



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

**Graziela Aparecida Silva Gonçalves**

**Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos  
em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e Infecção por  
*Mycobacterium leprae***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

**Botucatu**

**2023**

**Graziela Aparecida Silva Gonçalves**

**Efeito da Clofazimina sobre a Mielinização de Nervos Isquiáticos  
em Modelo Murino de Lesão Neural Traumática e Infecção por  
*Mycobacterium leprae***

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Renata Sales Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Dejair Caitano do Nascimento

**Botucatu**

**2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Gonçalves, Graziela Aparecida Silva.

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

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

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

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

## DEDICATÓRIA

**À Deus,**

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

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

**Aos meus pais,**

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

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

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

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

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

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

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

*Salmos 37:4-5*

---

## RESUMO

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

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

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

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

## **ABSTRACT**

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

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

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

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

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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

**Figura 1M<sup>2</sup>.** Experimentação Animal. Etapas do procedimento cirúrgico realizado em camundongos *nude*. (A) Indução anestésica com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, ip). (B) Posicionamento para intervenções subsequentes. (C) Acesso cirúrgico ao nervo isquiático expostos. (D-E) Lesão por esmagamento. (F) Inoculação intraneural com *Mycobacterium leprae*. (G-H) Inoculação de veículo, NaCl 0,9% estéril. (I) Pós-operatório em placa térmica, após reposicionamento dos tecidos e sutura.

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

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

---

<sup>1</sup> R = Revisão da Literatura

<sup>2</sup> M = Manuscrito

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg – Micrograma

µl – Microlitro

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

ADRP – *Adipose differentiation-related protein*

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

BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente

BB – *Borderline borderline* (Dimorfa-dimorfa)

BL – *Borderline lepromatous* (Dimorfa-virchowiana)

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

BT – *Borderline tuberculoid* (Dimorfa-tuberculóide)

cDNA – *Complementary DNA* (DNA complementar)

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

CFZ – Clofazimina

cm – Centímetro

CSH – *Crush* (Esmagamento)

Ct - *cycle treshold*

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

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)

dNTPs – *Phosphate Deoxyribonucleotides* (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)

dpi – Dias pós-intervenção

DTT – *Dithiothreitol* (Ditiotreitól)

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

ERK – *Extracellular-signal-regulated kinase*

g – Grama

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

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

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

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

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

HSL – *Hormone-sensitive lipase*

IFN $\gamma$  – *Gamma interferon* (Interferon gama)

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

IL-1 $\beta$  – *Interleukin 1 beta* (Interleucina 1 beta)

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

ip – Intraperitoneal

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

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

LDs – *Lipid droplets* (corpúsculos lipídicos)

LL – *Lepromatous leprosy* (Hanseníase virchowiana)

M – Molar

*M. leprae* – *Mycobacterium leprae*

*M. tuberculosis* – *Mycobacterium tuberculosis*

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

mg/kg – Miligramas por quilo

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

ML – *M. leprae*

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

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

mRNA – *Messenger RNA* (RNA mensageiro)

NaCl – Cloreto de sódio

°C – Graus Celsius

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

OMS – Organização Mundial da Saúde

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

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

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

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

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

PL – *Print length* (Comprimento de impressão)

PQT – Poliquimioterapia

RKIP – *Raf1 kinase inhibitory protein*

RNA – *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucleico)

RR – *Reversal reaction* (Reação reversa)

qPCR – *Quantitative PCR (PCR quantitativa)*

s – Segundos

SC – *Schwann cells* (Células de Schwann)

SES – Secretaria de Estado da Saúde

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

SW – *Swiss white*

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

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

TA – Temperatura ambiente

TAG – *Triacylglycerol* (Triacilglicerol)

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

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

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

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

TS – *Toe spreading* (Espalhamento do dedo)

TT – *Tuberculoid leprosy* (Hanseníase tuberculóide)

U – Unidades

## SUMÁRIO

---

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

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

## **CAPÍTULO I – REVISÃO DA LITERATURA**

---

## REVISÃO DA LITERATURA

### Aspectos Gerais e Epidemiológicos da Hanseníase

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

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

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

### Características Clínicas e Patogênese da Hanseníase

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

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

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

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

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

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

dos episódios reacionais, outras condições referentes a interação patógeno-hospedeiro, também têm sido correlacionadas com a progressão do comprometimento neural na hanseníase. (Mattos et al., 2014; Marques et al., 2015; Medeiros et al., 2016).

### **Tratamento da Hanseníase**

O *M. leprae* é suscetível a uma gama de antibióticos. A primeira droga a ser amplamente utilizada para tratamento da hanseníase foi a dapsona que, embora considerada um agente bacteriostático e anti-inflamatório eficaz (Noordeen, 2016), foi também associada ao aumento de resistência bacteriana (Smith et al., 2017). Conseqüentemente, a partir de 1981 a OMS preconizou um esquema de poliquimioterapia (PQT) composto pela associação de dapsona com rifampicina, uma potente droga bactericida, e clofazimina (CFZ) (Smith et al., 2017). A implementação universal da PQT levou cerca de 15 anos, devido a questões como alto custo do tratamento, disponibilidade limitada das três drogas, especialmente a CFZ, além da necessidade de alinhamento entre os especialistas acerca do regime terapêutico ideal (WHO, 2004).

Embora a hanseníase possua um tratamento microbiológico bem estabelecido, não há terapias eficazes para reverter ou prevenir o comprometimento neural. Estima-se que, aproximadamente 30% dos pacientes, independente da carga bacilar, seguem com progressão de dano neural, até após o tratamento (Meima et al., 2001; Monteiro et al., 2014; Penna et al., 2017).

### **Clofazimina**

A CFZ vem sendo utilizada na hanseníase mesmo antes da PQT, desde os anos 1960 (Degang et al., 2012). Trata-se de um corante riminofenazínico, sintetizado inicialmente na Irlanda (1944), com amplo espectro contra parasitas, fungos e bactérias Gram-Positivas (Cholo et al., 2012; van Rensburg et al., 2000). A ação da CFZ ainda não é bem explicada, embora hipóteses mais relevantes sugiram que, no interior das células hospedeiras, a droga se intercale e danifique o DNA microbiano (Korolkovas, 2004; Grosset; Vernon, 2015). Seu efeito também pode ser atribuído a fatores como, o aumento do número e tamanho de lisossomos e fagolisossomos em macrófagos, contribuindo para a maior geração de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio (Yano et al., 2011).

A CFZ possui propriedades lipofílicas elevadas e seu transporte é realizado via LDL, que possui receptores específicos em adipócitos, células do sistema imune e células gliais (O'connor et al., 1995). A meia-vida tecidual da CFZ varia entre 10 dias, para dose única, e 25 a 90 dias, para doses múltiplas (Venkatesan et al., 1997). Os efeitos adversos mais comuns da CFZ são a coloração avermelhada da pele, secreções, deposição na córnea e no cristalino, sendo necessário monitoramento oftalmológico (Barot et al., 2011).

A CFZ regula processos celulares que incluem inflamação (Yoon, 2016) e proliferação, em mamíferos. Guo et al. (2018) exploraram o papel da CFZ como agonista da proteína RKIP (*Raf1 kinase inhibitory protein*). RKIP faz parte da família de proteínas de ligação à fosfoetanolamina e modula a cascata de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK1/2 (Zeng et al., 2008), envolvida em diferentes condições fisiológicas e patológicas, como o câncer (Pearson et al., 200; Chen et al., 2015). O estudo de Guo et al. (2018), demonstraram que a CFZ, assim como RKIP, é capaz de estimular a fosforilação de ERK1/2 e aumentar a proliferação da linhagem HEK 293T (Guo et al., 2018). Vale refletir se, essa ação da CFZ não seria sinérgica ao próprio *M. leprae*, que também exacerba ERK1/2 nas SC, induzindo a desdiferenciação desse tipo celular e comprometendo a integridade dos nervos periféricos (Hess, Rambukkana, 2019).

A ação da CFZ sobre o *M. leprae* também está ligada à modulação do metabolismo lipídico, o que contribui para a deterioração da viabilidade bacilar, afetando seu acesso às vias metabólicas do hospedeiro em busca de nutrientes (Degang et al., 2012). Degang et al. (2012) investigaram o efeito das drogas utilizadas no tratamento da hanseníase, sobre o metabolismo lipídico da linhagem macrófaga THP-1 infectada por *M. leprae*, avaliando a expressão de ADRP e HSL. Os autores constataram que a CFZ devasta o ambiente rico em lipídios das células THP-1 infectadas por *M. leprae*, regulando a expressão de ADRP e HSL, além de ativar mediadores de resposta imune inata nessas células, ambos mecanismos relevantes ao controle da infecção (Degang et al., 2012). A biogênese de lipídios é, portanto, afetada pela CFZ. E, considerando que os lipídios são extremamente demandados durante a mielinização (Chrast et al., 2011; Revin et al., 2019), cabe questionar se a CFZ poderia impactar negativamente a regeneração dos nervos periféricos.

### **Interação de *M. leprae* com Células de Schwann**

De um modo geral, o sistema nervoso responde a diferentes formas de agressão por meio de inflamação e reprogramação celular (Boerboom et al., 2017). Nos nervos periféricos, as células gliais, Células de Schwann (SC) são responsáveis por promover a regeneração dos nervos (Jessen e Mirsky, [2019b](#) ; Nocera e Jacob, [2020](#)). A resposta imune inata envolve um processo referido como degeneração Walleriana, que se caracteriza por delaminação da bainha de mielina e retração axonal (Rotshenker, 2011). Nesse processo, as SC se reprogramam, passando de um estado maduro para um estado proliferativo de suporte ao reparo, semelhante ao precursor. Adicionalmente, eliminam os resíduos de mielina por autofagia/mielifagia, uma ação fundamental, uma vez que a mielina cria um ambiente não permissivo para que o crescimento axonal ocorra novamente. (Gomez-Sanchez et al., 2015; Balakrishnan et al., 2021). Posteriormente, essas células formam as bandas de Büngner, que dão suporte ao redirecionamento dos axônios para seus locais de inervação (Jessen et al., 2015). As células de reparo são produzidas sob demanda e são transitórias, estão presentes apenas pelo tempo necessário para o processo de reparo e regeneração. (revisado em Jessen & Mirsky, 2016). Na hanseníase, a infecção por *M. leprae* parece interferir na reparação neural ao perpetuar um fenótipo imaturo e não mielinizante nas SC, por regulação negativa da proteína básica da mielina (MBP), proteína zero da mielina (MPZ) e Krox-20, comprometendo o restabelecimento funcional dos nervos afetados (Casaleno et al., 2019; Mietto et al., 2019).

Além de assumirem propriedades reparadoras, logo após uma agressão aos nervos periféricos, as SC respondem prontamente por meio da expressão de moléculas MHC II e produzindo uma rede eficiente de citocinas pró e anti-inflamatórias (Ydens, 2013; Fregnan et al., 2012; Weiss et al., 2016). Citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-6, se destacam no processo de neuroinflamação por seu envolvimento na degeneração Walleriana, reprogramação celular (Shamash et al., 2002; Chen et al., 2019) e dor neuropática (Lindholm et al., 1987; Grace et al., 2014). Por outro lado, as SC também são responsáveis pelo *turnover* negativo da resposta imune, a fim de preservar e reparar o tecido neural. A expressão das moléculas co-inibitórias de células T, PD-L1 e PD-L2, e a produção de IL-10 são exemplos de controle da exacerbação de eventos inflamatórios por parte das SC (Camara-Lemarroy et al., 2010, 2012; Weiss et al., 2016).

Achados de nosso grupo de pesquisa indicam um aumento significativo de IL-6 em SC murinas expostas *in vitro* a *M. leprae*, em até 48 horas, paralelamente à redução na expressão de IL-10; o que se assemelha à resposta inicial das SC após uma agressão mecânica (Gonçalves,

2019). Porém, apesar das SC apresentarem essa resposta precoce à infecção por *M. leprae* aparentemente eficiente, sabe-se que esse perfil não se mantém (Samuel et al., 1987; Pereira et al., 2005; Guerreiro et al., 2013). A infecção por *M. leprae* promove queda na produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e inibe expressão de moléculas MHC II nas SC, resultando em diminuição de sua capacidade de apresentar antígenos e favorecendo a disseminação do patógeno (Samuel et al., 1987). Também foi observado que *M. leprae* reprime em SC a transcrição de NF kappaB (NF- $\kappa$ B), um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória (Pereira et al., 2005).

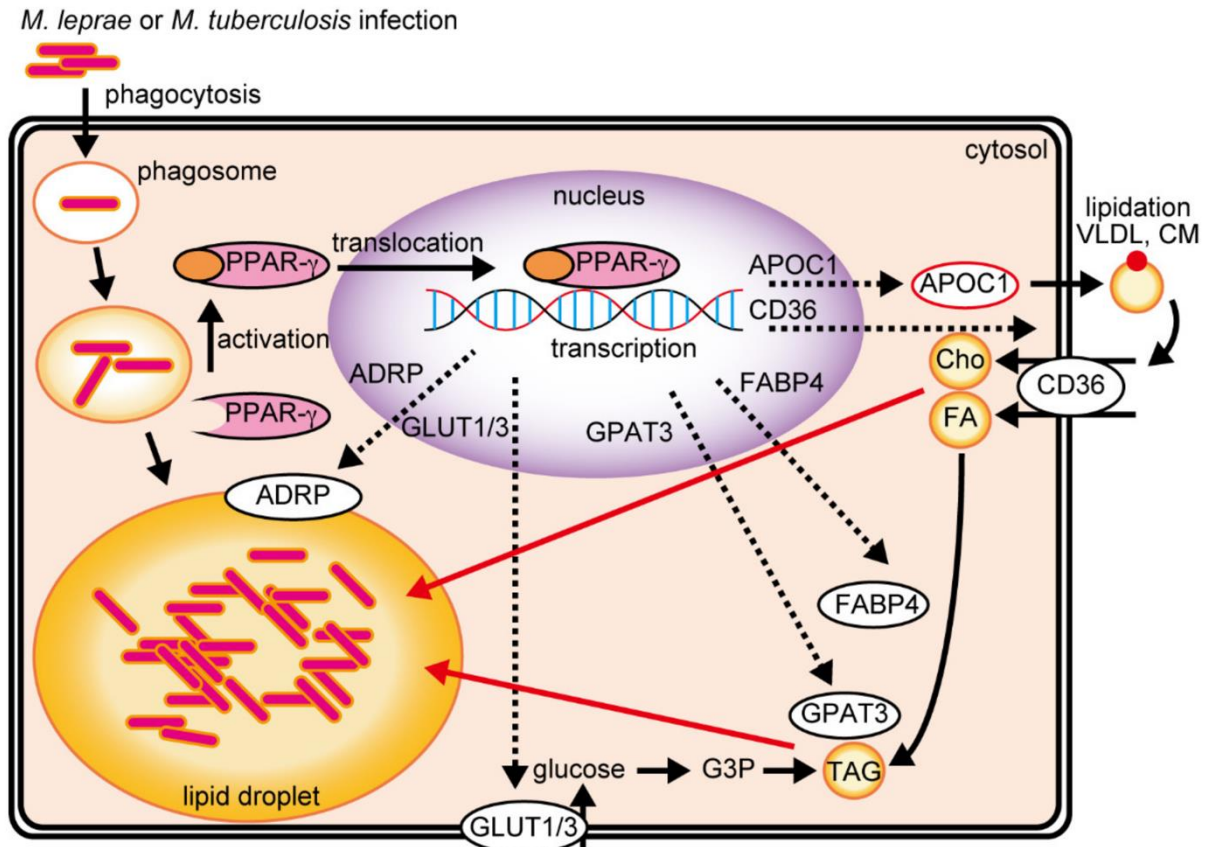
Adicionalmente, Guerreiro et al. (2013) realizaram experimentos de *microarray* em SC infectadas por *M. leprae* e nervos biopsiados de pacientes com hanseníase, comparados a amostras de outros tipos de neuropatias periféricas. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foi detectada regulação negativa de genes relacionados à resposta imune (CCL2, CCL3, CCL4, IL-1 $\beta$  e IL-10), assim como vários genes mitocondriais (mtCOX2, mtND1, mtND3, mtND5 mtATP6 e mtCYB). Por outro lado, genes envolvidos no metabolismo lipídico, como o receptor de LDL (LDLR, *low-density lipoprotein receptor*), foram regulados positivamente nos pacientes com neuropatia hanseniana *versus* outras neuropatias periféricas (Guerreiro et al., 2013). Leal-Calvo e Moraes (2020) reanalisaram e integraram as informações de nove conjuntos de dados de *microarray*, que avaliaram a expressão gênica do hospedeiro na hanseníase, para fortalecer as evidências de expressão diferencial de genes. Os estudos demonstraram uma expressão aumentada de genes relacionados ao metabolismo lipídico ao avaliar biópsias de pacientes com hanseníase virchowiana (Leal-Calvo, Moraes, 2020)

### **Bioacumulação Lipídica**

O acúmulo de corpúsculos lipídicos (LDs, *lipid droplets*) nas células do hospedeiro é comumente observado em resposta a inúmeras doenças infecciosas, e abrange não só infecções bacterianas, como também parasitárias e fúngicas (Pereira-Dutra et al., 2019). Esse aumento de carga lipídica dá suporte à sobrevivência de patógenos intracelulares, como as micobactérias. LDs induzidos por *M. tuberculosis* ao infectar macrófagos são compostos principalmente de ésteres de colesterol e triacilglicerol (TAG), e presume-se que sejam utilizados como fonte de carbono (Russel et al., 2010). Muitos dos compostos ativos capazes de restringir o crescimento de *M. tuberculosis* em macrófagos têm ação relacionada ao colesterol, inferindo seu papel central no curso da doença (Vandervan et al., 2015).

Na hanseníase, *M. leprae* participa ativamente da formação de LDs e de seu recrutamento, favorecendo sua invasão, parasitismo e persistência nas células-alvo (Mattos et al., 2014; Tanigawa et al., 2021a, b). LDs são estruturas formadas principalmente por triacilglicerol, colesterol, ésteres de colesterol e diacilglicerol; e sua membrana é composta por uma variedade de fosfolipídios derivados do hospedeiro (Kaur, Kaur, 2017). Proteínas como ADRP (*adipose differentiation-related protein*) e ACSL1 (*acyl-CoA synthetase long chain family member 1*) são necessárias para a produção de LDs (Kaur, Kaur, 2017). Em contrapartida, a enzima HSL (*hormone-sensitive lipase*) é um efetor da lipólise estimulada por catecolamina em adipócitos, que contribui para a degradação lipídica. O balanço entre essas moléculas pode desempenhar um papel relevante na bioacumulação lipídica em células infectadas por *M. leprae* (Degang et al., 2012).

*M. leprae* aumenta a captação de LDL e induz a biossíntese de colesterol por meio da regulação positiva de HMGCR (*Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase*) e dos receptores transmembrana de lipoproteínas, SR-A1, SR-B1, LRP-1 e LDL-R (Mattos et al., 2014). Lemes et al. (2020), demonstraram que o acúmulo intracelular de lipídios em lesões de pacientes multibacilares também se deve à disfuncionalidade de HDL (*high-density lipoprotein*) (Lemes et al., 2020). Recentemente, Tanigawa et al. (2021a) investigaram por cromatografia líquida (HPTLC), o perfil dos LDs em células monocíticas humanas (THP-1) infectadas por *M. leprae*, constatando esses corpúsculos são compostos essencialmente por triacilgliceról (TAG, *triacylglycerol*) (Tanigawa et al., 2021a). Em células de Schwann, a infecção por *M. leprae* aumenta a captação de glicose e estimula a via das pentoses fosfato, necessária para a síntese de TAG (Medeiros, 2016).



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

## Mielinização

Uma das características bioquímicas mais proeminentes da mielina é sua rica constituição lipídica (70 a 80% da massa seca total), principalmente colesterol (20-30%), um lipídio estrutural de todas as membranas celulares dos mamíferos, que mantém a estabilidade da mielina, regulando sua fluidez e permeabilidade (Chrast et al., 2011). Proteínas como MPZ e MBP fazem parte da composição dessa membrana, onde desempenham funções importantes na formação e manutenção da mielina (Gould et al., 2008; Liu et al., 2019). Ambas as proteínas, MPZ e MBP, vêm sendo amplamente exploradas no contexto da neuropatia diabética (Saiki et al., 2021).

Na hanseníase, Mietto et al. (2019) demonstraram que a infecção de SC por *M. leprae* acelera o processo de degradação da mielina no interior da célula, e reduz os níveis de mRNA para MBP e MPZ (Mietto et al., 2019). Considerando que a degradação da mielina resulta em formação de gotículas lipídicas, esse processo é, possivelmente, induzido por *M. leprae* para garantir a disponibilidade intracelular de lipídios e, conseqüentemente, sua sobrevivência (Mietto et al., 2019).

### **Experimentação Animal na Hanseníase**

Investigar os mecanismos intrínsecos à neuropatia hansênica em nervos humanos é uma tarefa limitada por fatores que incluem, a incapacidade de cultivar *M. leprae in vitro* e as considerações éticas e restrições práticas à utilização de amostras obtidas de tecidos neurais. As possibilidades restritas de pesquisa em espécimes de nervos humanos encorajaram a exploração de modelos animais de experimentação em hanseníase (Scollard et al., 2015). Desde a caracterização inicial do bacilo, os pesquisadores vêm tentando propagar *M. leprae* em uma variedade de espécies animais (Lenz et al., 2020). Infelizmente, a gama de hospedeiros susceptíveis é restrita, pois a maioria dos animais estudados elimina prontamente esse microrganismo. Atualmente, o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) é considerado o único reservatório natural de *M. leprae* (Sharma et al., 2013).

A infecção nos tatus recapitula muitos aspectos do hospedeiro humano, como a neuropatia periférica devido à evolução da doença (Sharma et al., 2013), porém a utilização experimental rotineira de tatus apresenta alguns entraves. Embora o sequenciamento do genoma dos tatus já tenha sido realizado, a falta de reagentes e anticorpos específicos, devidamente validados, ainda está entre as principais limitações na utilização desse modelo animal (Truman et al., 2014). Como os tatus não estão disponíveis comercialmente, eles geralmente precisam ser capturados na natureza e alojados em instalações específicas, limitando seu manuseio na maioria das instituições de pesquisa. Ainda, esses animais silvestres são altamente heterogêneos e podem variar amplamente em resposta ao mesmo estímulo (Truman et al., 2014).

A tentativa de induzir neuropatia periférica pela infecção por *M. leprae* em camundongos vem sendo abordada há décadas, tanto em animais imunocompetentes quanto em imunodeficientes (Shetty, Antia, 2002). As principais vias de inoculação são restritas aos coxins

plantares (Shepard, McRae, 1968) ou diretamente nos nervos isquiáticos (Birdi, Antia, 2003). As linhagens murinas utilizadas em estudos prévios, camundongos Swiss White (SW) e C57BL/6, demonstraram progressão neuropática insidiosa, semelhante ao que se observa em pacientes virchowianos e tuberculóides, respectivamente (Birdi, Antia, 2003). Shetty et al. (1999), compararam camundongos convencionais e imunodeficientes, demonstrando que a inoculação intraneural de *M. leprae* viável induziu granulomas em períodos precoces de inoculação, entre 3 e 4 semanas. Adicionalmente, os autores constataram, que essa forma de inoculação, não sustentou a viabilidade bacilar por períodos superiores a 12 meses (Shetty et al., 1999). Save et al. (2009), também inocularam *M. leprae* pela via intraneural, para demonstrar a hipofosforilação dos neurofilamentos e seu impacto no equilíbrio do calibre axonal e na velocidade de condução neural em nervos isquiáticos de camundongos SW (Save et al., 2009).

A linhagem murina que tem sido utilizada com sucesso para manutenção de cepas de *M. leprae*, são os camundongos *nude* atímicos (NU-*Foxn1<sup>nu</sup>*). Esses animais são deficientes em resposta de células T, permitindo boa multiplicação bacilar e formação de granulomas exuberantes, quando inoculados via coxim plantar (Trombone et al., 2014). A propagação de *M. leprae* nesse modelo é idealmente obtida em torno de seis meses; uma janela de tempo ainda considerada longa para se investigar eventos precoces da interação do bacilo com suas células-alvo. Em um estudo subsequente, Casalenovo et al., (2019) inocularam *M. leprae* na fossa poplíteia de camundongos *nude*, com o objetivo observar uma via ascendente de infecção dos nervos isquiáticos, e a fim de evitar trauma endoneural. Os autores, porém, só conseguiram identificar *M. leprae* no perineuro dos isquiáticos inoculados, limitando inferências maiores sobre eventuais alterações celulares e moleculares na intimidade dos tecidos neurais (Casalenovo et al., 2019).

Apesar da disponibilidade de alguns modelos experimentais, a natureza crônica da hanseníase, e a impossibilidade de cultivar *M. leprae in vitro*, limitam o desenvolvimento de modelos para explorar melhor os aspectos iniciais da infecção. Os modelos murinos utilizados no estudo da hanseníase geralmente necessitam de longas janelas de tempo, limitando, ocasionalmente limitando sua reprodutibilidade. Um modelo murino de infecção de infecções intraneural por *M. leprae* poderia beneficiar a compreensão da neuropatia hanseníase em seus eventos patogênicos mais precoces. No presente estudo, buscou-se introduzir um modelo de infecção intraneural por *M. leprae*, com períodos experimentais subagudos e subcrônicos,

comparando-os com o modelo bem estabelecido de lesão do nervo isquiático, via trauma por esmagamento. Propos-se ainda, investigar possíveis alterações relacionadas ao uso da clofazimina, droga empregada no tratamento da hanseníase que interfere no metabolismo lipídico e poderia comprometer a remielinização dos nervos periféricos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams LB. Susceptibility and resistance in leprosy: studies in the mouse model. *Immunol Rev.* 2021;301(1):157–74. doi: 10.1111/imr.12960.

Adams LB, Pena MT, Sharma R, Hagge DA, Schurr E, Truman RW. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107 suppl 1:197–208. doi: 10.1590/S0074-02762012000900028.

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

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

Araujo S, Rezende MMF, Sousa DCR, Rosa MR, Santos DC, Goulart LR, et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(6):739–45. doi: 10.1590/0037-8682-0245-2015.

Barot RK, Viswanath V, Pattiwar MS, Torsekar RG. Crystalline deposition in the cornea and conjunctiva secondary to long-term clofazimine therapy in a leprosy patient. *Indian J Ophthalmol.* 2011;59(4):328-29. doi: 10.4103/0301-4738.82012.

Boerboom A, Dion V, Chariot A, Franzen R. Molecular mechanisms involved in schwann cell plasticity. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:38. doi: 10.3389/fnmol.2017.00038.

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

Camara-Lemarroy CR, Gonzalez-Moreno EI, Guzman-de la Garza FJ, Fernandez-Garza NE. Arachidonic acid derivatives and their role in peripheral nerve degeneration and regeneration. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:ID168953. doi: 10.1100/2012/168953.

Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(5):314–24. doi: 10.1159/000292020.

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

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

Chen G, Luo X, Wang W, Wang Y, Zhu F, Wang W. Interleukin-1 $\beta$  promotes schwann cells de-differentiation in wallerian degeneration via the c-JUN/AP-1 pathway. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:304. doi: 10.3389/fncel.2019.00304.

Chen Q, Li P, Li P, Xu Y, Li Y, Tang B. Isoquercitrin inhibits the progression of pancreatic cancer in vivo and in vitro by regulating opioid receptors and the mitogen-activated protein kinase signalling pathway. *Oncol Rep*. 2014;33(2):840-8. doi: 10.3892/or.2014.3626.

Cholo MC, Steel HC, Fourie PB, Germishuizen WA, Anderson R. Clofazimine: current status and future prospects. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(2):290–8. doi: 10.1093/jac/dkr444.

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

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

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

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.

Fregnan F, Muratori L, Simões AR, Giacobini-Robecchi MG, Raimondo S. Role of inflammatory cytokines in peripheral nerve injury. *Neural Regen Res*. 2012;7(29):2259–66. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2012.29.003.

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

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;210(1):153–68. doi: 10.1083/jcb.201503019.

Gonçalves GAS. Determinação *in vitro* de citocinas TH1, TH2 e TH17 em células de schwann e macrófagos murinos estimulados por mycobacterium leprae [Monografia de Conclusão de Curso]. Bauru (SP): Instituto Lauro de Souza Lima; 2019.

Gould RM, Oakley T, Goldstone JV, Dugas JC, Brady ST, Gow A. Myelin sheaths are formed with proteins that originated in vertebrate lineages. *Neuron Glia Biol*. 2008; 4(2):137–52. doi: 10.1017/S1740925X09990238.

Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(4):217–31. doi: 10.1038/nri3621.

Grosset J, Vernon A. A reader's guide to the bactericidal activity of pyrazinamide and clofazimine alone and in combinations with pretomanid and bedaquiline. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015;191(8):871–3. doi: 10.1164/rccm.201502-0367ED.

Guerreiro LTA, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Brito TR, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One*. 2013;8(6):e64748. doi: 10.1371/journal.pone.0064748.

Guo C, Chang T, Sun T, Wu Z, Dai Y, Yao H, et al. Anti-leprosy drug clofazimine binds to human Raf1 kinase inhibitory protein and enhances ERK phosphorylation. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2018;50(10):1062–7. doi: 10.1093/abbs/gmy095.

Hess S, Rambukkana A. Cell biology of intracellular adaptation of mycobacterium leprae in the peripheral nervous system. *Microbiol Spectr*. 2019;7(4):10.1128. doi: 10.1128/microbiolspec.BAI-0020-2019.

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

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.

Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. Schwann cells: development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb Perspec Biol*. 2015;7(7):a020487. doi: 10.1101/cshperspect.a020487.

Kahawita IP, Lockwood DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(4):329–37. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.01.004.

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

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

Korolkovas A, França FF. *Dicionário Terapêutico Guanabara.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Lahiri R, Randhawa B, Franken KLMC, Duthie MS, Spencer JS, Geluk A, et al. Development of a mouse food pad model for detection of sub clinical leprosy. *Lepr Rev.* 2011;82(4):432-44.

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

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

Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H. Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature.* 1987;330(6149):658–9. doi: 10.1038/330658a0.

Liu B, Xin W, Tan J-R, Zhu R-P, Li T, Wang D, et al. Myelin sheath structure and regeneration in peripheral nerve injury repair. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116(44):22347–52. doi: 10.1073/pnas.191029211.

Lockwood DNJ, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, Van Brakel W, et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: baseline results for the north indian INFIR Cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12):e1327. doi: 10.1371/journal.pntd.0001327.

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

Marques MAM, Berrêdo-Pinho M, Rosa TLSA, Pujari V, Lemes RMR, Lery LMS, et al. The essential role of cholesterol metabolism in the intracellular survival of mycobacterium leprae is not coupled to central carbon metabolism and energy production. *J Bacteriol.* 2015;197(23):3698–707. doi: 10.1128/JB.00625-15.

Matsuoka M. Drug resistance in leprosy. *Jpn J Infect Dis.* 2010;63(1):1-7.

Mattos KA, Oliveira VCG, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LCM, Melo RCN, et al. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* 2014;16(6):797–815. doi: 10.1111/cmi.12279.

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

Meima A, Saunderson PR, Gebre S, Desta K, Habbema JD. Dynamics of impairment during and after treatment: the AMFES cohort. *Lepr Rev.* 2001;72(2):158-70. doi: 10.5935/0305-7518.20010022.

Mietto BS, Souza BJ, Rosa PS, Pessolani MCV, Lara FA, Sarno EN. Myelin breakdown favours mycobacterium leprae survival in Schwann cells. *Cell Microbiol.* 2019;22(1):e13128. doi: 10.1111/cmi.13128.

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

Vilani-Moreno FR, Barbosa ASAA, Sartori BGC, Diório SM, Silva SMUR, Rosa PS, et al. Murine experimental leprosy: evaluation of immune response by analysis of peritoneal lavage

cells and footpad histopathology. *Int J Exp Pathol.* 2019;100(3):161–74. doi: 10.1111/iep.12319.

Naafs B. Treatment of Leprosy: science or politics? *Trop Med Int Health.* 2006;11(3):268–78. doi: 10.1111/j.1365-3156.2006.01561.x.

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

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

Noordeen SK. History of chemotherapy of leprosy. *Clin Dermatol.* 2016;34(1):32-6. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.016.

O'connor R, O'sullivan JF, O'kenedy R. The pharmacology, metabolism, and chemistry of clofazimine. *Drug Metab Rev.* 1995;27(4):591–614. doi: 10.3109/03602539508994208.

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

paz WS, Souza MR, Tavares DS, Jesus AR, Santos AD, Carmo RF, et al. Impact of the COVID-19 pandemic on the diagnosis of leprosy in Brazil: an ecological and population-based study. *Lancet Reg Health Am.* 2022;9:100181. doi: 10.1016/j.lana.2021.100181.

Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153–83. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.

Penna GO, Bühner-Sékula S, Kerr LRS, Stefani MMA, Rodrigues LC, 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;11(7):e0005725. doi: 10.1371/journal.pntd.0005725.

Pereira RMS, Calegari-Silva TC, Hernandez MO, Saliba AM, Redner P, Pessolani MCV, et al. *Mycobacterium leprae* induces NF- $\kappa$ B-dependent transcription repression in human Schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;335(1):20–6. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.061.

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

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

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

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

Revin VV, Pinyaev SI, Parchaykina MV, Revina ES, Maksimov GV, Kuzmenko TP. The effect of resveratrol on the composition and state of lipids and the activity of phospholipase A2 during the excitation and regeneration of somatic nerves. *Front Physiol*. 2019;10:384. doi: 10.3389/fphys.2019.00384.

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

Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2011;8(1):109. doi: 10.1186/1742-2094-8-109.

Russell DG, VanderVen BC, Lee W, Abramovitch RB, Kim M, Homolka S, et al. Mycobacterium tuberculosis wears what it eats. *Cell Host Microbe*. 2010;8(1):68–76. doi: 10.1016/j.chom.2010.06.002.

Saiki T, Nakamura N, Miyabe M, Ito M, Minato T, Sango K, et al. The effects of insulin on immortalized rat schwann cells, IFRS1. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5505. doi: 10.3390/ijms22115505.

Samuel NM, Mirsky R, Grange JM, Jessen KR. Expression of major histocompatibility complex class I and class II antigens in human schwann cell cultures and effects of infection with mycobacterium leprae. *Clin Exp Immunol*. 1987;68(3):500–9.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;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;33(1):46–54. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.008.

Scollard DM, Martelli CMT, Maroja MF, Pardillo F, Stefani MMA, Villahermosa L, et al. Risk factors for leprosy reactions in three endemic countries. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;92(1):108–14. doi: 10.4269/ajtmh.13-0221.

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

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.

Schuenemann VJ, Avanzi C, Krause-Kyora B, Seitz A, Herbig A, Inskip S, et al. Ancient genomes reveal a high diversity of mycobacterium leprae in medieval europe. Monack DM, editor. PLoS Pathog. 2018;14(5):e1006997. doi: 10.1371/journal.ppat.1006997.

Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. The cytokine network of wallerian degeneration: tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\alpha$ , and interleukin-1 $\beta$ . J Neurosci. 2002;22(8):3052–60. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-08-03052.2002.

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

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;17(9):e293–7. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30418-8.

Spierings E, Boer TD, Zulianello L, Ottenhoff TH. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of schwann cells, T cells and mycobacterium leprae. Immunol Cell Biol. 2000;78(4):349-55. doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00939.x.

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

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

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.

VanderVen BC, Fahey RJ, Lee W, Liu Y, Abramovitch RB, Memmott C, et al. Novel inhibitors of cholesterol degradation in mycobacterium tuberculosis reveal how the bacterium's metabolism is constrained by the intracellular environment. *PLoS Pathog.* 2015;11(2): e1004679. doi: 10.1371/journal.ppat.1004679.

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

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.

Van Rensburg CE, Jooné GK, Sirgel FA, Matlola NM, O'Sullivan JF. In vitro investigation of the antimicrobial activities of novel tetramethylpiperidine-substituted phenazines against mycobacterium tuberculosis. *Chemotherapy.* 2000;46(1):43–8. doi: 10.1159/000007255.

Venkatesan K, Mathur A, Girdhar A, Girdhar BK. Excretion of clofazimine in human milk in leprosy patients. *Lepr Rev.* 1997;68(3):242-6. doi: 10.5935/0305-7518.19970033.

Voorend CGN, Post EB. A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):e2440. doi: 10.1371/journal.pntd.0002440.

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.

Weiss T, Taschner-Mandl S, Bileck A, Slany A, Kromp F, Rifatbegovic F, et al. Proteomics and transcriptomics of peripheral nerve tissue and cells unravel new aspects of the human schwann cell repair phenotype. *Glia.* 2016;64(12):2133–53. doi: 10.1002/glia.23045.

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

Yano T, Kassovska-Bratinova S, Teh JS, Winkler J, Sullivan K, Isaacs A, et al. Reduction of clofazimine by mycobacterial type 2 NADH: quinone oxidoreductase. *J Biol Chem.* 2011;286(12):10276–87. doi: 10.1074/jbc.M110.200501.

Ydens E, Lornet G, Smits V, Goethals S, Timmerman V, Janssens S. The neuroinflammatory role of schwann cells in disease. *Neurobiol Dis.* 2013;55:95–103. doi: 10.1016/j.nbd.2013.03.005.

Yoon GS, Keswani RK, Sud S, Rzczycki PM, Murashov MD, Koehn TA, et al. Clofazimine biocrystal accumulation in macrophages upregulates interleukin 1 receptor antagonist production to induce a systemic anti-inflammatory state. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3470–9. doi: 10.1128/AAC.00265-16.

Zeng L, Imamoto A, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(10):1275–87. doi: 10.1517/14728222.12.10.1275.

## **CAPÍTULO II – OBJETIVOS**

---

## OBJETIVO GERAL

- Comparar em camundongos *nude* atímicos (*NU-Foxn1<sup>tm</sup>*), dois modelos de lesão do nervo isquiático, via trauma por esmagamento e inoculação intraneural por *M. leprae*;
- Investigar em nervos isquiáticos murinos, o impacto do trauma por esmagamento, da inoculação de *M. leprae* e do tratamento com clofazimina, sobre a expressão gênica e de proteínas envolvidas na homeostasia lipídica e de mielina. As avaliações foram executadas em um experimental pré-intervenção, em dois períodos subagudos, 03 e 14 dias, e dois períodos subcrônicos, 28 e 90 dias.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a função motora de camundongos *nude*, por teste de marcha, empregando-se índice funcional do isquiático;
- Avaliar a função nociceptiva de camundongos *nude*, por estimulação mecânica, via analgesímetro eletrônico Von Frey;
- Determinar, por imunofluorescência, a expressão das proteínas lipídicas, ADRP e HSL, em nervos isquiáticos murinos;
- Determinar, por imunofluorescência, a expressão da proteína de mielina, MPZ, em nervos isquiáticos murinos;
- Os animais foram divididos em cinco grupos e duplicados quanto ao tratamento ou não com clofazimina (N = 03/grupo): CSH (lesão por esmagamento); ML (infectado por *M. leprae*); ML/CSH (infecção e esmagamento); NaCl (veículo cloreto de sódio); SHAM (cirurgia simulada).

## **CAPÍTULO III – MANUSCRITO**

---

## INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa milenar que afeta o sistema nervoso periférico, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo ácido-resistente identificado pela primeira vez por Gerhard Henrick Armauer Hansen, em 1873 (Alter et al., 2008). A doença é transmitida através do contato próximo e prolongado entre indivíduos suscetíveis e aqueles com alta carga bacilar, podendo induzir uma neuropatia grave e estigmatizante, com o desenvolvimento de incapacidades físicas permanentes (Lockwood, 2019).

O Brasil está entre os países com maior número de casos de hanseníase no mundo, respondendo por aproximadamente 13% de todos os novos casos registrados em 2021 (WHO, 2022). Embora a incidência de hanseníase no país tenha diminuído 41,4% em 2020 em relação aos cinco anos anteriores - em parte devido à pandemia de COVID-19 - o país ainda relatou um número significativo de indivíduos com grau 2 de incapacidade (G2D) no momento do diagnóstico em 2021, perdendo apenas para a Índia (WHO, 2022). O envolvimento neural em pacientes com hanseníase pode resultar em deformidades físicas e impactos psicossociais significativos, afetando até 30% dos pacientes mesmo após a cura microbiológica da doença (Lasry-Levy et al., 2011; Monteiro et al., 2014). O diagnóstico precoce e intervenções eficazes são essenciais para reduzir o impacto da neuropatia hanseniana.

A hanseníase apresenta um espectro clínico diversificado, com dois polos distintos e três formas intermediárias. Classicamente, em uma das extremidades está o polo tuberculóide (TT), caracterizado por uma resposta celular específica contra *M. leprae* e o desenvolvimento de vigilância imunológica (Reibel et al., 2015). Na outra extremidade, está a hanseníase virchowiana (LL), com predominância de resposta imune humoral e ineficiência de imunidade celular, permitindo a disseminação bacilar (Van der Wel et al., 2007). As formas clínicas dimorfas, ou *borderline*, são intermediárias e apolares, e incluem *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-virchowiana* (BL) (Ridley, Jopling, 1966). Alguns pacientes podem, ainda, manifestar a forma neural primária da hanseníase, com comprometimento do tronco nervoso e ausência de lesões cutâneas (Nascimento, 2013).

A neuropatia hansênica frequentemente se agrava devido a episódios inflamatórios agudos denominados (Nery et al., 2013; Antunes et al., 2013). Esses eventos podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento da hanseníase, e são classificados em reação tipo 1 (T1R ou reação reversa) e reação tipo 2 (T2R ou eritema nodoso hansênico - ENL) (Lockwood et al., 2011). A T1R é caracterizada por inflamação aguda da pele e dos nervos devido exacerbação da imunidade mediada por células em resposta a antígenos de *M. leprae* (Raffe et al., 2013; Scollard et al., 2022). Esse tipo de reação é considerado a principal causa do agravamento da neuropatia hansênica (Kamath et al., 2014). A T2R está associada à produção e deposição de imunocomplexos, com ativação do Sistema Complemento (Lockwood, 2019). Os mecanismos patogênicos das reações hansênicas ainda não estão totalmente esclarecidos e, embora biomarcadores promissores tenham sido identificados, atualmente não há testes laboratoriais recomendados para prever os estados reacionais (Devides et al., 2018; Scollard et al., 2022).

Além dos episódios reacionais, outros aspectos decorrentes da interação patógeno-hospedeiro na hanseníase foram são considerados como fatores de progressão do comprometimento neural (Medeiros et al., 2016). Estudos *in vitro* demonstraram que *M. leprae* eleva, em células de Schwann (SC) e macrófagos, a captação de LDL e a biossíntese de colesterol. Esse efeito ocorre por meio da regulação positiva de HMGCR (hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase) e de receptores de lipoproteínas transmembrana como, SR-A1, SR-B1, LRP-1 e LDL-R (Mattos et al., 2014). O acúmulo intracelular de lipídios em lesões de pacientes com hanseníase multibacilar também foi observado e correlacionado com a disfunção de HDL (Lemes et al., 2020).

A indução intracelular de corpúsculos lipídicos não é exclusividade da infecção por *M. leprae*, pode também ser observado em outras micobacterioses (Pereira-Dutra et al., 2019; Tanigawa et al., 2021a, b). Os corpúsculos lipídicos são estruturas formadas principalmente por triacilglicerol, colesterol, ésteres de colesterol e diacilglicerol. Sua membrana é composta por fosfolipídios e proteínas como ADRP e ACSL1 (Kaur, Kaur, 2017). A enzima HSL, por outro lado, é um efetor da lipólise estimulada por catecolaminas nos adipócitos que contribui para a degradação lipídica e controle de sua bioacumulação. O equilíbrio entre ADRP e HSL tem um papel relevante na homeostase de lipídios, e parece estar desregulado em células infectadas por *M. leprae* (Tanigawa et al., 2021a, b). *M. leprae* também impacta o metabolismo lipídico elevando, nas células hospedeiras, a captação de glicose e estimulando a via das pentoses fosfato, necessária para a síntese de triacilglicerol (Medeiros, 2016).

A gênese de lipídios pode, ainda, sofrer alterações devido à clofazimina (CFZ), uma droga utilizada no tratamento da hanseníase desde a década de 1960. A CFZ é um corante riminofenazina com amplo espectro contra parasitas, fungos e bactérias Gram-positivas. Seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido, mas acredita-se que seja capaz de danificar o DNA microbiano (Degang et al., 2012). A CFZ tem propriedades lipofílicas e é transportada via LDL, que possui receptores específicos em adipócitos, células do sistema imune e células gliais.

A ação da CFZ sobre *M. leprae* também está ligada à modulação do metabolismo lipídico, levando à deterioração da viabilidade bacilar e interferindo em seu acesso às vias metabólicas do hospedeiro (Degang et al., 2012). Degang et al. (2012), investigaram o efeito das drogas utilizadas na hanseníase sobre o metabolismo lipídico em células da linhagem monocítica THP-1. Os autores constataram que a CFZ devasta o ambiente lipídico nas células THP-1, alterando a expressão de ADRP e HS, além de ativar mediadores de resposta imune inata nessas células; ambos mecanismos importantes no controle da infecção (Degang et al., 2012). A biogênese de lipídios é, portanto, afetada pela CFZ. Considerando que os lipídios são extremamente demandados durante a mielinização (Chrast et al., 2011; Revin et al., 2019), cabe questionar se a CFZ poderia impactar negativamente a regeneração dos nervos periféricos em pacientes tratados por esse fármaco.

Investigar os mecanismos intrínsecos à neuropatia hansênica em nervos humanos é uma tarefa limitada por fatores que incluem, a incapacidade de cultivar *M. leprae in vitro* e as considerações éticas e restrições práticas à utilização de amostras obtidas de tecidos neurais. As possibilidades restritas de pesquisa em espécimes de nervos humanos encorajaram a exploração de modelos animais de experimentação em hanseníase. Desde a caracterização inicial do bacilo, os pesquisadores vêm tentando propagar *M. leprae* em uma variedade de espécies animais (Lenz et al., 2020). Infelizmente, a gama de hospedeiros susceptíveis é restrita, pois a maioria dos animais estudados elimina prontamente esse microrganismo. Atualmente, o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) é considerado o único reservatório natural de *M. leprae* (Sharma et al., 2013).

A infecção nos tatus recapitula muitos aspectos do hospedeiro humano, como a neuropatia periférica devido à evolução da doença (Sharma et al., 2013), porém a utilização

experimental rotineira de tatus apresenta alguns entraves. Embora o sequenciamento do genoma dos tatus já tenha sido realizado, a falta de reagentes e anticorpos específicos, devidamente validados, ainda está entre as principais limitações na utilização desse modelo animal (Truman et al., 2014). Como os tatus não estão disponíveis comercialmente, eles geralmente precisam ser capturados na natureza e alojados em instalações específicas, limitando seu manuseio na maioria das instituições de pesquisa. Ainda, esses animais silvestres são altamente heterogêneos e podem variar amplamente em resposta ao mesmo estímulo (Truman et al., 2014).

A tentativa de induzir neuropatia periférica pela infecção por *M. leprae* em camundongos vem sendo abordada há décadas, tanto em animais imunocompetentes quanto em imunodeficientes (Shetty, Antia, 2002). As principais vias de inoculação são restritas aos coxins plantares (Shepard, McRae, 1968) ou diretamente nos nervos isquiáticos (Birdi, Antia, 2003). As linhagens murinas utilizadas em estudos prévios, camundongos Swiss White (SW) e C57BL/6, demonstraram progressão neuropática insidiosa, semelhante ao que se observa em pacientes virchowianos e tuberculóides, respectivamente (Birdi et al., 1995). Shetty et al. (1999), compararam camundongos convencionais e imunodeficientes, demonstrando que a inoculação intraneural de *M. leprae* viável induziu granulomas em períodos precoces de inoculação, entre 3 e 4 semanas. Adicionalmente, os autores constataram, que essa forma de inoculação, não sustentou a viabilidade bacilar por períodos superiores a 12 meses (Shetty et al., 1999). Save et al. (2009), também inocularam *M. leprae* pela via intraneural, para demonstrar a hipofosforilação dos neurofilamentos e seu impacto no equilíbrio do calibre axonal e na velocidade de condução neural em nervos isquiáticos de camundongos SW (Save et al., 2009).

A linhagem murina que tem sido utilizada com sucesso para manutenção de cepas de *M. leprae*, são os camundongos *nude* atímicos (NU-*Foxn1<sup>nu</sup>*). Esses animais são deficientes em resposta de células T, permitindo boa multiplicação bacilar e formação de granulomas exuberantes, quando inoculados via coxim plantar (Trombone et al., 2014). A propagação de *M. leprae* nesse modelo é idealmente obtida em torno de seis meses; uma janela de tempo ainda considerada longa para se investigar eventos precoces da interação do bacilo com suas células-alvo. Em um estudo subsequente, Casalenovo et al., (2019) inocularam *M. leprae* na fossa poplítea de camundongos *nude*, com o objetivo observar uma via ascendente de infecção dos nervos isquiáticos, e a fim de evitar trauma endoneural. Os autores, porém, só conseguiram identificar *M. leprae* no perineuro dos isquiáticos inoculados, limitando inferências maiores

sobre eventuais alterações celulares e moleculares na intimidade dos tecidos neurais (Casalenovo et al., 2019).

Apesar da disponibilidade de alguns modelos experimentais, a natureza crônica da hanseníase, e a impossibilidade de cultivar *M. leprae in vitro*, limitam o desenvolvimento de modelos para explorar melhor os aspectos iniciais da infecção. Os modelos murinos utilizados no estudo da hanseníase geralmente necessitam de longas janelas de tempo, limitando, ocasionalmente limitando sua reprodutibilidade. Um modelo murino de infecção de infecções intraneural por *M. leprae* poderia beneficiar a compreensão da neuropatia hansênica em seus eventos patogênicos mais precoces.

No presente estudo, buscou-se introduzir um modelo de infecção intraneural por *M. leprae*, com períodos experimentais subagudos e subcrônicos, comparando-os com o modelo bem estabelecido de lesão do nervo isquiático, via trauma por esmagamento. Propôs-se ainda, investigar possíveis alterações relacionadas ao uso da clofazimina, droga empregada no tratamento da hanseníase que interfere no metabolismo lipídico e poderia comprometer a remielinização dos nervos periféricos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Experimentação Animal

Este estudo foi realizado utilizando três camundongos *nude* atômicos (*NU-Foxn1<sup>nu</sup>*), por grupo e tempo experimental, todos com 60 dias de vida. Os animais foram 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, ILSL005/2019). Todos os protocolos seguiram os Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Antes de cada procedimento, 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. Ao final de cada tempo experimental e após a confirmação do *status* anestésico, grupos de camundongos foram sacrificados por sobredose das mesmas drogas utilizadas para anestesia, ou por perfusão intracardíaca com solução de paraformaldeído a 4% (PFA, Sigma-Aldrich) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4).

Foram estabelecidos os seguintes grupos experimentais: CSH (lesão por esmagamento); ML (infectado por *M. leprae*); ML/CSH (infecção e esmagamento); NaCl (veículo cloreto de sódio) e SHAM (cirurgia simulada); então esses grupos foram subdivididos em tratados e não tratados com CFZ. As avaliações foram executadas 24 horas antes do experimento, em um período pré-intervenção (pi), em dois períodos experimentais subagudos, 03 e 14 dias, além de dois períodos subcrônicos, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi) (Campos et al., 2016). Com o intuito de reduzir o número de animais e considerando que, a avaliação motora pelo teste de marcha compara a pata traseira direita submetida ao estímulo, com a pata esquerda normal do mesmo animal (sem estímulo), nos grupos controle (NaCl e SHAM) os valores de normalidade de pata esquerda utilizados para estimar o SFI, foram os mesmos obtidos nos testes pré-intervenção. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram sacrificados e os nervos isquiáticos, devidamente coletados e criopreservados. Os espécimes foram então, divididos para a análise de expressão de mRNA e proteínas de interesse.

### **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). Em resumo, os animais foram inoculados nos coxins plantares traseiros com 30 µl de 10<sup>7</sup> 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 dissecação, isolamento e digestão de tecidos, além de quantificação e identificação bacilar, 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). Na porção endoneural do nervo isquiático, foram inoculados 10 µl de suspensão contendo 10<sup>7</sup> bacilos/mL (NaCl 0,9% estéril), por meio de agulha 30 G acoplada a seringa de 1 mL com escala centesimal (Ultra-Fine™ II, BD). A agulha foi cuidadosamente posicionada em paralelo ao longo eixo das fibras nervosas, com bisel voltado para cima, a fim de minimizar o dano mecânico causado pela inserção da agulha. Em seguida, a musculatura foi reposicionada e a pele suturada com fio de nylon 4-0. Os animais do grupo NaCl foram inoculados apenas com 10 µl desse veículo (Figura 1M).

### **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*. Cada nervo isquiático foi comprimido a 0,5 cm da trifurcação isquiática, por um minuto, com 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 simulada, com acesso, mas sem manipulação do nervo (Figura 1M).

### **Administração de Clofazimina**

A droga foi preparada em suspensão de agarose a 0,05% (p/vol), na concentração de 50 mg de clofazimina por quilograma de peso corporal, e administrada semanalmente por gavagem. O tratamento com CFZ se iniciou 24 horas após cada procedimento experimental, em todos os grupos destinados a esse fim: CSH\_cfz; ML\_cfz; ML/CSH\_cfz; NaCl\_cfz e SHAM\_cfz. Os animais foram tratados em todos os períodos pré-estabelecidos, em 3-14-28-90 dpi (Figura 2M A).

### **Avaliação de Função Motora**

A função motora foi estimada a partir do teste de marcha, empregando-se o Índice Funcional do Isquiático (SFI, *sciatic functional index*). Inicialmente, os testes foram realizados 24 horas antes de cada procedimento, no período pré-intervenção (pi). Posteriormente, todos os animais de cada grupo (CSH, ML, ML/CSH, NaCl, SHAM, CSH\_cfz, ML\_cfz, ML/CSH\_cfz, NaCl\_cfz, SHAM\_cfz) foram testados em todos períodos experimentais (3-14-28-90 dpi). Antes da execução dos testes, os animais foram previamente treinados para caminhar em uma passarela de acrílico, fechada nas laterais, com um abrigo ao final. Após o período de adaptação, as patas traseiras foram tingidas e os animais, posicionados para atravessar a passarela e deixar suas pegadas em papel filtro no assoalho da mesma. As marcações das pegadas no papel foram avaliadas pelos seguintes parâmetros: (I) Comprimento de impressão (PL, *print length*), 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:  $SFI = 118,9 \times (ETS - NTS / NTS) + 51,2 \times (EPL - NPL / NPL) - 7,5$ ; onde “E” representa locais experimentais e “N”, locais normais (Inserra et al., 1998; van Neerven et al., 2012) (Figura 2M B).

### **Avaliação de Nocicepção**

A resposta dos camundongos à estimulação mecânica foi registrada por analgesímetro eletrônico Von Frey (modelo EFF-301, Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O equipamento é

composto por um transdutor de força (0,1 a 1000 g) adaptado a uma ponteira de polipropileno de 0,5 mm. O contato entre a ponta do transdutor de força e a pata traseira do animal evoca uma resposta nociceptiva, com flexão característica e retirada da pata da superfície de apoio (PWT, *Paw Withdrawal Threshold*) (Cunha et al., 2004; Fontineli et al., 2019; Oliveira et al., 2020). Antes de cada teste, os camundongos foram posicionados em caixas de acrílico apropriadas e aclimatadas, contendo gradil de metal na base, permanecendo ali durante 30 minutos para adaptação. Os animais foram avaliados 24 horas antes dos procedimentos experimentais (pi), para caracterização da resposta basal. Durante o teste, nos períodos de 3-14-28-90 dpi, um investigador treinado aplicou pressão gradual e perpendicular à região central da pata traseira de cada animal, elicitando a resposta de flexão. A intensidade do estímulo foi registrada automaticamente no equipamento. A força máxima aplicada foi de 4,789 g. A estimulação das patas foi repetida até o registro de três valores independentes; os resultados finais foram obtidos das médias dos valores registrados (Figura 2M C).

### **Perfusão e Imunofluorescência em Espécimes Criopreservados**

Após a confirmação do *status* anestésico, os camundongos foram sacrificados por perfusão intracardíaca, com solução de PFA 4% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Inicialmente, foi realizada uma incisão ao nível do processo xifoide com a ajuda de uma tesoura cirúrgica média de ponta fina. O diafragma foi cortado e o gradil costal aberto, sendo devidamente rebatido para a exposição do coração na caixa torácica. Em seguida, foi introduzida uma agulha na ponta do ventrículo esquerdo para que a solução de perfusão fosse carregada por via circulatória através da aorta para todo o organismo. O transfusato foi retirado através de um picote (1 mm) no átrio direito. A quantidade de solução fixadora utilizada na perfusão foi de 20 mL por animal. Parte das amostras foi fixada em PFA 4%, *overnight*, a 4 °C. Em seguida, foram lavadas em PBS e, submetidas a criopreservação. As amostras, então, foram mantidas de um a três 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).

As amostras então, submetidas a técnica de imunofluorescência para localização dos alvos celulares de interesse. Brevemente, os espécimes foram fixados por imersão em PFA 4% durante 10 minutos, em temperatura ambiente (TA), desidratados em seguida e reidratados por 10 minutos, em TBS/glicina 0,1 mM. Foi então, realizado o bloqueio de ligações inespecíficas

com albumina de soro bovino 3% (BSA) em TBST (TBS/Triton X-100 0,3%), por 120 minutos. As amostras foram incubadas *overnight*, a 4 °C, com anticorpos primários específicos para os alvos (anti-MPZ, anti-ADRP e anti-HSL), diluídos em TBS/BSA 2%. Seguindo-se o período de incubação, as amostras foram suavemente lavadas em TBS e incubadas com cada anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo AlexaFluor® 488 (Molecular Probes®) diluído em TBS/BSA 2%, por 120 minutos (TA, protegidas de luz). Os núcleos celulares foram corados por DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dicloridrato) associado ao meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Os espécimes foram armazenados a -20 °C. Cada corte microscópico teve sua imagem capturada em microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 (Leica Microsystems) e armazenada via *software* LAS AF (Leica Microsystems). A análise quantitativa das respectivas densidades de fluorescência foi executada no *software* ImageJ 1.53v (National Institutes of Health, USA), a partir de três campos/espécime/grupo. A expressão proteica de ADRP, HSL e MPZ foi determinada estimando-se a densidade integrada de fluorescência de cada marcador, normalizada pelo número de núcleos DAPI+ em cada campo microscópico. Como controle endógeno de reação, foram utilizados espécimes nos quais os anticorpos primários foram suprimidos, e mantidos os anticorpos secundários conjugados a AlexaFluor® 488. A densidade de fluorescência nesses controles, também foi normalizada pelos núcleos DAPI+ de seus respectivos campos microscópicos. Posteriormente, os valores dos controles de reação foram subtraídos dos valores de imunodeteccção de cada espécime.

### **Detecção Molecular de *M. leprae* por qPCR RLEP**

O ensaio foi utilizado para detectar a presença de *M. leprae* nas amostras inoculadas com esse patógeno. A RLEP é uma sequência repetitiva, localizada em uma região altamente conservada no cromossomo do bacilo, que apresenta alto índice de sensibilidade e especificidade para o *M. leprae* (Collins et al., 2022). Inicialmente, o material foi isolado e purificado em TriReagent, utilizando o tubo FastPrep® ProBlue (MP-Biomedicals) e o equipamento Fast Prep 24 (MP-Biomedicals), segundo as recomendações do fabricante. O DNA do bacilo foi purificado a partir da fase aquosa e da interfase que permanece nos tubos FastPrep®. O DNA genômico extraído foi submetido a ensaio RLEP para detectar presença ou ausência do bacilo nas amostras. O qPCR foi realizado utilizando ensaio SYBR<sup>R</sup> *green* (PCRBio) em equipamento CFX Opus (BioRad). Todos os nervos expostos a *M. leprae* foram

avaliados. Os *primers* utilizados foram, *forward*: 5'-GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A-3' e *reverse*: 5'-CGC TAG AAG GTT GCC GTA T-3'(Martinez et al., 2009).

### **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-teste de comparações múltiplas de Šídák ou Tukey. Valores de  $p < 0,05$  (\*) foram estabelecidos como estatisticamente significantes.

## RESULTADOS

### Resposta Motora

O Índice Funcional do Isquiático (SFI, *sciatic functional index*), resultante do teste de marcha realizado em todos os animais experimentais, gera valores expressos como unidades de déficit funcional, que retratam o grau de envolvimento da função motora. Valores de SFI entre 10 e -10 são considerados normais na literatura pertinente. Valores inferiores a -100, representam perda completa da função motora. Valores entre -100 e -10 foram considerados nesse estudo, indicativos de comprometimento parcial da função motora. Em todos os grupos experimentais, o déficit funcional foi estimado no momento pré-intervenção (pi) e em 3, 14, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi).

Os dados foram analisados comparando-se inicialmente, todos os grupos sem e com tratamento por clofazimina (CSH x CSH\_cfz, ML x ML\_cfz, ML/CSH x ML/CSH\_cfz, NaCl x NaCl\_cfz, SHAM x SHAM\_cfz). Em seguida, os grupos foram comparados com seus respectivos controles (CSH x SHAM; ML x NaCl; ML/CSH x NaCl, CSH\_cfz x SHAM\_cfz, ML\_cfz x NaCl\_cfz, ML/CSH\_cfz x NaCl\_cfz) (Figura 3). No momento pré-intervenção (pi), as médias de SFI se mantiveram de -14,30 (SHAM) a -1,14 (SHAM\_cfz). Embora tenham sido detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ML x NaCl ( $p = 0,044$ ), NaCl x NaCl\_cfz ( $p = 0,003$ ), SHAM x SHAM\_cfz ( $p = 0,001$ ) e ML\_cfz x NaCl\_cfz ( $p = 0,027$ ), todos os valores de SFI se mantiveram dentro de padrões considerados normais (Figura 3M A).

Em 3 dpi, as médias de SFI oscilaram entre -78,44 (ML/CSH\_cfz) e -1,79 (SHAM\_cfz). Os grupos com diferenças estatisticamente significantes foram, CSH x SHAM ( $p < 0,0001$ ), ML/CSH x NaCl ( $p = 0,0066$ ), CSH\_cfz x SHAM\_cfz ( $p < 0,0001$ ) e ML/CSH\_cfz x NaCl\_cfz ( $p < 0,0001$ ). A avaliação em 3 dpi não demonstrou dados de SFI inferiores a -100, sem perda total da função motora. Todos os grupos, exceto SHAM e SHAM\_cfz, demonstraram perda parcial da função motora, com destaque para ML/CSH\_cfz (-78,44), CSH (-76,64), ML/CSH (-76,34) e CSH\_cfz (-73,94) (Figura 3M B).

Em 14 dpi, foram observadas médias de SFI entre -24,60 (CSH) e -3,70 (SHAM\_cfz). Nesse período, ML\_cfz (-24,19) e ML/CSH\_cfz (21,00) apresentaram SFI estatisticamente inferior ao controle NaCl\_cfz (-6,16) ( $p = 0,0132$ ;  $p = 0,0498$ , respectivamente) (Figura 3C). Os períodos de 28 e 90 dpi não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. As médias de SFI se mantiveram entre -15,15 (NaCl\_cfz) e -5,07 (ML/CSH) em 28 dpi, e entre -20,29 (NaCl) e -3,56 (CSH\_cfz) em 90 dpi, indicando recuperação da função motora nesses animais (Figuras 3M D e 3M E).

### **Resposta Nociceptiva**

A resposta à estimulação mecânica foi avaliada pelo analgesímetro eletrônico de Von Frey, no qual o limiar de retirada das patas traseiras de cada animal (PWT, *Paw Withdrawal Threshold*) foi mensurado em gramas (g). A nocicepção dos animais foi averiguada em todas as condições experimentais do mesmo modo que na avaliação de função motora (Figura 4). Antes dos procedimentos de indução de lesão do nervo isquiático (pi), os dados obtidos indicaram valores médios de PWT entre 1,01 g (NaCl\_cfz) e 1,51 g (ML), sem diferenças estatisticamente significantes (Figura 4M A). Em 3 dpi, os valores médios oscilaram entre 0,39 g em CSH e 0,67 g em SHAM, onde o limiar médio de CSH foi significativamente inferior a SHAM ( $p = 0,0081$ ) (Figura 4M B).

Em 14 dpi, as médias de PWT variaram entre 0,57 g (ML\_cfz) e 1,07 g (SHAM\_cfz), sem diferenças estatisticamente significantes (Figura 4M C). No período 28 dpi, as médias foram de 0,55 g (ML) a 1,44 g (NaCl), com o grupo ML apresentando valores significativamente inferiores a NaCl ( $p < 0,0001$ ) e ML\_cfz ( $p = 0,032$ ). Nesse período, as médias de ML/CSH também foram estatisticamente inferiores a NaCl (0,043) (Figura 4M D). Em 90 dpi, a resposta mínima de PWT foi 0,63 g (ML) e a máxima, 1,62 g (SHAM\_cfz). Os valores mais reduzidos foram observados nas comparações do grupo ML em relação a NaCl ( $p < 0,0001$ ) e ML\_cfz ( $p = 0,0012$ ), assim como CSH em relação a SHAM ( $p = 0,0270$ ). Foram também identificadas diferenças estatisticamente significantes entre ML/CSH x NaCl ( $p = 0,0001$ ), CSH\_cfz x SHAM\_cfz ( $p = 0,038$ ) e ML\_cfz x NaCl\_cfz ( $p = 0,049$ ) (Figura 4M E).

### **Regulação de Proteínas do Metabolismo Lipídico – ADRP**

A detecção de ADRP nos nervos isquiáticos de camundongos *nude*, 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 (Figuras 5M e 6M). A exemplo das avaliações motora e nociceptiva, a expressão da proteína ADRP foi comparada quanto aos diferentes grupos (CSH, ML, ML/CSH, NaCl, SHAM, CSH\_cfz, ML\_cfz ML/CSH\_cfz, NaCl\_cfz, SHAM\_cfz) e períodos experimentais (3dpi, 28 dpi, 90 dpi) (Figura 7M).

Em 3 dpi, a expressão de ADRP foi superior no grupo CSH em relação a CSH\_cfz ( $p = 0,002$ ), assim como ML x ML\_cfz ( $p < 0,0001$ ), NaCl x SHAM\_cfz ( $p = 0,013$ ) e SHAM x SHAM\_cfz ( $p < 0,0001$ ); a maioria, grupos teste em comparação aos seus respectivos controles (Figura 7M A). Em 28 dpi, foram observadas diferenças estatísticas em ML x ML\_cfz e NaCl ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,022$ , respectivamente), sendo que ADRP esteve paradoxalmente inferior no grupo ML em relação a ML\_cfz (Figura 7M B). Ainda em 28 dpi, a expressão de ADRP foi maior nas comparações, ML\_cfz x NaCl\_cfz ( $p < 0,0001$ ), ML/CSH x ML/CSH\_cfz e NaCl ( $p = 0,012$ ;  $p < 0,0001$ ), e ML/CSH\_cfz e NaCl\_cfz ( $p = 0,035$ ). Em 90 dpi (Figura 7M C), ADRP foi superior em ML/CSH x ML/CSH\_cfz ( $p = 0,006$ ). Ainda nesse período, o grupo SHAM apresentou ADRP elevada em relação a SHAM\_cfz ( $p < 0,0001$ ) e a CSH ( $p < 0,0001$ ).

Os grupos experimentais foram também avaliados individualmente, em relação as diferenças de tempo (Figura 7M D). No grupo CSH, a expressão da proteína ADRP foi maior em 3dpi do que 28 e 90 dpi ( $p = 0,041$ ;  $0,010$ ), sendo o mesmo observado em CSH\_cfz ( $p = 0,020$ ;  $0,005$ ), além de 28 x 90 dpi ( $p = 0,043$ ). Do mesmo modo, no grupo ML ADRP foi mais alta em 3dpi comparada a 28 e 90 dpi ( $p = 0,0002$ ;  $0,0008$ ), e em 28 x 90 dpi ( $p = 0,023$ ). No grupo ML\_cfz, tanto 3 dpi quanto 28 dpi, ADRP foi superior a 90 dpi ( $p = 0,013$ ;  $0,009$ ). Em ML/CSH\_cfz, notaram-se diferenças entre 3 x 90 dpi ( $p = 0,030$ ). Nos grupos controle, os períodos com elevação significativa do marcador foram, 3 dpi x 28 e 90 dpi ( $p = 0,021$ ;  $0,045$ ), para NaCl; 3 x 28 dpi ( $p = 0,010$ ), para NaCl\_cfz; 3 x 28 dpi ( $p = 0,021$ ) e 28 x 90 dpi ( $p = 0,027$ ), em SHAM.

### **Regulação de Proteínas do Metabolismo Lipídico – HSL**

A densidade integrada de fluorescência de HSL foi maior em 28 dpi, no grupo ML/CSH\_cfz comparado a ML/CSH ( $p = 0,04$ ) (Figura 10M B). Em 90 dpi, notou-se uma inversão, HSL foi maior em ML/CSH do que ML/CSH\_cfz e NaCl ( $p = 0,04; 0,001$ ) (figura 10M C). Individualmente, o grupo ML exibiu diferenças estatisticamente significantes entre os tempos 3 dpi x 28 e 90 dpi ( $p = 0,0009; 0,012$ ) (Figura 10M D).

### **Regulação de Proteína de Mielina – MPZ**

MPZ é a proteína de mielina mais abundante nos nervos periféricos e foi bem evidenciada nos nervos isquiáticos murinos submetidos à diferentes condições experimentais (Figura 11M). Nossos achados indicaram queda de sua detecção em 3 dpi, nos grupos CSH x SHAM ( $p = 0,0007$ ), ML x ML\_cfz e NaCl ( $p = 0,009; 0,037$ ) (Figura 12M A). Em 28 dpi, os grupos com menor expressão de MPZ foram, ML/CSH e NaCl\_cfz comparados a ML/CSH\_cfz ( $p = 0,014; 0,002$ ) (Figura 12M B). Em 90 dpi, MPZ esteve reduzida nas comparações entre CSH x SHAM ( $p = 0,0001$ ), CSH\_cfz x SHAM\_cfz ( $p = 0,002$ ), ML/CSH\_cfz x ML/CSH e NaCl ( $p = 0,0001; 0,031$ ) (Figura 12M C). Na avaliação intragrupos sobre as diferenças de tempo, a detecção de MPZ foi menor nos grupos, ML em 90 x 28 dpi ( $p = 0,044$ ), ML/CSH em 28 x 3 dpi ( $p = 0,012$ ), ML/CSH\_cfz em 90 x 3 dpi ( $p = 0,031$ ) e no controle SHAM, em 28 x 90 dpi ( $0,0002$ ) (Figura 12M D).

### **Detecção Molecular de *M. leprae* por qPCR RLEP**

O resultado do ensaio RLEP foi demonstrado pelo ciclo (*cycle threshold*, Ct) em que a curva de fluorescência acumulada ultrapassou a linha de corte de detecção, sendo considerados valores positivos aqueles em que os Cts foram menores que 40. O Valor do Ct, é inversamente proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. Todas as amostras investigadas detectaram a presença do DNA de *M. leprae*, com Ct médio de 22,30 (Figura 14M).

## DISCUSSÃO

*M. leprae* utiliza diversos mecanismos de sobrevivência que induzem alterações em suas células-alvo, favorecendo sua sobrevivência intracelular. Dentre essas alterações, destacam-se aquelas relacionadas ao metabolismo lipídico do hospedeiro. Um dos fármacos utilizados no tratamento da hanseníase, a CFZ, também interfere no metabolismo de células como, células de Schwann e macrófagos. Alterações lipídicas em nervos periféricos podem interferir no processo de mielinização. Este estudo teve como objetivo estabelecer um modelo murino de infecção intraneural por *M. leprae*, a fim de contribuir com o entendimento das alterações no metabolismo lipídico de suas células hospedeiras, bem como a influência do tratamento com CFZ na mielinização do nervo periférico.

O modelo experimental apresentado nesse estudo foi adaptado de estudos anteriores (Rambukkana et al., 2002; El Idrissi et al., 2015). Cada etapa experimental foi padronizada, desde o processo anestésico até a seleção de materiais adequados. Por exemplo, a agulha utilizada para a injeção intraneural foi escolhida com espessura adequada para evitar danos à estrutura do nervo isquiático e impedir obstruções durante a inoculação da suspensão bacilar. Durante o período pós-operatório, os animais foram cuidadosamente monitorados, com atenção a detalhes como o controle da temperatura corporal para evitar a hipotermia, que é comum em intervenções desse tipo. Além disso, foi essencial observar de perto os camundongos para identificar e lidar com qualquer comportamento agressivo causado pelo estresse induzido pelo procedimento.

Alguns modelos experimentais têm sido explorados para aprofundar a compreensão dos mecanismos de dano neural e regeneração na neuropatia hansênica. A alta suscetibilidade dos camundongos *nude* atímicos a infecções, devido às suas características imunológicas, garante o sucesso da propagação de *M. leprae* (Trombone et al., 2014). El Idrissi et al. (2015), utilizaram camundongos *nude* em infecção de nervos isquiáticos, assim como nosso estudo. A diferença entre ambos foi que, El Idrissi et al. (2015) empregaram inóculo de *M. leprae* morto e fragmentado previamente por processo de sonicação, além de ter sido propagado em tatus e não em camundongos (El Idrissi et al., 2015). Em estudo prévio conduzido pelo nosso grupo, foi testado um modelo de infecção neural indireta, com injeção intradérmica de suspensão bacilar na fossa poplíteia, seguida de inoculação nos coxins plantares de camundongos *nude*

(Casalenovo, 2019). No entanto, esse modelo não permitiu a observação de bacilos no endoneuro, somente no perineuro, e por esse motivo optou-se posteriormente pela inoculação direta no nervo isquiático.

A técnica descrita neste estudo possibilita a inoculação direta de *M. leprae* nos tecidos neurais, sem causar danos significativos às fibras nervosas. Adicionalmente, a utilização de suspensão de *M. leprae* com alto grau de viabilidade, garante um modelo *in vivo* que reproduz de forma mais precisa o processo infeccioso nos nervos humanos, uma melhor compreensão dos padrões de interação patógeno-hospedeiro, bem como a subsequente lesão neural periférica.

A comparação com a indução de lesão por esmagamento do nervo isquiático murino, surgiu como uma necessidade de alinhamento com uma técnica experimental padrão-ouro para investigar a regeneração neural periférica (Geuna, 2015). Nesse modelo de trauma, a ruptura das fibras nervosas não interfere nas estruturas de suporte do nervo, permitindo posterior reparação tecidual ao longo de aproximadamente 30 dias (van Neerven et al., 2012). Nossos achados indicaram que a lesão por esmagamento do nervo isquiático pode ser útil como controle positivo de lesão induzida por *M. leprae*, visto que ambos os modelos seguem o mesmo padrão de trauma e restabelecimento da função. Tais resultados podem ser observados principalmente por meio de avaliações funcionais, como as executadas nesse estudo.

O SFI é amplamente utilizado para avaliação funcional da marcha após lesão neural periférica (Byun et al., 2005). Inicialmente desenvolvemos uma passarela impressa em 3D em parceria com Faculdade de Tecnologia (FATEC, Bauru). Após processo de padronização do dispositivo, iniciaram-se testes-piloto. Na execução dos ensaios propriamente ditos, todos os grupos experimentais foram avaliados antes dos procedimentos e ao longo de 3, 14, 28 e 90 dias pós-intervenção (dpi).

Inicialmente, a avaliação entre os grupos mostrou que todos apresentaram algum nível de lesão neural em 3 dpi, exceto os animais do grupo SHAM. Os grupos com comprometimento motor mais acentuado foram aqueles submetidos a esmagamento do nervo ciático, com ou sem infecção por *M. leprae*, independentemente do uso de CFZ. Os camundongos apresentaram melhora aos 14 dpi, exceto os grupos infectados e tratados com CFZ, que ainda apresentavam algum grau de comprometimento. Em 28 e 90 dpi todos os grupos demonstraram restauração completa da função motora. Nossos achados corroboram estudos que utilizaram esse teste em

um modelo murino de lesão neural por esmagamento (Dinh et al., 2009; Haidar et al., 2020; Wei et al., 2022) e sugerem, ainda, que o modelo de infecção intraneural por *M. leprae* tem potencial para futuros estudos sobre mecanismos iniciais de neuropatia na hanseníase.

Os achados da análise de nociceção à estimulação mecânica indicaram que, em 3 dpi, houve queda no limiar de retirada de pata de camundongos de todos os grupos, caracterizando uma sensibilidade acentuada no período pós-cirúrgico. Os camundongos apresentaram melhora gradual nos períodos subsequentes, com exceção do grupo infectado por *M. leprae*. Em 90 dpi, o grupo ML, seguido de ML/CSH, apresentaram limiares inferiores aos demais grupos experimentais, o que poderia caracterizar dor decorrente de processo inflamatório associado à infecção. É importante ressaltar que quando tratados com CFZ, os grupos ML\_cfz e ML/CSH\_cfz não tiveram a resposta nociceptiva alterada em comparação aos demais grupos, possivelmente devido ao caráter anti-inflamatório da droga.

Após os períodos experimentais, os nervos ciáticos foram avaliados quanto à presença das proteínas ADRP, HSL e MPZ, por meio de microscopia confocal. No início do experimento, a produção de ADRP foi aumentada nos grupos CSH, NaCl, SHAM e principalmente no grupo ML, que apresentou uma produção de ADRP superior a todos os grupos, tratados ou não tratados. Esse resultado confirma que o modelo experimental utilizado permite constatar *in vivo*, a ação precoce de *M. leprae* sobre o metabolismo lipídico de suas células-alvo, refletindo a tentativa do bacilo de induzir a produção e o acúmulo de corpúsculos lipídicos no ambiente intracelular, uma estratégia amplamente conhecida. Mietto et al. (2019), também relataram interferência na expressão do mRNA da perilipina em células infectadas por *M. leprae*, o que corrobora nossos achados (Mietto et al., 2019). Os níveis de ADRP não pareceram tão altos nos grupos tratados com CFZ.

No entanto, aos 28 dpi, a ação moduladora da CFZ sobre ADRP em células infectadas por *M. leprae* só pôde ser observada no grupo ML/CSH. O grupo submetido apenas à infecção apresentou maior nível de ADRP no camundongo tratado. Este resultado deve ser acompanhado de perto em futuras repetições do experimento, pois a análise de imunodeteção da proteína alvo foi realizada em apenas um camundongo até o momento, podendo haver interferência de algum tipo de comorbidade.

Em 28 dpi, a ação modulatória da CFZ no ADRP em células infectadas por *M. leprae* só pôde ser observada no grupo ML/CSH. O grupo submetido apenas à infecção apresentou níveis mais elevados de ADRP no camundongo tratado. Este resultado deve ser cuidadosamente monitorado nas próximas repetições do experimento, pois as análises de imunodeteção das proteínas-alvo foram realizadas em apenas um camundongo até o momento, o qual pode estar afetado por alguma comorbidade. Quando avaliada no último tempo experimental, a produção de ADRP apresentou redução estatisticamente significativa nos nervos dos camundongos tratados nos grupos ML e ML/CSH. No entanto, não é possível atribuir esse achado ao tratamento com CFZ, pois os animais não tratados também apresentaram regulação negativa de ADRP aos 90 dpi, sugerindo a ação do *M. leprae* principalmente em um estágio inicial da infecção.

A produção de HSL não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e não tratados aos 3 dpi. No entanto, após 28 dias de administração da droga, houve aumento de HSL nos grupos ML e ML/CSH. Degang et al. (2012), demonstraram que as gotículas lipídicas acumuladas pelo *M. leprae* diminuem significativamente após o tratamento com CFZ, reduzindo ADRP e aumentando HSL, o que corrobora nossos achados (Degang et al., 2012). A regulação dessas proteínas nos nervos de camundongos tratados demonstra a ação da droga em perturbar o ambiente favorável à produção e acúmulo de lipídios, o que beneficiaria a infecção e a sobrevivência intracelular do patógeno.

A produção de MPZ em nervos ciáticos infectados diminuiu em 90 dpi. Esse resultado corrobora achados nos quais o *M. leprae* é capaz de induzir a reprogramação das CTs para um fenótipo não mielinizante (Casaleno, 2019). No entanto, esse comportamento não se repete no grupo que sofreu os dois tipos de lesão. Em camundongos tratados com CFZ, os grupos ML e ML/CSH tendem a se recuperar, com aumento do MPZ aos 28 dpi, o que acreditamos estar relacionado ao caráter anti-inflamatório da CFZ, o que estaria contribuindo para a recuperação neural. Porém, com 90 dias de tratamento, esse efeito não persiste, sendo observada diminuição do MPZ em ambos os grupos. Tais alterações podem estar associadas a um possível déficit de remielinização nos nervos dos indivíduos tratados com CFZ.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

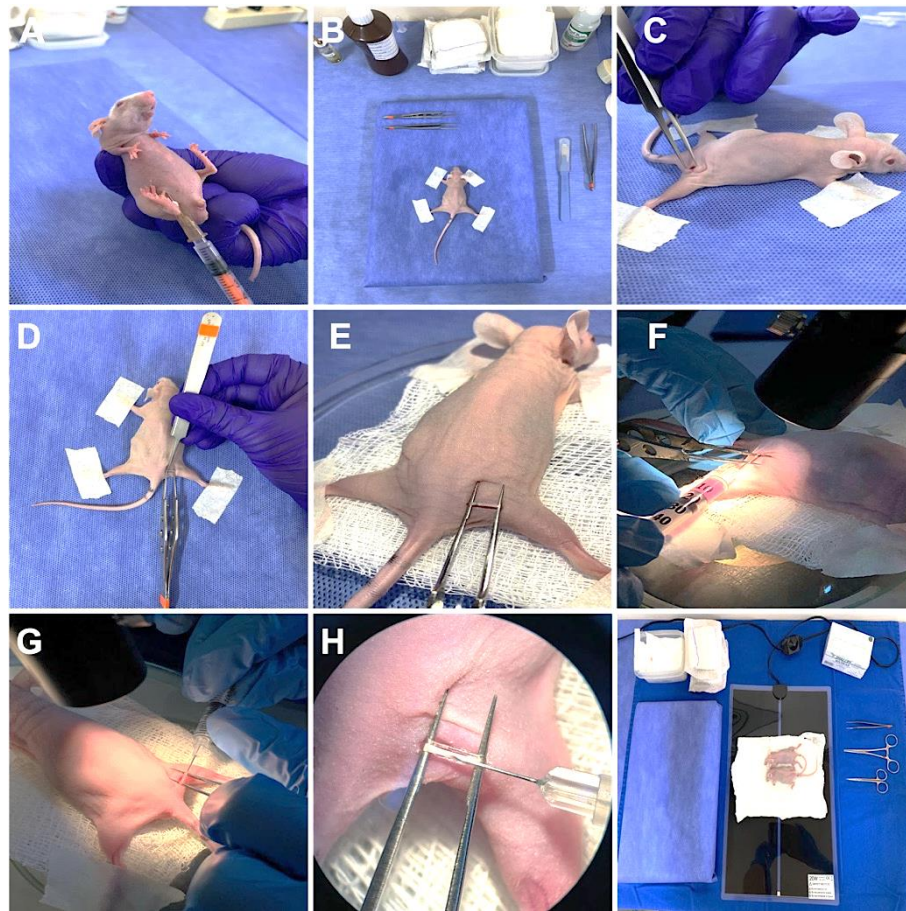
Byun YH, Lee MH, Kim SS, et al. Treadmill running promotes functional recovery and decreases brain-derived neurotrophic factor mRNA expression following sciatic crushed nerve injury in rats. *J Sports Med Phys Fitness*. 2005;45(2):222-228.

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

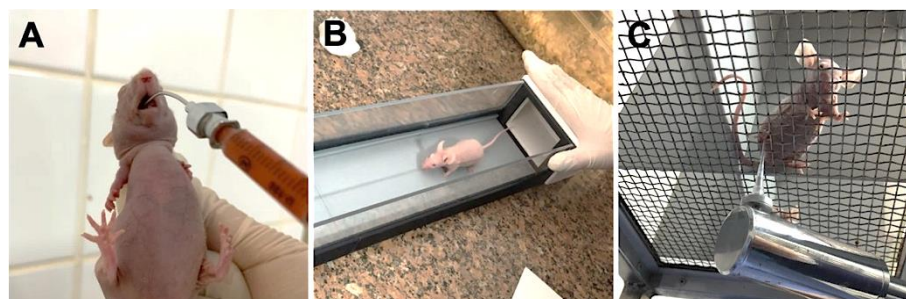
Haidar MK, Timur SS, Kazanci A, et al. Composite nanofibers incorporating alpha lipoic acid and atorvastatin provide neuroprotection after peripheral nerve injury in rats. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020; 153:1-13.

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

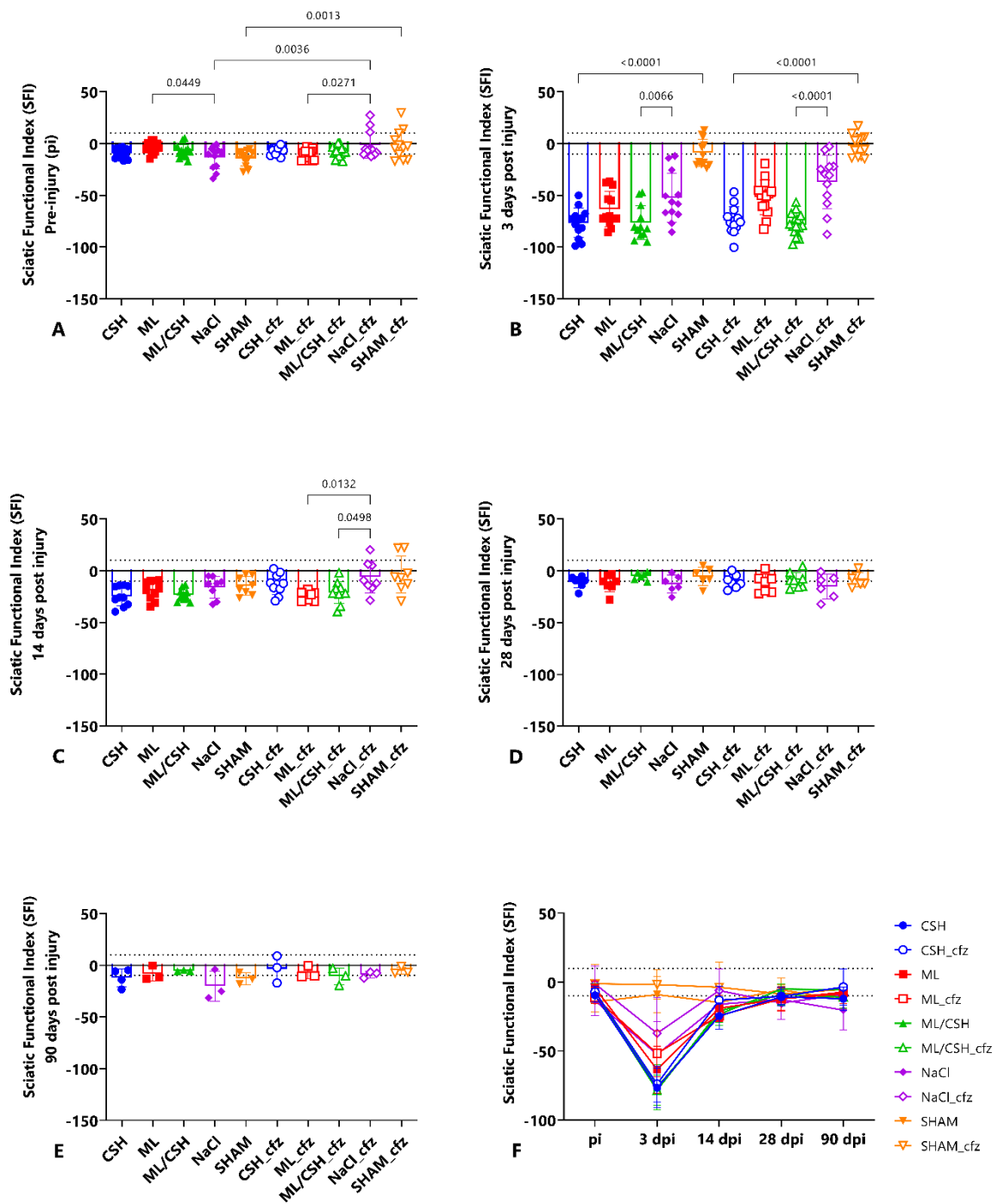
## FIGURAS



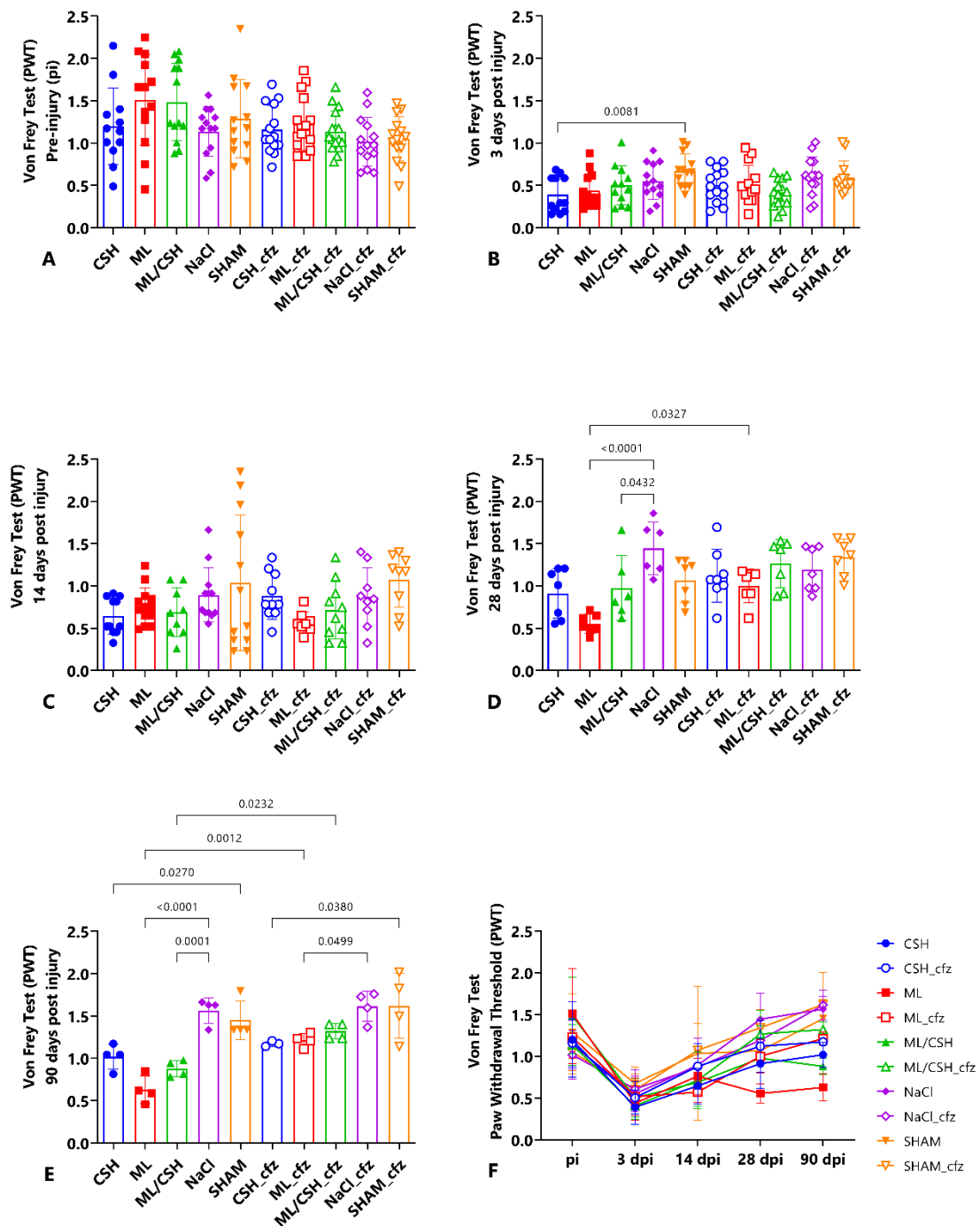
**Figura 1M. Experimentação Animal.** Etapas do procedimento cirúrgico realizado em camundongos nude. (A) Indução anestésica com cloridrato de xilazina (10 mg/kg, ip) e cloridrato de cetamina (100 mg/kg, ip). (B) Posicionamento para intervenções subsequentes. (C) Acesso cirúrgico ao nervo isquiático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



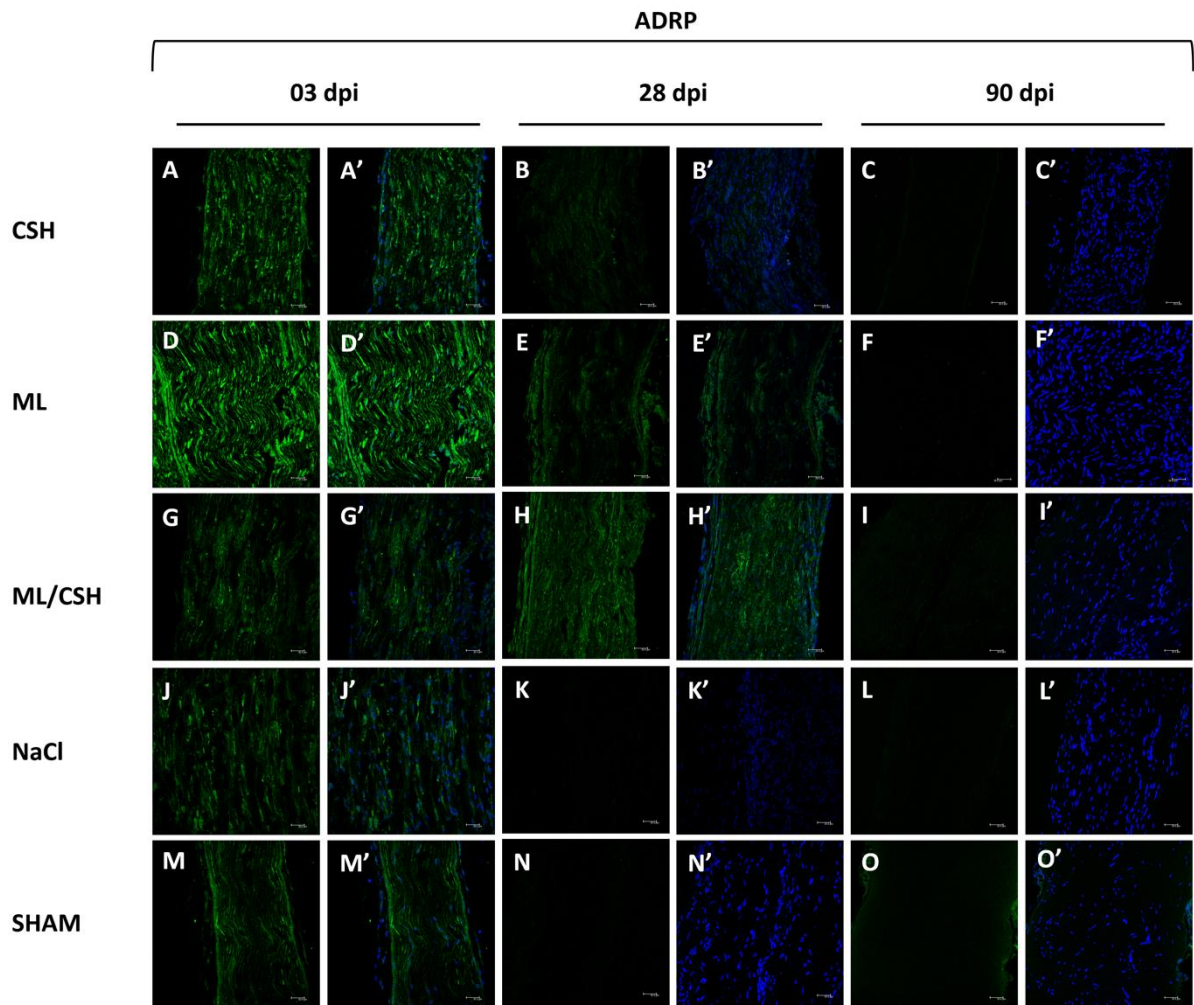
**Figura 2M. Experimentação Animal.** (A) Administração de clofazimina por gavagem. (B) Análise da função motora; camundongo nude em treinamento para caminhar na passarela. (C) Análise de nocicepção, via estimulação mecânica por analgesímetro eletrônico Von Frey



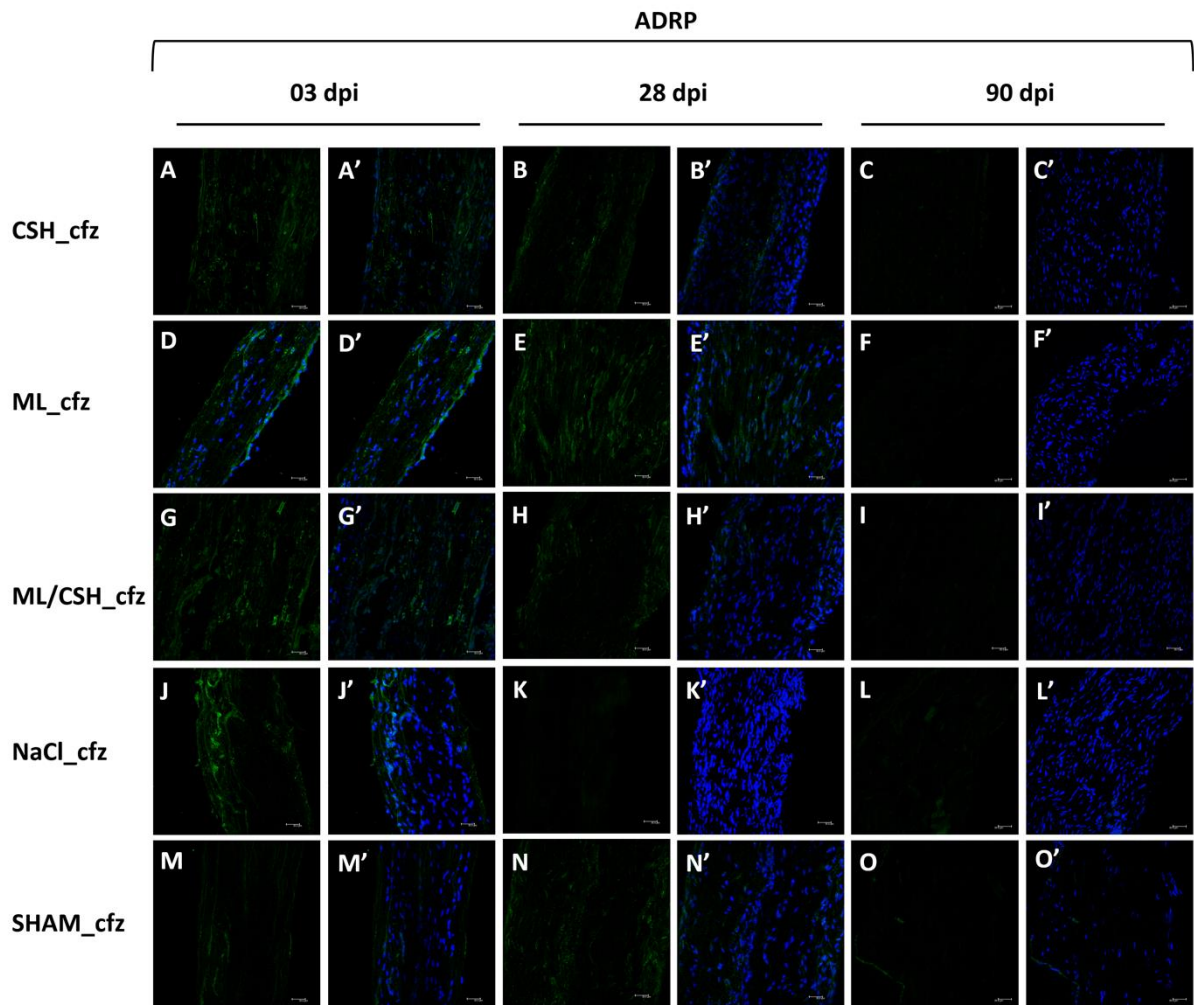
**Figura 3M. Avaliação da função motora em nervos isquiáticos de camundongos nude. Índice Funcional do Isquiático (SFI, Sciatic Functional Index). Períodos de análise: (A) pré-intervenção (pi), (B) 03, (C) 14, (D) 28 e (E) 90 dias pós-intervenção (dpi). (F) Valores agrupados. Grupos experimentais, não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH\_cfz); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML\_cfz); ML/CSH, ML/CSH\_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl\_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM\_cfz). Teste one-way ANOVA, com pós-teste Šidák. Valores de  $p < 0,05$  indicam significância estatística. Dados de três medições obtidas de em um a seis animais/grupo/período**



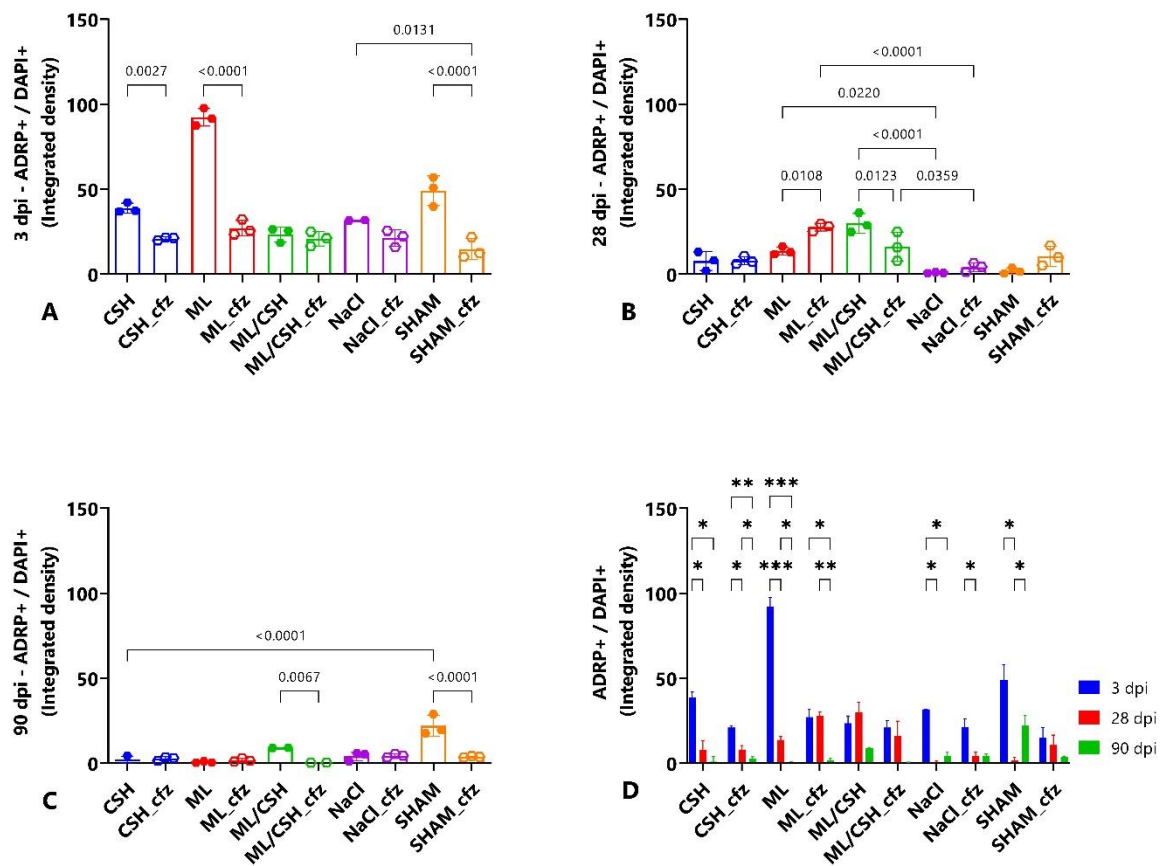
**Figura 4M.** Avaliação da resposta nociceptiva em nervos isquiáticos de camundongos nude. Limiar de retirada das patas (PWT, Paw Withdrawal Threshold). Períodos de análise: (A) pré-intervenção (pi), (B) 03, (C) 14, (D) 28 e (E) 90 dias pós-intervenção (dpi). (F) Valores agrupados. Grupos experimentais,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



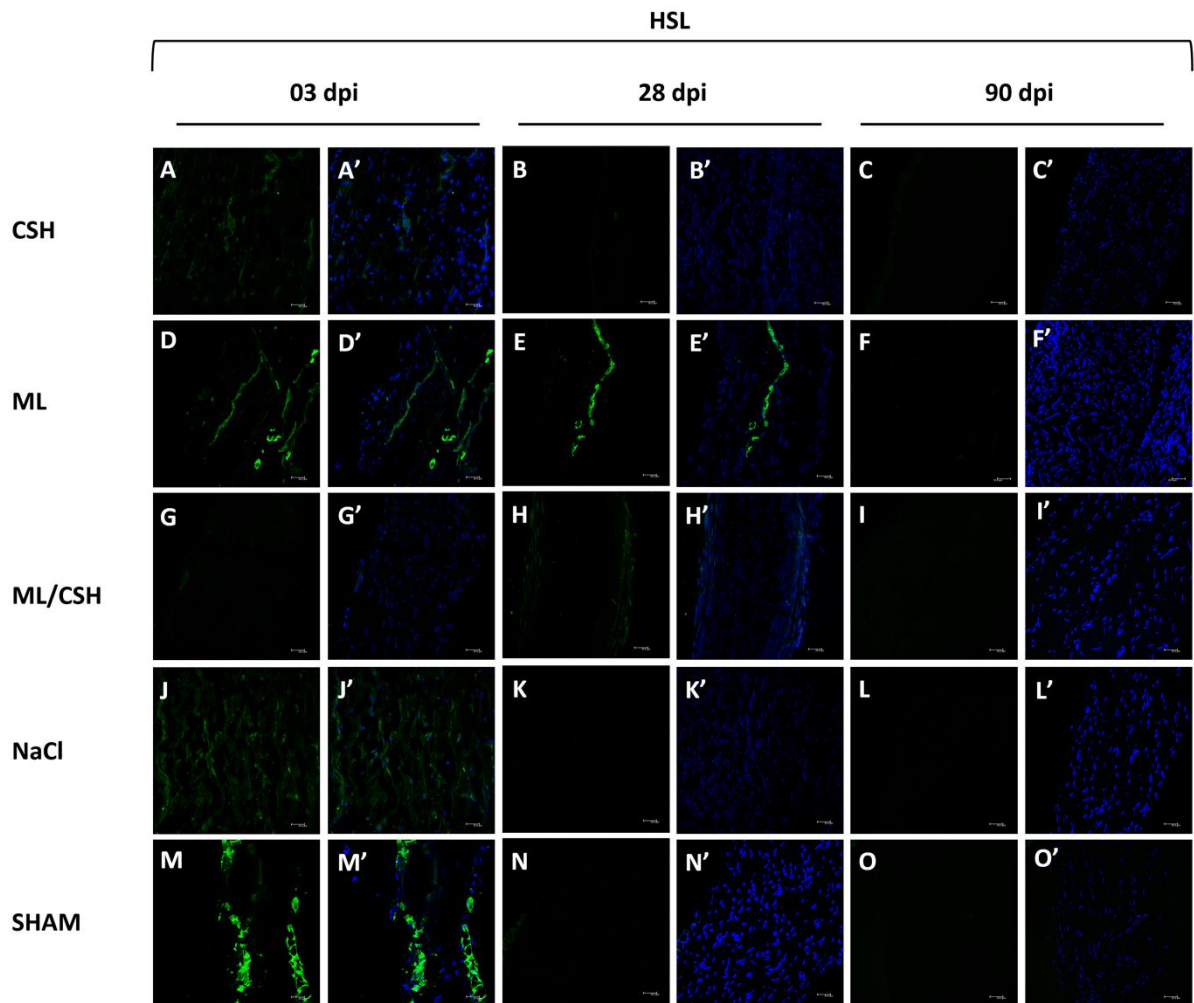
**Figura 5M. Imunodeteção de ADRP em nervos isquiáticos murinos.** (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl);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



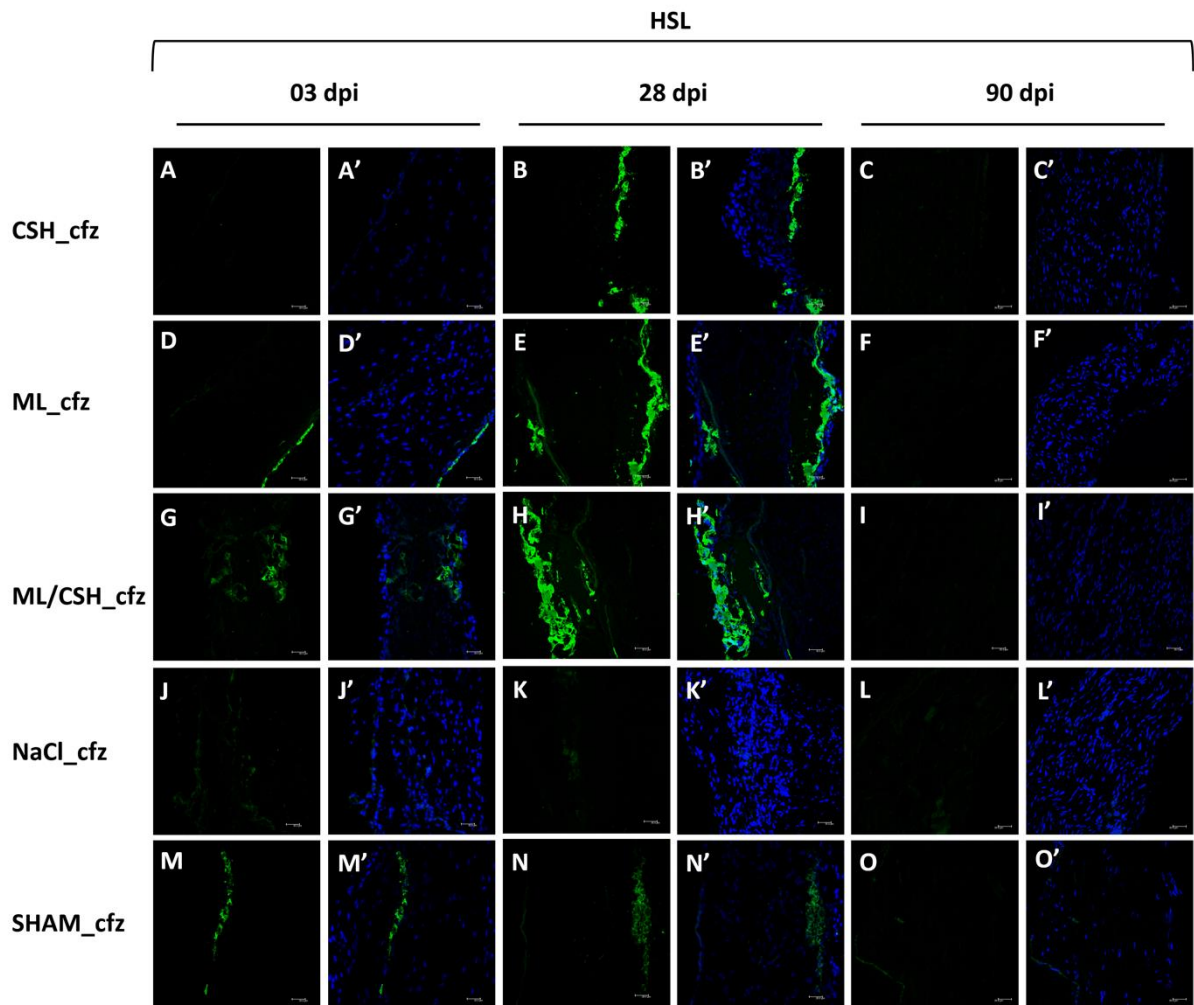
**Figura 6M. Imunodeteção de ADRP em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina.** (A-C') Lesão por esmagamento (CSH\_cfz); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML\_cfz); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH\_cfz); (J-L') Injeção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



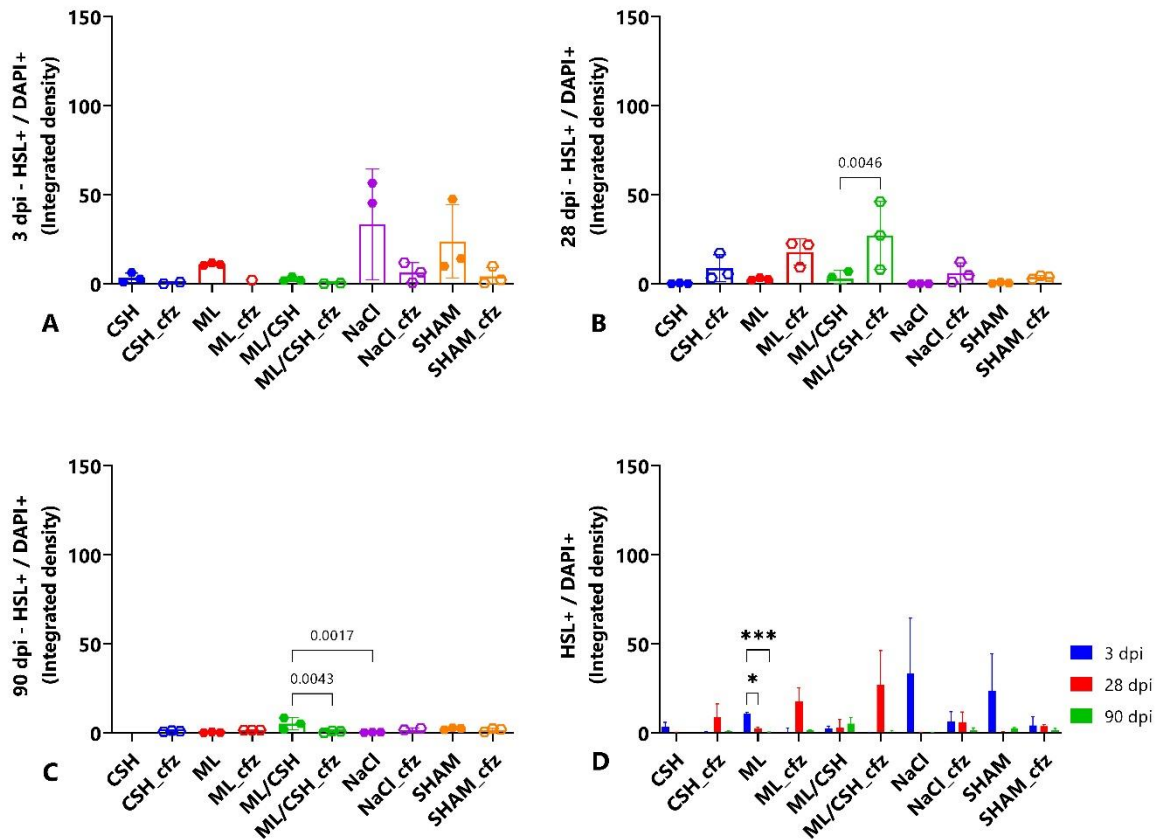
**Figura 7M. Avaliação de ADRP em nervos isquiáticos murinos.** Densidade de fluorescência de ADRP, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), em grupos não tratados e tratados com clofazimina (CFZ): Lesão por esmagamento (CSH, CSH\_cfz); Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML, ML\_cfz); ML/CSH, ML/CSH\_cfz; Cloreto de sódio intraneural (NaCl, NaCl\_cfz); Cirurgia simulada (SHAM, SHAM\_cfz). (D) Comparações intragrupos. Teste ANOVA, com pós-teste Šídák (A, B, C) ou Tukey (D). Valores de  $p < 0,05$  (\*) indicam significância estatística. Dados de três campos microscópicos de um animal/grupo/período



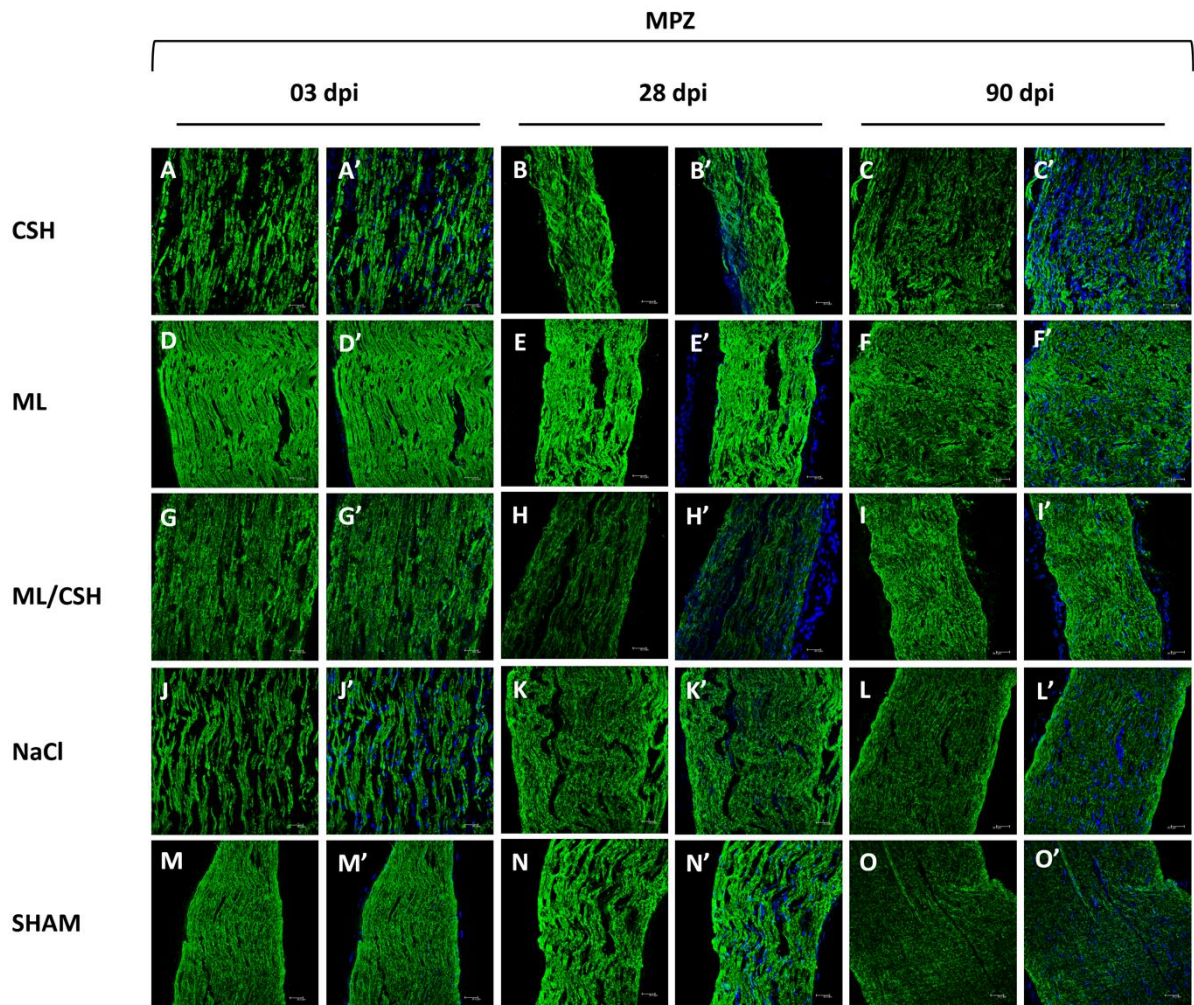
**Figura 8M. Imunodeteção de HSL em nervos isquiáticos murinos.** (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl);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



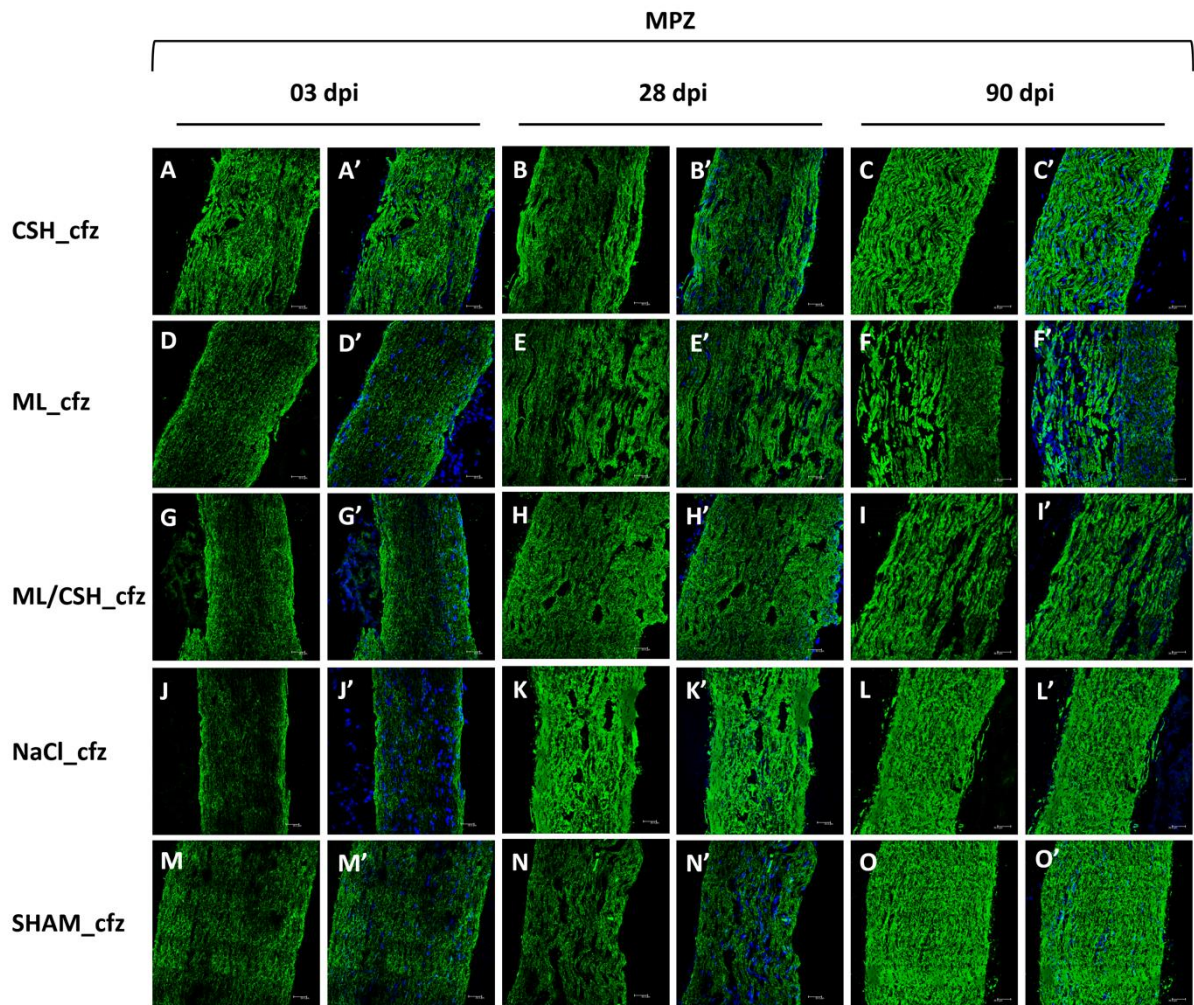
**Figura 9M. Imunodeteção de HSL em nervos isquiáticos murinos tratados com clofazimina.** (A-C') Lesão por esmagamento (CSH\_cfz); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML\_cfz); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH\_cfz); (J-L') Injeção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



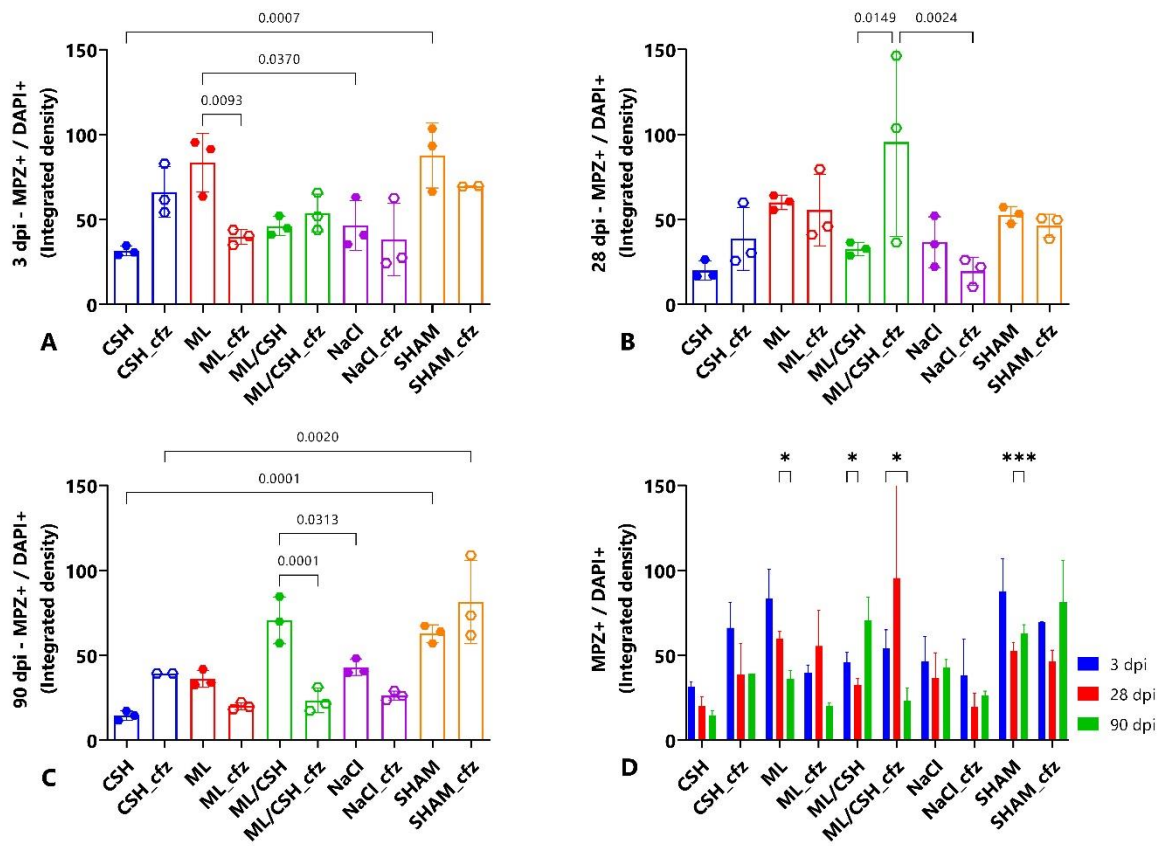
**Figura 10M.** Avaliação de HSL em nervos isquiáticos murinos. Densidade de fluorescência de HSL, normalizada pelo respectivo número de núcleos DAPI+. Avaliação conforme períodos experimentais de, (A) 03, (B) 28 e (C) 90 dias pós-intervenção (dpi), em grupos não tratados e tratados com clofazimina (CFZ):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



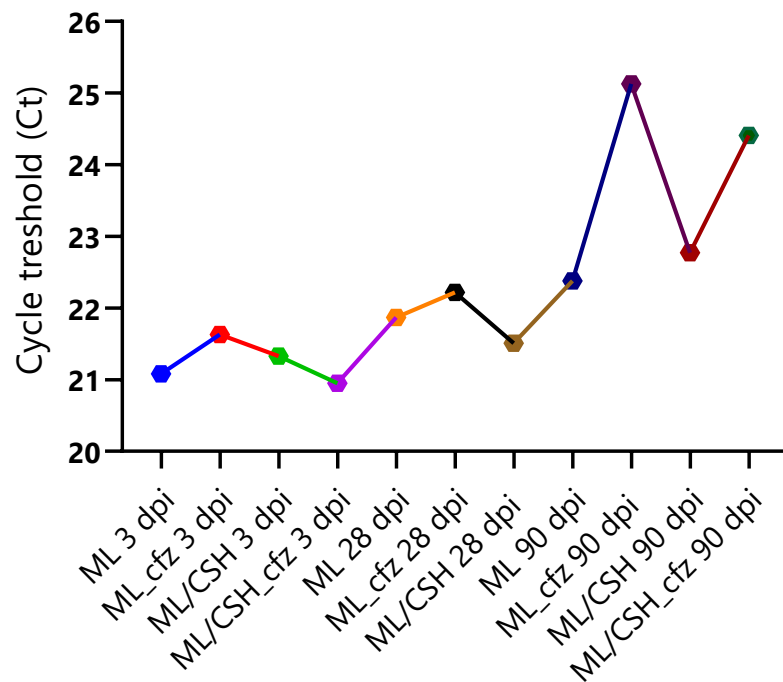
**Figura 11M. Imunodeteção de MPZ em nervos isquiáticos murinos.** (A-C') Lesão por esmagamento (CSH); (D-F') Infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML); (G-I') Lesão por esmagamento e infecção intraneural por *Mycobacterium leprae* (ML/CSH); (J-L') Injeção intraneural de cloreto de sódio (NaCl);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



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



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



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

## **CAPÍTULO IV – CONCLUSÃO**

---

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos chegar às seguintes conclusões:

- A avaliação da função motora em camundongos *nude*, por meio do teste de marcha, demonstrou sucesso na indução de lesão neural por infecção, assemelhando-se ao modelo de esmagamento, que já é amplamente utilizado em estudos de neuropatia periférica.

- Após 28 dias, a infecção por *M. leprae* resultou em aumento da sensibilidade nociceptiva nos animais testados, o que persistiu por 90 dias. Esse efeito pode ser atribuído a um processo inflamatório decorrente da infecção.

- Através da técnica de imunofluorescência, determinamos a expressão das proteínas lipídicas ADRP e HSL nos nervos isquiáticos dos camundongos, revelando o efeito precoce de *M. leprae* nas células hospedeiras. A infecção aumentou a expressão de ADRP, provavelmente para criar um ambiente rico em lipídios favorável à sobrevivência bacteriana. No entanto, a CFZ atuou contra esse mecanismo, regulando positivamente HSL, que é responsável pela degradação lipídica.

- Em um período mais longo de tratamento com CFZ, observou-se uma regulação negativa da proteína de mielina MPZ, o que pode estar associado a um possível déficit de remielinização nos nervos dos indivíduos tratados com o fármaco.

O modelo experimental apresentado aqui tem o potencial de contribuir significativamente para a compreensão dos mecanismos precoces envolvidos na neuropatia hansênica, além de ser uma ferramenta promissora para a pesquisa de novas drogas. O efeito negativo da CFZ na regulação de MPZ pode sugerir uma interferência na remielinização periférica e, portanto, deve ser alvo de investigações futuras.

**ANEXOS**

---

## ANEXO I

## Carta de Aprovação CEUA



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

## Memorando

**Número de Referência:** ILSL001/20  
**Interessado:** Patrícia Sammarco Rosa  
**Assunto:** Certificado CEUA-ILSL

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da clofazimina sobre a mielinização de nervos isquiáticos em modelo murino de lesão neural traumática e infecção por *M. leprae*", registrada com o nº ILSL001/20, sob a responsabilidade de Graziela Aparecida Silva Gonçalves, 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 virtual pela plataforma Microsoft Teams de 15/07/2020.

Finalidade	( ) Ensino	( x ) Pesquisa Científica
Vigência de autorização		Março/2022
Espécie/ linhagem/raça		Camundongos Nude Atímicos
Nº de animais		72
Peso/Idade		30g
Sexo		Machos e fêmeas
Origem		Biotério ILSL

Bauru, 28 de novembro de 2020.

PATRICIA SAMMARCO ROSA  
Coordenador da Comissão  
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA / DIVISÃO DE PESQUISA E ENSINO

Classif. documental	006.01.10.001
---------------------	---------------



Assinado com senha por PATRICIA SAMMARCO ROSA - 28/11/20 às 13:33:01.  
Documento Nº: 10990675-7594 - consulta à autenticidade em  
<https://www.documentos.spsempapel.sp.gov.br/sigaex/publico/app/autenticar?n=10990675-7594>



SESMEM202060944A

SIGA