecção por *M. leprae*. Tal fenômeno poderia ser atribuído à natureza crônica da infecção?

O papel de p38 MAPK no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática após lesão nos nervos periféricos recebeu destaque em alguns estudos nas últimas décadas (Hains, Waxman, 2006; Wen et al., 2007; Chen et al., 2016; Hausott, Klimaschewski, 2019). Huang et al. (2022), verificaram ativação persistente de p38 MAPK na medula espinhal, utilizando um modelo de esmagamento do nervo isquiático. Os autores argumentam que não está totalmente esclarecido em que tipo de célula p38 MAPK é ativado para desencadear eventos relacionados à dor crônica (Huang et al., 2022). A dor neuropática pode estar presente em doenças infecciosas e inflamatórias dos nervos periféricos (Woolf, Mannion, 1999; Dworkin et al., 2003; Ji, Strichartz, 2004; Raicher et al., 2018). Considerando que na hanseníase a dor neuropática apresenta alta prevalência e pode manifestar-se até mesmo após a cura

bacteriológica, seria interessante determinar qual o envolvimento de p38 MAPK no cenário da dor na neuropatia hansênica.

JNK é a terceira via MAPK investigada no presente estudo. Sua importância tem sido explorada em estudos sobre desenvolvimento e dano neural (Parkinson et al., 2008; Lee et al., 2014; Nocera, Jacob, 2020). Nossos resultados de ELISA InstantOne™ não indicaram diferenças estatisticamente significantes em 3 dpi, porém, em 28 dpi observamos que o grupo CSH apresentou maior ativação de JNK, em comparação com ML/CSH, sugerindo que uma lesão por trauma parece prolongar a ativação dessa via, se comparada a lesões geradas pela inoculação por *M. leprae*. Na análise por imunofluorescência em 3 dpi, o grupo CSH demonstrou maior ativação de JNK do que o controle SHAM. Do mesmo modo, ML/CSH exibiu valores superiores a NaCl e SHAM. Em 90 dpi o grupo ML demonstrou elevação estatisticamente significante de JNK em relação a NaCl, sugerindo que *M. leprae* promova a ativação sustentada de JNK em períodos experimentais subcrônicos.

O fator de transcrição c-Jun é ativado precocemente após uma lesão neural (Hutton et al., 2011; Fontana et al., 2012; Arthur-Farraj et al., 2012; Gomez-Sanchez et al., 2015; Wilcox et al., 2020, 2021). Na infecção por *M. leprae*, seu papel permanece incerto. Nossa avaliação de c-Jun por imunofluorescência revelou diferenças significativas em 3 dpi, no grupo ML e ML/CSH em comparação aos seus respectivos controles (NaCl e SHAM). A elevação de c-Jun também foi verificada no grupo CSH em relação a SHAM nesse período inicial. Em 28 dpi, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, porém, em 90 dpi observamos diferenças na expressão de c-Jun entre ML e NaCl, espelhando os valores encontrados para JNK. O fator de transcrição c-Jun é crucial na indução e manutenção do fenótipo reparador das SCs após uma lesão neural (Parkinson et al., 2004, 2008; Arthur-Farraj et al., 2012, 2017) e nossos resultados de c-Jun no grupo CSH acompanham as constatações de Norrmén et al. (2018), que também utilizaram esse modelo

experimental para investigar fatores moleculares envolvidos na regeneração dos nervos periféricos (Norrmén et al., 2018). Os resultados obtidos neste estudo sugerem um papel importante das vias de sinalização ERK1/2, p38α MAPK, JNK, e do fator de transcrição c-Jun, na hanseníase e demais neuropatias periféricas. A regulação diferencial dessas vias de sinalização pode, ainda, estar relacionada à sobrevivência e progressão da infecção por *M. leprae* no sistema nervoso periférico.

Vale mencionar eventuais limitações em nosso estudo. A casuística de neuropatia periférica associada à hanseníase foi relativamente pequena, o que pode limitar a generalização dos resultados. O estudo investigou somente e expressão das MAPKs em nervos periféricos, mas outros tecidos e células envolvidos na resposta inflamatória também podem desempenhar um papel importante na patogênese da hanseníase. Será importante também estendermos nosso olhar para o papel de ERK1/2, p38α MAPK, JNK durante as reações hansênicas, que agravam o quadro de dano neural no contexto dessa doença.

Neste estudo, determinamos a participação de ERK1/2, p38α MAPK, JNK e c-Jun na infecção por *M. leprae*, buscando contribuir para a melhor compreensão de mecanismos celulares e moleculares relacionados à progressão do dano neural na hanseníase.

.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn JH, So SP, Kim NY, Kim HJ, Yoon SY, Kim DH. c-Jun N-terminal Kinase (JNK) induces phosphorylation of amyloid precursor protein (APP) at Thr668, in okadaic acid-induced neurodegeneration. BMB Rep. 2016 Jul;49(7):376-81. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.7.246.
- Alhindi A, Boehm I, Forsythe RO, Miller J, Skipworth RJE, Simpson H, Jones RA, Gillingwater TH. Terminal Schwann cells at the human neuromuscular junction. Brain Commun. 2021 Apr 15;3(2): fcab081. doi: 10.1093/braincomms/fcab081.
- 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. doi: 10.1007/s00439-008-0474-z.
- Amniattalab A, Mohammadi R. Functional, Histopathological and Immunohistichemical Assessments of Cyclosporine A on Sciatic Nerve Regeneration Using Allografts: A Rat Sciatic Nerve Model. Bull Emerg Trauma. 2017 Jul;5(3):152-159.
- Antoniou X, Falconi M, Di Marino D, Borsello T. JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. J Alzheimers Dis. 2011;24(4):633-42. doi: 10.3233/JAD-2011-091567.
- 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. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.021.
- Arthur-Farraj PJ, Morgan CC, Adamowicz M, Gomez-Sanchez JA, Fazal SV, Beucher A, et al. Changes in the Coding and Non-coding Transcriptome and DNA Methylome that Define the Schwann Cell Repair Phenotype after Nerve Injury. Cell Rep. 2017 Sep 12;20(11):2719-2734. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.064.
- Balakrishnan A, Belfiore L, Chu TH, Fleming T, Midha R, Biernaskie J, et al. Insights into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair from

Studies of Development and Injury. Front Mol Neurosci. 2021 Jan 25; 13:608442. doi: 10.3389/fnmol.2020.608442.

- Barnett SC. Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? J Neurotrauma. 2004 Apr;21(4):375-82. doi: 10.1089/089771504323004520.
- Bathala L, N Krishnam V, Kumar HK, Neladimmanahally V, Nagaraju U, Kumar HM, et al. Extensive sonographic ulnar nerve enlargement above the medial epicondyle is a characteristic sign in Hansen's neuropathy. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jul 28;11(7):e0005766. doi: 10.1371/journal.pntd.0005766.
- Beghi E, Monticelli ML. Chronic symmetric symptomatic polyneuropathy in the elderly: a field screening investigation of risk factors for polyneuropathy in two Italian communities. Italian General Practitioner Study Group (IGPST). J Clin Epidemiol. 1998 Aug;51(8):697-702. doi: 10.1016/s0895-4356(98)00039-0.
- Boerboom A, Dion V, Chariot A, Franzen R. Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. Front Mol Neurosci. 2017 Feb 17; 10:38. doi: 10.3389/fnmol.2017.00038.
- Borah K, Girardi KDCV, Mendum TA, Lery LMS, Beste DJV, Lara FA, et al. Intracellular Mycobacterium leprae Utilizes Host Glucose as a Carbon Source in Schwann Cells. mBio. 2019 Dec 17;10(6):e02351-19. doi: 10.1128/mBio.02351-19.
- Bouche P. Neuropathy of the elderly. Rev Neurol (Paris). 2020 Nov;176(9):733-738. doi: 10.1016/j.neurol.2019.11.007.
- Boyette-Davis JA, Walters ET, Dougherty PM. Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. Pain Manag. 2015;5(4):285-96. doi: 10.2217/pmt.15.19.
- Brizzi KT, Lyons JL. Peripheral nervous system manifestations of infectious diseases. Neurohospitalist. 2014 Oct;4(4):230-40. doi: 10.1177/1941874414535215.
- Brügger LMO, dos Santos MML, Lara FA, Mietto BS. What happens when Schwann cells are exposed to Mycobacterium leprae - A systematic review. IBRO Neuroscience Reports. 2023 ; 15 : 11-16. doi.org/10.1016/j.ibneur.2023.05.009.

- Cabral N, de Figueiredo V, Gandini M, de Souza CF, Medeiros RA, Lery LMS, et al. Modulation of the Response to Mycobacterium leprae and Pathogenesis of Leprosy. Front Microbiol. 2022 Jun 2; 13:918009. doi: 10.3389/fmicb.2022.918009.
- Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev. 2011 Mar;75(1):50-83. doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- Casalenovo MB, Rosa PS, de Faria Bertoluci DF, Barbosa ASAA, Nascimento DCD, de 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 Apr;100(2):83-93. doi: 10.1111/iep.12309.
- Cervellini I, Galino J, Zhu N, Allen S, Birchmeier C, Bennett DL. Sustained MAPK/ERK Activation in Adult Schwann Cells Impairs Nerve Repair. J Neurosci. 2018 Jan 17;38(3):679-690. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2255-17.
- Chen NF, Chen WF, Sung CS, Lu CH, Chen CL, Hung HC, et al. Contributions of p38 and ERK to the antinociceptive effects of TGF-β1 in chronic constriction injury-induced neuropathic rats. J Headache Pain. 2016 Dec;17(1):72. doi: 10.1186/s10194-016-0665-2.
- Collins MP. The vasculitic neuropathies: an update. Curr Opin Neurol. 2012 Oct;25(5):573-85. doi: 10.1097/WCO.0b013e3283580432.
- de Freitas MR. Infectious neuropathy. Curr Opin Neurol. 2007 Oct;20(5):548-52. doi: 10.1097/WCO.0b013e32826fbca6.
- de Oliveira GL, Oliveira JF, Pescarini JM, Andrade RFS, Nery JS, Ichihara MY, Smeeth L, Brickley EB, Barreto ML, Penna GO, Penna MLF, Sanchez MN. Estimating underreporting of leprosy in Brazil using a Bayesian approach. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Aug 25;15(8):e0009700. doi: 10.1371/journal.pntd.0009700.
- de Souza BJ, Mendes MA, Sperandio da Silva GM, Sammarco-Rosa P, de Moraes MO, Jardim MR, et al. Gene Expression Profile of Mycobacterium leprae Contribution in the Pathology of Leprosy Neuropathy. Front Med (Lausanne). 2022 Apr 15; 9:861586. doi: 10.3389/fmed.2022.861586.

- Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. Oncogene. 2008 Oct 20;27(48):6245-51. doi: 10.1038/onc.2008.301.
- 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.
- Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, et al. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. Arch Neurol. 2003 Nov;60(11):1524-34. doi: 10.1001/archneur.60.11.1524.
- Ebenezer GJ, Scollard DM. Treatment and Evaluation Advances in Leprosy Neuropathy. Neurotherapeutics. 2021 Oct;18(4):2337-2350. doi: 10.1007/s13311-021-01153-z.
- Eggers R, Tannemaat MR, Ehlert EM, Verhaagen J. A spatio-temporal analysis of motoneuron survival, axonal regeneration and neurotrophic factor expression after lumbar ventral root avulsion and implantation. Exp Neurol. 2010 May;223(1):207-20. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.07.021.
- Farhad K, Traub R, Ruzhansky KM, Brannagan TH 3rd. Causes of neuropathy in patients referred as "idiopathic neuropathy". Muscle Nerve. 2016 Jun;53(6):856-61. doi: 10.1002/mus.24969.
- 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. doi: 10.1083/jcb.201205025.
- Frade MA, Nogueira-Barbosa MH, Lugão HB, Furini RB, Marques Júnior W, Foss NT. New sonographic measures of peripheral nerves: a tool for the diagnosis of peripheral nerve involvement in leprosy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 May;108(3):257–62. doi: 10.1590/S0074-02762013000300001.
- Fragoso G, Robertson J, Athlan E, Tam E, Almazan G, Mushynski WE. Inhibition of p38α mitogen-activated protein kinase interferes with cell shape changes and gene

expression associated with Schwann cell myelination. Exp Neurol. 2003 Sep;183(1):34-46. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00101-8.

- Gaesser JM, Fyffe-Maricich SL. Intracellular signaling pathway regulation of myelination and remyelination in the CNS. Exp Neurol. 2016 Sep;283(Pt B):501-11. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.03.008.
- Garbino JA, Heise CO, Marques W Jr. Assessing nerves in leprosy. Clin Dermatol. 2016 Jan-Feb;34(1):51-8. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.018.
- Goldstein B. Anatomy of the peripheral nervous system. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2001 May;12(2):207-36. doi: 10.1016/S1047-9651(18)30066-4.
- Gomez-Sanchez JA, Carty L, Iruarrizaga-Lejarreta M, Palomo-Irigoyen M, Varela-Rey M, Griffith M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves. J Cell Biol. 2015 Jul 6;210(1):153-68. doi: 10.1083/jcb.201503019.
- Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, et al. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. J Neurosci. 2017 Sep 13;37(37):9086-9099. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1453-17.2017.
- Gonçalves GAS. Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e Infecção por Mycobacterium leprae [Dissertação de Mestrado]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2023. 92 p.
- Grigoryan T, Birchmeier W. Molecular signaling mechanisms of axon-glia communication in the peripheral nervous system. Bioessays. 2015 May;37(5):502-13. doi: 10.1002/bies.201400172.
- Guo Y, Wu W, Yang X, Fu X. Dedifferentiation and in vivo reprogramming of committed cells in wound repair (Review). Mol Med Rep. 2022 Dec;26(6):369. doi: 10.3892/mmr.2022.12886.

- Haefner K, Walther F, Chichava OA, Ariza L, Alencar CH, de Alencar MJF, et al. High occurrence of disabilities caused by leprosy: census from a hyperendemic area in Brazil's savannah region. Leprosy Review. 2017; 88(4): 520-532. doi: 10.47276/lr.88.4.520.
- 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.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. J Neurosci. 2006 Apr 19;26(16):4308-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0003-06.2006.
- Hanani M, Spray DC. Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. Nat Rev Neurosci. 2020 Sep;21(9):485-498. doi: 10.1038/s41583-020-0333-z.
- Hanewinckel R, Ikram MA, Van Doorn PA. Peripheral neuropathies. Handb Clin Neurol. 2016; 138:263-82. doi: 10.1016/B978-0-12-802973-2.00015-X.
- Hausott B, Klimaschewski L. Promotion of Peripheral Nerve Regeneration by Stimulation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Pathway. Anat Rec (Hoboken). 2019 Aug;302(8):1261-1267. doi: 10.1002/ar.24126.
- Hess S, Rambukkana A. Cell Biology of Intracellular Adaptation of Mycobacterium leprae in the Peripheral Nervous System. Microbiol Spectr. 2019 Jul;7(4): 10.1128/microbiolspec.BAI-0020-2019.
- Höke A. Animal models of peripheral neuropathies. Neurotherapeutics. 2012 Apr;9(2):262-9. doi: 10.1007/s13311-012-0116-y.
- Hossain S, de la Cruz-Morcillo MA, Sanchez-Prieto R, Almazan G. Mitogen-activated protein kinase p38α regulates Krox-20 to direct Schwann cell differentiation and peripheral myelination. Glia. 2012 Jul;60(7):1130-44. doi: 10.1002/glia.22340.
- Howard AG 4th, Baker PA, Ibarra-García-Padilla R, Moore JA, Rivas LJ, et al. An atlas of neural crest lineages along the posterior developing zebrafish at single-cell resolution. Elife. 2021 Feb 16;10: e60005. doi: 10.7554/eLife.60005.

- Huang S, Chen Y, Jia Y, Yang T, Su W, Zhu Z, et al. Delayed inhibition of ERK and p38 attenuates neuropathic pain without affecting motor function recovery after peripheral nerve injury. Neuropharmacology. 2022 Jan 1;202:108835. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108835.
- Hutton EJ, Carty L, Laura M, Houlden H, Lunn MP, Brandner S, et al. c-Jun expression in human neuropathies: a pilot study. J Peripher Nerv Syst. 2011 Dec;16(4):295-303. doi: 10.1111/j.1529-8027.2011.00360. x.
- Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R. Role of ERK1/2 MAPK signaling in the maintenance of myelin and axonal integrity in the adult CNS. J Neurosci. 2014 Nov 26;34(48):16031-45. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3360-14.2014.
- Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R. ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. J Neurosci. 2012 Jun 27;32(26):8855-64. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0137-12.2012.
- Jain R, Watson U, Vasudevan L, Saini DK. ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. Int Rev Cell Mol Biol. 2018;338:79-109. doi: 10.1016/bs.ircmb.2018.02.003.
- Janes K, Little JW, Li C, Bryant L, Chen C, Chen Z, et al. The development and maintenance of paclitaxel-induced neuropathic pain require activation of the sphingosine 1-phosphate receptor subtype 1. J Biol Chem. 2014 Jul 25;289(30):21082-97. doi: 10.1074/jbc.M114.569574.
- Jardim MR, Vital R, Hacker MA, Nascimento M, Balassiano SL, Sarno EN, et al. Leprosy neuropathy evaluated by NCS is independent of the patient's infectious state. Clin Neurol Neurosurg. 2015 Apr; 131:5-10. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.01.008.
- Jessen KR, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. Glia. 2019 Mar;67(3):421-437. doi: 10.1002/glia.23532.

- 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. doi: 10.1101/cshperspect. a020487.
- Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. Glia. 2008 Nov 1;56(14):1552-1565. doi: 10.1002/glia.20761.
- Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. Nat Rev Neurosci. 2005 Sep;6(9):671-82. doi: 10.1038/nrn1746.
- Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. J Physiol. 2016 Jul 1;594(13):3521-31. doi: 10.1113/JP270874.
- Jessen KR, Mirsky R. The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. Front Cell Neurosci. 2019 Feb 11; 13:33. doi: 10.3389/fncel.2019.00033.
- Ji RR, Strichartz G. Cell signaling and the genesis of neuropathic pain. Sci STKE. 2004 Sep 21;2004(252):reE14. doi: 10.1126/stke.2522004re14.
- Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Feb;12(2):79-89. doi: 10.1038/nrm3043.
- Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. Physiol Meas. 2017 May;38(5): R89-R118. doi: 10.1088/1361-6579/aa6782.
- Kim J, Yang M, Kim SH, Kim JC, Wang H, Shin T, et al. Possible role of the glycogen synthase kinase-3 signaling pathway in trimethyltin-induced hippocampal neurodegeneration in mice. PLoS One. 2013 Aug 5;8(8): e70356. doi: 10.1371/journal.pone.0070356.
- Kollmer J, Bendszus M. Magnetic Resonance Neurography: Improved Diagnosis of Peripheral Neuropathies. Neurotherapeutics. 2021 Oct;18(4):2368-2383. doi: 10.1007/s13311-021-01166-8.
- Kubiak CA, Kung TA, Brown DL, Cederna PS, Kemp SWP. State-of-the-Art Techniques in Treating Peripheral Nerve Injury. Plast Reconstr Surg. 2018 Mar;141(3):702-710. doi: 10.1097/PRS.0000000000004121.

- 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.
- Laverdet B, Danigo A, Girard D, Magy L, Demiot C, Desmoulière A. Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. Histol Histopathol. 2015 Aug;30(8):875-92. doi: 10.14670/HH-11-610.
- Lee HJ, Shin YK, Park HT. Mitogen Activated Protein Kinase Family Proteins and c-jun Signaling in Injury-induced Schwann Cell Plasticity. Exp Neurobiol. 2014 Jun;23(2):130-7. doi: 10.5607/en.2014.23.2.130.
- Li Y, Zhang H, Kosturakis AK, Cassidy RM, Zhang H, Kennamer-Chapman RM, et al. MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy. Brain Behav Immun. 2015 Oct;49:255-66. doi: 10.1016/j.bbi.2015.06.003.
- Lockwood DN, Darlong J, Govindharaj P, Kurian R, Sundarrao P, John AS. AZALEP a randomized controlled trial of azathioprine to treat leprosy nerve damage and Type 1 reactions in India: main findings. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Mar 30;11(3):e0005348. doi: 10.1371/journal.pntd.0005348.
- Lugão HB, Nogueira-Barbosa MH, Marques W Jr, Foss NT, Frade MA. Asymmetric Nerve Enlargement: A Characteristic of Leprosy Neuropathy Demonstrated by Ultrasonography. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Dec 8;9(12):e0004276. doi: 10.1371/journal.pntd.0004276.
- Manassero G, Repetto IE, Cobianchi S, Valsecchi V, Bonny C, Rossi F, Vercelli A. Role of JNK isoforms in the development of neuropathic pain following sciatic nerve transection in the mouse. Mol Pain. 2012 May 22; 8:39. doi: 10.1186/1744-8069-8-39.
- Mao R, Wei Z, Li W, Zhu X, Du D, Xu W. Analysis of Influencing Factors of Repair Effect after Peripheral Nerve Injury. Comput Math Methods Med. 2021 Nov 23; 2021:8294267. doi: 10.1155/2021/8294267.

- Marques MA, Antonio 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. doi: 10.1099/0022-1317-50-1-23.
- Martini R, Fischer S, López-Vales R, David S. Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease. Glia. 2008 Nov 1;56(14):1566-1577. doi: 10.1002/glia.20766.
- Masaki T, McGlinchey A, Tomlinson SR, Qu J, Rambukkana A. Reprogramming diminishes retention of Mycobacterium leprae in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. F1000Res. 2013 Sep 25; 2:198. doi: 10.12688/f1000research.2-198.v3.
- McGregor CE, English AW. The Role of BDNF in Peripheral Nerve Regeneration: Activity-Dependent Treatments and Val66Met. Front Cell Neurosci. 2019 Jan 11; 12:522. doi: 10.3389/fncel.2018.00522.
- McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. Oncogene. 2007 May 14;26(22):3113-21. doi: 10.1038/sj.onc.1210394.
- Medeiros RC, Girardi KD, Cardoso FK, Mietto BS, Pinto TG, Gomez LS, et al. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by Mycobacterium leprae. J Biol Chem. 2016 Oct 7;291(41):21375-21387. doi: 10.1074/jbc.M116.725283.
- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. J Peripher Nerv Syst. 2008 Jun;13(2):122-35. doi: 10.1111/j.1529-8027.2008.00168. x.
- Naafs B, Nogueira MRS, Garbino JA. (2022). Peripheral Nerves in Leprosy. In: Nunzi, E., Massone, C., Portaels, F. (eds) Leprosy and Buruli Ulcer. Springer, Cham.
- Napoli I, Noon LA, Ribeiro S, Kerai AP, Parrinello S, Rosenberg LH, et al. A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo. Neuron. 2012 Feb 23;73(4):729-42. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.031.

- Newbern J, Birchmeier C. Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. Semin Cell Dev Biol. 2010 Dec;21(9):922-8. doi: 10.1016/j.semcdb.2010.08.008.
- Newbern JM. Molecular control of the neural crest and peripheral nervous system development. Curr Top Dev Biol. 2015; 111:201-31. doi: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.007.
- Nocera G, Jacob C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. Cell Mol Life Sci. 2020 Oct;77(20):3977-3989. doi:10.1007/s00018-020-03516-9.
- Noon LA, Lloyd AC. Hijacking the ERK signaling pathway: Mycobacterium leprae shuns MEK to drive the proliferation of infected Schwann cells. Sci STKE. 2005 Nov 8;2005(309):pe52. doi: 10.1126/stke.3092005pe52.
- Norrmén C, Figlia G, Pfistner P, Pereira JA, Bachofner S, Suter U. mTORC1 Is Transiently Reactivated in Injured Nerves to Promote c-Jun Elevation and Schwann Cell Dedifferentiation. J Neurosci. 2018 May 16;38(20):4811-4828. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3619-17.2018.
- Notterpek L, Tolwani RJ. Experimental models of peripheral neuropathies. Lab Anim Sci. 1999 Dec;49(6):588-99.
- 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. doi: 10.1083/jcb.200803013.
- 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. doi: 10.1083/jcb.200307132.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr Rev. 2001 Apr;22(2):153-83. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.

- Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. Tissue Barriers. 2013 Jul 1;1(3): e24956. doi: 10.4161/tisb.24956.
- Penna GO, Bührer-Sékula S, Kerr LRS, Stefani MMA, Rodrigues LC, de Araújo MG, et al. Uniform multidrug therapy for leprosy patients in Brazil (U-MDT/CT-BR): Results of an open label, randomized and controlled clinical trial, among multibacillary patients. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Jul 13;11(7):e0005725. doi: 10.1371/journal.pntd.0005725.
- Phelps CH. Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease: some selected comments. Prog Brain Res. 1990; 86:3-9. doi: 10.1016/s0079-6123(08)63162-3.
- Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. Front Immunol. 2017 Mar 13; 8:233. doi: 10.3389/fimmu.2017.00233.
- Raicher I, Stump PRNAG, Harnik SB, de Oliveira RA, Baccarelli R, Marciano LHSC, et al. Neuropathic pain in leprosy: symptom profile characterization and comparison with neuropathic pain of other etiologies. Pain Rep. 2018 Feb 23;3(2):e638. doi: 10.1097/PR9.0000000000000638.
- Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of Mycobacterium leprae mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. Cell. 1997 Mar 21;88(6):811-21. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81927-3.
- Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, et al. Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for Mycobacterium leprae. Science. 1998 Dec 11;282(5396):2076-9. doi: 10.1126/science.282.5396.2076.
- Rambukkana A. Usage of signaling in neurodegeneration and regeneration of peripheral nerves by leprosy bacteria. Prog Neurobiol. 2010 Jun;91(2):102-7. doi: 10.1016/j.pneurobio.2009.12.002.
- Raposo MT, Reis MC, Caminha AVQ, Heukelbach J, Parker LA, Pastor-Valero M, et al. Grade 2 disabilities in leprosy patients from Brazil: Need for follow-up after completion of multidrug therapy. PLoS Negl Trop Dis. 2018 Jul 16;12(7): e0006645. doi: 10.1371/journal.pntd.0006645.

- Reed CB, Feltri ML, Wilson ER. Peripheral glia diversity. J Anat. 2022 Nov;241(5):1219-1234. doi: 10.1111/joa.13484.
- Roberts SL, Dun XP, Dee G, Gray B, Mindos T, Parkinson DB. The role of p38 alpha in Schwann cells in regulating peripheral nerve myelination and repair. J Neurochem. 2017 Apr;141(1):37-47. doi: 10.1111/jnc.13929.
- Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. J Neuroinflammation. 2011 Aug 30; 8:109. doi: 10.1186/1742-2094-8-109.
- Santos DFD, Mendonça MR, Antunes DE, Sabino EFP, Pereira RC, Goulart LR, Goulart IMB. Revisiting primary neural leprosy: Clinical, serological, molecular, and neurophysiological aspects. PLoS Negl Trop Dis. 2017 Nov 27;11(11):e0006086. doi: 10.1371/journal.pntd.0006086.
- Sarikcioglu L, Demirel BM, Utuk A. Walking track analysis: an assessment method for functional recovery after sciatic nerve injury in the rat. Folia Morphol (Warsz). 2009 Feb;68(1):1-7.
- Scheib JL, Höke A. An attenuated immune response by Schwann cells and macrophages inhibits nerve regeneration in aged rats. Neurobiol Aging. 2016 Sep; 45:1-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.004.
- Serrano-Coll H, Cardona-Castro N. Neuropathic ulcers in leprosy: clinical features, diagnosis and treatment. J Wound Care. 2022 Jun 1;31(Sup6): S32-S40. doi: 10.12968/jowc.2022.31.Sup6.S32.
- Serrano-Coll H, Salazar-Peláez L, Acevedo-Saenz L, Cardona-Castro N. Mycobacterium leprae-induced nerve damage: direct and indirect mechanisms. Pathog Dis. 2018 Aug 1;76(6). doi: 10.1093/femspd/fty062.
- Silva SR, de Souza SN, Santana MFS, Domingos AM, Martins NDS, de Paula HL, et al. Assessment of neuropathic pain, functional activity limitation and quality of life of people affected by leprosy in an endemic area in Northeast Brazil: a cross-sectional study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2023 Jun 2;117(6):451-459. doi: 10.1093/trstmh/trac133.

- Singer MA, Vernino SA, Wolfe GI. Idiopathic neuropathy: new paradigms, new promise. J Peripher Nerv Syst. 2012 May;17 Suppl 2:43-9. doi: 10.1111/j.1529-8027.2012.00395.x.
- Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Apr 23;9(4):e0003658. doi: 10.1371/journal.pntd.0003658.
- Soares de Lima C, Zulianello L, Marques MA, Kim H, Portugal MI, Antunes SL, et al. 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. doi: 10.1016/j.micinf.2005.02.013.
- Souza CDF, Tavares DLC, Tavares CM, Almeida AGCDS, Accioly SMPDS, Paiva JPS, et al. Physical disabilities due to leprosy in Alagoas State, Northeast Brazil: a temporal and spatial modeling. Rev Soc Bras Med Trop. 2019 Jul 18;52:e20180540. doi: 10.1590/0037-8682-0540-2018.
- Stassart RM, Woodhoo A. Axo-glial interaction in the injured PNS. Dev Neurobiol. 2021 Jul;81(5):490-506. doi: 10.1002/dneu.22771.
- Sternini C. Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. J Investig Dermatol Symp Proc. 1997 Aug;2(1):1-7. doi: 10.1038/jidsymp.1997.2.
- Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, Suzuki K. Pathogenicity and virulence of Mycobacterium leprae. Virulence. 2022 Dec;13(1):1985-2011. doi: 10.1080/21505594.2022.2141987.
- Syed N, Reddy K, Yang DP, Taveggia C, Salzer JL, Maurel P, et al. Soluble neuregulin-1 has bifunctional, concentration-dependent effects on Schwann cell myelination. J Neurosci. 2010; 30:6122–6131. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1681-09.2010.
- Taal AT, Blok DJ, van Brakel WH, de Vlas SJ, Richardus JH. Number of people requiring post-exposure prophylaxis to end leprosy: A modeling study. PLoS Negl Trop Dis. 2021 Feb 25;15(2): e0009146. doi: 10.1371/journal.pntd.0009146.

- 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. doi: 10.1038/nm1433.
- 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.
- 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.
- Trujillo-Ramirez L, Palacios-Ariza MA, Pradilla I, Gamboa LA. Peripheral neuropathy in leprosy: Clinical manifestations and disability in a Colombian national referral center. Dermatol Reports. 2021 Aug 5;14(2):9308. doi: 10.4081/dr.2021.9308.
- 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.
- Vijayan BV, Dominic MR, Nair VCP. Leprous Neuropathy: Observational Study Highlighting the Role of Electrophysiology in Early Diagnosis. J Neurosci Rural Pract. 2021 Jul;12(3):530-534. doi: 10.1055/s-0041-1727575.
- Voltan G, Filho FB, Leite MN, De Paula NA, Santana JM, Silva CML, et al. Point-of-care ultrasound of peripheral nerves in the diagnosis of Hansen's disease neuropathy. Front Med (Lausanne). 2022 Sep 9;9:985252. doi: 10.3389/fmed.2022.985252.
- Waetzig V, Zhao Y, Herdegen T. The bright side of JNKs-Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. Prog Neurobiol. 2006 Oct;80(2):84-97. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.002.

- 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.
- Wen YR, Suter MR, Kawasaki Y, Huang J, Pertin M, Kohno T, et al. Nerve conduction blockade in the sciatic nerve prevents but does not reverse the activation of p38α mitogen-activated protein kinase in spinal microglia in the rat spared nerve injury model. Anesthesiology. 2007 Aug;107(2):312-21. doi: 10.1097/01.anes.0000270759.
- Wilcox MB, Jessen KR, Quick TJ, Phillips JB. The molecular profile of nerve repair: humans mirror rodents. Neural Regen Res. 2021 Jul;16(7):1440-1441. doi: 10.4103/1673-5374.301014.
- Wilcox MB, Laranjeira SG, Eriksson TM, et al. Characterising cellular and molecular features of human peripheral nerve degeneration. Acta Neuropathol Commun. 2020 Apr 17;8(1):51. doi: 10.1186/s40478-020-00921-w.
- Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB, et al. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. Nat Neurosci. 2009 Jul;12(7):839-47. doi: 10.1038/nn.2323.
- Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. Lancet. 1999 Jun 5;353(9168):1959-64. doi: 10.1016/S0140-6736(99)01307-0.
- World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2021: moving towards interruption of transmission. Weekly Epidemiol Rec. 2022;97(36):429-50.
- World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control. Weekly Epidemiol Rec. 2021;96(36): 421-44.
- Yang DP, Kim J, Syed N, Tung YJ, Bhaskaran A, Mindos T, et al. p38α 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. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5812-11.2012.
- Zhang H, Dougherty PM. Enhanced excitability of primary sensory neurons and altered gene expression of neuronal ion channels in dorsal root ganglion in

paclitaxel-induced peripheral neuropathy. Anesthesiology. 2014 Jun;120(6):1463-75. doi: 10.1097/ALN.0000000000000176.

- Zhao H, Nepal P, Alam SI. Sonographic evaluation of leprosy of ulnar nerve. Radiol Case Rep. 2021 Feb 24;16(5):1057-1060. doi: 10.1016/j.radcr.2021.02.003.
- Zigmond RE, Echevarria FD. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. Prog Neurobiol. 2019 Feb; 173:102-121. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.12.001.

CAPÍTULO III – CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O presente estudo forneceu informações relevantes sobre o perfil sociodemográfico e clínico de indivíduos com neuropatia associada à hanseníase, em comparação à outras formas de neuropatia periférica. Nossos resultados indicaram também uma regulação diferencial das vias de sinalização intracelular, ERK1/2, p38α MAPK, JNK e do fator de transcrição c-Jun, em modelo murino de trauma por esmagamento e infecção por *M. leprae*. Esses achados contribuem para nossa compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da neuropatia hansênica e podem orientar pesquisas futuras e intervenções terapêuticas nessa área.

ANEXOS

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estando ciente de que serei submetido a uma cirurgia (ou uma biópsia) para auxiliar no tratamento de minha lesão, permito que sejam coletados fragmentos excedentes dessa cirurgia (ou biópsia) e que esses fragmentos sejam utilizados na pesquisa com título "Verificação do Papel de *Mycobacterium leprae* na Ativação de MAPKs em Nervos Periféricos Humanos e Murinos". Fui informado que essa pesquisa tem o objetivo de beneficiar futuramente os pacientes que sofrem de doenças dos nervos periféricos, e que uma dessas doenças é a hanseníase. Estou ciente de que os desconfortos que porventura ocorram após a cirurgia não se relacionam à coleta do material para a pesquisa. Fui informado que minha identidade será mantida em sigilo e que posso mudar de idéia e sair da pesquisa, pois o tratamento será feito da mesma maneira sem qualquer prejuízo. Fui informado que, se assim desejado, tanto eu quanto o médico responsável pela cirurgia em mim realizada poderemos ter acesso a todos os procedimentos a serem realizados e aos resultados da pesquisa.

Fui informado que parte das células (células de Schwann) que foram extraídas dos fragmentos excedentes da minha cirurgia poderão ser armazenadas e utilizadas em outros projetos que visam compreender a interação do *Mycobacterium leprae* com as células de Schwann. Neste sentido,

( ) autorizo que as células sejam armazenadas após a conclusão deste projeto de pesquisa para uso futuro e em caso de uso em novo projeto de pesquisa DESEJO SER CONSULTADO A FIM DE CONCEDER NOVA AUTORIZAÇÃO.

( ) autorizo que as células sejam armazenadas após a conclusão deste projeto de pesquisa para uso futuro E MANIFESTO MEU CONSENTIMENTO PARA USO EM NOVO(S) PROJETO(S) DE PESQUISA SEM A NECESSIDADE DE NOVO CONSENTIMENTO.

( ) não autorizo o armazenamento das células após a conclusão deste projeto de pesquisa para uso futuro.

Eu, _____, portador (a) da cédula de identidade (RG) _____, após leitura minuciosa do parágrafo acima e ciente dos procedimentos aos quais serei submetido (a), firmo meu consentimento livre e esclarecido, concordando em participar da pesquisa proposta.

_____de_____ de_____.

Por estarem de acordo assinam o presente termo,

_____	_____
Sujeito da pesquisa ou representante legal	***Profissional responsável pela coleta do material ou responsável pela pesquisa***

ANEXO II

Parecer Consubstanciado - CEP

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: VERIFICAÇÃO DO PAPEL DE MYCOBACTERIUM LEPRAE NA ATIVAÇÃO DE MAPKS EM CÉLULAS DE SCHWANN HUMANAS
Pesquisador: MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO
Área Temática:
Versão: 3
CAAE: 86456518.0.0000.5475
Instituição Proponente: Instituto Lauro de Souza Lima
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.968.270

Apresentação do Projeto:
O projeto está muito bem escrito e apresenta excelente fundamentação teórica. Os resultados a serem obtidos auxiliarão no entendimento das alterações nas vias intracelulares responsáveis pela manutenção e reparo de nervos periféricos e podem contribuir manejo de danos neurais na hanseníase.

Objetivo da Pesquisa:
Investigar vias de sinalização e componentes moleculares envolvidos na ativação do processo de reprogramação celular adaptativa em cultura de células de Schwann humanas infectadas por M. leprae.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Não há riscos, uma vez que os pesquisadores pretendem usar material oriundo de amputações e cirurgias reconstrutivas.
Não há benefícios diretos para os participantes da pesquisa mas o estudo deve gerar novos conhecimentos sobre as alterações nas vias intracelulares responsáveis pela manutenção e reparo de nervos periféricos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
O projeto está muito bem escrito e apresenta excelente fundamentação teórica. Os resultados a serem obtidos auxiliarão no entendimento das alterações nas vias intracelulares responsáveis pela

Endereço: Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226
Bairro: Caixa Postal 3021 **CEP:** 17.034-971
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3103-5855 **Fax:** (14)3103-5963 **E-mail:** etica@ilsl.br

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

manutenção e reparo de nervos periféricos e podem contribuir manejo de danos neurais na hanseníase.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
O TCLE foi adequado de acordo com as considerações do CEP e agora cotnempla as recomendações da CONEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
O projeto esta em consonância com preceitos éticos ditados pela CONEP. A alteração apresentada no momento diz respeito apenas a equipe de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1220764_E1.pdf	14/09/2018 10:25:44		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2018.pdf	11/06/2018 13:25:16	MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_Compromisso_Equipe_Executora.pdf	20/03/2018 18:49:04	MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	20/03/2018 18:43:09	MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	20/03/2018 18:37:24	MARIANE BERTOLUCCI CASALENOVO	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

Continuação do Parecer: 2.968.270

BAURU, 18 de Outubro de 2018

Assinado por:
Ida Maria Foschiani Dias Baptista
(Coordenador(a))

Endereço: Rod Comte João Ribeiro de Barros Km 225/226
Bairro: Caixa Postal 3021 **CEP:** 17.034-971
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3103-5855 **Fax:** (14)3103-5963 **E-mail:** etica@ilsl.br

ANEXO III

Certificado Comissão de Ética no Uso de Animais - ILSL

Governo do Estado de São Paulo
Secretaria da Saúde
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA / DIVISÃO DE PESQUISA E ENSINO

OFÍCIO

Número de Referência: 001/22
Assunto: CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Verificação do Papel de *Mycobacterium leprae* na Ativação de MAPKs em Nervos Periféricos Humanos e Murinos ", registrada com o nº 001/22, sob a responsabilidade de Mariane Bertolucci Casalenovo que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/ILSL) DO(A)Instituto Lauro de Souza Lima, em reunião de 16/05/2022.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência de autorização	**Dezembro 2022**
Espécie/ linhagem/raça	**Camundongos atímicos**
Nº de animais	**48**
Peso/Idade	**30g**
Sexo	**Machos e fêmeas**
Origem	**Biotério ILSL**

Bauru, 09 de junho de 2022.

PATRICIA SAMMARCO ROSA

Classif. documental	006.01.10.003

SESOFI202222267A

Assinado com senha por PATRICIA SAMMARCO ROSA - 09/06/2022 às 14:29:13.
Documento Nº: 44090416-7127 - consulta à autenticidade em
https://www.documentos.spsempapel.sp.gov.br/sigaex/public/app/autenticar?n=44090416-7127

SIGA